



สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย  
The Thailand Research Fund

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์  
โครงการวิจัยทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย (เมธีวิจัยอาวุโส สกว.)

โครงการ

1. การศึกษาพยาธิชีววิทยา การสังเคราะห์และวิเคราะห์คุณลักษณะของแอนติเจนและยีนของพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* ที่มีศักยภาพในการพัฒนาวิธีตรวจสอบการติดเชื้อและวัคซีน  
Immunopathobiology, syntheses and characterizations of *Fasciola gigantica* antigens, and encoding genes with diagnostic and vaccine potentials
2. การควบคุมกระบวนการสร้างและหลังเซลล์สืบพันธุ์โดยประสาทฮอร์โมนในหอยเป๋าฮื้อ  
Neuroendocrine controls of gametogenesis and spawning in a tropical abalone, *Haliotis asinina*

โดย

ศ. ดร. ประเสริฐ ไสภาน และคณะ



สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

**The Thailand Research Fund**

## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย (เมธีวิจัยอาวุโส สกว.)

(1 สิงหาคม 2544 – 30 กันยายน 2547)

### ชื่อโครงการ

1. การศึกษาพยาธิชีววิทยา การสังเคราะห์และวิเคราะห์คุณลักษณะของแอนติเจนและยีนของพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* ที่มีศักยภาพในการพัฒนาวิธีตรวจสอบการติดเชื้อและวัคซีน

Immunopathobiology, syntheses and characterizations of *Fasciola gigantica* antigens, and encoding genes with diagnostic and vaccine potentials

2. การควบคุมกระบวนการสร้างและหลังเซลล์สืบพันธุ์โดยประสาทฮอร์โมนในหอยเป่าฮือ

Neuroendocrine controls of gametogenesis and spawning in a tropical abalone, *Haliotis asinina*

### หัวