

Figure 143

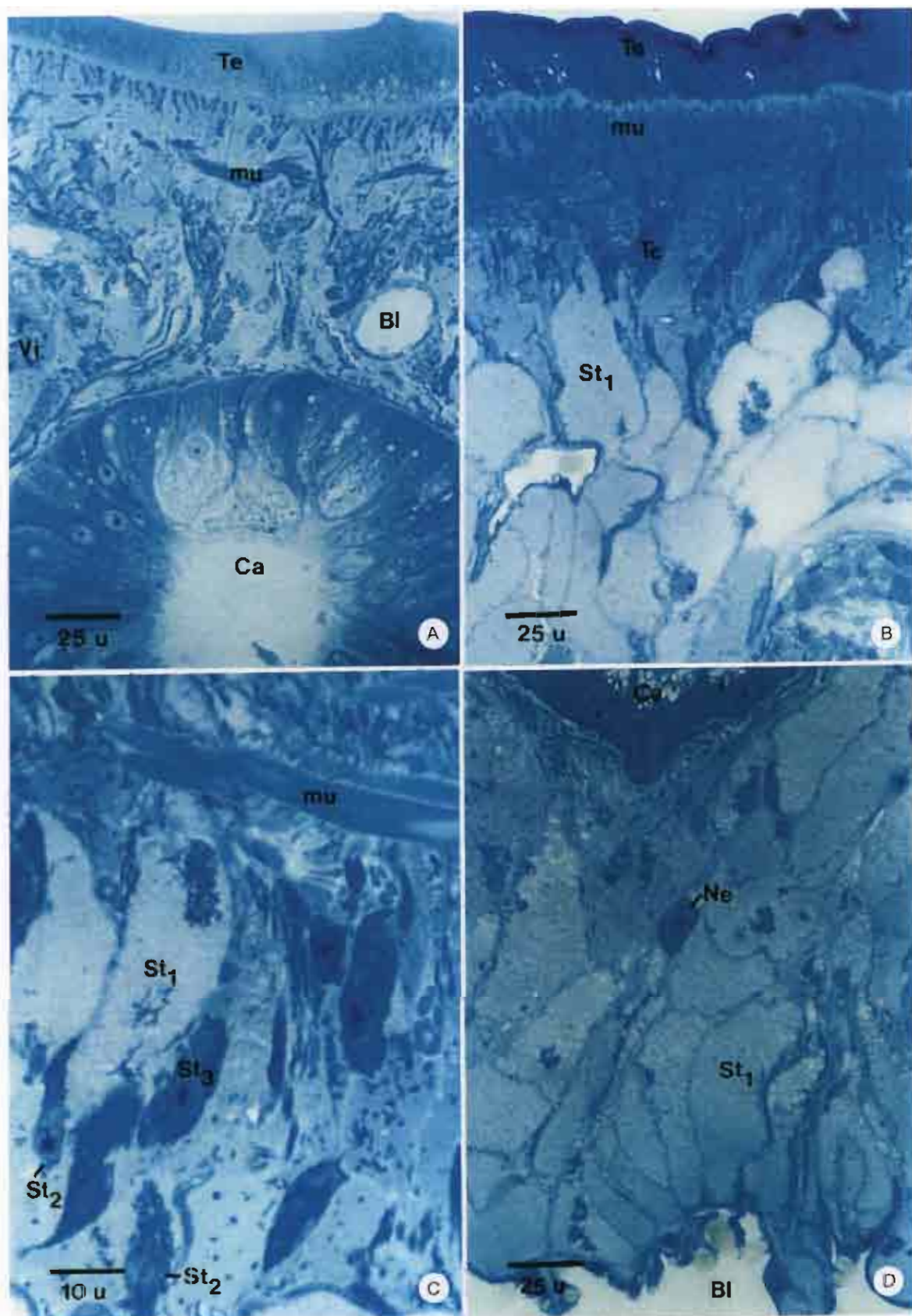


Figure 144

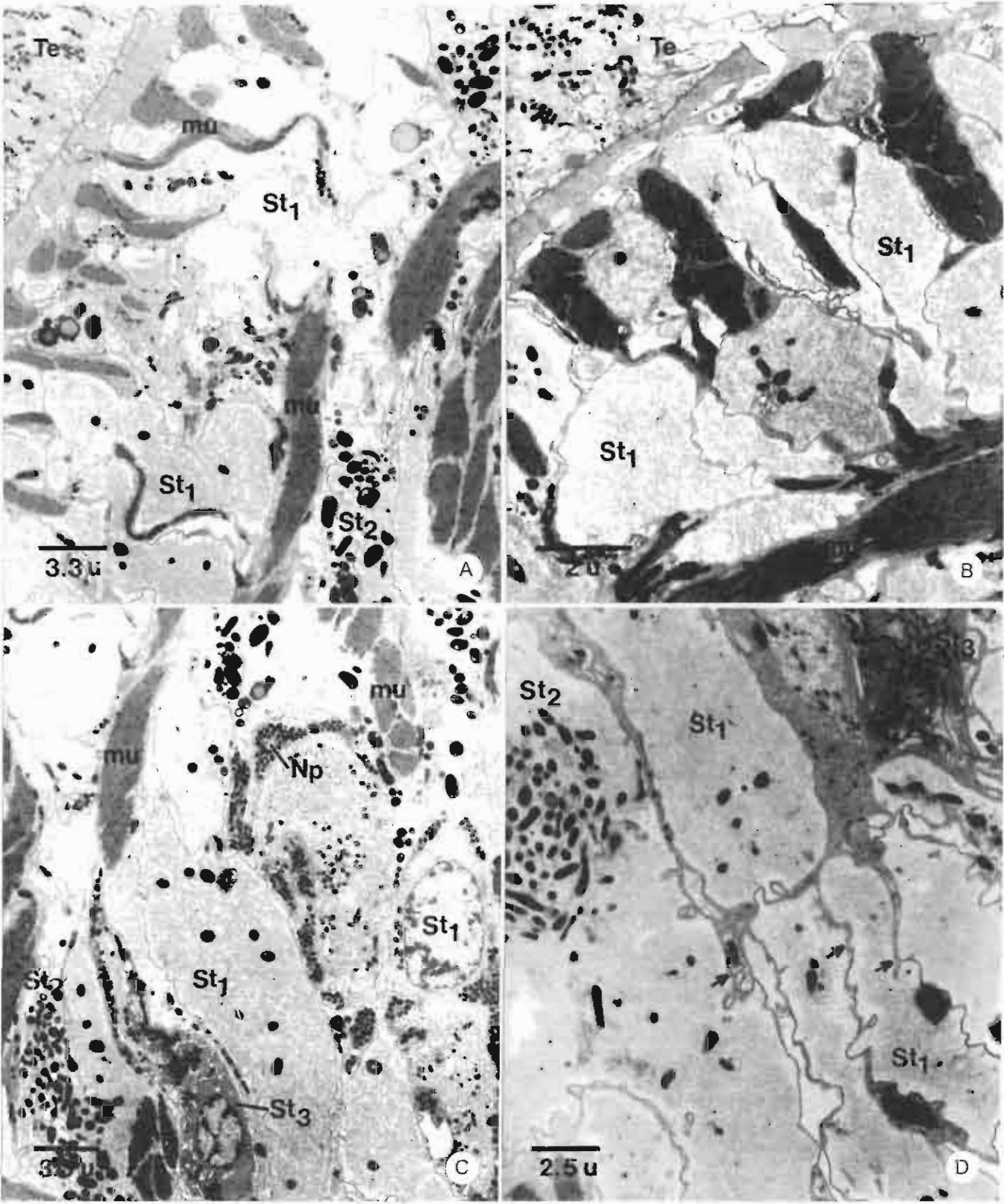


Figure 145

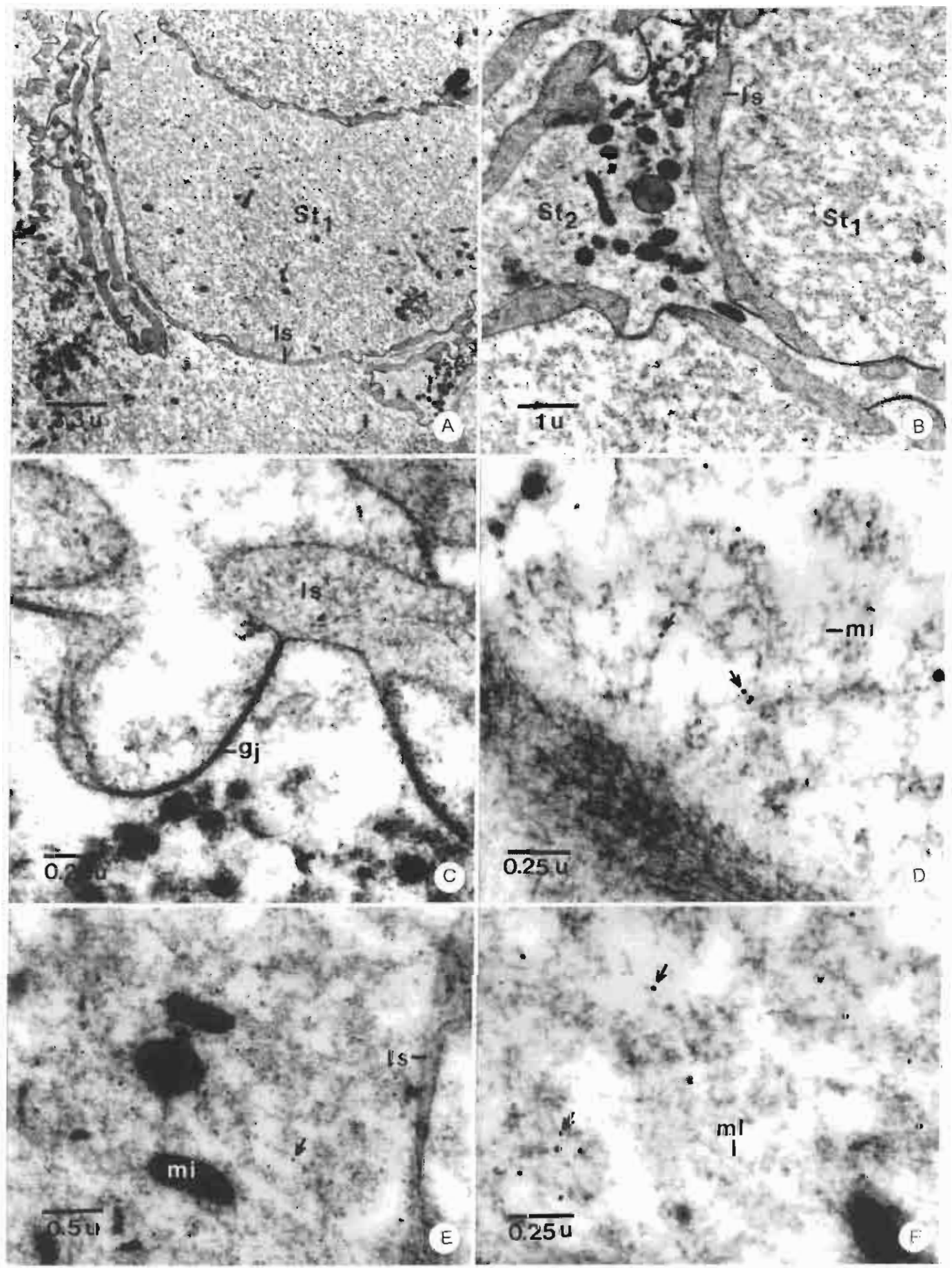


Figure 146

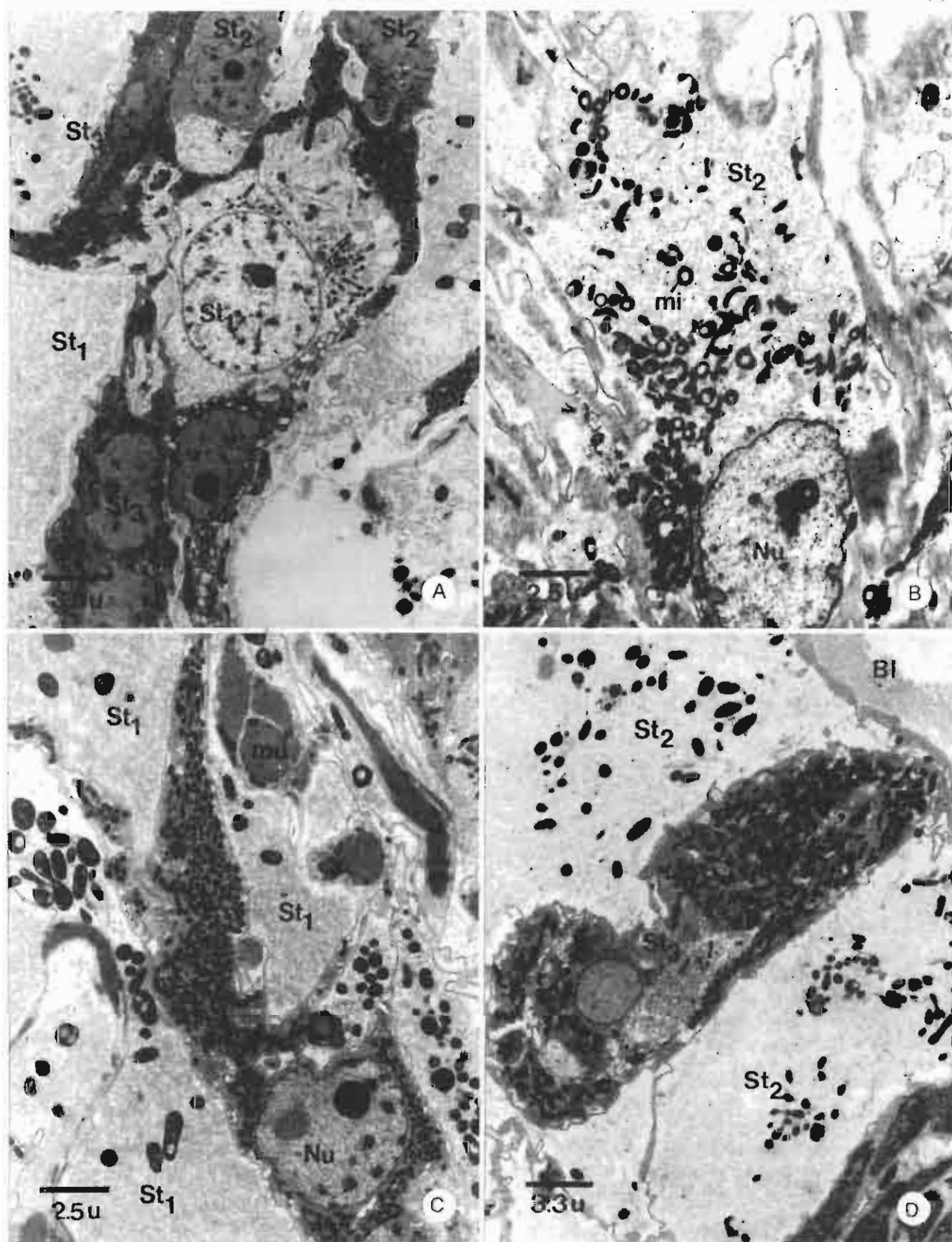


Figure 147

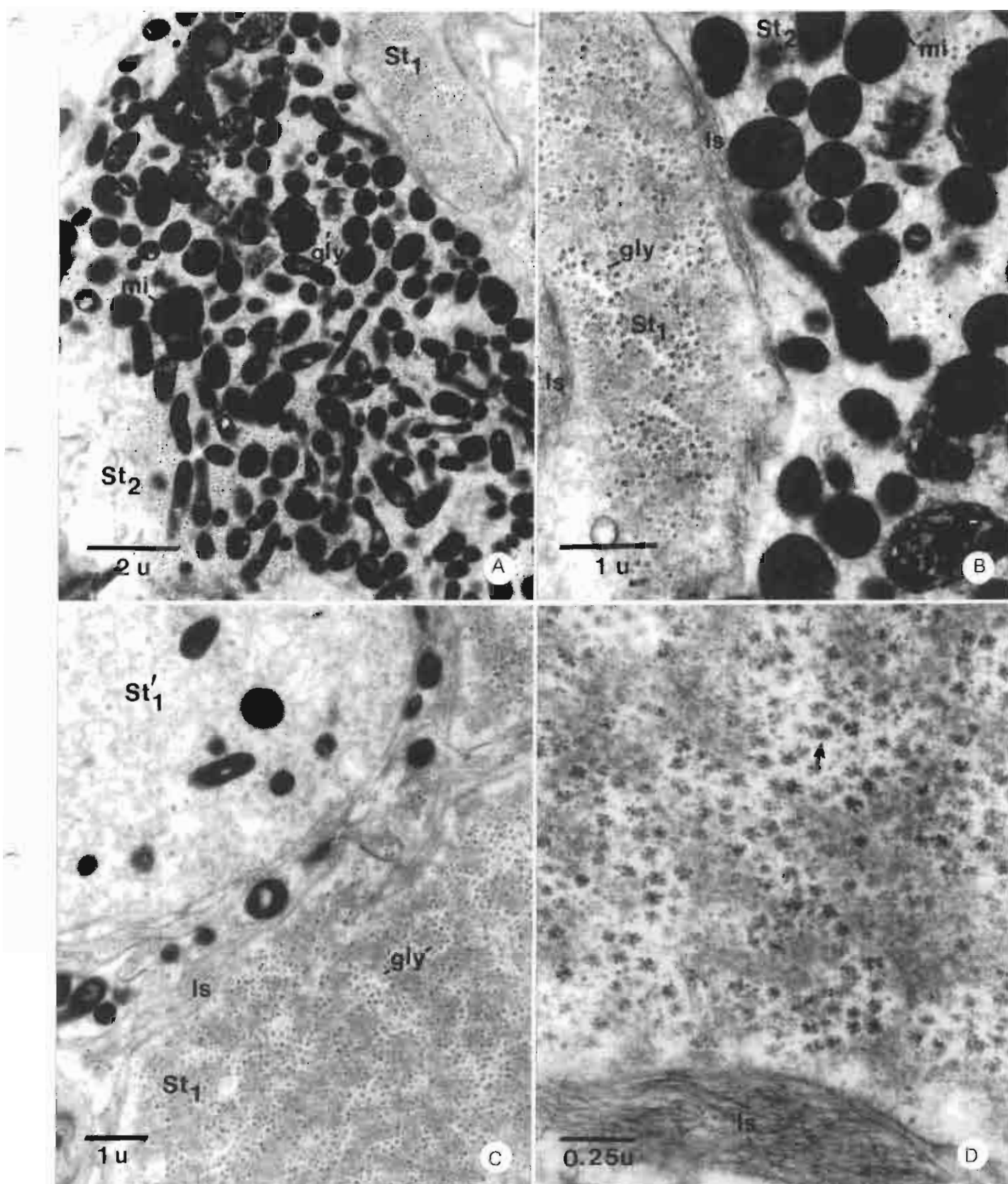


Figure 148

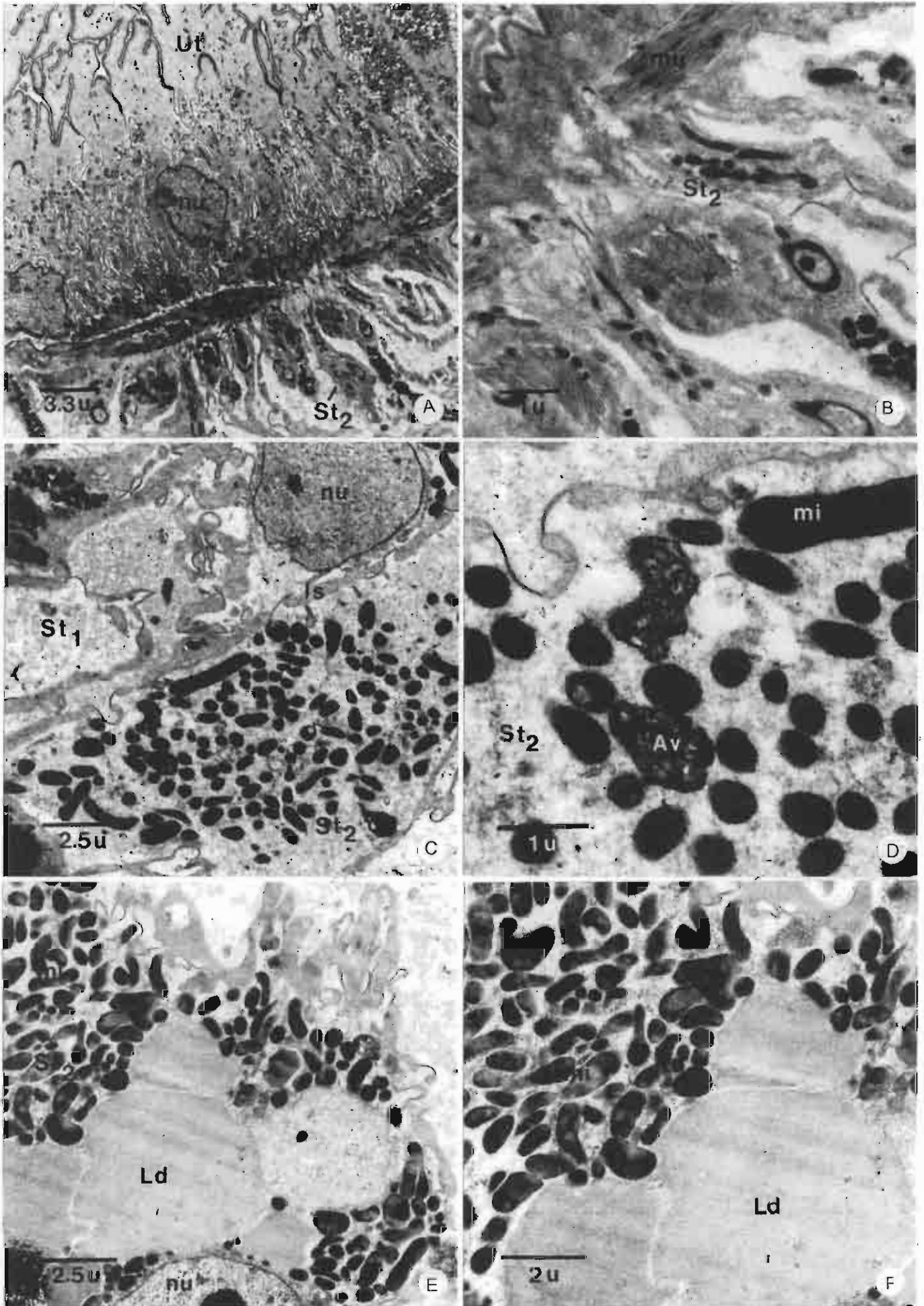


Figure 149

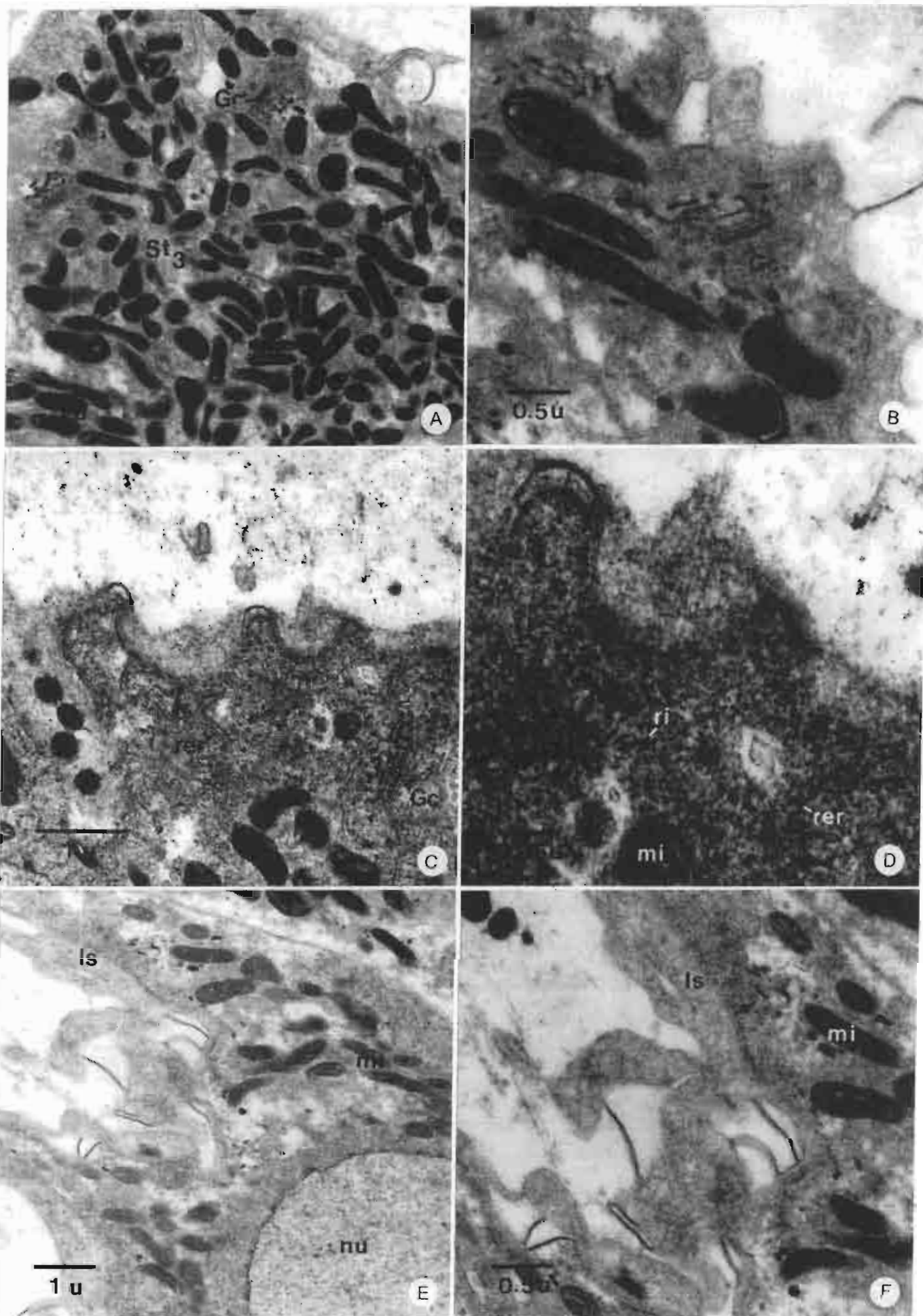
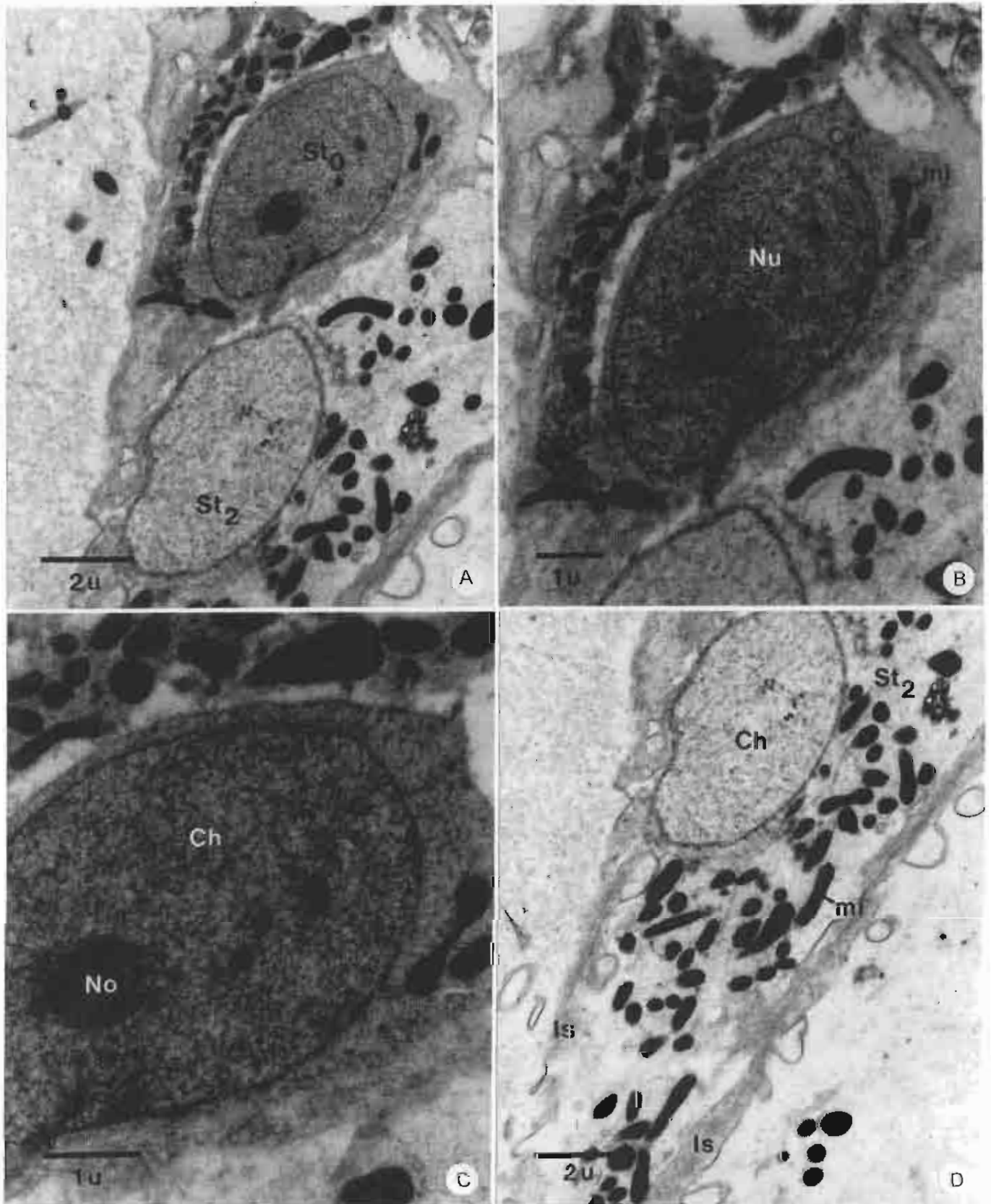


Figure 150



2.3.6 การศึกษาโครงสร้างระบบสืบพันธุ์เพศเมียและกระบวนการสร้างไข่และเปลือกไข่

พยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* มีการสืบพันธุ์ 2 ขั้นตอนคือ การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ซึ่งเกิดขึ้นในขณะที่ตัวเต็มวัยอาศัยอยู่ใน definitive host และการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งเกิดขึ้นใน intermediate host สำหรับการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศนั้นต้องอาศัยอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียซึ่งมีอยู่พร้อมกันภายในพยาธิแต่ละตัว แต่การผสมพันธุ์มักจะเกิดข้ามตัว (cross fertilization) อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไข่ของพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola* ที่สำคัญแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ovary และ oviduct, vitelline gland และ ducts และ Mehlis' gland complex ซึ่งประกอบด้วยอวัยวะหรือโครงสร้างต่าง ๆ ดังนี้คือ Mehlis' gland, ootype, oviduct, vitelline reservoir และ median vitelline duct, Laurer's canal และ proximal part ของ uterus ซึ่งความสัมพันธ์ของอวัยวะเหล่านี้แสดงไว้ในรูปที่ 151 การสร้างเปลือกไข่เป็นกระบวนการสำคัญที่จะทำให้ได้ไข่ที่มีคุณภาพหรือขาดคุณภาพ โดยเริ่มจากเซลล์ไข่ (oocyte) และ vitelline cells จำนวนหนึ่งที่ถูกกลืนผ่านท่อ oviduct และท่อ vitelline ducts สู่อotype ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ถึงของ Mehlis' gland cells มาเปิดเพื่อปล่อยแกรนูลไปกระตุ้น vitelline cells ให้ปล่อย eggshell granules ออกมาหุ้มรอบเซลล์ไข่และ vitelline cells ดังกล่าวแล้วเพื่อให้กลายเป็นเปลือกไข่ที่แข็งแรง ซึ่งกระบวนการนี้ดำเนินไปจากตอนที่ไข่อยู่ใน ootype จนถึงส่วนต้นของ uterus ดังนั้นวิธีป้องกันการแพร่ระบาดของโรคพยาธิชนิดนี้ทางหนึ่งก็คือการยับยั้งกระบวนการสร้างไข่และเปลือกไข่ซึ่งจะตัดขั้นตอนของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของพยาธิทำให้วงจรชีวิตของพยาธิถูกตัดขาด แต่อย่างไรก็ตาม กลไกการสร้างไข่และเปลือกไข่ของพยาธิชนิดนี้ยังไม่ได้มีการศึกษาในรายละเอียด ดังนั้นการศึกษาในส่วนนี้จึงมุ่งเน้นที่กระบวนการสร้างไข่และเปลือกไข่โดยได้ทำการศึกษาโครงสร้างของอวัยวะที่เกี่ยวข้องด้วย

รังไข่ (Ovary)

รังไข่ (ovary) เป็นอวัยวะขนาดเล็กที่ประกอบด้วยท่อซึ่งแตกแขนงออกจำนวนมาก โดยมีลักษณะเป็น compound tubular gland รังไข่วางตัวอยู่ระหว่าง uteris และ testis ทางด้านซ้ายของ Mehlis' gland และมีท่อนำไข่ (oviduct) แทรกตัวเข้าไปภายใน Mehlis' gland (รูปที่ 152A) ซึ่งต่อมาจะรวมกับ Laurer's canal และ vitelline duct เป็น ootype ภายในท่อของรังไข่อัดแน่นไปด้วยเซลล์ไข่ที่สมบูรณ์แล้วและเซลล์ไข่ที่กำลังพัฒนาจำนวนมากซึ่งสามารถจำแนกได้เป็น 5 ชนิด คือ oogonia, oocyte stages 1, 2, 3 และ 4 (รูปที่ 152B-D)

Oogonia (Og) เป็นเซลล์ขนาดเล็กย้อมติดสีเข้มยึดติดอยู่กับผนังของท่อ มีนิวเคลียสขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์ (รูปที่ 152B-D) ภายในประกอบด้วย euchromatin เกือบทั้งหมด มี ก้อน heterochromatin กระจายอยู่ประปราย

Oocyte 1 (Oc_1) เป็นเซลล์ขนาดเล็กยึดติดอยู่กับ basement membrane ของท่อ ไชโตพลาสซึมมีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับนิวเคลียส ออแกเนลลภายในไชโตพลาสซึมประกอบด้วยไมโทคอนเดรียจำนวนไม่มากนักซึ่งกระจายตัวอยู่ห่าง ๆ มีไรโบโซมอิสระอยู่จำนวนมากและกระจายอยู่ทั่วทั้งไชโตพลาสซึม นิวเคลียสประกอบด้วย euchromatin เป็นส่วนใหญ่ มีก้อน heterochromatin ขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วไป นอกจากนี้บางเซลล์ยังพบ synaptonemal complex ซึ่งเป็นสัญลักษณ์ของการแบ่งเซลล์แบบ meiosis ในขั้น zygotene แสดงว่าเซลล์ในระยะนี้มีการแบ่งตัวให้เซลล์ระยะอื่น ๆ ต่อไป (รูปที่ 153A)

Oocyte 2 (Oc_2) เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ Oc_1 และเริ่มแยกตัวออกจาก basement membrane และเคลื่อนเข้าสู่ส่วนกลางของท่อรังไข่ ไชโตพลาสซึมมีปริมาณมากขึ้นและมีไมโทคอนเดรียจำนวนมาก นิวเคลียสมีนิวคลีโอลัสขนาดใหญ่และบรรจุด้วย euchromatin เกือบทั้งหมด พบก้อน heterochromatin ขนาดเล็กกระจายอยู่ประปรายคล้ายเซลล์ Oc_1 แต่มีปริมาณน้อยกว่า (รูปที่ 153B)

Oocyte 3 (Oc_3) ในระยะนี้เซลล์แยกตัวออกจาก basement membrane มากขึ้น จนเคลื่อนออกไปเกือบถึงส่วนกลางของท่อ และไชโตพลาสซึมมีปริมาตรมากขึ้นทำให้เซลล์มีขนาดใหญ่กว่า Oc_2 มาก และมีไมโทคอนเดรียจำนวนมากอัดอยู่ในทุกส่วนของไชโตพลาสซึม นอกจากนั้นยังพบ cortical granules จำนวนมากกระจายอยู่บริเวณขอบนอกของไชโตพลาสซึม และ cortical granules จำนวนหนึ่งถูกกล้ำเลียงออกไปอยู่ชิดกับ cell membrane นิวคลีโอลัสภายในนิวเคลียสมีขนาดเล็กลงหรืออาจหายไป chromatin ยังคงเป็น euchromatin เกือบทั้งหมด (รูปที่ 153C)

Oocyte 4 (Oc_4) เป็นเซลล์ในระยะสมบูรณ์และพบในส่วนกลางของท่อซึ่งพร้อมที่จะถูกกล้ำเลียงผ่านไปตามท่อ นำไข่เข้าสู่ท่อ ootype ต่อไป ไชโตพลาสซึมของเซลล์ระยะนี้บรรจุไมโทคอนเดรียจำนวนมาก และ cortical granules ส่วนใหญ่ถูกกล้ำเลียงไปอยู่ชิดกับ cell membrane นิวเคลียสประกอบด้วย euchromatin เป็นส่วนใหญ่ (รูปที่ 153D)

รูปที่ 151 A) ภาพวาดแสดงอวัยวะภายในของพยาธิตัวแบน และพยาธิใน class Trematoda

B) ภาพวาดแสดงความสัมพันธ์ของอวัยวะของระบบสืบพันธุ์ในพยาธิตัวแบน และพยาธิใน Class Trematoda

รูปที่ 152 A) ภาพส่วนหัวของพยาธิระยะตัวเต็มวัยย้อมด้วยสี carmine แสดงตำแหน่งของ oral sucker (Os), seminal vesicle (Sv), ventral sucker (Vs), uterus (Ut), ovary (Ov), oviduct (Od), Mehlis' gland (Mg), vitelline gland (Vg), vitelline duct (Vd), vitelline reservoir (Vr), testis (Tc) และ caecum

B-D) ภาพ semithin sections ย้อมด้วย methylene blue แสดงท่อ ovary (Ov) ภายในมี oogonia (Og) และ oocyte (Oc) อัดแน่น ภาพกำลังขยายสูง (C, D) แสดงให้เห็นเซลล์ oogonia (Og) และ oocyte (Oc) ระยะต่างๆ ซึ่งแบ่งได้ 4 ระยะ คือ oocyte 1 (Oc1), oocyte 2 (Oc2), oocyte 3 (Oc3) และ oocyte 4 (Oc4); Bl – bladder, Pc – parenchymal cells, Nu – nucleus, No – nucleolus

รูปที่ 153 A) ภาพ TEM แสดงเซลล์ oocyte 1 ซึ่งเป็นเซลล์ขนาดเล็กยึดติดกับ basement membrane (Bm) ไซโตพลาสซึมมีไมโทคอนเดรีย (Mi) จำนวนน้อย นิวเคลียส (Nu) ประกอบด้วย euchromatin เป็นส่วนใหญ่ และมีก้อน heterochromatin และ synaptonemal complex (Sy) กระจายอยู่ทั่วไป Mu – muscle

B) ภาพ TEM แสดงเซลล์ oocyte 2 เซลล์ระยะนี้แยกตัวออกจาก basement membrane และเริ่มเคลื่อนตัวเข้าส่วนกลางของท่อ นิวเคลียสประกอบด้วย euchromatin เกือบทั้งหมด มีก้อน heterochromatin ขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วไป นิวคลีโอลัส (No) มีขนาดใหญ่ ไซโตพลาสซึมมีปริมาณมากขึ้น ไมโทคอนเดรีย (Mi) ก็มีจำนวนมากขึ้นด้วย

C) ภาพ TEM แสดงเซลล์ oocyte 3 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ นิวเคลียส (Nu) ประกอบด้วย euchromatin เป็นส่วนใหญ่ มีก้อน heterochromatin เล็ก ๆ กระจายอยู่ทั่วไป ไซโตพลาสซึมมีไมโทคอนเดรียจำนวนมากและมีการสร้าง cortical granules (Gr) สะสมอยู่ภายใน

D) ภาพ TEM ของ oocyte 4 ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ นิวเคลียส (Nu) ประกอบด้วย euchromatin เป็นส่วนใหญ่ มีก้อน heterochromatin เล็ก ๆ กระจายอยู่ทั่วไป ไซโตพลาสซึมมีไมโทคอนเดรียจำนวนมากและ cortical granules (Gr) ถูกทำลายไปสะสมอยู่ใต้เยื่อหุ้มเซลล์

Figure 151

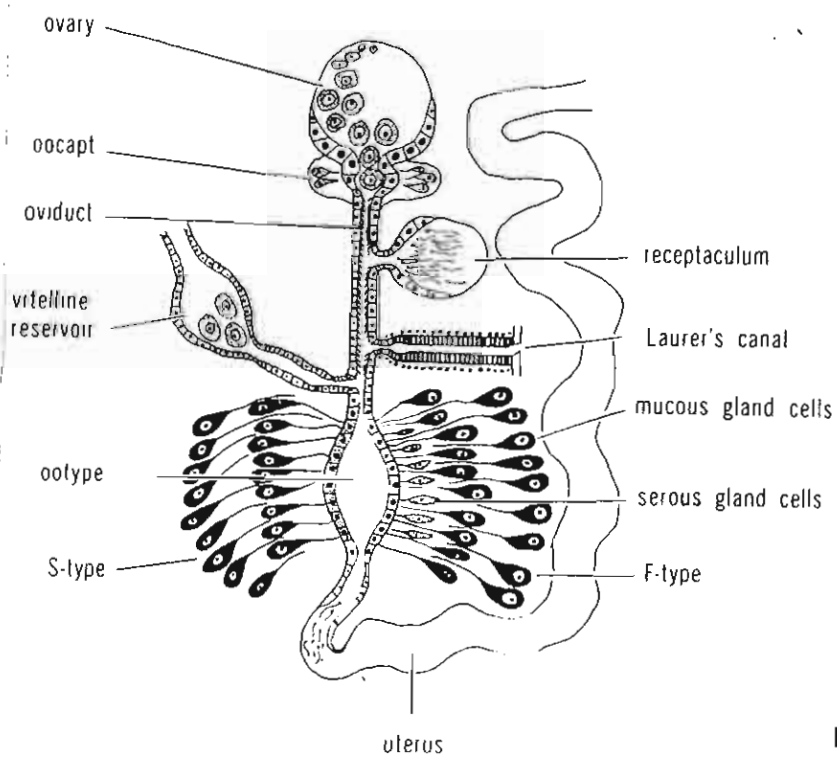
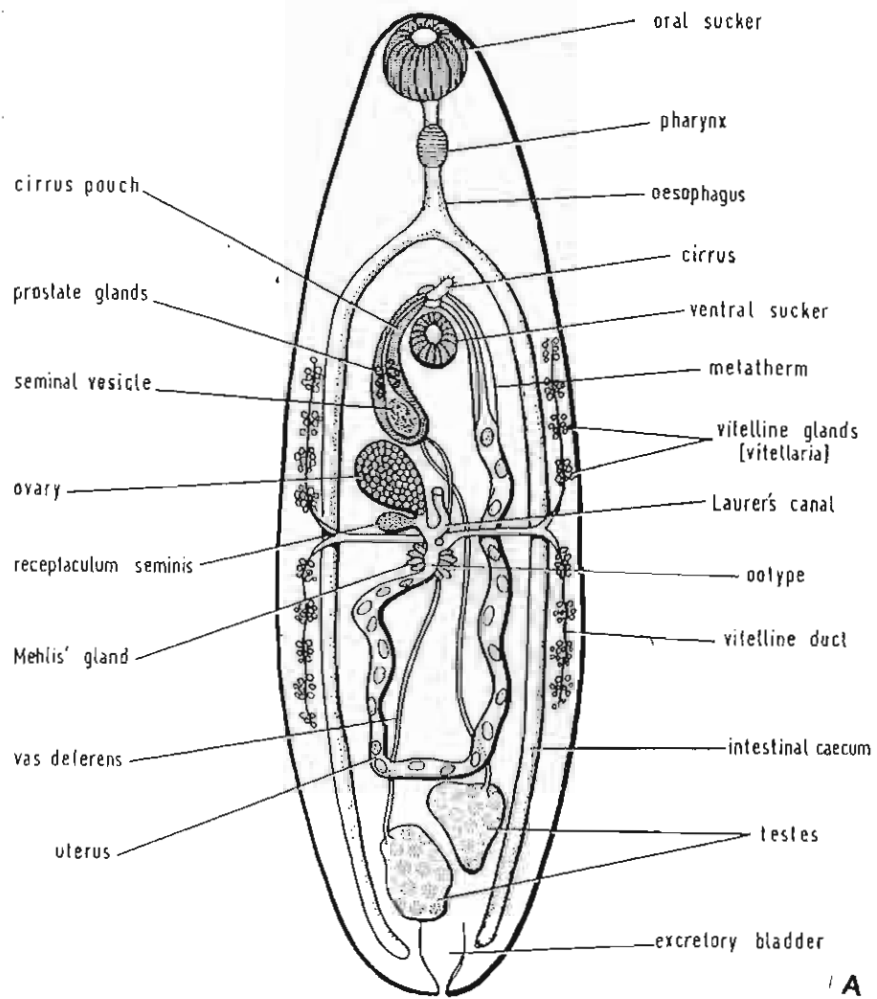


Figure 152

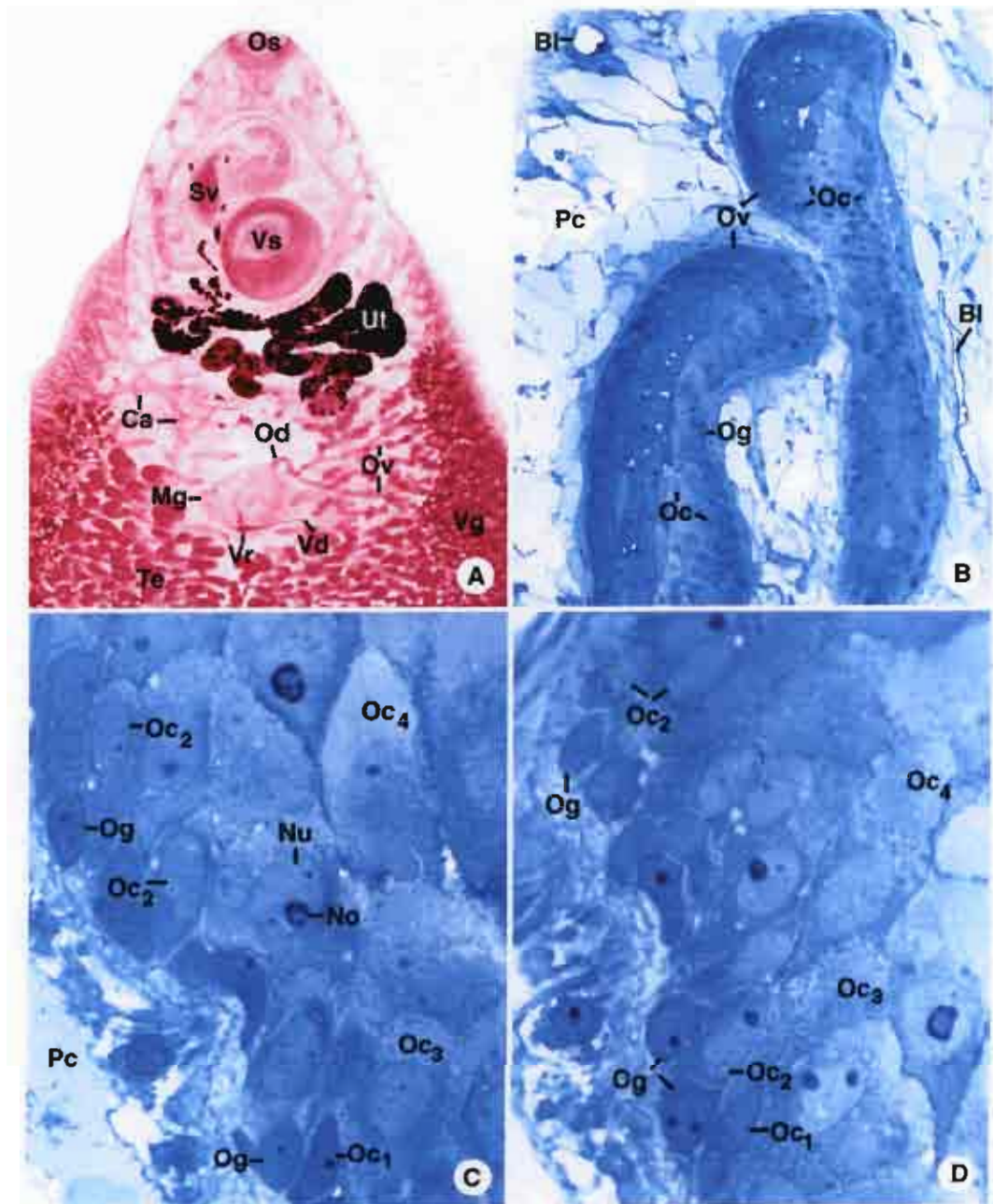
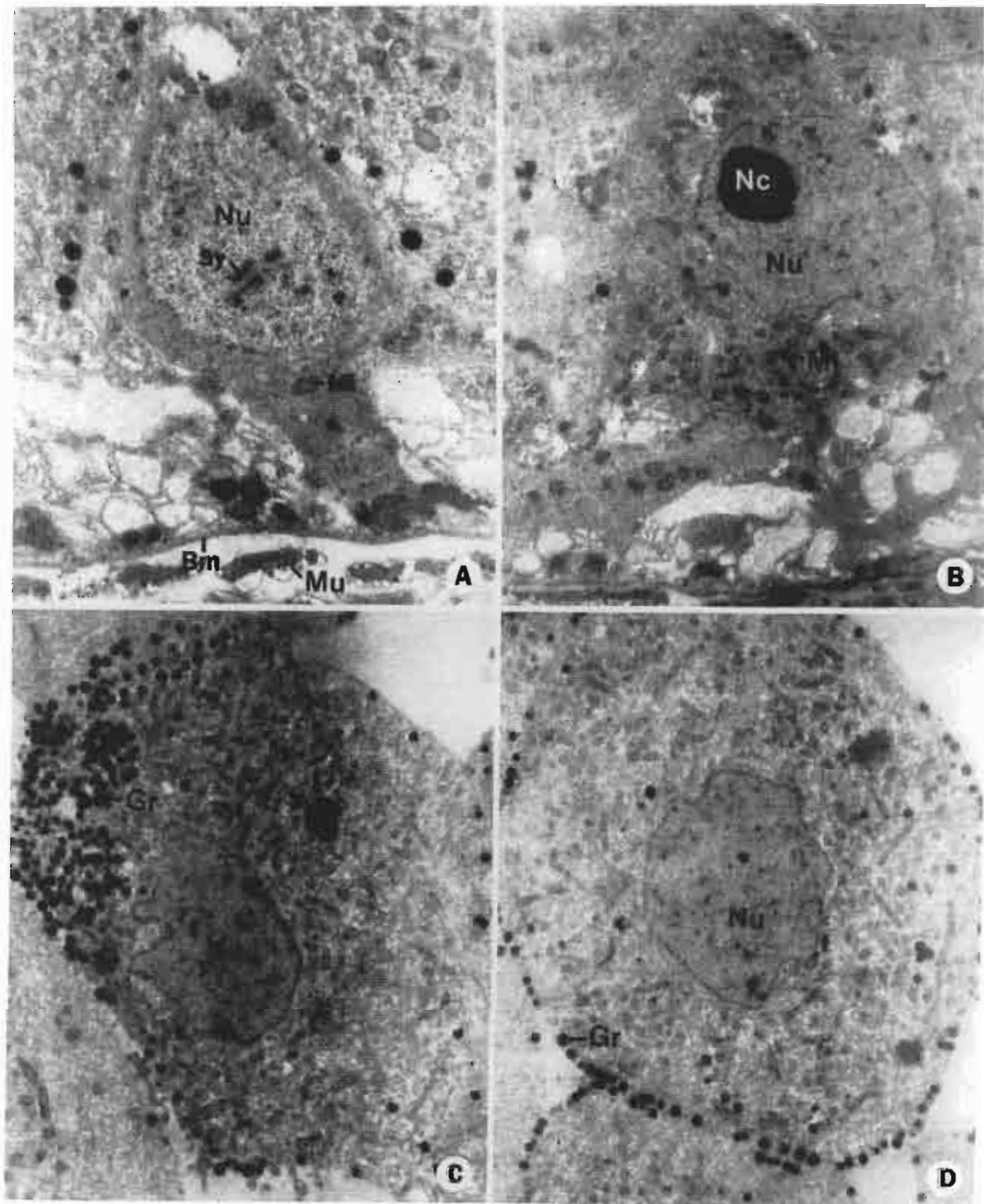


Figure 153



Vitelline gland

Vitelline gland เป็นต่อมที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในระบบสืบพันธุ์เพศเมียของพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* ประกอบด้วย vitelline follicles จำนวนมาก แบ่งเป็นสองกลุ่ม กระจายตัวจากด้านหน้าตั้งแต่ด้านข้างของมดลูกและอันทะลงไปจนถึงส่วนท้ายของตัวพยาธิทั้งด้านซ้ายและขวา (รูปที่ 154A) แต่ละ vitelline follicles จะถูกเชื่อมต่อกับ interfollicular vitelline ducts ซึ่งรวมกันเป็นท่อที่ใหญ่ขึ้น โดยท่อที่มาจาก vitelline follicle ที่กระจายตัวอยู่ด้านหน้าและด้านข้างของมดลูกรวมกันเป็น anterior longitudinal vitelline duct และท่อที่มาจากด้านหลังของมดลูกและอันทะรวมกันเป็น posterior longitudinal vitelline duct และท่อทั้งสองส่วนนี้จะรวมกันเป็นท่อ transverse vitelline duct ทอดตัวเข้าสู่ตรงกลางของลำตัว และเปิดเข้าสู่ vitelline reservoir ที่อยู่บริเวณด้านหลังของ Mehlis' gland (รูปที่ 154B, C)

Vitelline cells ที่พัฒนาอยู่ภายใน vitelline follicles สามารถแยกออกได้เป็น 6 ระยะ ดังนี้ ระยะเซลล์ต้นตอ (stem cell; 1) ระยะเซลล์ตัวอ่อน (immature stage; 2) ระยะสร้าง eggshell granules (granular stage; 3) ระยะสร้างและสะสม glycogen (vacuolar stage; 4) และ ระยะสร้าง glycan vesicle (5) และระยะสมบูรณ์ (mature stage; M) (รูปที่ 154D-F) โดยเซลล์ในระยะต้นจะอยู่บริเวณขอบของ follicle และเคลื่อนตัวเข้าสู่ส่วนกลางในระยะถัดไป นอกจาก vitelline cells ระยะต่าง ๆ แล้วยังพบ nurse cells ซึ่งทำหน้าที่เป็นเซลล์พี่เลี้ยงของ vitelline cells อยู่ด้วย

ระยะ Stem cells และ Immature cells Stem cells (รูปที่ 155A) เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็กประมาณ 7 μm วางตัวอยู่ชิดกับผนัง follicle นิวเคลียสมีขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับขนาดของเซลล์ ภายในมีก้อน heterochromatin กระจายตัวอยู่ห่าง ๆ กัน ไซโตพลาสซึมปริมาณน้อยและพบ mitochondria กับ rough endoplasmic reticulum (RER) กระจายตัวอยู่ไม่มากนัก ส่วน immature cells (รูปที่ 155B) มีตำแหน่งอยู่ที่ชั้นในต่อ stem cells เซลล์ระยะนี้มีขนาดใหญ่กว่าระยะแรกเล็กน้อย มีขนาดประมาณ 10 μm นิวเคลียสยังคงมี heterochromatin กระจายตัวอยู่ทั่วไปแต่ก้อน heterochromatin มีขนาดและจำนวนลดลง ส่วน euchromatin เพิ่มขึ้น ไซโตพลาสซึมมีปริมาณมากขึ้นโดยมี mitochondria และ RER เพิ่มขึ้นตามมากขึ้นเช่นกัน

ระยะสร้าง eggshell granules ช่วงต้นของระยะนี้เซลล์ยังคงมีขนาดใกล้เคียงกับระยะที่ 2 นิวเคลียสมี euchromatin มากขึ้น ไซโตพลาสซึมมี mitochondria และ RER เพิ่มขึ้น นอกจากนั้นยังพบ eggshell granules เดี่ยวๆ อยู่ประปราย ซึ่งในระยะต่อมาจะมีการสร้าง eggshell granules เพิ่มขึ้นภายในถุงของ eggshell granule เดี่ยวที่ถูกสร้างขึ้นมาในครั้งแรกอีกจำนวนมาก จนทำให้กลายเป็นถุงของ eggshell globules ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นมาก โดยภายในถุงเดียวกันบรรจุ eggshell granules ขนาดต่าง ๆ อยู่จำนวนมาก eggshell granules ที่อัดแน่นกันอยู่ภายในถุงนั้นยังคงแยกกันอยู่เป็นก้อนเดี่ยวโดยไม่ได้รวม

และบางส่วนสัมผัสอยู่กับแขนงของ parenchymal cells ซึ่งคอยลำเลียงสารต่างๆ เข้าออกจาก nurse cells อีกต่อหนึ่ง ส่วนด้าน apical surface ขึ้นเข้าสู่ส่วนกลางของ follicle และโอบล้อม vitelline cells ระยะต่างๆ ไว้ ไซโตพลาสซึมของเซลล์เหล่านี้มี mitochondria และ RER กระจายอยู่รอบๆ คิวเซลล์ ส่วนที่เป็นกิ่ง ซึ่งขึ้นไปโอบล้อม vitelline cells จะมี mitochondria กระจายอยู่ห่างๆ กัน นิวเคลียสของ nurse cell อยู่ก่อนไปทางด้านฐานของเซลล์ (รูปที่ 157A, B) ภายนอก basement membrane ยังพบเซลล์กล้ามเนื้อชนิดบางกระจายตัวอยู่ห่างๆ ระหว่างแขนงของ parenchymal cells

Vitelline duct

ลักษณะของ vitelline duct เป็นท่อที่มีเยื่อผิวเพียงชั้นเดียว ซึ่งถูกล้อมรอบด้วยเซลล์กล้ามเนื้อบางๆ กระจายตัวอยู่อย่างหลวมๆ เซลล์เยื่อผิวของท่อเป็นเซลล์แบนๆ ด้านฐานสัมผัสอยู่กับ basement membrane และ parenchymal cells ส่วนด้านยอดประกอบด้วย stereocillia จำนวนมากที่ขึ้นเข้าไปในช่องกลางของท่อ ไซโตพลาสซึมมีความหนาแน่นน้อยและมี mitochondria กระจายอยู่เป็นระยะ ภายในช่องกลางของท่อมี mature vitelline cells ที่กำลังถูกลำเลียงไปยัง vitelline reservoir (รูปที่ 157C, D)

รูปที่ 154 A) ภาพพยาธิระยะตัวเต็มวัยที่ผ่านการตรึงด้วยสารเคมีและแผ่อบบนสไลด์ แสดงตำแหน่งของ

oral sucker (Os), uterus (Ut), Mehlis' gland (Mg), vitelline gland (Vg) และ testis (Ti)

B) ภาพขยายของพยาธิที่ย้อมด้วยสี carmine ด้านข้างของMehlis' gland (B) แสดงตำแหน่งและความสัมพันธ์ของ vitelline follicle (Vf), anterior (Ald) และ posterior (PLd) longitudinal vitelline ducts ซึ่งเชื่อมต่อกันเป็น transverse vitelline duct (Td), Ut – uterus, Ca – caecum

C) ภาพบริเวณ Mehlis' gland (Mg) ของพยาธิย้อมด้วยสี carmine แสดงตำแหน่งของ transverse vitelline duct (Td), vitelline reservoir (Vr), ootype (Ot), ovary (Ov), oviduct (Od), uterus (Ut), Testis (Te) และ caecum (Ca)

D-F) ภาพ semithin sections ย้อมด้วย methylene blue (D, E) และ PAS กับ methylene blue (F) แสดง vitelline follicles ที่ประกอบด้วยเซลล์ที่กำลังพัฒนาในระยะที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ mature cell (M) โดยเซลล์ระยะที่ 3 มีการสร้าง eggshell granules (Sg) เซลล์ระยะที่ 4 มี vacuole ที่ย้อมติดสี PAS ระยะที่ 5 มี glycan vesicles (Gv) ที่ย้อมติดสี PAS

รูปที่ 155 A) ภาพ TEM กำลังขยายต่ำของเซลล์ระยะที่ 1 ซึ่งเป็นเซลล์ขนาดเล็ก สัดส่วนของนิวเคลียสต่อ

ไซโตพลาสซึมมากกว่าระยะอื่น ๆ ภายในนิวเคลียส (Nu) ประกอบด้วยก้อน heterochromatin (Hc) สั้น ๆ กระจายอยู่ทั่วไป ไซโตพลาสซึมมี mitochondria (Mi) กระจายอยู่ห่าง ๆ ด้านนอกของเซลล์ถูกล้อมรอบด้วยแขนงของ nurse cell (Np)

B) ภาพ TEM กำลังขยายต่ำของเซลล์ระยะที่ 2 แสดงเซลล์ที่มีสัดส่วนของนิวเคลียส (Nu) ต่อไซโตพลาสซึมลดลงเมื่อเทียบกับเซลล์ระยะที่ 1 และมีปริมาณ heterochromatin (Hc) ลดลง ไซโตพลาสซึมมีเนื้อางกว่า และมี mitochondria (Mi) กับ RER มากขึ้น

C, D) ภาพ TEM กำลังขยายต่ำ (C) และสูง (D) ของ vitelline cell ระยะที่ 3 ช่วงต้น แสดง eggshell granules (Gr) ขนาดเล็กและ eggshell globules (Eg) ขนาดใหญ่ที่ประกอบขึ้นด้วย granules ขนาดเล็กจำนวนมากรวมกันอยู่โดยมีช่องว่างขนาดเล็ก (ลูกศร) กันไว้ แกรนูลเหล่านี้ลอยอยู่ในไซโตพลาสซึมซึ่งมี RER ล้อมรอบอยู่จำนวนมาก Nu = นิวเคลียส Np = nurse cell process

- รูปที่ 156 A) ภาพกำลังขยายต่ำของ vitelline cell ระยะที่ 4 ช่วงต้น แสดงการเกิดโพรงในไซโทพลาสซึม ซึ่งมีลักษณะคล้าย vacuole (Va) ในขณะที่ RER และ eggshell globules (Eg) ยังคงกระจายอยู่ในไซโทพลาสซึมที่มีความหนาแน่นมากขึ้น Nu = นิวเคลียส
- B) ภาพกำลังขยายสูงแสดงส่วนนอกของ vitelline cell ระยะที่ 4 ซึ่งมี eggshell globules (Eg) และ RER อยู่ติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ (Pm) และส่วนหนึ่งของ vacuole ที่อัดแน่นไปด้วย glycogen particles (Gy) จำนวนมาก
- C) ภาพกำลังขยายต่ำของ vitelline cell ระยะที่ 5 ช่วงต้น ซึ่งอยู่ใกล้ ๆ กับเซลล์ระยะที่ 3 และ 4 แสดงการสร้าง glycan vesicles (Gv) จากไซโทพลาสซึมที่อยู่รอบ ๆ นิวเคลียส (Nu), ภาพแทรกขยายบริเวณรอบ ๆ นิวเคลียส (Nu) แสดงการสร้าง glycan vesicles (Gv) โดยเริ่มสร้างเป็น vesicle ขนาดเล็ก (ลูกศร) ที่ขยายขนาดใหญ่ขึ้น และภายในบรรจุ electron dense particles ที่มีลักษณะคล้าย glycogen particles, Va = vacuole, Eg = eggshell granule
- D) ภาพกำลังขยายต่ำของ vitelline cell ระยะที่ 5 ช่วงปลายซึ่งอยู่ติดกับเซลล์ระยะที่ 3 และ 4 แสดง glycan vesicles (Gv) กระจายตัวอยู่ภายใน vacuole (Va) ภาพแทรกแสดงภาพขยายของ glycan vesicle (Gv), Eg = eggshell granule, Nu = นิวเคลียส, Bl = bladder

รูปที่ 157 ภาพ TEM ของ vitelline gland และ vitelline duct

- A) ภาพกำลังขยายต่ำและ B) กำลังขยายสูงบริเวณผนังของ vitelline follicle แสดง nurse cell ซึ่งมีตัวเซลล์และนิวเคลียส (Nu) อยู่ติดกับผนังและกึ่งไซโทพลาสซึม (Np) ขึ้นออกไปโอบล้อม vitelline cell ระยะที่ 4 ไว้
- C) ภาพกำลังขยายต่ำและ D) ภาพกำลังขยายสูงของ vitelline duct ที่บุด้วย epithelium บาง ๆ ชั้นเดียว ด้านบนมี stereocillia (Sc) ขาว ๆ จำนวนมาก ท่อ vitelline duct ถูกล้อมรอบด้วยเส้นใยกล้ามเนื้อ (Mu) บาง ๆ ภายในท่อบาง ๆ มี mature vitelline cell (Vc) บรรจุอยู่, Bm = basement membrane

Figure 154

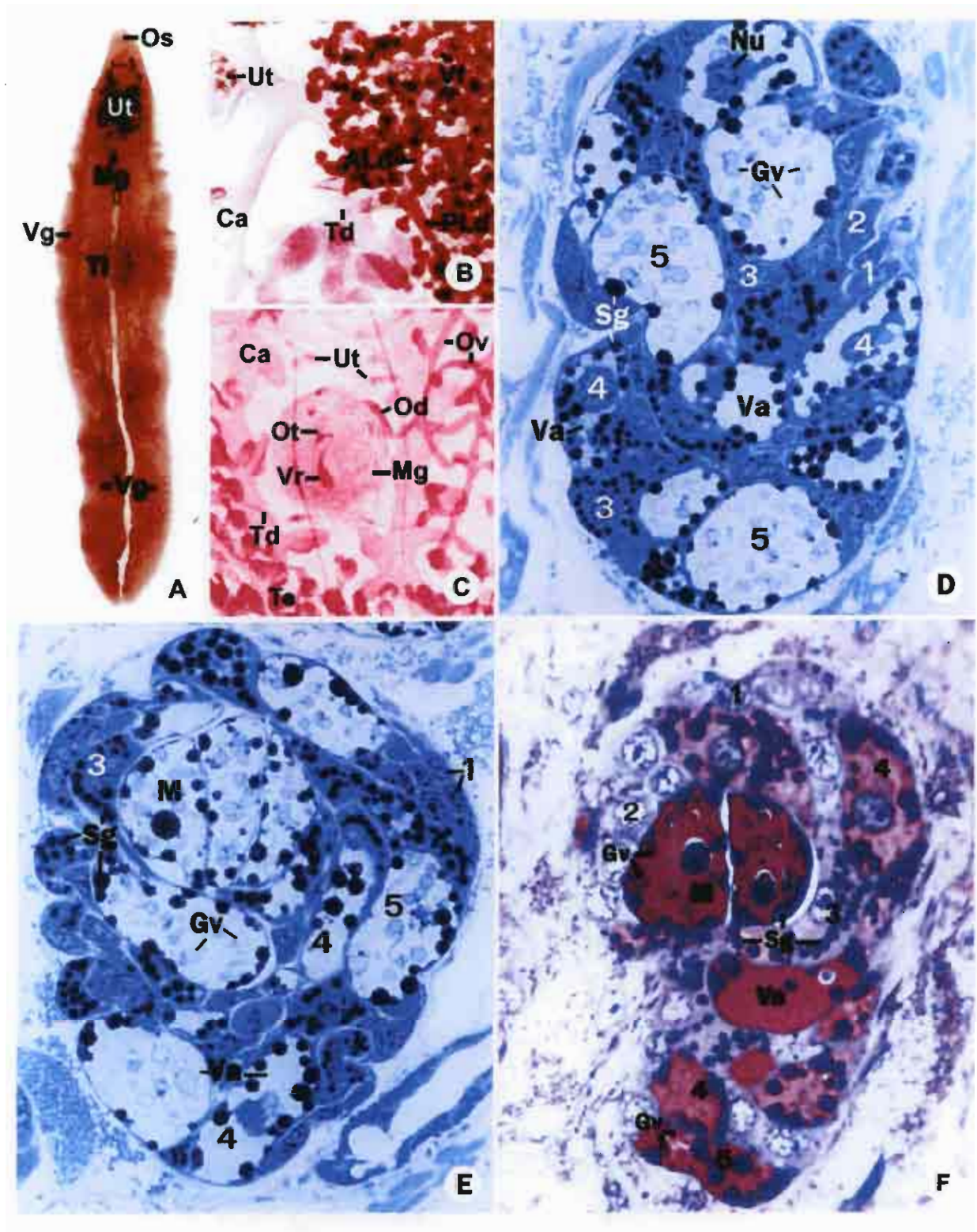


Figure 155

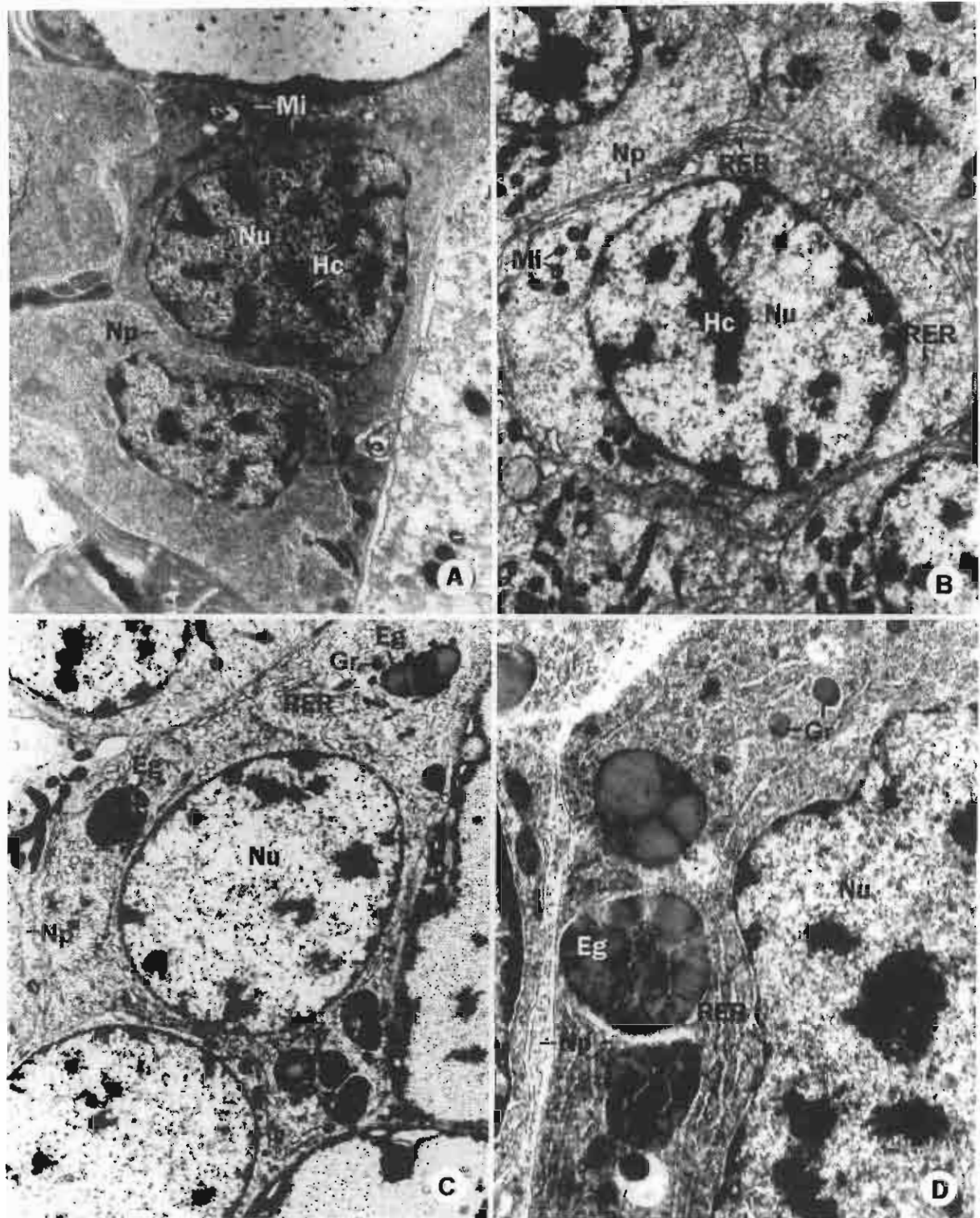


Figure 156

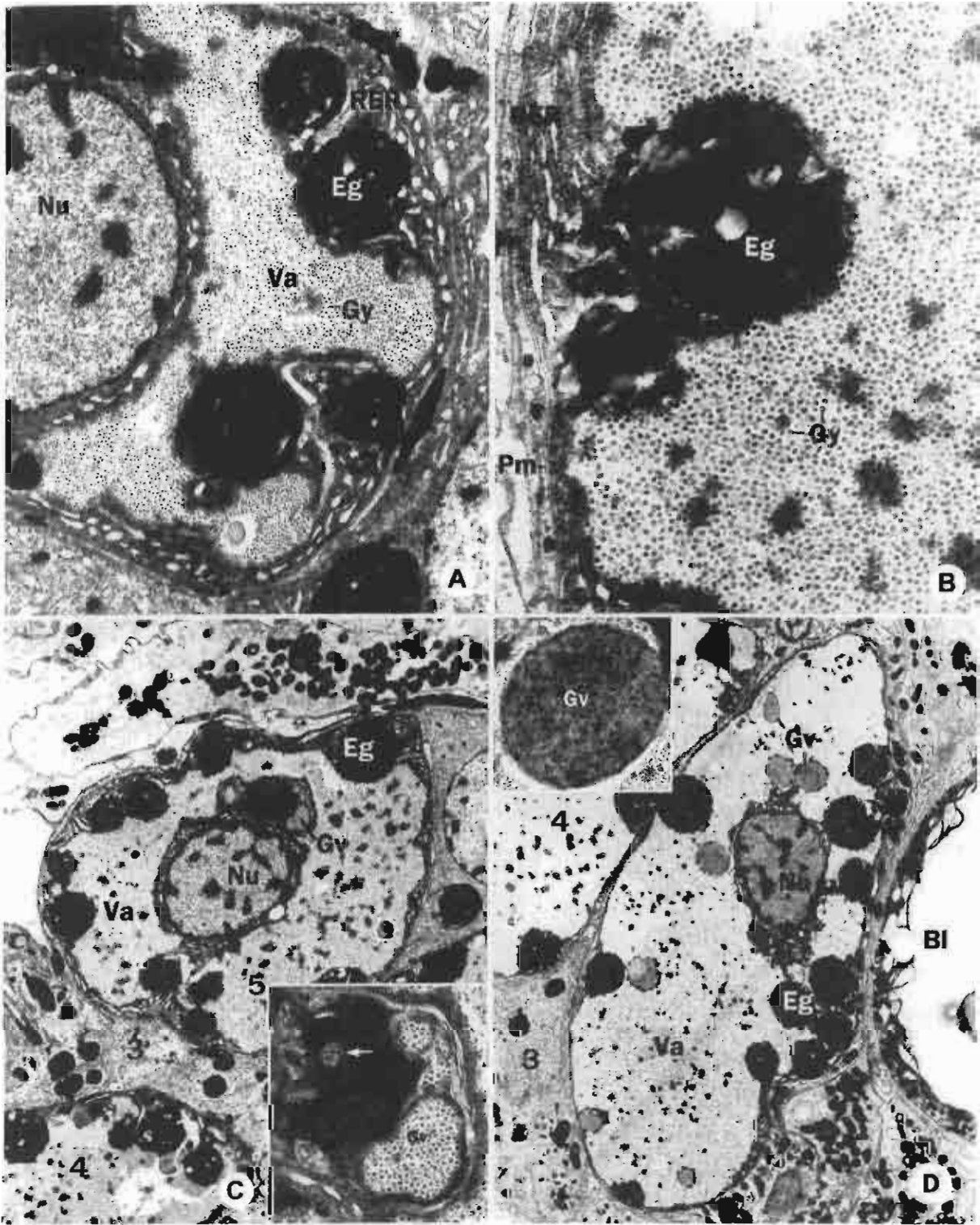
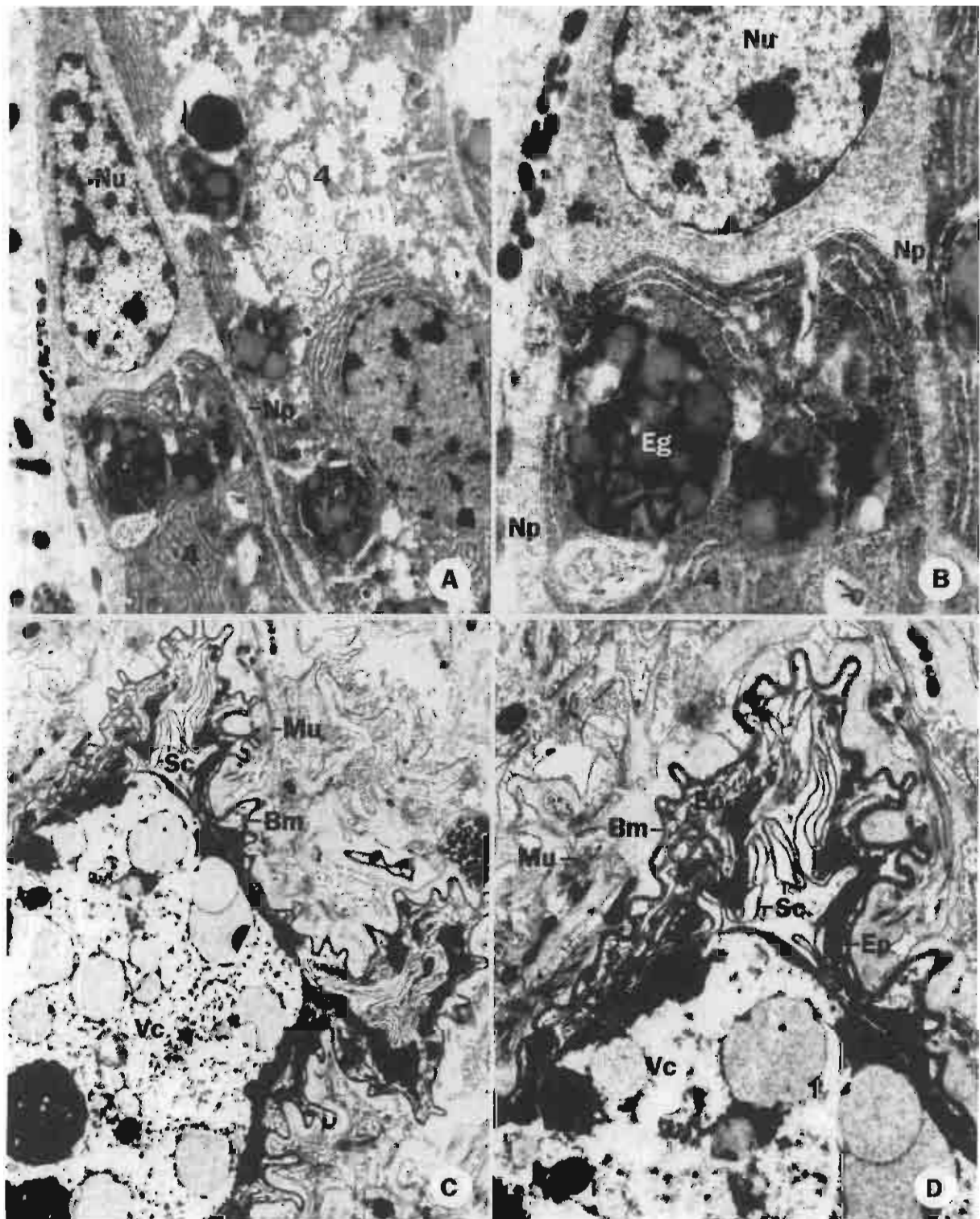


Figure 157



Mehlis' gland complex

จากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาพบว่า Mehlis' gland เป็นต่อมที่มีขนาดเล็กที่สุดในระบบสืบพันธุ์เพศเมียของพยาธิชนิดนี้ ตั้งอยู่แนวกลางตรงบริเวณรอยต่อระหว่าง uterus และ testis ประกอบด้วยเซลล์จำนวนมากเรียงตัวอยู่ทางด้านนอก แต่ละเซลล์มีกึ่งไซโทพลาสซึมยาวทอดตัวเข้าไปสู่ส่วนกลางของต่อม ด้านล่างก่อนไปทางด้านหลังติดอยู่กับ vitelline reservoir และเป็นทางผ่านของ median vitelline duct เข้าสู่ภายในตัวต่อม ด้านซ้ายก่อนไปทางด้านหน้าเล็กน้อยเป็นบริเวณที่ oviduct แทรกตัวเข้ามา ด้านบนเป็นทางผ่านของ Laurer's canal เข้าสู่ส่วนกลางของต่อม ด้านหน้าเป็นทางผ่านของท่อนคั้นของ uterus ออกจากต่อม ส่วนกลางของต่อมคือ ootype ซึ่งเป็นอวัยวะที่เกิดจากการรวมกันของ oviduct, median vitelline duct และ Laurer's canal ส่วนปลายของ ootype ต่อเนื่องออกไปเป็นส่วนคั้นของ uterus (รูปที่ 158A, B) จึงอาจกล่าวได้ว่า Mehlis' gland เปรียบเสมือนศูนย์กลางของระบบสืบพันธุ์เพศเมียของพยาธิชนิดนี้

Mehlis' gland cells เซลล์ที่พบภายใน Mehlis' gland แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ Mehlis' gland cell type I (Mc_1) และ II (Mc_2) ระหว่างเซลล์และกึ่งของเซลล์ทั้งสองชนิดนี้มี parenchyma cells แทรกตัวอยู่ นอกจากนั้นแล้วยังพบเซลล์ประสาทจำนวนหนึ่งกระจายอยู่ระหว่าง Mehlis' gland cells (รูปที่ 158C, D)

Mehlis' gland cell type I (Mc_1) กระจายตัวอยู่ทางด้านล่างของต่อมใกล้ ๆ กับ vitelline reservoir เป็นส่วนใหญ่ เซลล์มีนิวเคลียสอยู่กลางเซลล์ นิวคลีโอลัสเด่น และไซโทพลาสซึมถูกแบ่งออกเป็น ส่วน ๆ (compartments) เนื่องจากการพับเข้าไป (invagination) ของเยื่อหุ้มเซลล์จนเกือบถึงนิวเคลียส (รูปที่ 158C) เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าแต่ละส่วนของไซโทพลาสซึมมี mitochondria, rough endoplasmic reticulum (RER) ที่ขยายกว้างเนื่องจากการสร้างและสะสมสารไว้ภายใน นอกจากนี้ยังพบ electron dense granule (Gr) จำนวนมากกระจายตัวอยู่ระหว่าง RER (รูปที่ 160A, B) ซึ่ง granules เหล่านี้จะถูกถลำเลียงผ่านกึ่งไซโทพลาสซึมของเซลล์ไปยังผนังของ ootype ต่อไป

Mehlis' gland cell type II (Mc_2) เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็กกว่า Mc_1 กระจายตัวอยู่ทั่วทั้งต่อมโดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนบนของต่อม นิวเคลียสอยู่กลางเซลล์ นิวคลีโอลัสเด่น ไซโทพลาสซึมถูกแบ่งเป็นส่วน ๆ (compartment) เช่นเดียวกับ Mc_1 แต่มีขนาดเล็กและมีจำนวนมากกว่า (รูปที่ 158D) ภายในแต่ละส่วนมี mitochondria และ RER จำนวนมาก และมี granule รูปร่างคล้าย dumbbell ส่วนกลางที่บวมใสเล็กน้อย ส่วนหัวและท้ายมีลักษณะเป็น dense core matrix (รูปที่ 160C, D)

ภายใน Mehlis' gland ยังพบเซลล์ประสาทที่มีลักษณะต่างกัน 2 แบบคือ Nerve cell type I (Nc_1) ซึ่งมีนิวเคลียสนิวคลีโอลัสเด่น ไซโทพลาสซึมมีแกรนูลที่ข้อมติดสี methylene blue เข้มชัดแน่นสลับกับ lipid droplets และ Nerve cell type II (Nc_2) เป็นเซลล์ที่ไซโทพลาสซึมมีการแบ่งส่วนออกคล้ายกับ Mehlis' gland cells แต่น้อยกว่าและมีแกรนูลติดอยู่อย่างหนาแน่น (รูปที่ 158E) นอกจากนั้นยังมี muscle

cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ ไซโตพลาสซึมมีการแบ่งเป็นส่วนจำนวนมากและมีแขนงของเซลล์ยื่นไปที่ประกอปกันเป็นกลุ่มของ muscle fibers ที่อยู่ล้อมรอบท่อต่าง ๆ (รูปที่ 158F)

Vitelline reservoir และ Median vitelline duct ผนังของ Vitelline reservoir และ Median vitelline duct บุด้วยเซลล์เยื่อเมือกบาง ๆ ชั้นเดียว ด้านนอกมีเซลล์กล้ามเนื้อขนาดเล็กกระจายตัวล้อมรอบอยู่ ผิวด้านฐานเรียบ ด้านยอดของเซลล์มีกิ่งของไซโตพลาสซึมขนาดเล็กยื่นเข้าไปภายในช่องว่างที่บรรจุ vitelline cells ใช้อย่างหนาแน่น (รูปที่ 159D, 162A, B)

Oviduct ท่อนำไข่เป็นท่อที่ต่อจากรังไข่ ทอดตัวเข้าสู่ Mehlis' gland ทางด้านล่างซ้ายก่อนไปทางด้านหน้า จากนั้นทอดตัวเฉียงขึ้นสู่ด้านบนและรวมตัวกับ Laurer's canal ซึ่งทอดตัวลงมาจากด้านบนของลำตัวพยาธิ จากนั้นจึงวกกลับเข้าสู่ส่วนกลางของท่อและรวมตัวกับ median vitelline duct ซึ่งเป็นส่วนที่ต่อมาจาก vitelline reservoir กลายเป็น ootype ลักษณะของผนังท่อนำไข่สามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนต้นก่อนการรวมกับ Laurer's canal และส่วนหลังจากการรวมกับ Laurer's canal

ท่อนำไข่ส่วนต้นบุด้วยเยื่อบุผิวที่มีเซลล์เรียงตัวกันเป็นชั้นเดียว ล้อมรอบด้วยเส้นใยกล้ามเนื้อบาง ๆ โดยมีกิ่งของเซลล์ parenchyma แทรกตัวผ่านกล้ามเนื้อเข้าไปสัมผัสกับด้านฐานของเซลล์บุผิว ด้านยอดของเซลล์บุผิวมี stereocillia ที่มีขนาดยาวจำนวนมากยื่นเข้าไปในท่อ ไซโตพลาสซึมของเซลล์บุผิวมี mitochondria กระจายอยู่อย่างห่าง ๆ บางเซลล์มีความหนาแน่นของไซโตพลาสซึมมาก และบางเซลล์น้อย (รูปที่ 159A; 161A, B) ภายในท่อยังพบเซลล์ไข่ที่ยังไม่ได้ผสมกำลังถูกกลืนผ่านท่อนี้ซึ่งสังเกตได้จาก cortical granules ที่เรียงตัวอยู่ใต้ผิวของเซลล์ไข่เหล่านั้น

ท่อนำไข่ส่วนปลายบุด้วยเซลล์รูปร่างลูกบาศก์สองชนิดเรียงตัวชั้นเป็นเดียว เซลล์ชนิดที่หนึ่ง (Ep_1) เป็นเซลล์ที่มีจำนวนมากกว่าเซลล์ชนิดที่สอง (Ep_2) ไซโตพลาสซึมของเซลล์ชนิดนี้จะมีไมโทคอนเดรียจำนวนมากและ rer ซึ่งเรียงตัวในแนวตั้งอยู่พอประมาณ นอกจากนั้นยังพบแกรนูลขนาดใหญ่จำนวนมาก (รูปที่ 159C; 161C, D) ส่วนยอดของเซลล์มี cilia จำนวนมากยื่นเข้าไปในท่อ ด้านฐานของเซลล์เรียบและยึดติดกับ basement membrane ซึ่งเป็นไปได้ว่าท่อส่วนนี้จะไม่มีการขยายตัวเลยทั้งนี้เพื่อเป็นการควบคุมเซลล์ไข่ให้ผ่านไปในแบบแถวเรียงหนึ่งและเป็นการควบคุมปริมาณของเซลล์ไข่ต่อปริมาณของ vitelline cells ในอัตราส่วนประมาณ 1:30 เพื่อสร้างเป็นไข่หนึ่งใบ

เซลล์ชนิดที่สอง (Ep_2) เป็นเซลล์ที่มีจำนวนน้อย มีไซโตพลาสซึมเข้มกว่าเซลล์ชนิดที่หนึ่งมาก เนื่องจากอัดแน่นไปด้วยแกรนูลขนาดเล็กเป็นจำนวนมากสลับกับ rer และไมโทคอนเดรีย ส่วนยอดของเซลล์มีลักษณะเช่นเดียวกับเซลล์ชนิดที่หนึ่งคือมี cilia ยาวจำนวนมาก (รูปที่ 159C; 161E, F) และส่วนฐานของเซลล์ติดอยู่กับ basement ที่เรียบ และภายนอกของท่อมีเส้นใยกล้ามเนื้อบาง ๆ ล้อมรอบอยู่ และระหว่างเส้นใยกล้ามเนื้อยังมีแขนงของ parenchyma cells แทรกตัวเข้ามาสัมผัสกับส่วนฐานของเซลล์ทั้งสองชนิดอีกด้วย

Laurer's canal เป็นท่อที่มีขนาดเล็กปลายเปิดออกสู่ภายนอกที่ผิวหนังด้านหลังของตัวพยาธิ ตัวท่อทางทะลุชั้นของกล้ามเนื้อที่ห่อหุ้มลำตัวได้ชั้น tegument เข้าสู่ Mehlis' gland ทางด้านบน เยื่อบุผิวของท่อมีลักษณะเป็น syncytium โดยมีตัวเซลล์อยู่ติดต่อกับชั้นกล้ามเนื้อ ชั้นบุผิวที่เป็น syncytium เป็นส่วนต่อจากชั้นผิว (tegument) (รูปที่ 159B) จึงมีลักษณะโครงสร้างละเอียดคล้ายคลึงกับของชั้นผิวมาก กล่าวคือสามารถแบ่งออกเป็น 4 ชั้นย่อย ชั้นย่อยที่ 1 ประกอบด้วย pits สลับกับ ridge ภายในไซโตพลาสซึมมี granules ชนิดที่ 1 และ 2 (G_1 , G_2) อัดอยู่กันอย่างหนาแน่น ชั้นย่อยที่ 2 เป็นชั้นที่อยู่ติดลงไป และในชั้นนี้เป็นชั้นที่มีความแตกต่างกับชั้นผิวที่ห่อหุ้มตัวพยาธิภายนอก เนื่องจากไม่พบ lysosome ที่มักจะมียูในชั้นผิวเป็นจำนวนมาก ชั้นย่อยที่ 3 มี mitochondria เรียงตัวอยู่จำนวนมาก และชั้นที่ 4 เป็นชั้นที่มี infoldings ของ basal plasma membrane และมีกึ่งไซโตพลาสซึมของเซลล์บุผิวส่งออกมาเชื่อมติด

Ootype เป็นอวัยวะที่มีลักษณะเป็นท่อคดไปมา ซึ่งเกิดจากการรวมกันของ median vitelline duct และ oviduct ผนังบุด้วยเยื่อบุผิวชั้นเดียวล้อมรอบด้วยเซลล์กล้ามเนื้อบาง ๆ ระหว่างเส้นใยกล้ามเนื้อเป็นทางผ่านของกึ่งของไซโตพลาสซึมของเซลล์ต่าง ๆ ที่แทรกตัวผ่านเข้าไปยังชั้นเยื่อบุผิว (รูปที่ 159E) ลักษณะโดยทั่วไปของเซลล์เยื่อบุผิวสามารถแบ่งออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนฐาน (basal part) และส่วนยอดเซลล์ (apical part) (รูปที่ 162C) โดยส่วนฐานเซลล์ มี cytoplasm ที่มีความหนาแน่นน้อยกว่าและมีการพับตัวของเยื่อหุ้มเซลล์แทรกเข้าไปใน cytoplasm (basal infolding) สำหรับส่วนยอดของเซลล์เยื่อบุผิวมีลักษณะคล้ายนิ้วมือยื่นเข้าไปภายในช่องกลางของท่อ นอกจากนี้ยังพบกึ่งของ Mehlis' gland cells ทั้งสองชนิดแทรกตัวผ่านเข้าไปในเซลล์เยื่อบุผิวและเปิดสู่ท่อของ ootype บริเวณส่วนฐานของ cytoplasmic processes ของเซลล์เยื่อบุผิว แต่เปิดเข้าสู่ ootype ในตำแหน่งที่แตกต่างกัน โดย Mehlis' gland cell type I จะเปิดเข้าสู่ส่วนต้น (proximal part) ของ ootype (รูปที่ 162C, D) ในขณะที่ Mehlis' gland cell type II จะเปิดเข้าสู่ lumen ของ ootype ในส่วนปลาย (distal part) (รูปที่ 162E, F) นอกจากนั้นยังพบ process ของ parenchyma cells แทรกตัวผ่านชั้นกล้ามเนื้อเข้ามาสัมผัสกับ basement membrane ของเซลล์เยื่อบุผิว และภายใน lumen ของ ootype ยังพบ vitelline cells ซึ่งกำลังปลดปล่อย eggshell granules ขนาดเล็กออกจากเซลล์ และแกรนูลที่ถูกปล่อยออกมาบางส่วนรวมกันเป็นก้อนที่ใหญ่ขึ้น

ส่วนต้นของ uterus คือส่วนของ uterus ที่ยังคงฝังตัวอยู่ใน Mehlis' gland ซึ่งเป็นส่วนของท่อที่ต่อจาก ootype และมีโครงสร้างละเอียดโดยทั่วไปคล้ายกับ ootype กล่าวคือ ผนังบุด้วยเยื่อบุผิวชั้นเดียว (รูปที่ 159F) เซลล์เยื่อบุผิวสามารถแบ่งออกเป็นสองส่วน คือ ส่วนฐานและส่วนยอดเซลล์ ส่วนฐานเซลล์มีการม้วนตัวของเยื่อหุ้มเซลล์แทรกเข้าไปในตัวเซลล์ประมาณครึ่งหนึ่งของความกว้างของเซลล์แต่ไม่พบ process ของ Mehlis' gland cells หรือเซลล์ชนิดอื่นแทรกตัวเข้ามาในชั้นนี้ พบเพียงการสัมผัสของ cytoplasmic process ของ parenchyma cells กับ basement membrane ของเซลล์เยื่อบุผิวเท่านั้น ด้านบนของเซลล์มีกึ่งไซโตพลาสซึมคล้ายนิ้วมือขนาดใหญ่ ยื่นเข้าไปในช่องว่างของท่อ ภายในกึ่งของ

เซลล์นี้มีไซโตพลาสซึมแน่นทึบเนื่องจากมีจำนวน organelles เช่น mitochondria มากกว่าชั้นฐาน (รูปที่ 163A-D) ด้านนอกของเซลล์เชื่อมล้อมรอบด้วยชั้นกล้ามเนื้อ และระหว่างเส้นใยกล้ามเนื้อพบกับไซโตพลาสซึมของ parenchyma cells แทรกตัวผ่านเข้าไปสัมผัสกับชั้นของเยื่อผิว ภายในท่อของ uterus ส่วนนี้ยังพบ vitelline cells ที่มีการปลดปล่อย eggshell granules ออกหมดแล้ว และพบ eggshell granules ขนาดใหญ่ที่มีการเชื่อมต่อกันกลายเป็นแผ่นของ eggshell บรรจุอยู่ (รูปที่ 163A-D)

รูปที่ 158 ภาพ semithin sections ของ Mehlis' gland complex

- A, B) ภาพกำลังขยายต่ำแสดงความสัมพันธ์ของ ootype (Ot) Laurer's canal (Lc) และ ส่วนต้นของ uterus (Ut) กับ Mehlis' gland ซึ่งมี Mehlis' gland cells (Mc) เรียงตัวอยู่บริเวณรอบนอกของต่อม
- C) ภาพขยายของ Mehlis' gland แสดง type I cell (Mc_1) ซึ่งนิวเคลียส (Nu) มีนิวคลีโอลัส (No) เด่น เยื่อหุ้มเซลล์มีวนตัวเข้าไปแบ่งไซโทพลาสซึมออกเป็น ส่วน ๆ (ลูกศร)
- D) ภาพขยายของ Mehlis' gland แสดง type II cell (Mc_2) ซึ่งนิวเคลียส (Nu) มีนิวคลีโอลัส (No) เด่น เยื่อหุ้มเซลล์มีวนตัวเข้าไปแบ่งไซโทพลาสซึมออกเป็น ส่วน ๆ (ลูกศร) เช่นเดียวกับ Mc_1 แต่มีจำนวนชิ้นมากกว่า
- E) ภาพขยายแสดงลักษณะของเซลล์ประสาท 2 ชนิด คือ เซลล์ประสาทชนิดที่ 1 (Nc_1) ซึ่งสามารถสังเกตเห็น lipid droplets กระจายตัวอยู่ทั่วไซโทพลาสซึมที่ติดสีเข้ม และเซลล์ประสาทชนิดที่ 2 (Nc_2) ซึ่งไซโทพลาสซึมถูกแบ่งออกเป็น ส่วนสีเข้มสลับกับสีจาง แทรกตัวอยู่ระหว่าง Mehlis' gland cell type I (Mc_1) และเซลล์ parenchyma (Pc)
- F) ภาพขยายส่วนกลางของ Mehlis' gland แสดงตัวเซลล์กล้ามเนื้อ (Mc) ขนาดใหญ่แทรกตัวอยู่ระหว่างเซลล์ parenchyma (Pc) ตัวเซลล์กล้ามเนื้อประกอบด้วยไซโทพลาสซึมถูกแบ่งออกเป็น ส่วนย่อย ๆ จำนวนมาก และส่งกิ่ง (Mp) ยื่นออกไปเป็นก้านใยกล้ามเนื้อที่อยู่รอบ ๆ ผังของท่อ ootype

รูปที่ 159 ภาพ semithin sections ของ Mehlis' gland และ ootype ย้อมด้วย methylene blue

- A) ภาพกำลังขยายสูงของ oviduct ส่วนต้นแสดงเยื่อหุ้ม (Ep) ที่มีการเรียงตัวเป็นชั้นเดียว ภายในบรรจุเซลล์ไข่ (Om) อยู่แน่น
- B) ภาพของ Laurer's canal แสดงให้เห็นชั้นบุผิวชนิด syncytial epithelium (Ep) ถูกล้อมรอบด้วยเส้นใยกล้ามเนื้อ (Mu) หนา และเซลล์ของเยื่อหุ้ม (Tc) ที่อยู่ด้านนอกกล้ามเนื้อส่งกิ่งของเซลล์ผ่านกล้ามเนื้อเข้าไปเชื่อมกับชั้นบุผิว และมีเซลล์ Mehlis' gland type I (Mc_1) และ parenchyma (Pc) อยู่ใกล้ ๆ
- C) ภาพกำลังขยายสูงของ oviduct ส่วนปลายซึ่งบุด้วยเซลล์บุผิว 2 ชนิด เซลล์ชนิดที่ 1 (Ep_1) ไซโทพลาสซึมมีแกรนูลขนาดเล็ก (หัวลูกศร) จำนวนมาก และเซลล์ชนิดที่ 2 (Ep_2) มีแกรนูลขนาดใหญ่ (ลูกศร) บรรจุอยู่ ด้านนอกมีกล้ามเนื้อ (Mu) บาง ๆ ล้อมรอบ Pc - parenchyma cells, Mc_1 - Mehlis' gland cell type I
- D) ภาพบริเวณขอบของ median vitelline duct ซึ่งบุด้วยเยื่อหุ้ม (Ep) ชั้นเดียวล้อมรอบด้วย Mehlis' gland cell (Mc_1 , Mc_2) และเซลล์ parenchyma (Pc) ภายในช่องว่างของ vitelline reservoir อัดแน่นด้วย mature vitelline cells (Vc)

- E) ภาพบริเวณ ootype ที่บุด้วย epithelium cells (Ep) ชั้นเดียว ภายในท่อบรรจุ vitelline cells (Vc) จำนวนมาก ซึ่งบางเซลล์มีการหลั่ง eggshell granules (Eg, ลูกศรขาว) ด้านนอกของท่อมี กิ่งของเซลล์ Mehlis' gland (Cp) แทรกตัวผ่านชั้นกล้ามเนื้อ (Mu) เข้ามายังเซลล์เยื่อหุ้มเพื่อ ปล่อยแกรนูล (ลูกศรดำ) เข้าไปในท่อ
- F) ภาพ uterus ส่วนต้น แสดงการสร้างเปลือกไข่ (Sh) ล้อมรอบ เซลล์ไข่ (Zy) และ vitelline cells (Vc) ที่หลั่ง eggshell granules ออกหมดแล้ว และคงเหลือเฉพาะ glycan vesicles (Gv) อยู่ภายในไซโตพลาสซึม

รูปที่ 160 A) ภาพ TEM กำลังขยายต่ำแสดง Mehlis' gland cell type I ซึ่งมีนิวเคลียส (Nu) อยู่กลางเซลล์ มีนิวคลีโอลัส (No) เด่น ไซโตพลาสซึมถูกแบ่งออกเป็นส่วน ๆ (ลูกศร)

- B) ภาพขยายของ Mc₁ แสดงการม้วนตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ (Pm) เข้าไปในเซลล์จนเกือบถึง นิวเคลียส (Nu) ทำให้ไซโตพลาสซึมถูกแบ่งออกเป็นส่วน ๆ (ลูกศร) ภายในแต่ละส่วนมี RER ที่มีการสะสมสารจนถ่างออกเป็นถุง มี mitochondria (Mi) และแกรนูล (Gr) อยู่จำนวน พอประมาณ (ภาพแทรก)

- C) ภาพ TEM กำลังขยายต่ำแสดง Mehlis' gland cell type II ซึ่งมีนิวเคลียส (Nu) อยู่ตรงกลาง เซลล์ มีนิวคลีโอลัส (No) เด่น ไซโตพลาสซึมถูกแบ่งออกเป็นส่วน ๆ (ลูกศร) ซึ่งมีจำนวนชิ้น มากกว่า Mc₁

- D) ภาพกำลังขยายปานกลางและสูง (ภาพแทรก) แสดงลักษณะของแกรนูล (Gr) ของ Mehlis' gland cell type II ซึ่งมีลักษณะเป็นรูปยาวหรือ dumbbell ส่วนกลางทึบแสงอิเล็กตรอนมี ลักษณะเป็น dense core matrix ส่วนหัวและท้ายพองออก

รูปที่ 161 A) ภาพ TEM กำลังขยายต่ำของ oviduct แสดง เยื่อหุ้ม (Ep) ชั้นเดียวบาง ๆ ซึ่งมี stereocilia (Sc) ยาวยื่นเข้าไปภายในช่องว่างของท่อที่มีเซลล์ไข่ (Om) บรรจุอยู่เต็ม ด้านนอกท่อถูกล้อม รอบด้วยกล้ามเนื้อ (Mu) บาง ๆ Nu – nucleus ของเซลล์ไข่

- B) ภาพกำลังขยายสูงแสดงเยื่อหุ้ม (Ep) ส่วนที่มีความหนาแน่นของไซโตพลาสซึมมาก ด้าน นอกมีเซลล์กล้ามเนื้อ (Mu) บาง ๆ ด้านในมี stereocilia (Sc) ยาวยื่นเข้าไปภายในท่อซึ่งมี เซลล์ไข่ (Om) ที่ยังไม่ได้รับการผสมที่สังเกตได้จาก cortical granules (Cg) ไซโตพลาสซึม ของเซลล์บุผิวมี mitochondria (Mi) อยู่เป็นจำนวนมาก

- C, D) ภาพ TEM กำลังขยายต่ำ (C) และปานกลาง (D) ของท่อ oviduct ส่วนปลายแสดงเยื่อหุ้ม ชนิดที่ 1 (Ep, Ep1) วางตัวอยู่บน basement membrane (Bm) ภายในไซโตพลาสซึมมี granules (Gr) ขนาดใหญ่จำนวนมากและ ไมโทคอนเดรีย (Mi) สะสมอยู่ ส่วนยอดของเซลล์ พบ cilia (Ci) ยื่นเข้าไปในช่องว่างของท่อ และส่วนฐานของเยื่อหุ้มเซลล์พับตัว (In) แทรกเข้า

ไปในเซลล์ (infolding) ภายนอกมีกล้ามเนื้อ (Mu) บาง ๆ ล้อมรอบอยู่ ระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อ มีกิ่งของเซลล์ parenchyma (Cp) แทรกตัวเข้ามาสัมผัสกับฐานของเซลล์เยื่อผิว

E, F) ภาพ TEM กำลังขยายต่ำ (E) และปานกลาง (F) แสดงเซลล์บุผิวชนิดที่ 1 (Ep_1) และ 2 (Ep_2) เซลล์ Ep_2 มีไซโตพลาสซึมแน่นและมี granules (Gr_2) ขนาดเล็กสะสมอยู่จำนวนมาก ในขณะที่ Ep_1 มีไซโตพลาสซึมโปร่งกว่าและมีเกรนูลขนาดใหญ่ (Gr_1) สะสมอยู่ ภาพ F ขยายไซโตพลาสซึมของเซลล์ Ep_2 แสดงลักษณะของ granules (Gr) ขนาดเล็ก Mi = ไมโทคอนเดรีย

รูปที่ 162 A) ภาพ TEM ของ transverse vitelline duct แสดงเยื่อผิวชั้นเดียว (Ep) บาง ๆ วางตัวอยู่บน basement membrane (Bm) สองชั้น ส่วนยอดของเซลล์มี stereocilia (Sc) จำนวนมากยื่นเข้าไปภายในท่อซึ่งมี vitelline cell (Vc) ที่ยังมี eggshell granules (Eg) และ glycan vesicle (Gv) ด้านนอกถูกล้อมรอบด้วยเส้นใยกล้ามเนื้อ (Mu) บาง ๆ

B) ภาพ TEM ของ vitelline reservoir แสดงเยื่อผิว (Ep) ชั้นเดียวบาง ๆ วางตัวอยู่บน basement membrane (Bm) สองชั้น ด้านนอกหุ้มด้วยกล้ามเนื้อ (Mu) ส่วนยอดมีกิ่งไซโตพลาสซึม (Ap) ยื่นเข้าไปในช่องว่างที่บรรจุ vitelline cells (Vc) อยู่

C, D) ภาพ TEM กำลังขยายต่ำ (E) และภาพขยายส่วนของเซลล์บุผิว (F) ของ ootype ส่วนต้น แสดง เยื่อผิวชั้นเดียว ส่วนยอดของเซลล์มีกิ่งเซลล์ขนาดใหญ่ (apical process - Ap) ยื่นเข้าไปภายในท่อ ส่วนฐานของเซลล์วางตัวอยู่บน basement membrane (Bm) และมีกิ่งของ Mehlis' gland type I (Cp) ที่ภายในบรรจุเกรนูล (Gr) จำนวนมากแทรกตัวผ่านกล้ามเนื้อ (Mu) เข้ามาเปิดเข้าสู่ท่อบริเวณส่วนฐาน (ลูกศร) ของ apical process ของเซลล์ และเกรนูลบางส่วน (Gr') กำลังถูกหลั่งเข้าสู่ท่อ ภายในท่อมี vitelline cell (Vc) ซึ่งกำลังหลั่ง eggshell granules (Eg)

E, F) ภาพ TEM กำลังขยายต่ำ (E) และภาพขยายส่วนของเซลล์บุผิว (F) ของ ootype ส่วนปลาย แสดง เยื่อผิวชั้นเดียว ส่วนยอดของเซลล์มี apical process (Ap) ยื่นเข้าไปภายในท่อ ส่วนฐานของเซลล์วางตัวอยู่บน basement membrane (Bm) และมีกิ่งของ Mehlis' gland type II (Cp) ที่ภายในบรรจุเกรนูล (Gr) จำนวนมากแทรกตัวผ่านกล้ามเนื้อ (Mu) เปิดเข้าสู่ท่อบริเวณส่วนฐาน (ลูกศร) ของ apical process ของเซลล์ และเกรนูลบางส่วน (Gr') ถูกหลั่งเข้าสู่ท่อ ภายในท่อมี vitelline cell (Vc) ซึ่งกำลังหลั่ง eggshell granules (Eg) ในขณะที่ glycan vesicle ยังคงอยู่ในเซลล์

รูปที่ 163 A) ภาพ TEM กำลังขยายต่ำของ uterus ส่วนต้น แสดงเยื่อผิว (Ep) ที่เรียงตัวเป็นชั้นเดียว ด้านบนมีกิ่งไซโตพลาสซึม (Cp) ยื่นเข้าไปในช่องว่างของท่อซึ่งมี eggshell granules (Eg) กระจายอยู่ ด้านฐานมีกิ่งของเซลล์ที่มาจากด้านนอกแทรกตัวผ่านชั้นกล้ามเนื้อ (Mu) และ basement membrane (Bm) เข้าไปเชื่อมกับเยื่อผิว

- B) ภาพกำลังขยายปานกลางแสดงเยื่อหุ้มที่มีกึ่งไซโทพลาสซึม (Cp) ยื่นเข้าไปในช่องว่างของท่อซึ่งมี eggshell granules (Eg) และ vitelline cell (Vc) อยู่ ไซโทพลาสซึมด้าน basement membrane (Bm) มีความเข้มข้นกว่าด้านบน Mu = กล้ามเนื้อ
- C) ภาพกำลังขยายสูงแสดงส่วนฐานของเยื่อหุ้มที่มีชั้นกล้ามเนื้อ (Mu) หุ้มอยู่ และมีกึ่งของเซลล์ (Cp) แทรกตัวผ่าน basement membrane (Bm) เข้าไปเชื่อมกับเยื่อหุ้ม ไซโทพลาสซึมด้านฐานมีความเข้มข้นกว่าด้านบนและมี infoldings ของเยื่อหุ้มเซลล์ (In) ยื่นเข้าไปเกือบถึงกลางเซลล์ และมี mitochondria (Mi) กระจายอยู่ห่าง ๆ
- D) ภาพกำลังขยายสูงแสดงกึ่งไซโทพลาสซึม (Cp) ของเซลล์เยื่อหุ้ม ที่ยื่นเข้าไปในช่องว่างของท่อที่มี eggshell granules (Eg) และ vitelline cell (Vc) อยู่

Figure 158

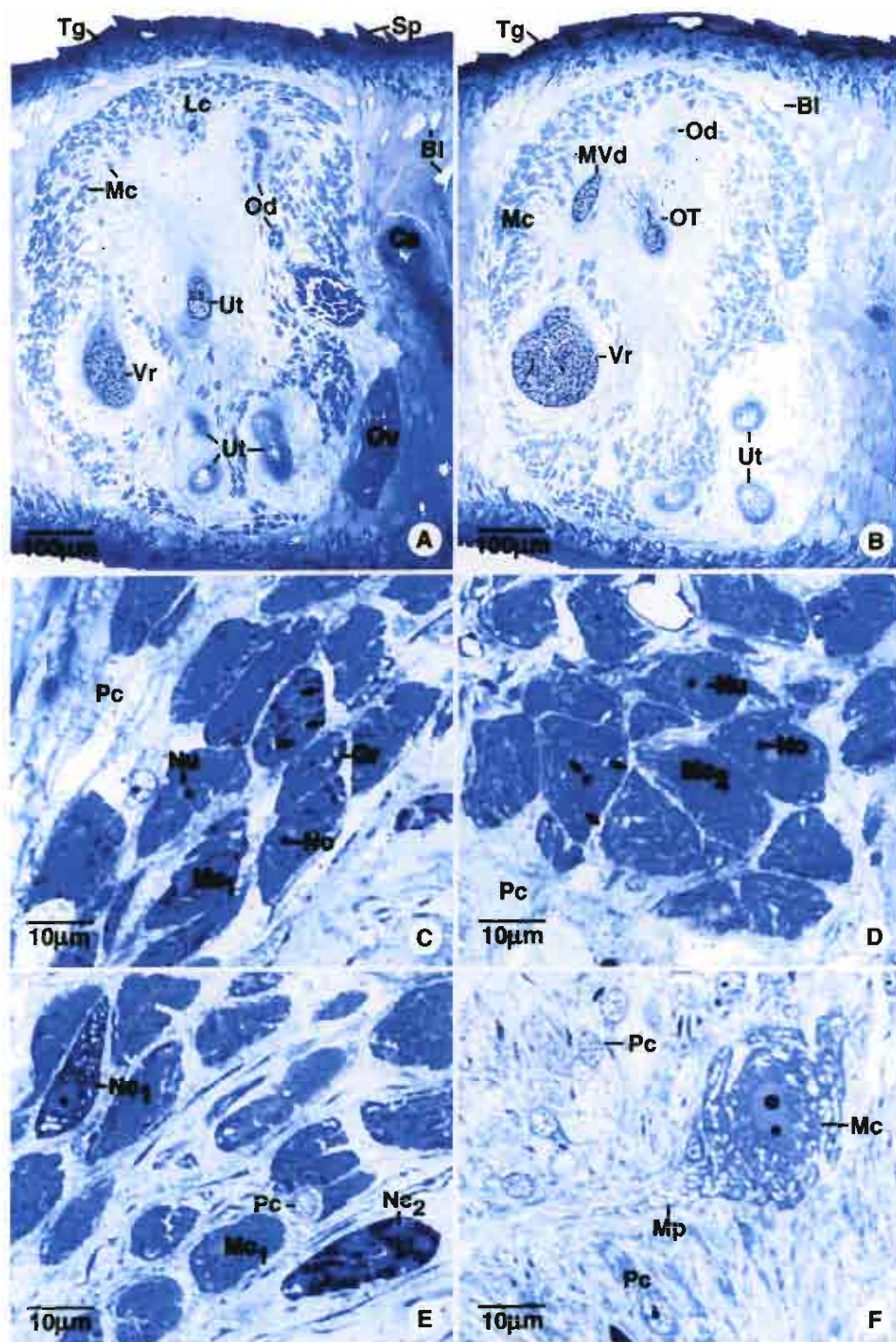


Figure 159

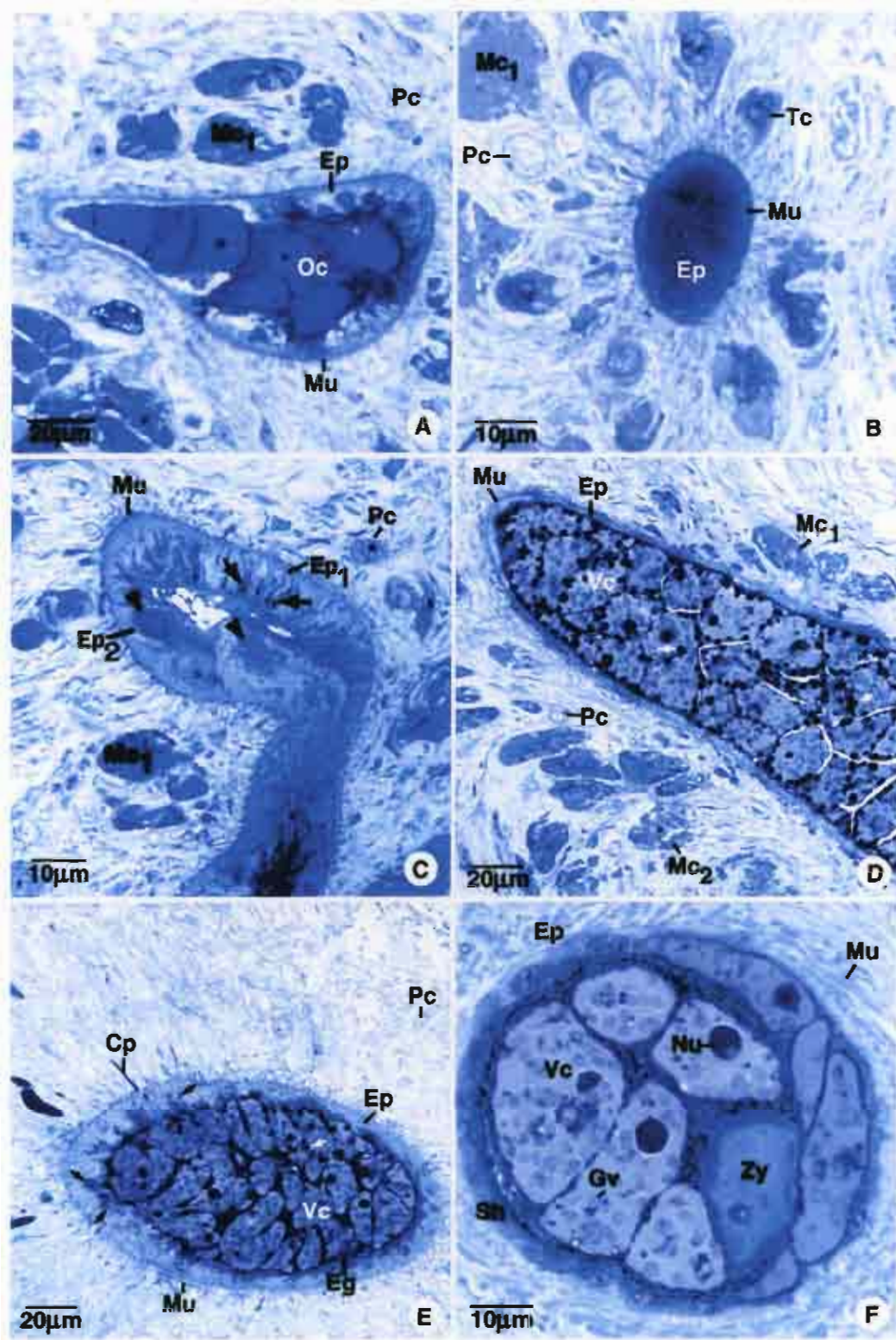


Figure 160

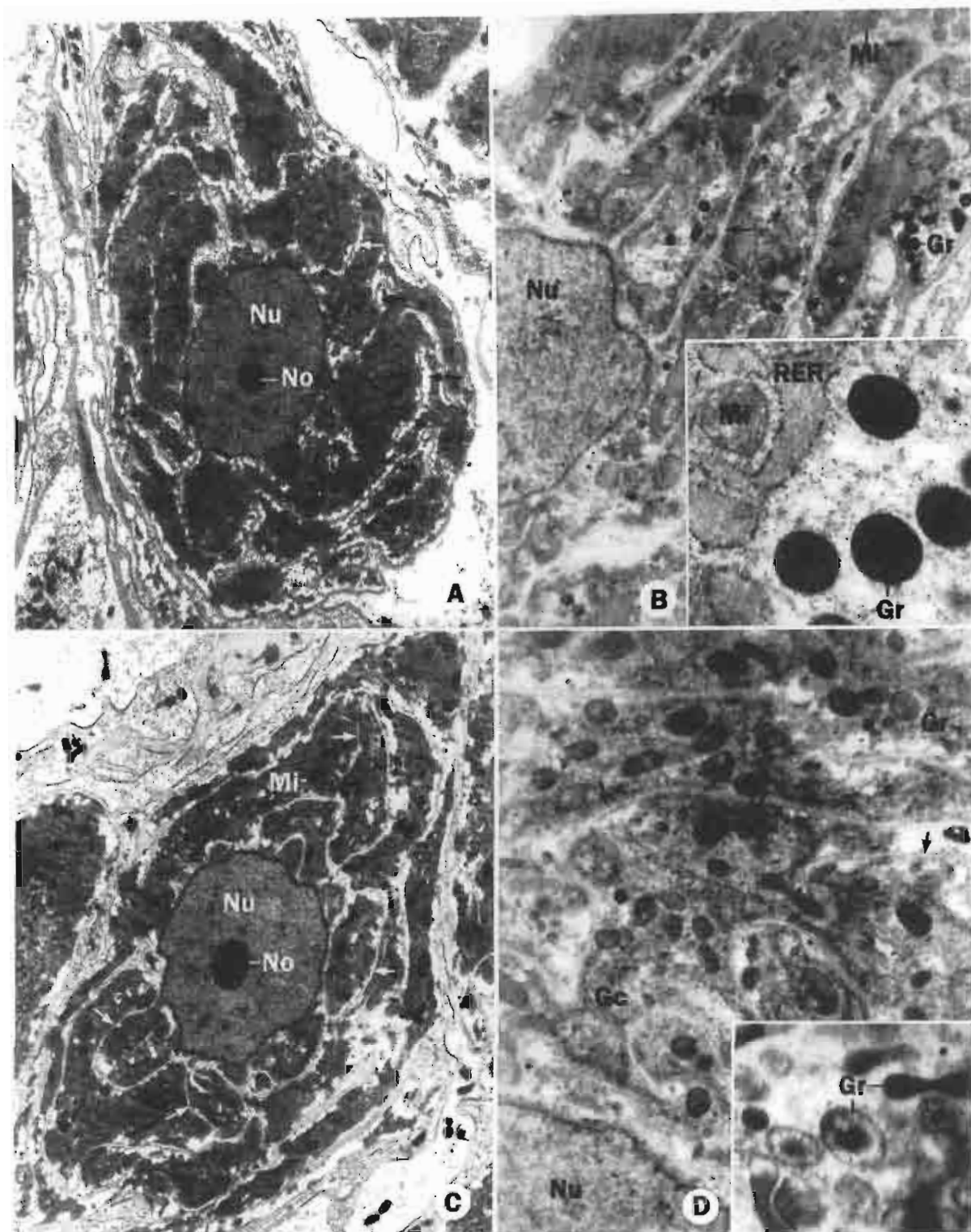


Figure 161

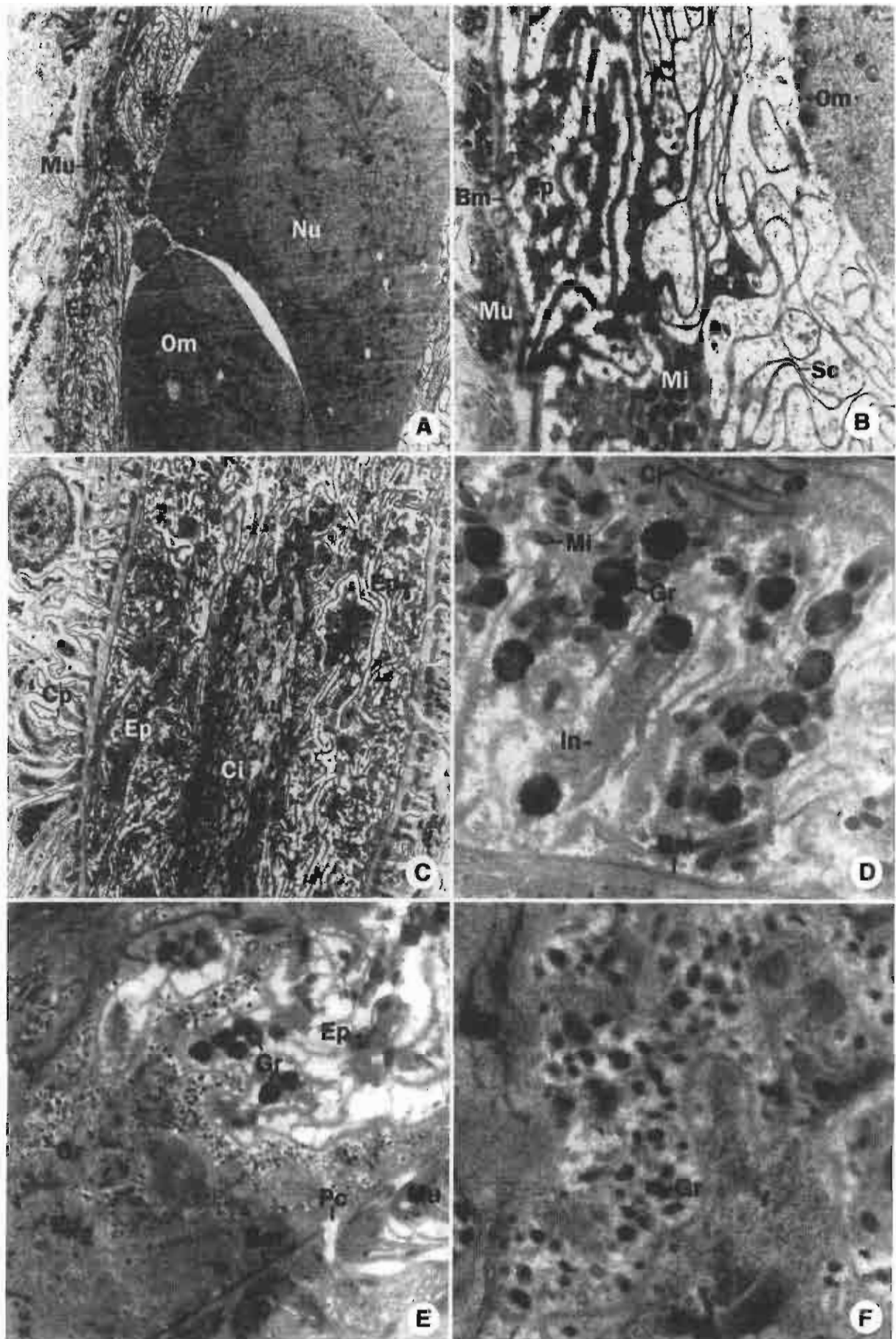


Figure 162

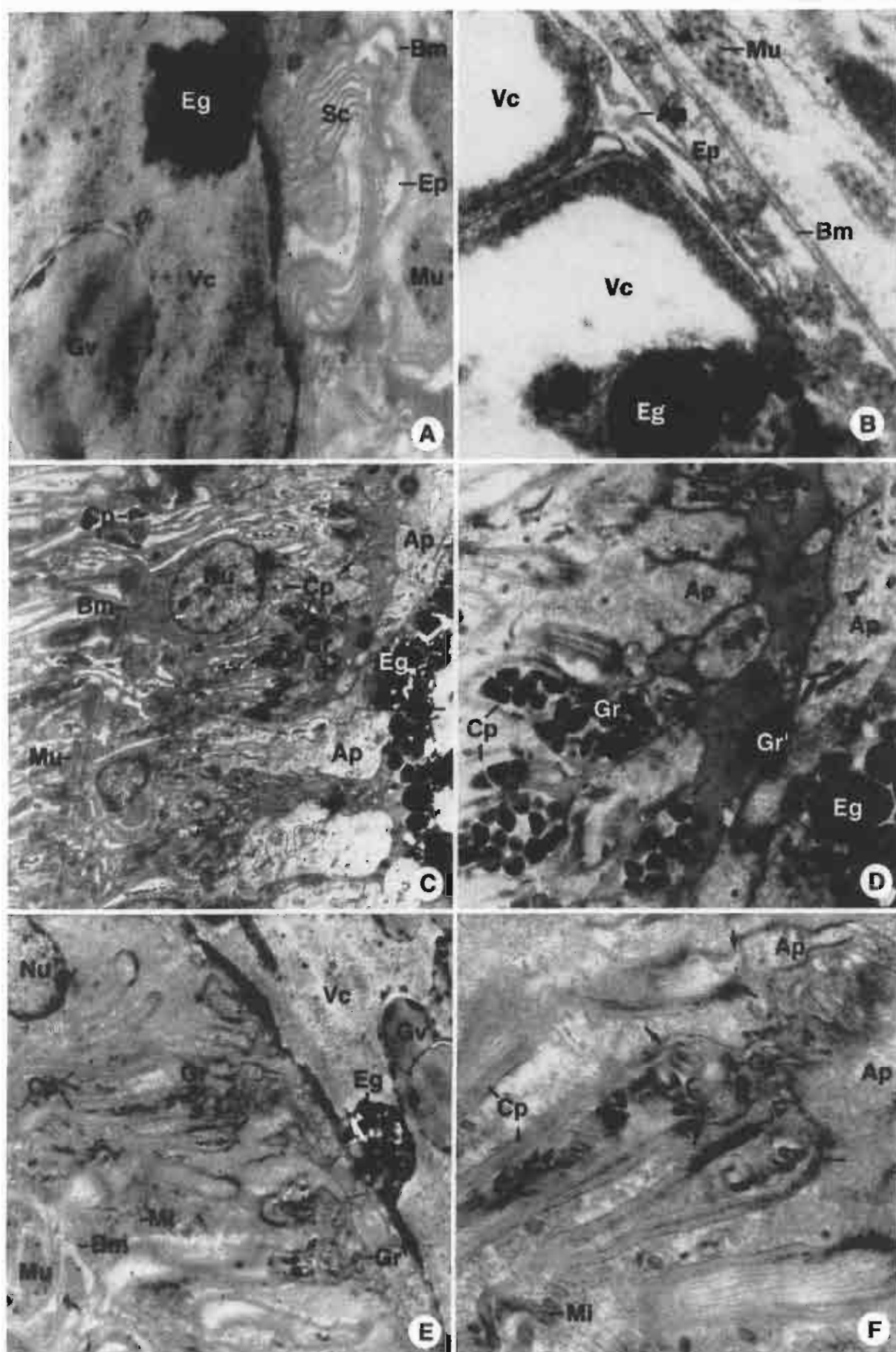
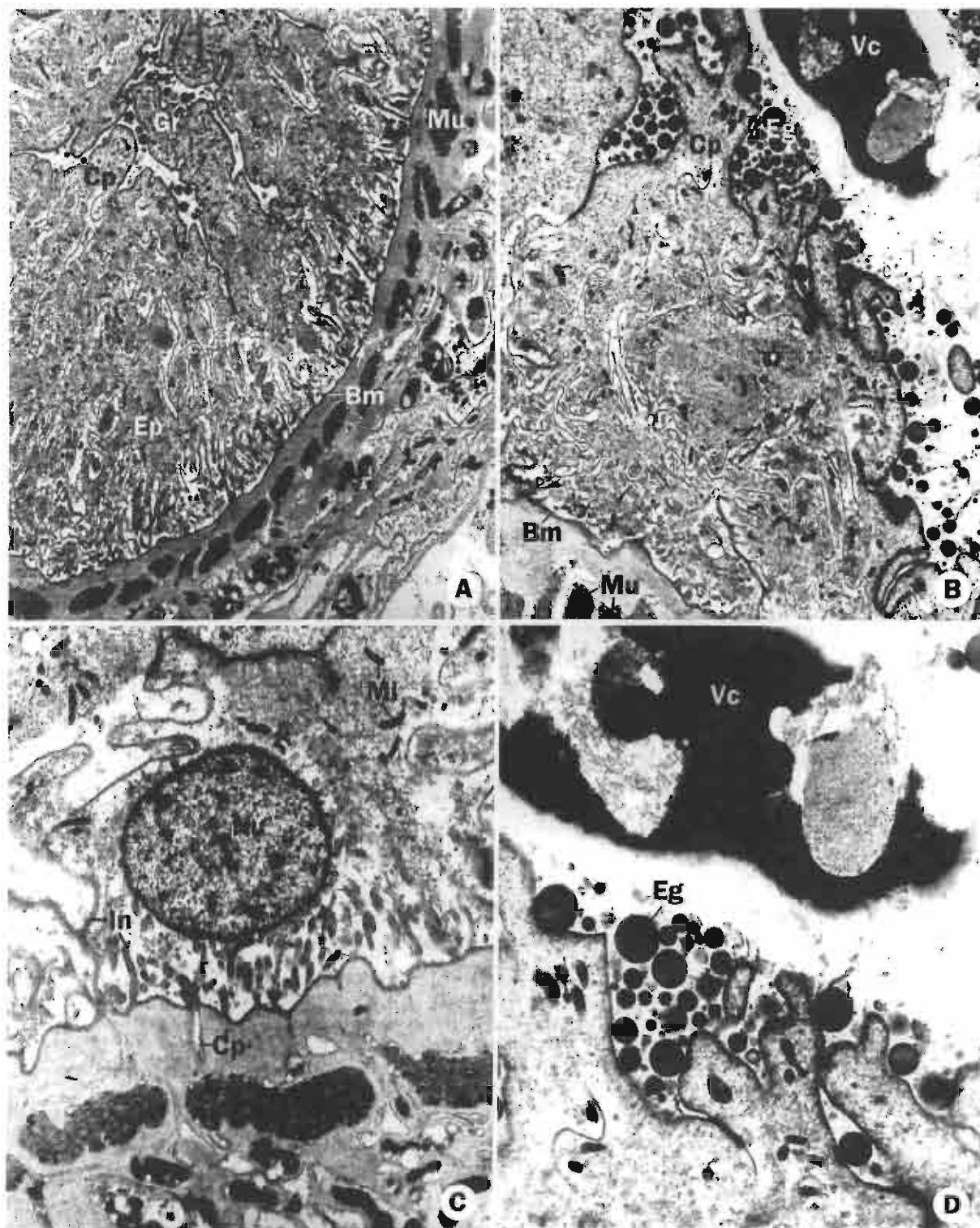


Figure 163



กลไกการสร้างเปลือกไข่

กระบวนการสร้างเปลือกไข่เริ่มต้นภายในท่อของ ootype โดย vitelline cells ที่ถูกลำเลียงจาก vitelline reservoir ผ่านทาง median vitelline duct เข้ามาในท่อของ ootype ที่ผนังของ ootype มีกิ่งของ Mehlis' gland cells จำนวนมากมาเปิดและหลังแกรนูลเข้าสู่ภายในท่อ สารถัดหลังจาก Mehlis' gland cells เหล่านี้ยังไม่มีการศึกษาว่าเป็นสารชนิดใดและหลังจากเซลล์ชนิดไหน แต่เชื่อกันว่าน่าจะเป็นสารที่หลั่งมาจาก Mehlis' gland cells type II เพื่อกระตุ้นให้ vitelline cells หลั่งสารที่อยู่ใน eggshell granules (รูปที่ 164A, B) ซึ่งพิสูจน์ชัดแล้วในพยาธิใบไม้ตับ *F. hepatica* และพยาธิใบไม้เลือดบางชนิดว่าประกอบด้วย eggshell precursor proteins และ phenol oxidase enzyme เอนไซม์ชนิดนี้จะทำหน้าที่เปลี่ยนกรดอะมิโน tyrosine ที่อยู่ใน eggshell precursor protein ให้เป็น DOPA สาร DOPA นี้จะมีคุณสมบัติในการทำปฏิกิริยา crosslink กับกรดอะมิโน Lysine ที่อยู่ใน eggshell precursor protein อีกเส้นหนึ่ง เป็นที่น่าแปลกใจว่าทั้ง eggshell precursor protein และ phenol oxidase enzyme ถูกบรรจุอยู่ในแกรนูลเดียวกันแต่ไม่ทำปฏิกิริยากันจนกระทั่งถูกหลั่งออกจากเซลล์ vitelline ได้มีการอธิบายในพยาธิใบไม้ชนิดอื่นว่า phenol oxidase enzyme ที่อยู่ในแกรนูลนั้นยังไม่สามารถทำงานจนกระทั่งได้รับการกระตุ้นจากสารชนิดอื่นก่อน เช่น Mehlis' gland ประกอบกับภายในแกรนูลนั้นมีสภาพเป็นกรดจึงไม่เหมาะต่อการทำปฏิกิริยาของ enzyme ชนิดนี้

การหลั่งของ egg shell granules ยังคงดำเนินต่อไปจนกระทั่งถึงส่วนต้นของ uterus (รูปที่ 164C; 165A) ซึ่งระหว่างการลำเลียงกลุ่มของเซลล์ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ไข่ (ovum) และ vitelline cells ประมาณ 30 เซลล์ จาก ootype ไปยัง uterus ส่วนต้นนั้น eggshell granules ที่ถูกหลั่งออกสู่ด้านนอกของกลุ่มเซลล์จะรวมกันเป็นก้อนที่มีขนาดใหญ่ขึ้น (รูปที่ 164D) และก้อนแกรนูลเหล่านั้นก็จะรวมตัวกันเป็นแผ่นของเปลือกไข่บาง ๆ ล้อมรอบกลุ่มของ ovum และ vitelline cells ดังกล่าวไว้ แกรนูลที่หลั่งออกจากส่วนกลางของกลุ่มเซลล์จะเคลื่อนตัวออกสู่ส่วนนอกและรวมกับเปลือกไข่ที่สร้างขึ้นก่อนหน้านี้ ทางด้านนอกของเปลือกไข่ระยะนี้ไม่มีการรวมตัวของ eggshell granules เลย ถึงแม้ว่าจะมีก้อนแกรนูลที่ถูกหลั่งมาจาก vitelline cells อีกระยะตาม ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าผิวด้านนอกของเปลือกไข่ระยะนี้ถูกห่อหุ้มไว้ด้วยสารบางตัวที่ถูกหลั่งออกมาจาก Mehlis' gland cell type II จนทำให้ผิวด้านนอกมีคุณสมบัติไม่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา crosslink ซึ่งก็เป็นการป้องกันไม่ให้ไข่ที่อยู่ข้างเคียงติดกับ

การสร้างเปลือกไข่ใน uterus ส่วนต้นนั้นยังไม่เสร็จสมบูรณ์แต่จะยังคงดำเนินต่อไปจนถึงส่วน uterus ที่อยู่นอก Mehlis' gland เมื่อไข่เคลื่อนผ่าน Mehlis' gland เปลือกไข่ยังคงมีช่องว่างเล็ก ๆ ติดกับภายนอกอยู่จำนวนหนึ่ง และใน uterus ส่วนนี้ก็ยังเป็นที่สะสมของ spermatozoa (รูปที่ 164E; 165B-D) จำนวนมาก ซึ่งจะเข้าไปทำการปฏิสนธิกับ ovum ที่อยู่ในเปลือกไข่ที่ยังไม่เสร็จสมบูรณ์โดยผ่านเข้าทางช่องว่างเล็ก ๆ เหล่านี้ เมื่อเวลาผ่านไปไข่ก็จะถูกกลืนไปตามท่อของ uterus เปลือกไข่ก็มีความสมบูรณ์ขึ้นเรื่อย ๆ โดยการเคลื่อนที่ของ eggshell granules ที่ถูกหลั่งออกมาจากส่วนกลางของกลุ่ม

เซลล์ vitelline ที่อยู่ภายในเปลือกไข่ เพื่ออุดช่องว่างเล็ก ๆ เหล่านั้นจนหมด และช่วยเสริมด้านในของเปลือกไข่ให้มีความหนาและความแข็งแรงขึ้นจนเป็นเปลือกไข่ที่สมบูรณ์ก่อนที่จะถูกปล่อยออกจาก genital pore ต่อไป (รูปที่ 164F) และเนื่องจากการปฏิสนธิเกิดขึ้นภายหลังการสร้างเปลือกไข่ซึ่งเป็นไปได้ว่าไข่จำนวนหนึ่งจะไม่ได้รับการปฏิสนธิและไม่สามารถพัฒนาต่อไปเป็นตัวอ่อนระยะ miracidia ได้

โดยสรุปจะเห็นว่า vitelline cells ที่พัฒนาจาก vitelline gland และ Mehlis' gland มีบทบาทที่สำคัญมากในการสร้างเปลือกไข่ และอาจเป็นเป้าหมายอีกจุดหนึ่งที่วัชชีนสามารถยับยั้งการสร้างไข่และเปลือกไข่ โดยการแทรกแซงกับการทำงานของอวัยวะทั้งสอง ดังกล่าวแล้ว วิธีการยับยั้งการทำงานของอวัยวะดังกล่าวที่อาจเป็นไปได้คือการเสาะหาวัชชีนหรือชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ที่สามารถกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีต่อเปลือกไข่ หรือสารเคมีที่สามารถระงับการเชื่อมโยงกันของ eggshell precursor proteins และ Mehlis' gland proteins ซึ่งจะทำให้เปลือกไข่ไม่พัฒนาหรือพัฒนาผิดปกติจนเป็นผลให้ไข่ไม่สมบูรณ์และช่วยตัดวงจรชีวิตของพยาธิได้

รูปที่ 164 ภาพ semithin sections ย้อมด้วย methylene blue แสดงกระบวนการสร้างไข่และเปลือกไข่

- A) ภาพ ootype ส่วนต้นแสดง กิ่งของเซลล์ Mehlis' gland (ลูกศร) แทรกผ่านกล้ามเนื้อ (Mu) เข้าไปในเยื่อหุ้ม (Ep) ootype และภายในท่อมมี vitelline cells (Vc) ที่ยังมี eggshell granules (Eg) อยู่ในไซโตพลาสซึม
- B) ภาพ ootype ส่วนปลายแสดง กิ่งของเซลล์ Mehlis' gland (ลูกศร) แทรกผ่านกล้ามเนื้อเข้าไปในเยื่อหุ้ม (Ep) ootype และภายในท่อมมี vitelline cells (Vc) และ eggshell granule ส่วนใหญ่ถูกผลักออกจากเซลล์ (Eg') ในขณะที่แกรนูลบางส่วน (Eg) ยังคงอยู่ภายในเซลล์
- C) ภาพ uterus ส่วนต้น แสดง vitelline cells ที่หุ้ม eggshell granule (Eg') ออกไปอยู่ระหว่างเซลล์ Ep – epithelium ของ uterus, Mu – muscle, Gv – glycan vesicle, Nu – nucleus ของ vitelline cell
- D) ภาพ uterus ส่วนต้น แสดง vitelline cells ที่หุ้ม eggshell granule (Eg') ออกไปอยู่ระหว่างเซลล์ และเปลือกไข่ (Sh) ที่เพิ่งถูกสร้างจากแกรนูลที่เคลื่อนไปอยู่บริเวณด้านนอกของกลุ่ม vitelline cells, Ep – epithelium ของ uterus, Mu – muscle, Gv – glycan vesicle, Nu – nucleus ของ vitelline cell
- E) ภาพ uterus ส่วนปลาย แสดงกลุ่มของ vitelline cells (Vc) ถูกล้อมรอบด้วยเปลือกไข่ (Sh) ที่ยังไม่สมบูรณ์ ซึ่งมีช่องว่าง (ลูกศร) และ eggshell granules ที่อยู่ภายนอกเซลล์ (Eg') ด้านนอกของเปลือกไข่มีเซลล์อสุจิ (Sz) สะสมอยู่จำนวนมาก Op – operculum
- F) ภาพไข่ที่สมบูรณ์ มีเปลือกไข่ (Sh) หนา และภายในมีเซลล์ไข่ที่ได้รับการผสมแล้ว (Zy) และ vitelline cell ที่กำลังสลายตัว (Dv) ล้อมรอบอยู่ Op – operculum

รูปที่ 165 ภาพ TEM แสดงการสร้างไข่และเปลือกไข่

- A) แสดงการหลั่งของ eggshell granules (Eg) จาก vitelline cell (Vc) โดยสังเกตจากการหลวมตัวของ eggshell granules ที่อยู่ภายในเซลล์ และมี eggshell granules ขนาดเล็กกระจายอยู่ในช่องของ uterus, Ep = เยื่อหุ้มของ uterus, Mu = ชั้นกล้ามเนื้อ
- B) แสดงระยะที่มีการสร้างเปลือกไข่ (Sh) ที่ยังไม่สมบูรณ์ ภายในไข่มี vitelline cells (Vc) ที่กำลังหลั่ง eggshell granules (Eg) ออกสู่ช่องว่างระหว่างเซลล์และเปลือกไข่บางๆ (Sh) ที่เกิดขึ้นแล้ว Ep = เยื่อหุ้มของ uterus, Mu = ชั้นกล้ามเนื้อ
- C) แสดง vitelline cells (Vc) และ eggshell granules (Eg) ขนาดต่างๆ ที่เชื่อมเข้ากับผิวด้านในของเปลือกไข่ (Sh), Gv = glycan vesicle
- D) แสดงการรวมกันของ eggshell granules (Eg) ที่ถูกหลั่งออกมาจาก vitelline cell (Vc) เข้ากับด้านในของเปลือกไข่ (Sh และลูกศร), Gv = glycan vesicle, RER = rough endoplasmic reticulum, Ut = uterus

Figure 164

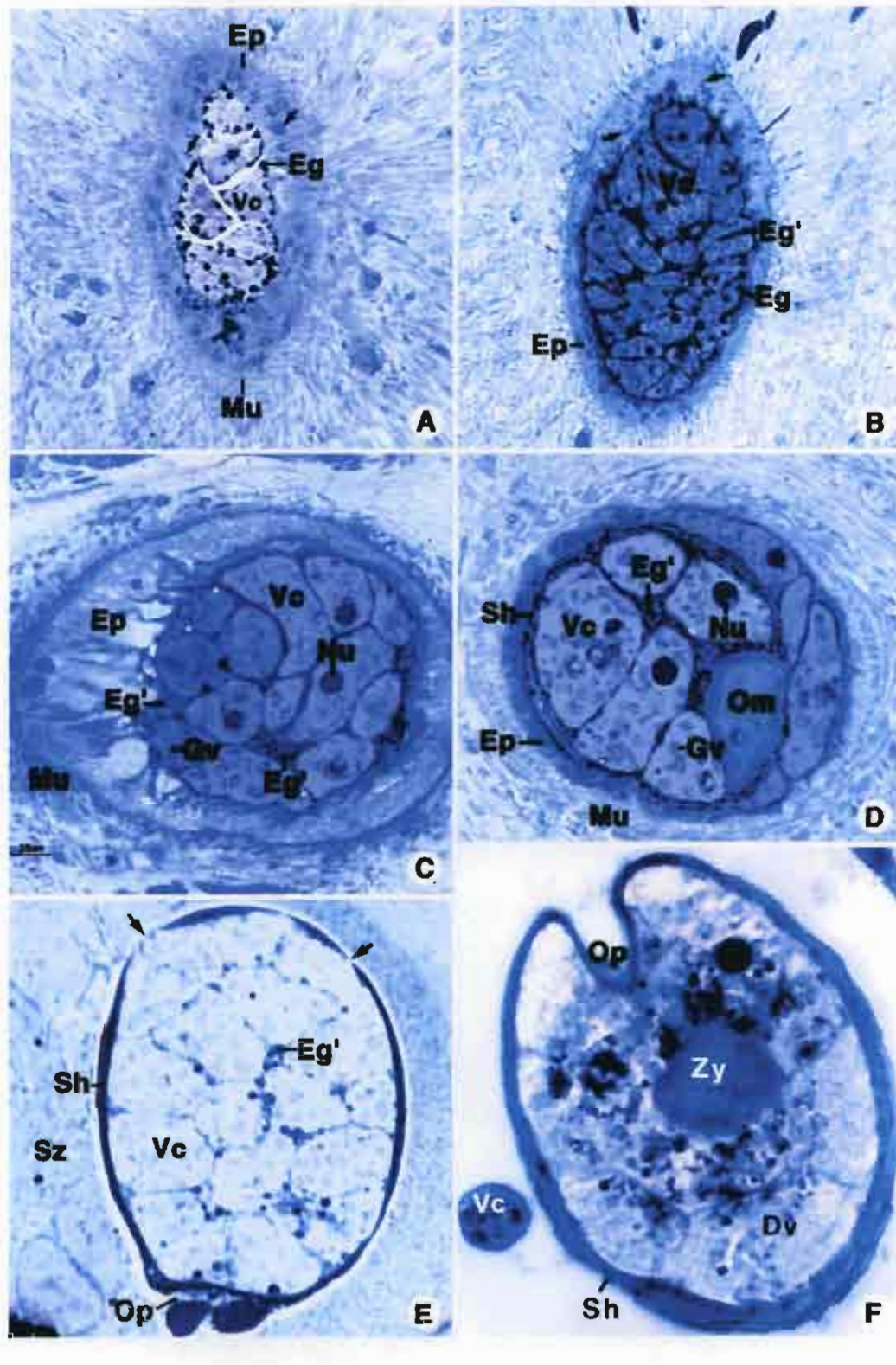
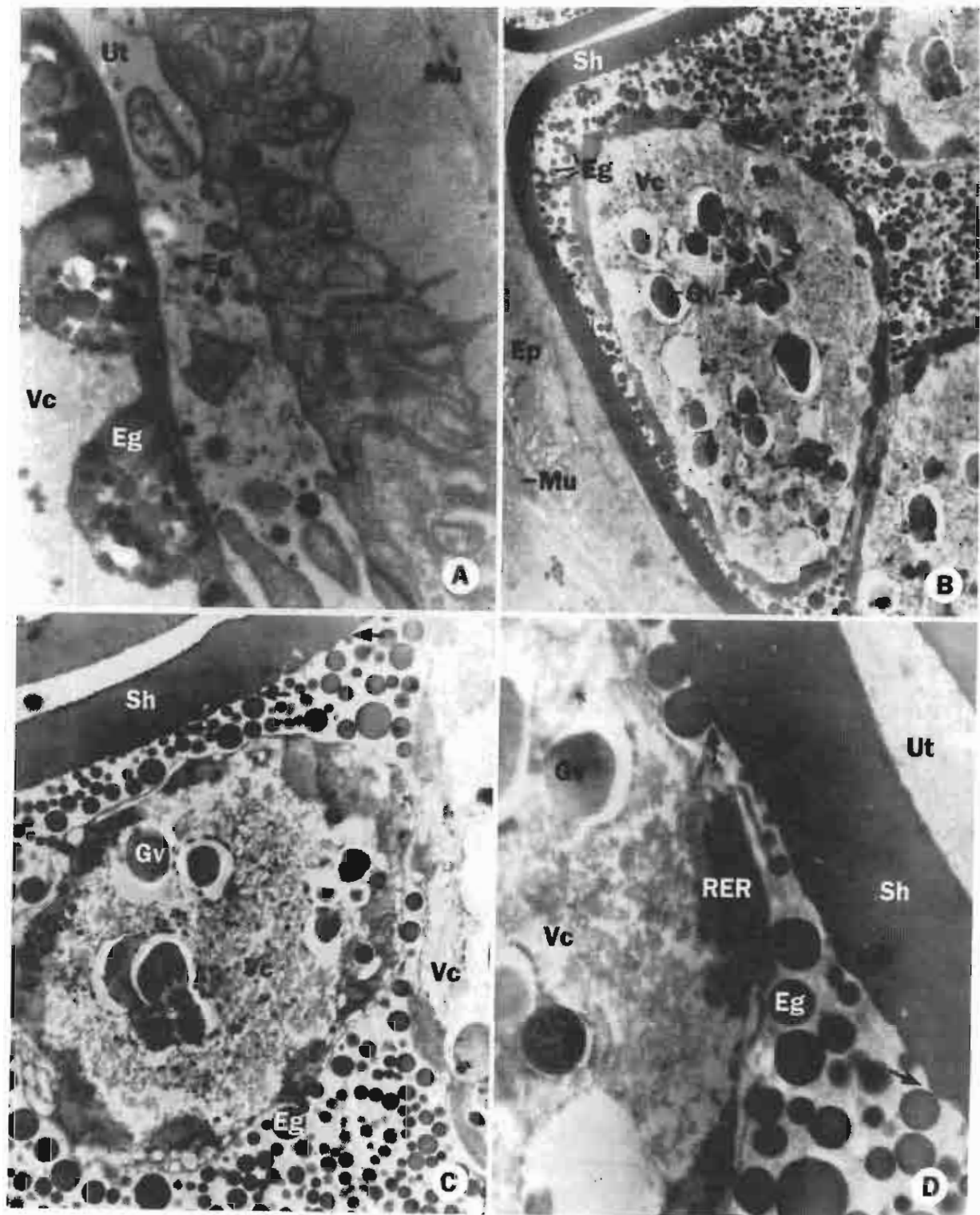


Figure 165



2.4 การทดสอบอิทธิพลของแอนติบอดีต่อวัคซีนตัวเล็กกับเนื้อเยื่อของพยาธิ และการทำลายพยาธิ

เราได้ศึกษาอิทธิพลของแอนติบอดีชนิดต่างๆ คือ เซรุ่มของวัวติดเชื้อ (cattle-infected serum - CIS) โมโนโคลนัลแอนติบอดี (MoAb) ต่อ GST และต่อ FABP ในการทำลายพยาธิตัวเต็มวัยและอัตราการอยู่รอดของพยาธิตัวเต็มวัย โดยใช้วิธีทดสอบแบบ in vitro antibody-killing assay กล่าวคือ นำพยาธิตัวเต็มวัยที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์มาล้างด้วยน้ำเกลือหลายครั้งเพื่อให้ผิวสะอาด จากนั้นตรวจดูว่าพยาธิยังมีชีวิตอยู่โดยยังแสดงอาการบิดคดและเคลื่อนไหวอย่างปกติ จากนั้นนำพยาธิไปแช่ในสารละลายที่มีแอนติบอดีผสมอยู่กับ 10% fetal calf serum และ 10 µg/ml gentamycin ที่ 37 °C ในบรรยากาศ 5% CO₂ สารละลายแอนติบอดีที่ใช้คือ culture fluid ที่มีโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อ GST และ FABP โดยไม่เจือจาง และ 50% CIS เจือจางโดย RPMI ส่วนกลุ่มควบคุมแช่ใน RPMI เมื่อแช่พยาธิครบเวลา 1, 3, 6, 12 ชั่วโมง ก็นำเอาตัวอย่างพยาธิออกมาแช่ใน 4% glutaraldehyde และ 2% paraformaldehyde ใน 0.1 M PBS ที่ 4 °C นาน 3-4 ชั่วโมง เพื่อเตรียมสำหรับการตรวจดูด้วย SEM ผลปรากฏว่า พยาธิในกลุ่มควบคุมที่ล้างโดยน้ำเกลือ (รูปที่ 166A-F) และแช่ใน RPMI 12 ชั่วโมง (รูปที่ 167A-F) แล้วนำไปเตรียมตรวจดูโดย SEM แสดงทุกส่วนของพยาธิและองค์ประกอบของผิวเช่น หนาม fold, ridges, sensory papillae ที่คลุมลำตัวอยู่มีสภาพปกติและพยาธิสามารถมีชีวิตใน RPMI ได้เกิน 48 ชั่วโมง ส่วนในกลุ่มที่แช่อยู่ CIS พบว่าเริ่มมีขุยเกิดขึ้นบนผิวคลุมหนามและผิวระหว่างหนามเมื่อเวลาผ่านไปเพียง 1-3 ชั่วโมง (รูปที่ 168A-F) ที่กำลังขยายสูงขุยเหล่านี้คือชั้นบนของผิวที่หลุดลอกออกมา ขุยเหล่านี้เป็นแผ่นใหญ่ขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง (รูปที่ 169A-C) และในที่สุด ผิวบางแห่งจะหลุดลอกออกมาเป็นแผ่นที่มีขนาดใหญ่เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง (รูปที่ 169D-F)

กลุ่มที่แช่ใน MoAb GST แสดงการเปลี่ยนแปลงที่ผิวอย่างรวดเร็วภายใน 1 ชั่วโมง โดยปรากฏเป็นตุ่มที่พองออกมา ณ บริเวณหนามและบริเวณผิวที่อยู่ติดกับโคนหนาม (รูปที่ 170A-C) ตุ่มที่พองออกมามีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อย ๆ จนตุ่มบางอันแตก และหนามหลุดออกไปเมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมง (รูปที่ 170D-F; 171A-C) ผิวที่มีการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะมีบริเวณที่แผ่กว้างออกไปเรื่อย ๆ จนพบว่ามีส่วนของทั้งหนามและผิวที่หลุดลอกออกไป จนทำให้ผิวถูกกัดเซาะลึกลงจนถึงชั้น basement membrane หลังจาก 12 ชั่วโมง (รูปที่ 171D-F)

กลุ่มที่แช่ใน MoAb FABP ก็แสดงปฏิกิริยารุนแรงเช่นเดียวกันกับ MoAb GST โดยมีตุ่มพองออกมาจากหนามและผิวเมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง (รูปที่ 172A, B) ตุ่มเหล่านี้มีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อย ๆ และ มีปริมาณมากขึ้นทั่วทุกบริเวณของผิว (รูปที่ 172C, D) ในที่สุดตุ่มส่วนมากจะแตกออกทำให้ผิวพ่นและ เป็นแผ่นหลุดลอกออกจนสังเกตเห็นชั้นผิวถูกกัดเซาะลึกเมื่อเวลาผ่านไปเพียง 12 ชั่วโมง (รูปที่ 172E-G)

อย่างไรก็ตามดูเหมือนว่าพยาธิตัวเต็มวัยยังสามารถมีชีวิตและเคลื่อนไหวอยู่ได้แม้เวลาจะผ่านไป 12 ชั่วโมงแล้วก็ตาม ถึงแม้ว่าผิวบางส่วนจะถูกทำลายและหลุดลอกออกไป ทั้งนี้เนื่องจากพยาธิตัวเต็มวัยมีขนาดใหญ่และมีความยากที่จะซ่อมแซมชั้นผิวใหม่ทดแทนส่วนที่ถูกทำลายไปได้ เมื่อเราได้ผลิต MoAb

ต่อ GST, FABP และ tegumental antigens ได้ปริมาณมากพอแล้วก็ทำการทดสอบการออกฤทธิ์ของ MoAb ในการเปลี่ยนแปลงทำลายชั้นผิวและอัตราการฆ่าพยาธิในระยะต้น (newly excysted juveniles) ต่อไป ซึ่งคาดว่าพยาธิในระยะต้นดังกล่าวน่าจะถูกทำลายได้โดยแอนติบอดีเนื่องจากพยาธิยังมีขนาดเล็กมาก และยังไม่ได้พัฒนากลไกการเลี่ยงภูมิคุ้มกันที่สมบูรณ์เช่นที่มีอยู่ในพยาธิตัวเต็มวัย อย่างไรก็ตามจะเห็นว่าแอนติบอดีต่อ FABP และ GST มีอิทธิพลต่อชั้นผิวมากแม้แต่ในพยาธิตัวเต็มวัยที่ได้พัฒนากลไกในการเลี่ยงภูมิคุ้มกันและประสิทธิภาพในการซ่อมแซมผิวสูงแล้วก็ตาม

- รูปที่ 166 A-F) ภาพ SEM แสดงผิวของพยาธิตัวเต็มวัยที่เพิ่งเก็บจากตับและถุงน้ำดีของโค แสดงลักษณะ
ผิวที่ปกติเช่นเดียวกับที่แสดงและบรรยายโดยละเอียดแล้วในรูปที่ 116-119 Os – oral
sucker, Vs – ventral sucker, Sp – spine, fo – fold, pa – papillae, ri – ridges
- รูปที่ 167 A-F) ภาพ SEM ของพยาธิตัวเต็มวัยหังขเกลี้ยงใน RPMI medium เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สภาพ
และลักษณะของผิวยังดูปกติดีเมื่อเทียบกับรูปที่ 166
- รูปที่ 168 A-C) ภาพ SEM ของพยาธิตัวเต็มวัยหลังจากแช่ในเซรัมของวัวที่ติดเชื้อพยาธิ (cattle-infected
serum – CIS) 1 ชั่วโมง แสดงขุบ (ลูกศร) ที่ปรากฏบนผิวของหนาม (Sp) และบริเวณผิว
ระหว่างหนาม (fo ในภาพ A และ C)
D-F) ภาพผิวพยาธิหลังจากแช่ใน CIS 3 ชั่วโมง แสดงการลอกของผิว (ลูกศร) จากบริเวณหนาม
(Sp ในภาพ E) และบริเวณผิวระหว่างหนาม (ภาพ F)
- รูปที่ 169 A-C) ภาพ SEM ของผิวพยาธิตัวเต็มวัยหลังจากแช่ใน CIS 6 ชั่วโมง แสดงการหลุดลอกของชั้นผิว
(ลูกศร) ที่ลึกลงและแผ่บริเวณกว้างขึ้น
D-F) ภาพ SEM ของผิวพยาธิตัวเต็มวัยหลังจากแช่ใน CIS 12 ชั่วโมง แสดงการหลุดลอกของผิว
บริเวณกว้างขึ้น (ลูกศร) ทั้งจากชั้นผิวที่คลุมหนาม (Sp ภาพ E) และจากบริเวณ ผิวรอบ ๆ
papillae (Pa – ภาพ F)
- รูปที่ 170 A-C) ภาพ SEM ผิวพยาธิตัวเต็มวัยหลังจากที่แช่ในโมโนโคลนัลแอนติบอดี (MoAb) ต่อ rGST
(clone 3A3) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แสดงการลอกออกของผิวที่คลุมหนาม (Sp) และบริเวณโคน
ของหนาม (ลูกศร) ภาพ C แสดงตุ่ม (bleb) (ลูกศร) ที่พองออกจากผิวบริเวณ fold (fo)
D-F) ภาพผิวพยาธิตัวเต็มวัยหลังจากที่แช่ใน MoAb ต่อ rGST (clone 3A3) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
แสดงการหลุดของหนามออกจากผิว (ภาพ D) และตุ่มที่พองออกจากผิว (ภาพ E) ในภาพ F
แสดงผิวลอกออกเป็นบริเวณกว้าง (ลูกศร) และหนาม (Sp, Sp') ที่หลุดออกไปแล้วและคง
เหลือแต่เฉพาะแองก์ที่เคยมีหนามอยู่
- รูปที่ 171 A-C) ภาพ SEM ผิวของพยาธิตัวเต็มวัยหลังจากแช่ใน MoAb ต่อ rGST 6 ชั่วโมง แสดงการพอง
ออกเป็นตุ่มเล็ก ๆ (ภาพ C) การลอกหลุดของผิวและหนามเป็นบริเวณกว้างขึ้น (ภาพ A, B)
D-F) ภาพผิวพยาธิตัวเต็มวัยหลังจากแช่ใน MoAb ต่อ rGST 12 ชั่วโมง แสดงการกักร่อนของ
ผิวเป็นบริเวณกว้างและลึกลง (ลูกศร) หนาม (Sp) หลุดออกไปเกือบหมด

- รูปที่ 172 A, B) ภาพ SEM ของผิวพยาธิตัวเต็มวัยหลังการแช่ใน MoAb ต่อ rFABP (clone 6F3-2) 1 ชั่วโมง แสดงขุยและตุ่มเล็ก ๆ (BI) ที่พองและลอกออกจากผิว (ลูกศร)
- C, D) ภาพ SEM ของผิวพยาธิตัวเต็มวัยหลังการแช่ใน MoAb ต่อ rFABP 6 ชั่วโมง แสดงตุ่มผิวเรียบขนาดต่างๆ (b11, b12) ที่พองออกจากผิว และกลุ่มที่เริ่มยุบตัวลงและแตกออก (b13, b14) ซึ่งทำให้ผิวเริ่มกลายเป็นแผล (รูป D)
- E-G) ภาพ SEM ของผิวพยาธิตัวเต็มวัยหลังการแช่ใน MoAb ต่อ rFABP 12 ชั่วโมง แสดงการหลุดลอกและกักร่อนของผิวออกเป็นบริเวณกว้าง (Ls – ลูกศร ในภาพ E) และตุ่ม (b1) ขนาดต่าง ๆ ที่พองออกมาจากชั้นผิวหนังหนาม (Sp) และบริเวณระหว่างหนาม (ภาพ F และ G)

Figure 166

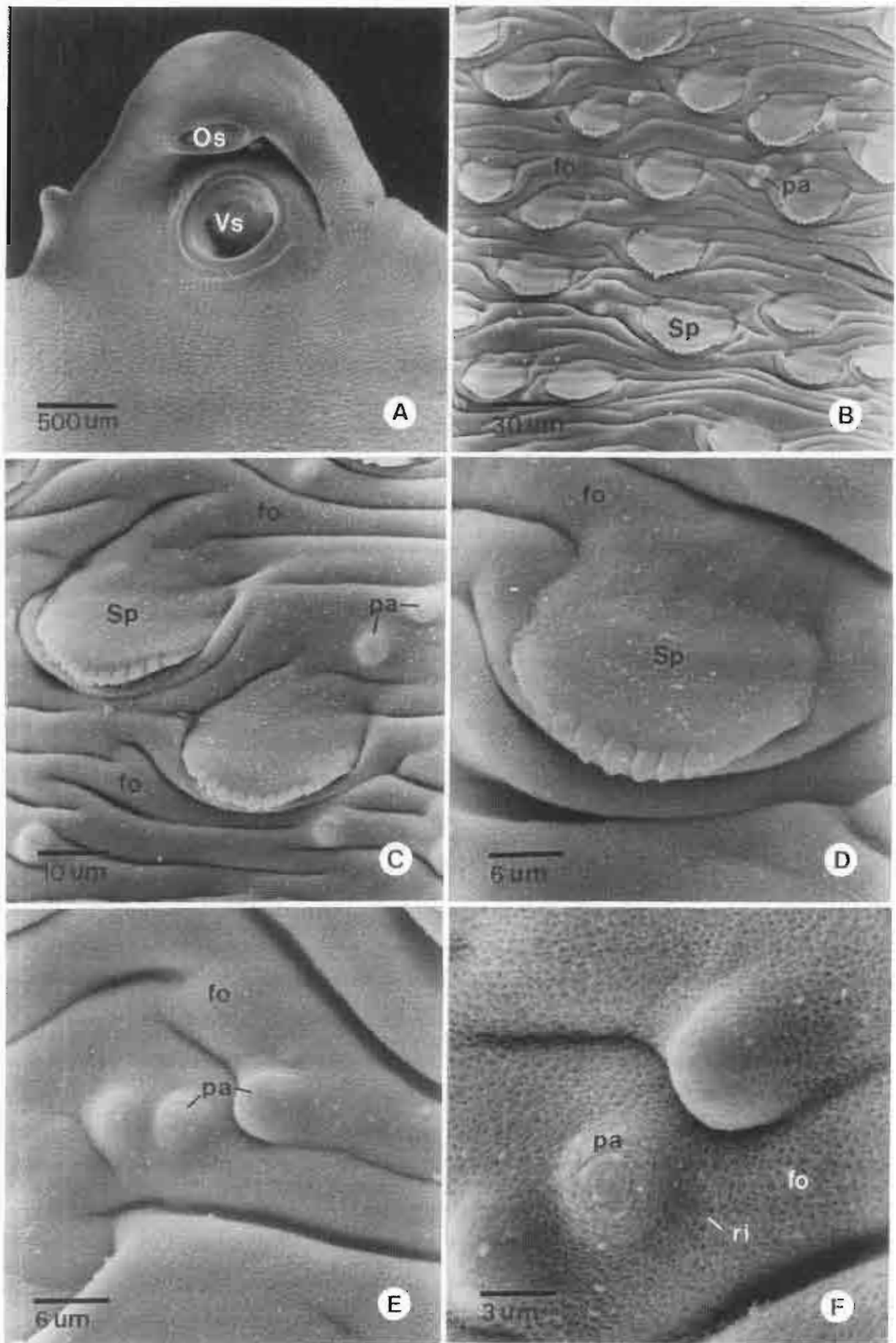


Figure 167

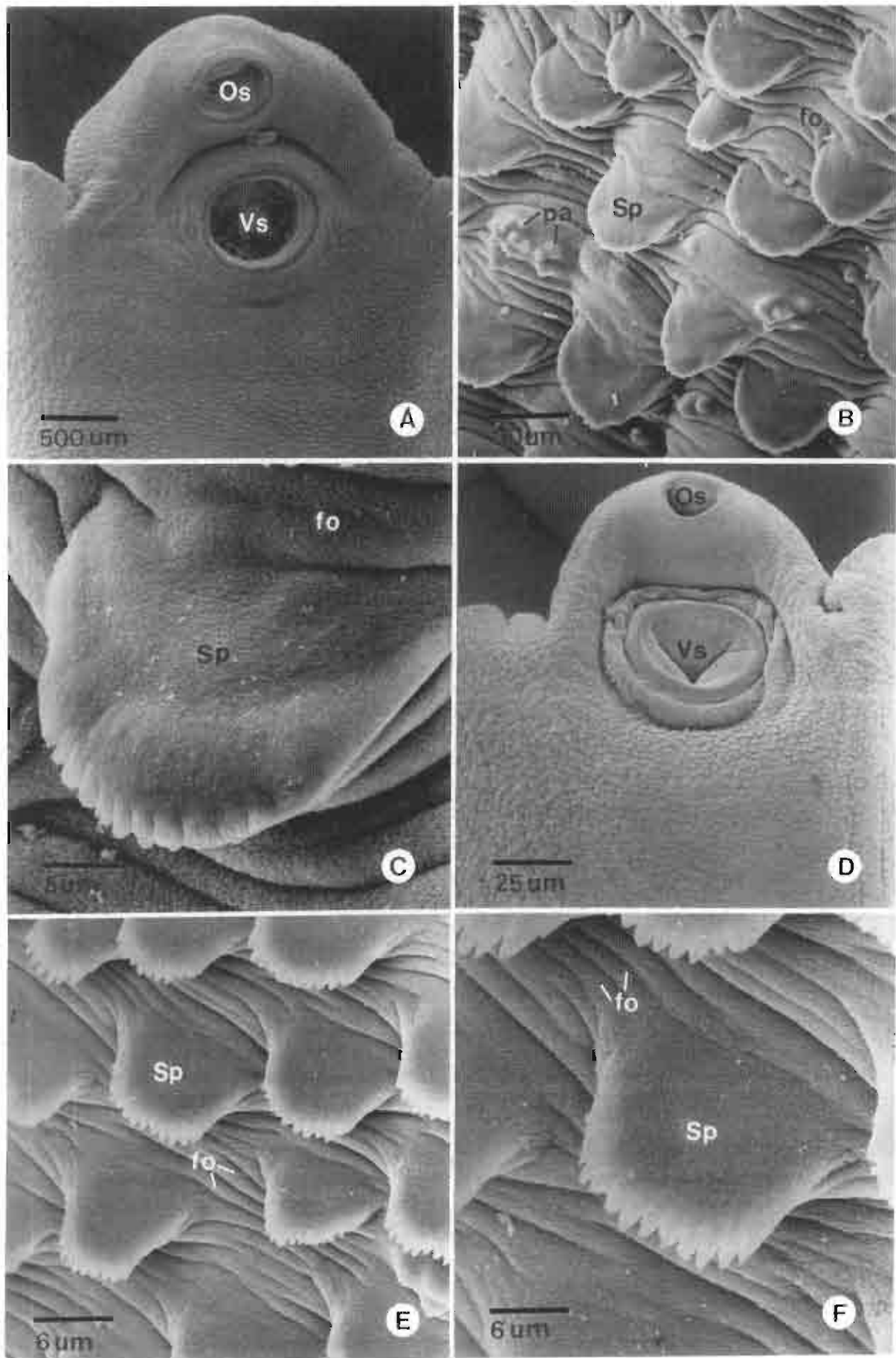


Figure 168

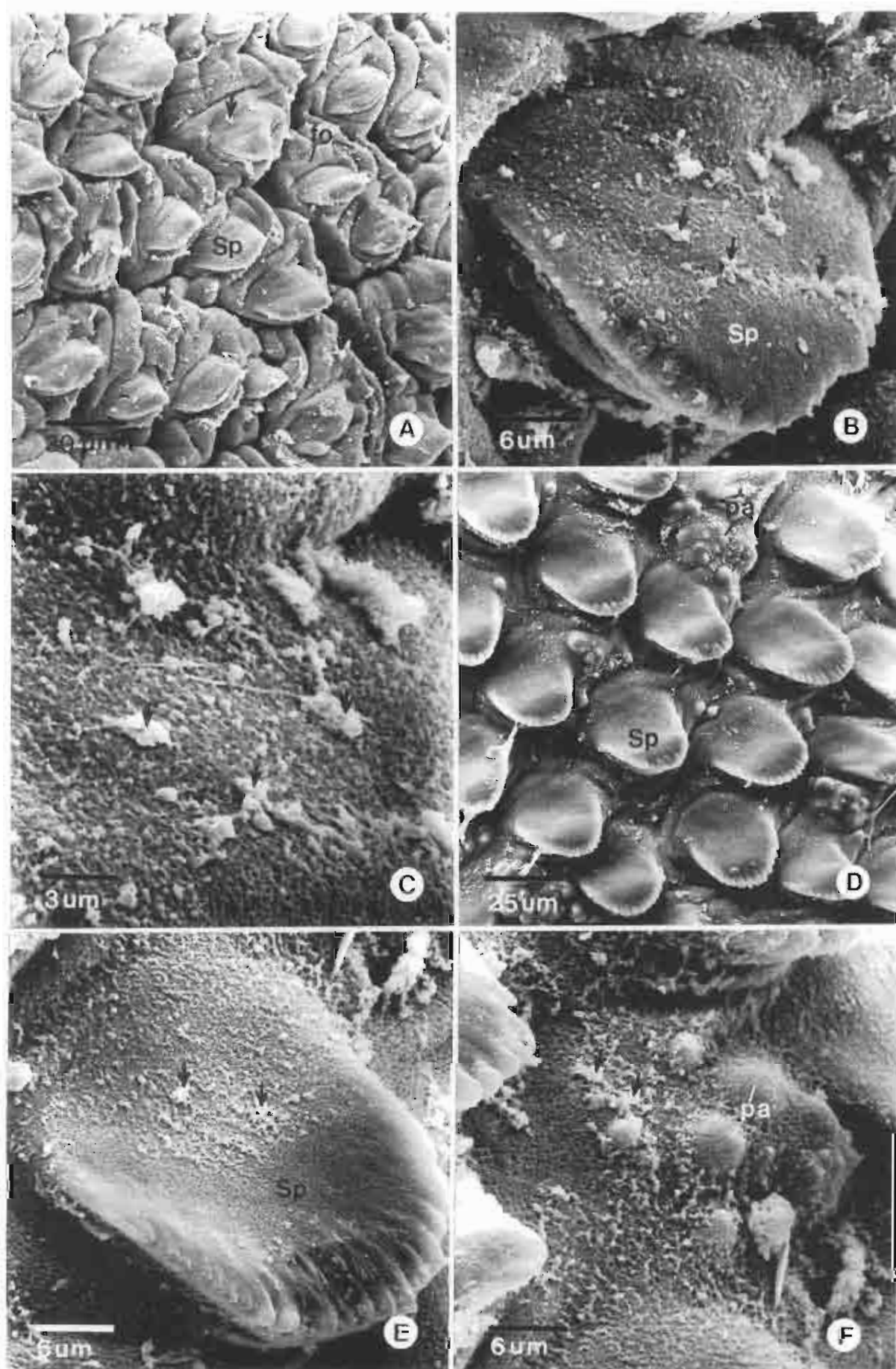


Figure 169

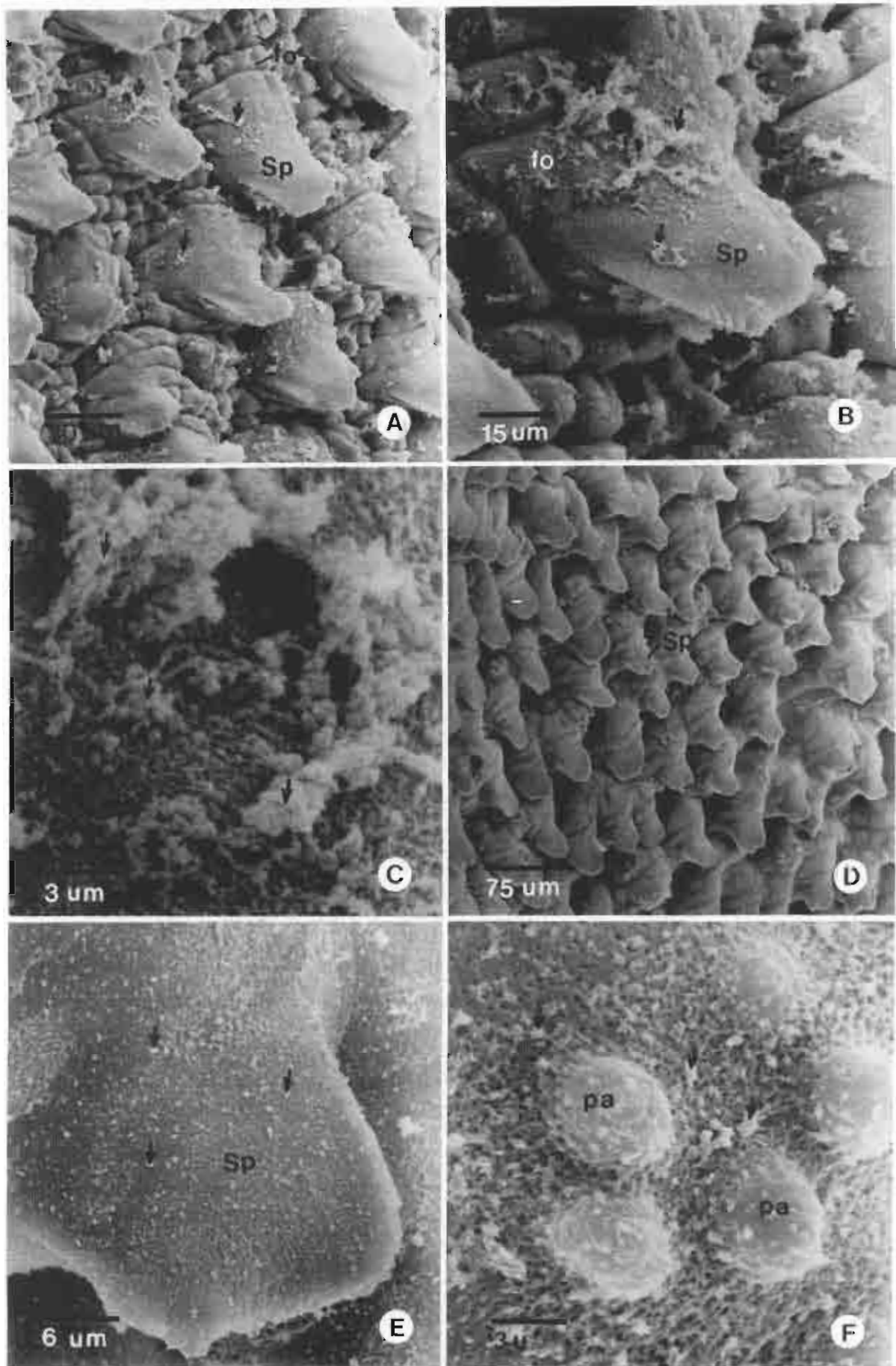


Figure 170

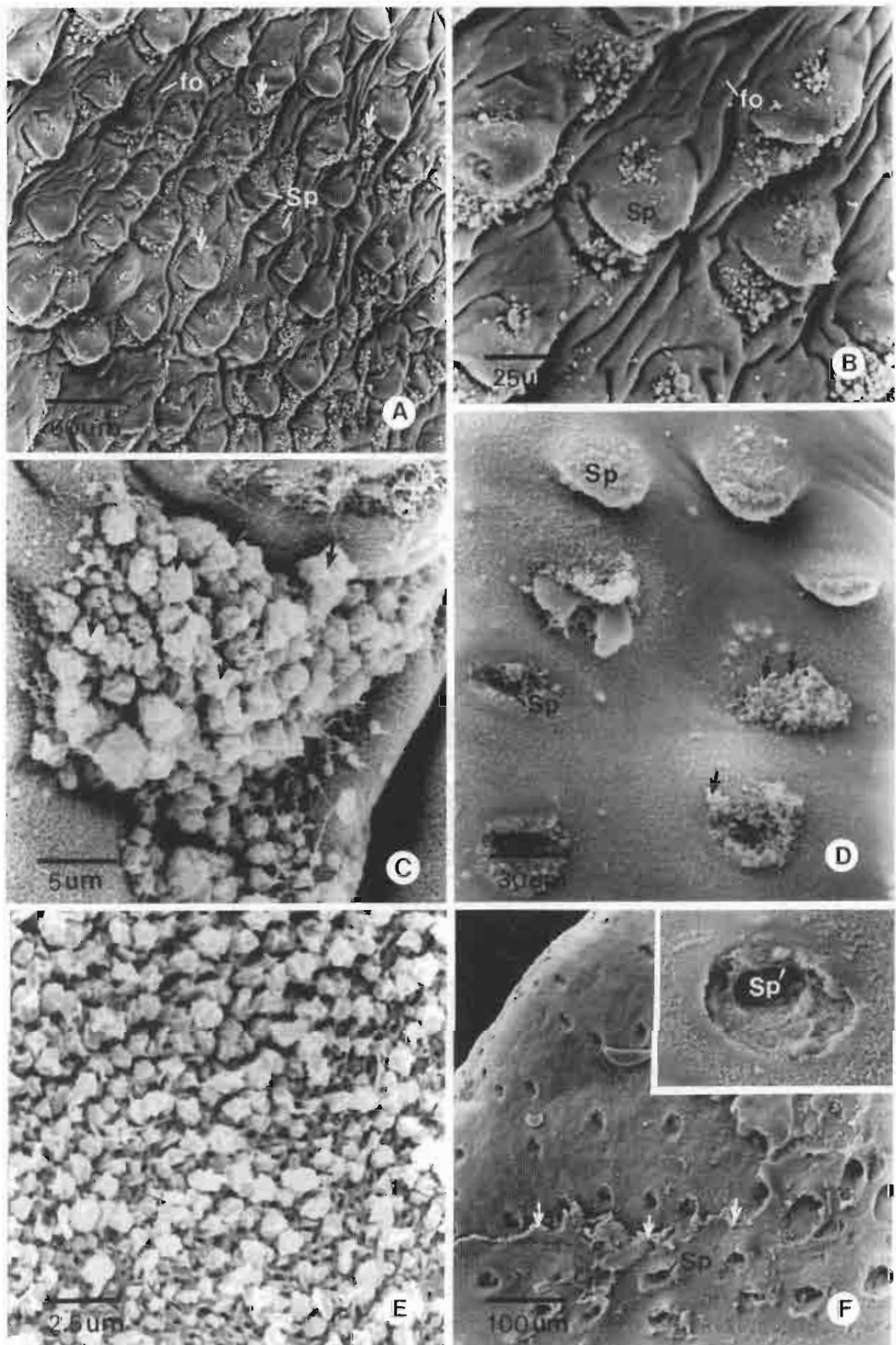


Figure 171

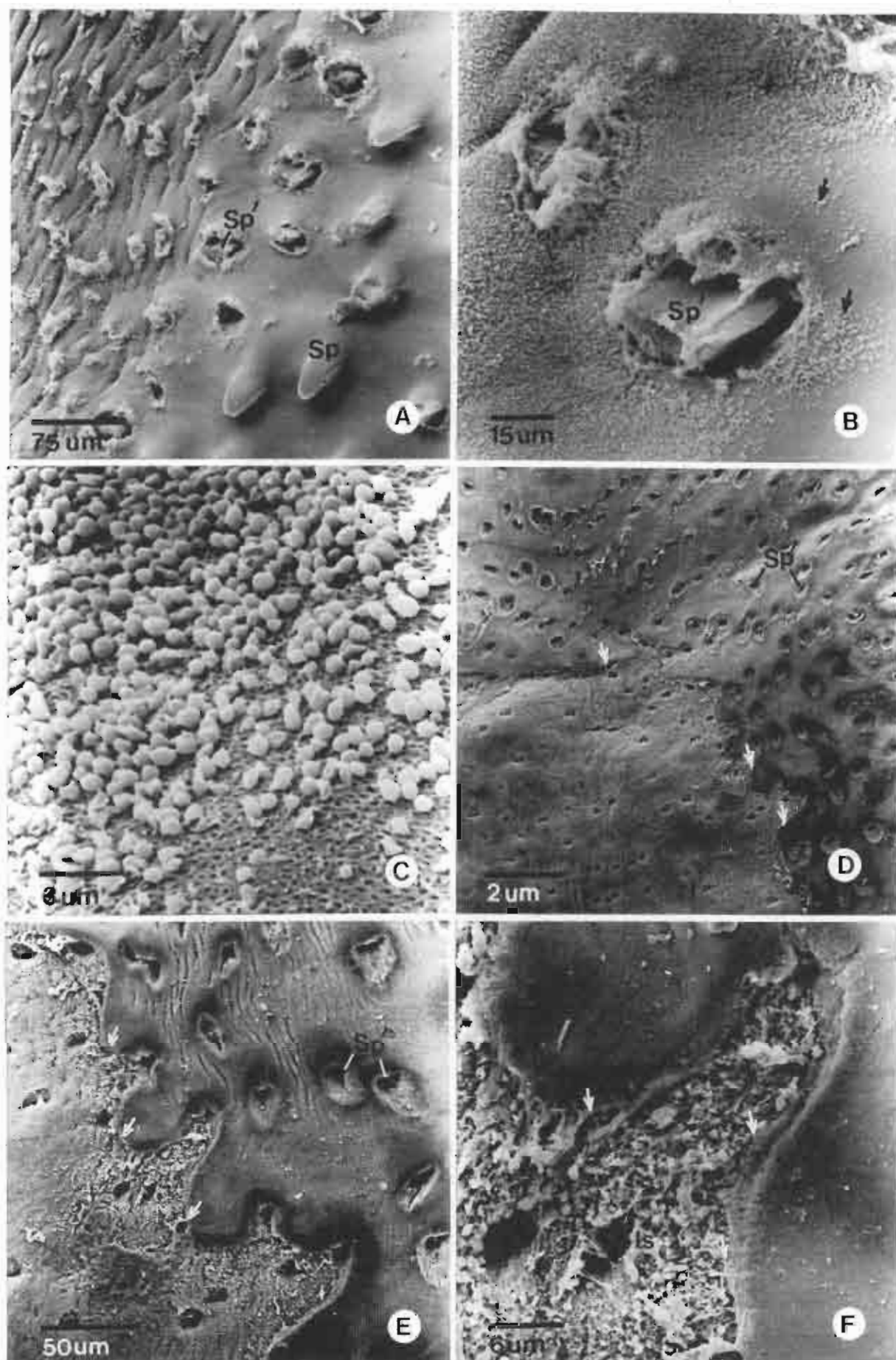
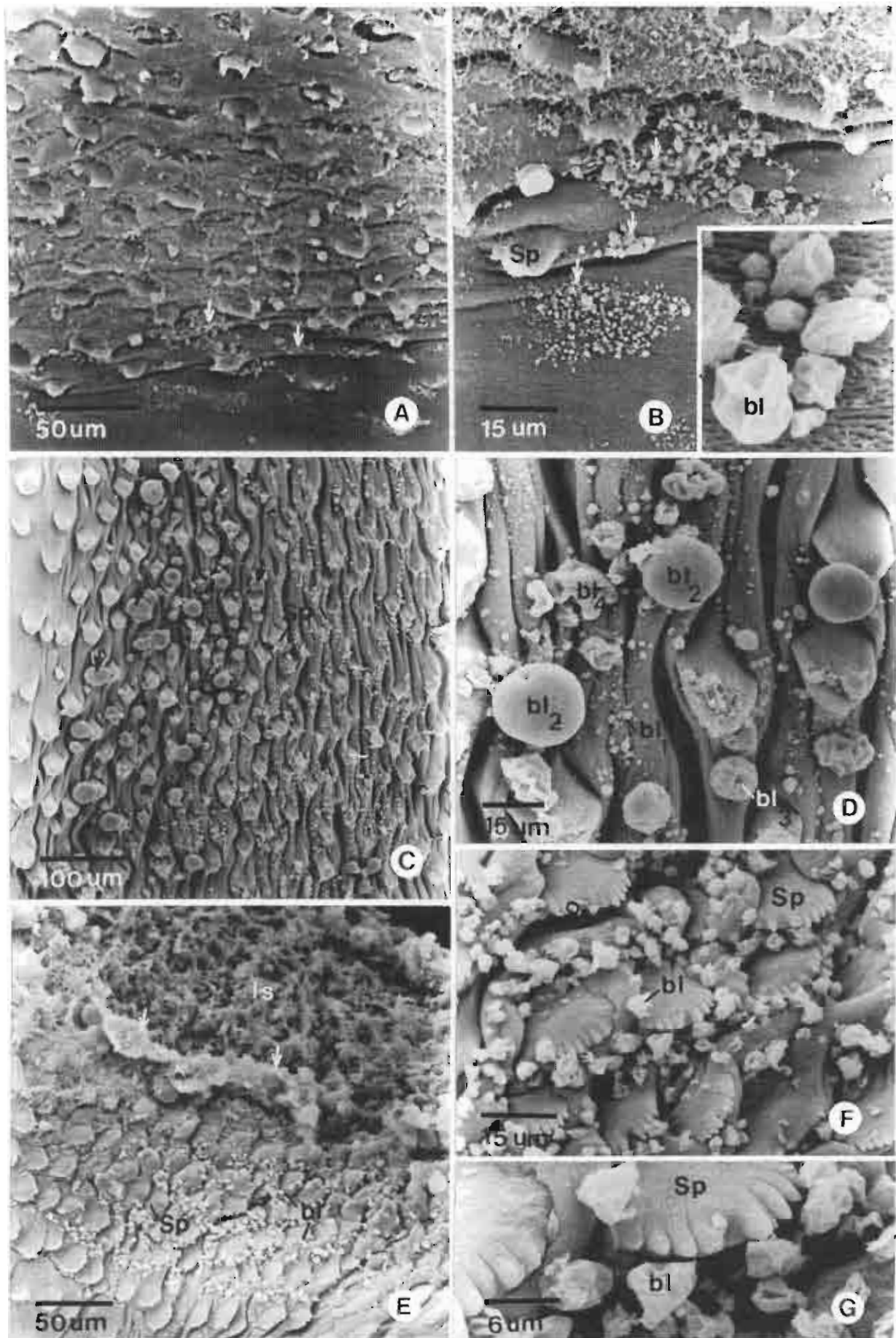


Figure 172



สรุป

เราได้ทำการศึกษาวิเคราะห์แอนติเจนหลักของพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* ที่มีศักยภาพในการนำมาใช้พัฒนาวิธีตรวจสอบการติดเชื้อและวัคซีนพร้อมกับศึกษาแหล่งกำเนิดและการกระจายของแอนติเจนหลักเหล่านี้ในเนื้อเยื่อต่างๆ ของพยาธิ นอกจากนั้นแล้วเรายังได้ศึกษาโครงสร้างละเอียดของเนื้อเยื่อที่เป็นแหล่งสร้างและสะสมแอนติเจนเพื่อให้เข้าใจถึงกลไกการสร้างแอนติเจนที่ระดับเซลล์ และท้ายที่สุดเราได้ศึกษาผลกระทบของแอนติบอดีต่อแอนติเจนหลักบางตัวในการทำลายพยาธิระยะตัวเต็มวัย ผลงานวิจัยที่ได้ทำไปแล้วสรุปได้ดังนี้

1. จากการวิเคราะห์โดยวิธี SDS-PAGE และ immunoblotting แอนติเจนหลักของพยาธิที่แสดงออกและมีความเด่นในระยะเมตาเซอร์คาเรียและระยะตัวเต็มวัยที่มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาวิธีตรวจสอบการติดเชื้อและวัคซีนมีอยู่ 4 กลุ่ม คือ

1.1 แอนติเจนจากชั้นผิว (TA) ที่น้ำหนักโมเลกุล (MW) ที่ 66, 58, 54 และ 28.5 kD แอนติเจนเหล่านี้มีความจำเพาะค่อนข้างสูงในพยาธิ *F. gigantica* และน่าจะเป็นกลุ่มที่สามารถนำไปพัฒนาวิธีตรวจสอบสภาพการติดเชื้อพยาธิในสัตว์ได้ดี

1.2 แอนติเจนในกลุ่ม fatty acid binding proteins (FABP) ที่ MW 14.5 และ glutathione-S-transferase (GST) ที่ MW 28 kD โดย FABP เกี่ยวข้องกับการขนส่ง free fatty acids และ cholesterol จากโฮสต์เข้าสู่ตัวพยาธิ และ GST เกี่ยวข้องกับการทำลาย oxygen free radicals และ nitric oxide ที่ปล่อยออกมาจากเซลล์สร้างภูมิคุ้มกันของโฮสต์เพื่อทำลายพยาธิ FABP และ GST มีความจำเพาะใน *F. gigantica* พอประมาณ โดยมีปฏิกิริยาข้ามชนิดกับแอนติเจนชนิดเดียวกับในพยาธิใบไม้เลือดแต่ไม่มีปฏิกิริยาข้ามชนิดกับแอนติเจนของพยาธิตัวแบนชนิดอื่น ๆ เช่น *Eurythema pancreaticum* และ *Paraphistomum spp.*

1.3 แอนติเจนที่ปล่อยออกมาใน excretion-secretion (ES) มีเอนไซม์ Cathepsin L (Cath L) ที่ MW 26-27 kD เป็นแอนติเจนหลักที่มีปริมาณมากที่สุด นอกจากนั้นบางส่วนของ TA แอนติเจน FABP และ GST ก็พบใน ES ด้วย แต่มีปริมาณน้อยกว่า Cath L มาก Cathepsin L เป็นเอนไซม์หลักที่พยาธิตัวเต็มวัยใช้ในการย่อยสลายสารอาหารจากเนื้อเยื่อโฮสต์ เอนไซม์ชนิดนี้ไม่พบในระยะตัวอ่อนเมตาเซอร์คาเรีย

1.4 แอนติเจนที่ผลิตจากเซลล์ในเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์โดยเฉพาะจากเปลือกของเซลล์ไข่ (Vitelline proteins)

2. เราได้ผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี (MoAb) ต่อแอนติเจนในกลุ่มหลัก ๆ เหล่านี้โดยเฉพาะต่อ TA แอนติเจนที่ MW 66, 58, 54, และ 28.5 kD ต่อ rFABP, rGST และต่อ Cathepsin L จากนั้นเราได้ตรวจสอบความจำเพาะ (specificity) ของ MoAb เหล่านี้พบว่า MoAb ต่อ TA แอนติเจนมีความจำเพาะต่อแอนติเจน *F. gigantica* เท่านั้น ส่วน MoAb ต่อ FABP และ GST มีความจำเพาะต่อ *F. gigantica* และมี

ปฏิกิริยาข้ามชนิดกับแอนติเจนของพยาธิใบไม้เลือด (Schistosomes) ส่วน MoAb ต่อ Cath L มีความจำเพาะต่ำสุด เนื่องจากเป็นแอนไซม์ที่ผลิตโดยพยาธิเกือบทุกชนิด

3. เราได้ทำการศึกษาแหล่งกำเนิดและการกระจายของแอนติเจนหลักในเนื้อเยื่อของพยาธิระยะตัวเต็มวัยและระยะเมตาเซอร์คาเรียโดยใช้ MoAb ที่ผลิตได้ในข้อ 2 และโพลีโคลนัลแอนติบอดี (PoAb) ที่ได้จากการคิดเชื้อตามธรรมชาติเป็น probes โดยการใช้วิธี immunofluorescence และ immunoperoxidase พบว่า

3.1 TA แอนติเจนที่ MW 66, 58, 54 และ 28.5 kD สะสมอยู่ปริมาณสูงในชั้นผิว (tegument) โดยเฉพาะบริเวณใต้เยื่อหุ้มผิว ในตัวเซลล์และกิ่งของเซลล์ (tegument cell) ที่ถูกส่งออกมาเชื่อมกับชั้นผิว แอนติเจนเหล่านี้พบในเนื้อเยื่อชนิดเดียวกันในระยะเมตาเซอร์คาเรียแต่มีปริมาณน้อยกว่า

3.2 FABP และ GST สะสมอยู่ปริมาณสูงในกลุ่มเซลล์ parenchyma มีปริมาณปานกลางในเนื้อเยื่อของระบบสืบพันธุ์โดยเฉพาะในเซลล์สืบพันธุ์ระยะต้นของรังไข่และอวัยวะ และมีปริมาณน้อยในเยื่อของทั้งชั้นผิวและของลำไส้ ส่วนในเซลล์กล้ามเนื้อไม่มีแอนติเจนทั้งสองชนิดสะสมอยู่เลย นอกจากนี้พบว่า FABP และ GST มีปริมาณสูงใน parenchyma และมีปริมาณระดับปานกลางในชั้นผิวของระยะเมตาเซอร์คาเรีย

3.3 Cathepsin L มีการสะสมอยู่ปริมาณสูงในเซลล์ผิวของลำไส้ ในเยื่อผิวส่วนต้นของท่อ uterus ของพยาธิระยะตัวเต็มวัย และบางส่วนเคลือบอยู่ที่ด้านนอกของชั้นผิว ส่วนในระยะเมตาเซอร์คาเรียไม่พบ cathepsin L อยู่ในเนื้อเยื่อชนิดใดเลย

4. เราได้ทำการศึกษาลักษณะโครงสร้างละเอียดของเนื้อเยื่อที่เป็นแหล่งกำเนิดและสะสมแอนติเจนหลักเหล่านี้โดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ผลสรุปคือ

4.1 ชั้นผิว พบว่าในพยาธิตัวเต็มวัยมีเซลล์ชั้นผิว 2 ชนิดสร้างแกรนูล (tegumental granules) 2 แบบคือ G1 และ G2 ที่ถูกกลืนออกไปสู่ชั้นผิวโดยกิ่งของเซลล์ที่แทรกระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อออกไปเชื่อมกับชั้นผิว แกรนูลเหล่านั้นมีส่วนหนึ่งที่อาจจะประกอบด้วย TA แอนติเจนดังที่กล่าวแล้วในข้อ 1.1 G1 และ G2 แกรนูลจะประกอบเป็นเยื่อหุ้มของชั้นผิว (plasma membrane) และชั้นเคลือบผิว (glycocalyx) ในระยะเมตาเซอร์คาเรียอาจมีเซลล์ชั้นผิวเพียงหนึ่งชนิดที่สร้างแกรนูลแบบที่คล้าย G1 ที่เรียกว่า G0 กับแกรนูลแบบ G2 ออกไปสร้างเป็นชั้นเยื่อหุ้มผิวและชั้นเคลือบผิวซึ่งหนาและแข็งแรงกว่าในระยะตัวเต็มวัย

4.2 เราสามารถจำแนก parenchymal cells ได้ออกเป็น 3 ชนิด คือ Pa1, Pa2 และ Pa3 Pa1 เป็นเซลล์ที่มีปริมาณมากที่สุดซึ่งทำหน้าที่เป็นทั้งเซลล์ค้ำจุน (supporting cells) ในตัวพยาธิและเป็นเซลล์ที่สะสมสารไกลโคเจนและอาจควบคุมเมตาบอลิซึมของสารคาร์โบไฮเดรตในเนื้อเยื่อพยาธิ เซลล์ Pa2 สะสมไขมันเป็นหลักโดยมีไมโทคอนเดรียและ lipid droplets อยู่จำนวนมาก ดังนั้นอาจเป็นเซลล์ที่ควบคุมเมตาบอลิซึมของสารไขมันเป็นหลัก ส่วน Pa3 เป็นเซลล์ที่มีไมโทคอนเดรียจำนวนมากและ

พัฒนาระบบ Golgi-RER เต็มที่เพื่อการสร้างและหลั่งสารที่อาจเป็นไขของเยื่อเกี่ยวพันที่ประกอปกกันเป็นกรอบหรือโครงรอบ ๆ parenchymal cells เป็นผลทำให้เซลล์สามารถคงตัวอยู่ได้และช่วยพยุงเนื้อเยื่อภายในตัวพยาธิอีกต่อหนึ่ง เซลล์ Pa1 และ Pa2 เชื่อมต่อกันโดย gap junction ที่มีจำนวนมาก ซึ่งเป็นทางส่งสัญญาณควบคุมเพื่อประสานการทำงานของเซลล์ดังกล่าว FABP ที่สะสมอยู่ใน parenchymal cells มีปริมาณไม่เท่ากัน โดยสามารถจำแนกเซลล์ตามปริมาณของ FABP ได้สามแบบ คือ เซลล์ที่มี FABP อยู่ในระดับสูงมาก ระดับปานกลาง และระดับต่ำ อาจเป็นไปได้ว่า Pa2 คือเซลล์ที่มี FABP มากที่สุด Pa1 มีพอประมาณ ส่วน Pa3 และ tegument cells มี FABP อยู่่น้อยมาก

4.3 เยื่อบุผิวลำไส้ (caecum) ประกอบด้วยเซลล์ที่มีลักษณะต่างกันสามแบบคือ caecal epithelium (Cep) แบบที่ 1, 2, 3 เซลล์ Cep1 เป็นเซลล์ที่มี RER และไมโทคอนเดรียเป็นออร์แกเนลหลัก แต่ยังไม่มีการพัฒนาระบบ Golgi complex มี zymogen granules ที่น่าจะเป็นแหล่งสะสมของ cathepsin L อยู่่น้อย เซลล์ Cep2 มีไมโทคอนเดรีย RER และ Golgi complex ที่พัฒนาเต็มที่ อีกทั้งมี zymogen granule สะสมอยู่ที่ส่วนยอดในปริมาณสูง เซลล์ Cep3 ปล่อย zymogen granules ออกจากเซลล์ทำให้ไซโตพลาสซึมส่วนยอดใสและโปร่งขึ้น RER และ Golgi complex ในส่วนยอดสลายไป แต่ไมโทคอนเดรียและ RER ส่วนใหญ่ยังคงสะสมอยู่ในไซโตพลาสซึมส่วนฐาน เซลล์ทั้งสามชนิดเชื่อมต่อกันด้วย septate desmosomes และทำหน้าที่ดูดซึมสารอาหารผ่านเยื่อหุ้มด้านยอดโดยระบบ coated vesicles ดังนั้นเซลล์ทั้งสามชนิดอาจเป็นช่วง (phases) ต่าง ๆ ของเซลล์ประเภทเดียวกันที่ทำหน้าที่ทั้งสร้างและหลั่งเอนไซม์ Cathepsin L ออกไปย่อยอาหารแล้วดูดซึมสารอาหารกลับเข้าสู่เนื้อเยื่อพยาธิเพื่อส่งผ่านไปสู่ชั้น parenchyma โดยผ่านเซลล์ Pa1 และ Pa2 ที่ส่งกึ่งมาสัมผัสกับด้านฐานของเซลล์ Cep และเซลล์เยื่อบุของอวัยวะทุกชนิดในตัวพยาธิ

4.4 เนื่องจากการย้อมเนื้อเยื่อพยาธิด้วยวิธีด้วยเซรัมของวัวที่ติดเชื่อตามธรรมชาติพบว่าเนื้อเยื่อที่สร้างแอนติเจนหลักอีกกลุ่มหนึ่งคือเนื้อเยื่อของระบบสืบพันธุ์โดยเฉพาะต่อม vitellaria และเปลือกไข่ เราจึงได้ศึกษาลักษณะโครงสร้างละเอียดของเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับการสร้างไข่และเปลือกไข่พบว่า เซลล์ไข่ถูกสร้างขึ้นที่รังไข่จากเซลล์ oogonia โดยผ่านเซลล์ oocyte 4 ชั้น เซลล์ oocytes ขั้นสุดท้ายถูกปล่อยออกมาสู่ ootype ซึ่งเป็นอวัยวะที่เกิดจากการรวมกันของท่อ vitelline duct และ oviduct และมีกิ่งของเซลล์ Mehlis' gland เข้ามาเปิด vitelline duct นำเซลล์ vitelline ที่พัฒนาเต็มที่แล้ว (ซึ่งมีการพัฒนา 6 ชั้น) เข้ามารวมกลุ่มกับเซลล์ไข่ เซลล์ vitelline ปล่อยสาร vitelline proteins ซึ่งเมื่อถูกกระตุ้นโดยสารคัดหลั่งจากเซลล์ของ Mehlis' gland จะรวมตัวกันเข้าเป็นเปลือกไข่ Cathepsin L ที่พบในผนังของ uterus ส่วนที่อยู่ติดกับ ootype อาจมีส่วนช่วยในการคัดลอกให้ vitelline proteins มีโครงสร้างที่เหมาะสมก่อนที่จะถูกนำไปประกอปกกันเข้าเป็นเปลือกไข่

5. การทดสอบการทำลายพยาธิด้วยแอนติบอดีต่อแอนติเจนของพยาธิด้วยวิธี *in vitro* antibody killing assay พบว่า

5.1 เซรัม (โพลีโคลนัลแอนติบอดี) จากวัวที่ติดเชื้อพยาธิตามธรรมชาติที่ใช้เป็น positive control สามารถทำให้พยาธิตัวเต็มวัยของ เต่า และหลอดลออกออกไปได้ถึงแม้ว่าจะไม่สามารถฆ่าพยาธิตัวเต็มวัยได้

5.2 โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อ rFABP และ rGST มีการออกฤทธิ์ที่ชัดเจนในการทำลายพยาธิตัวเต็มวัย โดยทำให้ผิวหนังออกเป็นตุ่ม (blebbing) ก่อนแตกออกเป็นแผล (lesion) ซึ่งนำไปสู่การหลุดลอกของชั้นผิวและหนาม (sloughing) ออกจากตัวพยาธิเป็นแถบกว้าง แต่ MoAb ดังกล่าวไม่สามารถทำให้พยาธิตัวเต็มวัยตายได้ แต่ MoAb ดังกล่าวน่าจะสามารถฆ่าตัวอ่อน โดยเฉพาะระยะ newly excysted juvenile (NEJ) ได้เนื่องจากเป็นระยะที่ยังไม่ได้พัฒนาไกลการซ่อมแซมผิวและการเลี้ยงภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพสูงอย่างเช่นที่ปรากฏในพยาธิตัวเต็มวัย ซึ่งขณะนี้กำลังดำเนินการทดสอบการออกฤทธิ์ของ MoAb ดังกล่าวและ MoAb ต่อแอนติเจนชนิดอื่น ๆ ต่อระยะ NEJ อยู่โดยวิธี *in vitro* killing assay ซึ่งจะช่วยให้รู้ว่าแอนติเจนชนิดใดมีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาเป็นวัคซีนได้

ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการ

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

ที่ได้รับการตีพิมพ์แล้วและกำลังจะลงตีพิมพ์ (in press) 19 เรื่อง

1. **Sobhon P**, Anantavara S, Dangprasert T, Viyanant V, Krailas D, Upatham ES, Wanichanon C, Kusamsan T *Fasciola gigantica*: studies of the tegument as a basis for the developments of immunodiagnosis and vaccine. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 1998; 29: 387-400.
2. Upatham ES, Thongkukiatkul A, Kruatrachue M, Wanichanon C, Chitramvong YP, Sahavacharin S, **Sobhon P** Classification of neurosecretory cells neurons and neuroglia in the cerebral ganglia of *Haliotis asinina* Linnaeus by light microscopy. *Journal of Shellfish Research* 1998; 17: 737-748.
3. Chitramvong YP, Upatham ES, Kruatrachue M, **Sobhon P**, Linthong V. Scanning electron microscope study of radulae in *Haliotis asinina* Linnaeus 1768 and *Haliotis ovina* Gmelin 1791 (Gastropoda: Haliotidae). *Journal of Shellfish Research* 1998; 17: 755-759.
4. **Sobhon P**, Apisawetakan S, Chanpoo M, Wanichanon C, Linthong V, Thongkukiatkul A, Jarayabhand P, Kruatrachue M, Upatham ES, Pumthong T Classification of germ cells, reproductive cycle and maturation of gonads in *Haliotis asinina* Linnaeus. *Science Asia* 1999; 25: 3-21.
5. Apisawetakan S, **Sobhon P**, Wanichanon C, Linthong V, Upatham ES, Kruatrachue M, Jarayabhand P, Pumthong T Ultrastructure of spermatozoa in the testis of *Haliotis asinina* Linnaeus. *Journal of Medical and Applied Malacology* 2000; 10: 101-109.
6. Chavadej J, Jerareungrattana A, Sretarugsa P, **Sobhon P** Structure and development of the testis of bullfrog, *Rana catesbeiana* and their changes during seasonal variation. *Science Asia* 2000; 26: 69-80.

7. Dangprasert T, Khawsuk W, Meepool A, Wanichanon C, Upatham ES, Wongratanacheevin S, **Sobhon P** *Fasciola gigantica* : surface topography of the adult tegument. *Journal of Helminthology* 2000; 74: 1-8.
8. Chavadej J, Vichatrong N, Sretarugsa P, **Sobhon P** Effect of synthetic mammalian gonadotropin releasing hormone, human chorionic gonadotropin and pituitary homogenate on spermiation in *Rana tigerina* and *Rana catesbeiana*. *Science Asia* 2000; 26: 149-158.
9. **Sobhon P**, Dangprasert T, Chuanchaiyakul S, Meepool A, Khawsuk W, Wanichanon C, Viyanant V, Upatham ES *Fasciola gigantica*: ultrastructure of the adult tegument. *Science Asia* 2000; 26: 137-148.
10. **Sobhon P**, Apisawetakan S, Linthong V, Pankao V, Wanichanon C, Meepool A, Kruatrachue M, Upatham ES, Pumthong T Ultrastructure of differentiating male germ cells of *Haliotis asinina* Linnaeus. *Invertebrate Reproduction and Development* 2001; 39: 55-66.
11. Apisawetakan S, Linthong V, Wanichanon C, Panasophonkul S, Meepool A, Kruatrachue M, Upatham ES, Pumthong T, **Sobhon P** Ultrastructure of female germ cells in *Haliotis asinina* Linnaeus. *Invertebrate Reproduction and Development* 2001; 39: 67-79.
12. Grams R, Vichasri-Grams S, **Sobhon P**, Upatham ES, Viyanant V Molecular cloning and characterization of cathepsin L encoding genes from *Fasciola gigantica*. *Parasitology International* 2001; 50: 105-114.
13. Sretarugsa P, Weerachathanukul W, Chavadej J, Kruatrachue M, Upatham ES, **Sobhon P** Classification of developing oocytes, ovarian development and seasonal variation in *Rana tigerina*. *Science Asia* 2001; 24: 1-14.
14. Apisawetakan S, Chanpoo M, Wanichanon C, Linthong V, Kruatrachue M, Upatham ES, Pumthong T, **Sobhon P** Characterization of trabecular cells in the gonad of *Haliotis asinina* Linnaeus. *Journal of Shellfish Research* 2001; 2: (in press).
15. Chanpoo M, Apisawetakan S, Thongkukiatkul A, Wanichanon C, Linthong V, Kruatrachue M, Upatham ES, Pumthong T, Hanna PJ, **Sobhon P**

Localization of egg-laying hormone in the gonad of a tropical abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus. *Journal of Shellfish Research* 2001; 2: (in press).

16. Sahaphong S, Linthong V, Wanichanon C, Riengrojpitak S, Viyanant V, Upatham ES, Kangwanrangsang N, Pumthong T, Chansue N, **Sobhon P** Morphofunctional study of the hemocytes of *Haliotis asinina* Linnaeus. *Journal of Shellfish Research* 2001; 2: (in press).

17. Thongkukiatkul A, **Sobhon P**, Upatham ES, Kruatrachue M, Wanichanon C, Chitramvong YP, Pumthong T Ultrastructure of neurosecretory cells in the cerebral and pleuropedal ganglia of *Haliotis asinina* Linnaeus. *Journal of Shellfish Research* (in press).

18. Wanichanon C, Weerachatanukul W, Suphamungmee W, Meepool A, Apisawetakan S, Sretarugsa P, Chavadej J, **Sobhon P** Chromatin condensation during spermiogenesis in rats. *Science Asia* (in press).

19. Sirisriro A, Vichasri-Grams S, Grams R, Ardseungneon P, Chaithirayanon K, Tan-Ariya P, Viyanant V, Upatham ES, **Sobhon P** Production and characterization of monoclonal antibody against recombinant fatty acid binding protein of *Fasciola gigantica*. *Veterinary Parasitology* (Accepted for publication).

ที่กำลังรอการพิจารณาเพื่อลงตีพิมพ์ 2 เรื่อง

20. **Sobhon P**, Linthong V, Weerachatanukul W, Suphamungmee W, Meepool A, Apisawetakan S, Wanichanon C, Sretarugsa P, Chavadej J, Muangmun V Chromatin condensation during spermiogenesis in human. *Anatomy and Embryology* (submitted).

21. Praditsathaporn S, Sretarugsa P, Chavadej J, Wanichanon C, Kruatrachue M, Linthong V, **Sobhon P** Spermatogenesis and chromatin condensation in male germ cells of *Rana tigerina*. *Journal of Experimental Zoology* (Submitted).

2. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศไทย --ไม่มี--

3. หนังสือ (International Proceedings) 4 เรื่อง

1. **Sobhon P**, Apisawetakan S, Chanpoo M, Wanichanon C, Linthong V, Thongkukiatkul A, Jarayabhand P, Kruatrachue M, Upatham ES, Pumthong T Gametogenesis, reproductive cycle and development of gonads in *Haliotis asinina* Linnaeus. *Mollusk Research in Asia 2000: Proceedings of the Special Session on Mollusk Research in Asia held at the 5th Asian Fisheries Forum, Chiangmai, Thailand (November 12, 1998)* pp. 183-200.

2. Grams R, Vichasri-Grams S, **Sobhon P**, Upatham ES, Viyanant V Molecular cloning and characterization of antigen-coding genes from *Fasciola gigantica*. *Proceedings of the 2nd Congress of the Federation of Immunological Societies of Asia-Oceania, Bangkok, Thailand (January 23-27, 2000)*, Editors: Sirisinha S, Chaiyaroj SC, Tapchaisri P; Monduzzi Editore, Bologna, Italy p. 39-43.

3. **Sobhon P**, Viyanant V, Upatham ES, Grams SV, Ardseungnoen P, Krailas D, Khawsuk W, Chaithirayanon K, Sriburee S, Meepool A, Wanichanon C, Chompoochan T, Thammasart S, Prasittirat P Development of immunodiagnosis for *Fasciola gigantica*. *Proceedings of the 2nd Congress of the Federation of Immunological Societies of Asia-Oceania, Bangkok, Thailand (January 23-27, 2000)*, Editors: Sirisinha S, Chaiyaroj SC, Tapchaisri P; Monduzzi Editore, Bologna, Italy p. 117-121.

4. Sretarugsa P, Sawatpanich T, Weerachatanukul W, Chavadej J, Kruatrachue M, **Sobhon P** The number and steroid-producing activity of follicle cells around various stages of oocytes in *Rana tigerina*. *Proceeding of the 14th International Congress of Comparative Endocrinology, Sorrento (Napoli), Italy (May 26-30, 2001)*, Editors: Goos HJ Th, Rastogi RK, Vaudry H, Pierantoni; Monduzzi Editore, Bologna, Italy p. 1209-1215.

4. รหัสพันธุกรรมในฐานข้อมูล GenBank 3 รหัส --- Accession No. AF 112566, AF 112567, AF 112568 (Nucleotide sequences for *F. gigantica* fatty acid binding proteins (FABP), glutathione-S-transferase (GST) and Cathepsin L).

5. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

1. **Sobhon, P.**, Anantavara, S., Viyanant, V. 1997 *Fasciola gigantica*; Studies of the tegument as a basis for the development of immunodiagnosis and vaccine. *Joint International Tropical Medicine Meeting, Bangkok, Thailand (August 25-27, 1997)*. p. 120.
2. **Sobhon, P.**, Apisawetakan, S., Chanpoo, M., Wanichanon, C., Linthong, V., Thongkukiatkul, A., Jarayabhand, P., Kruatrachue, M. and Upatham, E.S. 1998 Gametogenesis, reproductive cycle and development of the gonad in *Haliotis asinina* Linnaeus. *The 5th Asian Fisheries Forum: International Conference on Fisheries and Food Security Beyond the Year 2000, Chiang Mai, Thailand (November 11-14, 1998)* p. 6.
3. Linthong, V., **Sobhon, P.**, Apisawetakan, S., Chanpoo, M., Wanichanon, C., Thongkukiatkul, A., Jarayabhand, P., Kruatrachue, M. and Upatham, E.S. 1998 Ultrastructure of male germ cells in the testis of *Haliotis asinina* Linnaeus. *The 5th Asian Fisheries Forum: International Conference on Fisheries and Food Security Beyond the Year 2000, Chiang Mai, Thailand (November 11-14, 1998)* p. 21.
4. **Sobhon, P.**, Apisawetakan, S., Linthong, V., Wanichanon, C., Kruatrachue, M., Upatham, E.S., Chanpoo, M. and Jarayabhand, P. 1998 Ultrastructure of gamete cells in the ovary of *Haliotis asinina* Linnaeus. *Fifth International Congress on Medical and Applied Malacology, Chiang Mai, Thailand (December 27-30, 1998)* p. 34.
5. Apisawetakan, S., **Sobhon, P.**, Wanichanon, C., Linthong, V., Upatham, E.S., Kruatrachue, M. and Jarayabhand, P. 1998 Ultrastructure of spermatozoa in the testis of *Haliotis asinina* Linnaeus. *Fifth International Congress on Medical and Applied Malacology, Chiang Mai, Thailand (December 27-30, 1998)* p. 60.
6. **Sobhon, P.**, Apisawetakan, S., Linthong, V., Wanichanon, C., Sretarugsa, P., Chavadej, J. and Upatham, E.S. 1998 Condensation of chromatin in male germ cells of *Haliotis asinina* Linnaeus. *Fifth International Congress on Medical and Applied Malacology, Chiang Mai, Thailand (December 27-30, 1998)* p. 61.

7. Grams, R., Vichasri-Grams, S., **Sobhon, P.**, Upatham, E.S. and Viyanant, V. 2000 Molecular cloning and characterization of antigen encoding genes from *Fasciola gigantica*. *2nd Congress of the Federation of Immunological Societies of Asia-Oceania (FIMSA), Bangkok, Thailand (January 23-27, 2000)* p. 182.

8. **Sobhon, P.**, Viyanant, V., Upatham, E.S., Vichasri-Grams, S., Ardseungnoen, P., Krailas, D., Khawsuk, W., Chaithirayanon, K., Sriburee, S., Meepool, A., Wanichanon, C., Chonpoochantra, T., Thammasart S. and Prasittirat, P. 2000 Development of immunodiagnosis for *Fasciola gigantica*. *2nd Congress of the Federation of Immunological Societies of Asia-Oceania (FIMSA), Bangkok, Thailand (January 23-27, 2000)* p. 211.

9. Apisawetakan, S., Chanpoo, M., Wanichanon, C., Linthong, V., Kruatrachue, M., Upatham, E.S., Pumthong, T. and **Sobhon, P.** 2000 Characterization of trabecular cells in the gonad of *Haliotis asinina*. *The 4th International Abalone Symposium, University of Cape Town, South Africa (February 6-11, 2000)* p. 62.

10. Chanpoo, M., Apisawetakan, S., Thongkukiatkul, A., Wanichanon, C., Linthong, V., Kruatrachue, M., Upatham, E.S., Pumthong, T., Hanna, P.J. and **Sobhon, P.** 2000 Localization of egg-laying hormone, (aELH) in the gonad of a tropical abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus. *The 4th International Abalone Symposium, University of Cape Town, South Africa (February 6-11, 2000)* p. 64.

11. Sahaphong, P., Linthong, V., Apisawetakan, S., Wanichanon, C., Riengrojpitak, S., Viyanant, V., Upatham, E.S., Kangwanrangsang, N., Pumthong, T. and **Sobhon, P.** 2000 Morphofunctional study of the hemocytes of *Haliotis asinina*: A preliminary report. *The 4th International Abalone Symposium, University of Cape Town, South Africa (February 6-11, 2000)* p. 79.

12. **Sobhon, P.**, Weerachatanukul, W., Apisawetakan, S., Wanichanon, C., Sretarugsa, P. and Chavadej, J. Chromatin condensation during spermiogenesis in human. *The 7th Asia-Pacific Electron Microscopy Conference, Singapore (June 26-30, 2000), Life Sciences* p. 83-84.

13. Kruatrachue, M., Apisawetakan, S., Linthong, V., Chanpoo, M., Wanichanon, C., Thongkukiatkul, A., Upatham, E.S., Pumthong, T. and **Sobhon P.** Chromatin condensation during spermatogenesis and spermiogenesis in *Haliotis asinina* Linnaeus. *The 7th Asia-Pacific Electron Microscopy Conference, Singapore (June 26-30, 2000), Life Sciences* p. 290-291.

14. Sretarugsa, P., Praditsathaporn, S., Chavadej, J., Wanichanon, C., Linthong, V. and **Sobhon, P.** Chromatin condensation in male germ cells of a rice field frog, *Rana tigerina*. *The 7th Asia-Pacific Electron Microscopy Conference, Singapore (June 26-30, 2000), Life Sciences* p. 302-303.

15. Wanichanon, C., Weerachatanukul, W., Apisawetakan, S., Sretarugsa, P., Chavadej, J. and **Sobhon, P.** Chromatin condensation during spermiogenesis in rats. *The 7th Asia-Pacific Electron Microscopy Conference, Singapore (June 26-30, 2000), Life Sciences* p. 304-305.

16. **Sobhon, P.**, Pankao, V., Apisawetakan, S., Panasophonkul, S., Linthong, V., Wanichanon, C., Chavadej, J., Sretarugsa, P., Kruatrachue, M. and Upatham, E.S. Gonadal histology and gametogenesis in a giant land snail, *Achatina fulica* Bowdich. *The Sixth International Congress on Medical and Applied Malacology, Havana, Cuba (September 4-8, 2000)* p. 56-57.

17. Upatham, E.S., Panasophonkul, S., Thongkukiatkul, A., Apisawetakan, S., Pankao, V., Wanichanon, C., Linthong, V., Kruatrachue, M. and **Sobhon, P.** Gonadal histology and gametogenesis in a marine oyster, *Saccostrea forskali* Gmelin. *The Sixth International Congress on Medical and Applied Malacology, Havana, Cuba (September 4-8, 2000)* p. 58.

18. **Sobhon, P.**, Viyanant, V., Wanichanon, C., Upatham, E.S., Vichasri-Grams, S., Grams, R. and Ardseungnoen, P. Identification of *Fasciola gigantica* antigen that have immunodiagnostic and vaccine potentials, and the studies of their tissue sources. Symposium entitled "Fasciolosis: Recent Advances in Immunodiagnosis and Vaccine Development" in *The 3rd Seminar on Food-and-Water*

Borne Parasitic Zoonoses (FBPZ) and Joint International Tropical Medicine Meeting 2000 (JITMM), December 6-8, Bangkok, Thailand p. 102.

19. Viyanant, V., Krailas, D., **Sobhon, P.**, Vichasri-Grams, S., Ardseungnoen, P. and Upatham, E.S. Immunodiagnosis of animal fasciolosis. Symposium entitled "Fasciolosis: Recent Advances in Immunodiagnosis and Vaccine Development" in *The 3rd Seminar on Food-and-Water Borne Parasitic Zoonoses (FBPZ) and Joint International Tropical Medicine Meeting 2000 (JITMM), December 6-8, Bangkok, Thailand p. 103.*

20. Grams, R., Vichasri-Grams, S., Upatham, E.S., **Sobhon, P.** and Viyanant, V. Cloning and characterization of antigen-encoding genes from *Fasciola gigantica*. Symposium entitled "Fasciolosis: Recent Advances in Immunodiagnosis and Vaccine Development" in *The 3rd Seminar on Food-and-Water Borne Parasitic Zoonoses (FBPZ) and Joint International Tropical Medicine Meeting 2000 (JITMM), December 6-8, Bangkok, Thailand p. 105.*

21. Meepool, A., Khawsuk, W., Meemon, K., Wanichanon, C., Viyanant, V., Upatham, E.S. and **Sobhon, P.** The role of vitellaria in the production of the egg and its shell in *Fasciola gigantica*. *The 3rd Seminar on Food-and-Water Borne Parasitic Zoonoses (FBPZ) and Joint International Tropical Medicine Meeting 2000 (JITMM), December 6-8, Bangkok, Thailand p. 264.*

22. Sahaphong, S., Tansatit, T., Riengrojpitak, S., Sirimujarin, R., Viyanant, V., Upatham, E.S. and **Sobhon, P.** Hepatic changes in experimental infection of rats and hamsters with *Fasciola gigantica*. *The 3rd Seminar on Food-and-Water Borne Parasitic Zoonoses (FBPZ) and Joint International Tropical Medicine Meeting 2000 (JITMM), December 6-8, Bangkok, Thailand p. 265.*

23. Sirisriro, A., Ardseungneon, P., Vichasri-Grams, S., Tan-Ariya, P., Viyanant, V., Upatham, E.S. and **Sobhon, P.** Production and characterization of monoclonal antibody against recombinant fatty-acid-binding protein of *Fasciola gigantica*. *The 3rd Seminar on Food-and-Water Borne Parasitic Zoonoses (FBPZ) and*

Joint International Tropical Medicine Meeting 2000 (JITMM), December 6-8, Bangkok, Thailand p. 281.

24. Chaithirayanon, K., Ardseungneon, P., Wanichanon, C., Vichasri-Grams, S., Grams, R., Viyanant, V., Upatham, E.S. and **Sobhon, P.** Production and characterization of monoclonal antibody against 28.5 kD tegumental antigen of *Fasciola gigantica*. *The 3rd Seminar on Food-and-Water Borne Parasitic Zoonoses (FBPZ) and Joint International Tropical Medicine Meeting 2000 (JITMM), December 6-8, Bangkok, Thailand* p. 282.

6. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับประเทศ

1. Apisawetakan, S., **Sobhon, P.**, Wanichanon, C., Linthong, V., Kruatrachue, M., Upatham, E.S. and Nugranad, J. 1997 The gametogenic processes in a Thai abalone, *Haliotis Asinina* Linnaeus. *The 23rd Congress on Science and Technology of Thailand, Chiang Mai (October 20-22, 1997)* p. 436-7.

2. **Sobhon, P.**, 1997 The organization of human sperm chromatin as visualized by high resolution microscopy. *The 15th Annual Conference of the Electron Microscopy Society of Thailand, Bangkok (December 19, 1997)* p. 56-57.

3. Sriburee, S., Khawsuk, W., Ardseungnoen, P., Kumkate, S., Vichasri-Grams, S., Viyanant, V., Upatham, E.S., Wanichanon, C. and **Sobhon, P.** 1998 Localization of cysteine protease in adult *Fasciola gigantica*. *The 24th Congress on Science and Technology of Thailand, Bangkok (October 19-20, 1998)* p. 660-1.

4. Apisawetakan, S., Chanpoo, M., Wanichanon, C., Linthong, V., Jarayabhand, P., Kruatrachue, M., Upatham, E.S. and **Sobhon, P.** 1998 Reproductive cycle and development of the gonads in *Haliotis asinina* Linnaeus. *The 24th Congress on Science and Technology of Thailand, Bangkok (October 19-20, 1998)* p. 682-3.

5. Khawsuk, W., Ardseungnoen, P., Kumkate, S., Sriburee, S., Vichasri-Grams, S., Viyanant, V., Wanichanon, C. and **Sobhon, P.** 1998 Localization of paramyosin in adult *Fasciola gigantica*. *The 24th Congress on Science and Technology of Thailand, Bangkok (October 19-20, 1998)* p. 716-7.

6. Kumkate, S., Ardseungnoen, P., Vichasri-Grams, S., Viyanant, V., Upatham, E.S., Khawsuk, W. and **Sobhon, P.** 1998 Infection of *Fasciola gigantica* in mice: An animal model for testing candidate vaccine. *The 24th Congress on Science and Technology of Thailand, Bangkok (October 19-20, 1998)* p. 718-9.
7. Chanpoo, M., Apisawetakan, S., Thongkukiatkul, A., Wanichanon, C., Linthong, V., Kruatrachue, M., Upatham, E.S., Pumthong, T. and **Sobhon, P.** 1999 Localization of egg-laying hormone (ELH) in the gonad of a tropical abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus. *The Seventeenth Annual Conference of the Electron Microscopy Society of Thailand, Chiang Mai, Thailand (December 7-9, 1999)* p. 58-9.
8. Sriburee, S., Grams, R., Vichasri-Grams, S., Khawsuk, W., Chaithirayanon, K., Meepool, A., Ardseungnoen, P., Viyanant, V., Upatham, E.S., Wanichanon, C. and **Sobhon, P.** 1999 The expression of Cathepsin L gene in the digestive tract epithelial cells in *Fasciola gigantica* as detected by *in situ* hybridization. *The Seventeenth Annual Conference of the Electron Microscopy Society of Thailand, Chiang Mai, Thailand (December 7-9, 1999)* p. 62-3.
9. Meepool, A., Khawsuk, W., Sriburee, S., Chaithirayanon, K., Linthong, V., Viyanant, V., Upatham, E.S., Wanichanon, C. and **Sobhon, P.** 1999 Development of vitelline cells of *Fasciola gigantica*. *The Seventeenth Annual Conference of the Electron Microscopy Society of Thailand, Chiang Mai, Thailand (December 7-9, 1999)* p. 64-5.
10. Chaithirayanon, K., Ardseungnoen, P., Sriburee, S., Khawsuk, W., Meepool, A., Grams, S.V., Viyanant, V., Upatham, E.S., Wanichanon, C. and **Sobhon, P.** 1999 Localization of 28.5 kDa tegumental antigen in *Fasciola gigantica*. *The Seventeenth Annual Conference of the Electron Microscopy Society of Thailand, Chiang Mai, Thailand (December 7-9, 1999)* p. 66-7.
11. Khawsuk, W., Chaithirayanon, K., Sriburee, S., Meepool, A., Ardseungnoen, P., Linthong, V., Grams, S.V., Viyanant, V., Upatham, E.S., Wanichanon, C. and **Sobhon, P.** 1999 *Fasciola gigantica*: Tegumental surface of the

newly excysted juvenile. *The Seventeenth Annual Conference of the Electron Microscopy Society of Thailand, Chiang Mai, Thailand (December 7-9, 1999)* p. 72-3.

12. Praditsathaporn, S., Sretarugsa, P., Chavadej, J., Wanichanon, C., Linthong, V. and **Sobhon, P.** 1999 Chromatin condensation during spermiogenesis in *Rana tigerina* as studied by transmission electron microscopy. *The Seventeenth Annual Conference of the Electron Microscopy Society of Thailand, Chiang Mai, Thailand (December 7-9, 1999)* p. 85-6.

13. Apisawetakan, S., Chanpoo, M., Wanichanon, C., Linthong, V., Upatham, E.S., Kruatrachue, M. and **Sobhon, P.** 1999 Characterization of trabecular cells in the gonad of *Haliotis asinina*. *The Seventeenth Annual Conference of the Electron Microscopy Society of Thailand, Chiang Mai, Thailand (December 7-9, 1999)* p. 87.

14. Pankao, V., Apisawetakan, S., Panasophonkul, S., Linthong, V., Wanichanon, C., Chavadej, J., Sretarugsa, P. and **Sobhon, P.** 1999 Gametogenesis in a giant land snail, *Achatina fulica* Bowdich. *The Seventeenth Annual Conference of the Electron Microscopy Society of Thailand, Chiang Mai, Thailand (December 7-9, 1999)* p. 88.

15. Panasophonkul, S., Thongkukiatkul, A., Apisawetakan, S., Pankao, V., Wanichanon, C., Linthong, V., Upatham, E.S. and **Sobhon, P.** 1999 The gametogenetic processes in a marine oyster, *Saccostrea forskali*. *The Seventeenth Annual Conference of the Electron Microscopy Society of Thailand, Chiang Mai, Thailand (December 7-9, 1999)* p. 89.

16. Weerachatanukul, W., Apisawetakan, S., Wanichanon, C., Sretarugsa, P., Chavadej, J. and **Sobhon, P.** 1999 Chromatin condensation during spermiogenesis in rats. *The Seventeenth Annual Conference of the Electron Microscopy Society of Thailand, Chiang Mai, Thailand (December 7-9, 1999)* p. 90-1.

7. อาจารย์ผู้ร่วมวิจัยในโครงการที่ได้รับการกำหนดตำแหน่งทางวิชาการสูงขึ้น

นาง จิตติพันธ์ ชวเดช (จาก ผศ. เป็น รศ.)

น.ส. ภาวิ อนุพันธ์พิสิฐ (จาก อ. เป็น ผศ.)

น.ส. อัมพร ทองกู้เกียรติกุล (จาก อ. เป็น ผศ.)

นาง สุขศิริ วิชาศรี กรามส์ (จาก อ. เป็น ผศ.)

8. นักศึกษาบัณฑิตที่สำเร็จการศึกษาจากโครงการ

ระดับปริญญาโท (10 คน)	หลักสูตร (สาขา)	หัวข้อวิทยานิพนธ์
1) น.ส. สุมล จิ่งอุดมเจริญ	กายวิภาคศาสตร์	Chromatin condensation during spermatogenesis in the mountain frog, <i>Rana blythii</i>
2) น.ส. สุพีชา กุ่มกตุ	ชีววิทยา	Development of <i>Fasciola gigantica</i> in mice and characterization of monoclonal antibodies against adult worm antigens
3) น.ส.ปิยะดา ชิตทนต์	กายวิภาคศาสตร์	The effect of cryopreservation on structure and viability of spermatozoa of <i>Rana tigerina</i>
4) นายสมพงษ์ ศรีบุรี	กายวิภาคศาสตร์	Characteristics of epithelial cells and the expression of Cathepsin L gene in the digestive tract of <i>Fasciola gigantica</i>
5) น.ส. ประภาพร ลายเมฆ	กายวิภาคศาสตร์	Structure and development of nerve ganglia, peripheral nervous system and special sensory organs in <i>Haliotis asinina</i>
6) นางมาลี จันทร์ภู	กายวิภาคศาสตร์	Development of the reproductive system and localization of egg laying hormone (ELH) in the gonad of the tropical abalone, <i>Haliotis asinina</i>
7) น.ส.กุลจิรา ชัยธีระยานนท์	กายวิภาคศาสตร์	Characterization and localization of <i>Fasciola gigantica</i> tegument antigen at 28.5 kD by monoclonal antibody
8) น.ส.วิริยา พันธุ์ขาว	กายวิภาคศาสตร์	Spermatogenesis and chromatin condensation in the male germ cells of the giant African snail, <i>Achatina fulica</i>

- | | | |
|------------------------------|----------------|--|
| 9) บ.ส.เสีพร พนโสภณกุล | กายวิภาคศาสตร์ | Spermatogenesis and chromatin condensation in the male germ cells of a marine oyster, <i>Saccostrea forskali</i> |
| 10) น.ส. อนุชิตดา ศิริศรีโร | จุลชีววิทยา | Production and characterization of monoclonal antibody against recombinant fatty acid binding protein of <i>Fasciola gigantica</i> |
| ระดับปริญญาเอก (3 คน) | | |
| หลักสูตร (สาขา) | | |
| 1) นายวัฒนา วีระชาติยานุกูล | กายวิภาคศาสตร์ | Studies of mammalian sperm membrane and molecules involving in fertilization and chromatin organization during spermatogenesis |
| 2) น.ส.ศิริกุล ประคิมฐ์สถาพร | กายวิภาคศาสตร์ | Chromatin organization and condensation during spermatogenesis in <i>Rana tigerina</i> |
| 3) นายวิฑูร ขาวสุข | กายวิภาคาสตร์ | Ultrastructure of <i>Fasciola gigantica</i> tegument and muscle, identification and localization of associated antigens |

ภาคผนวก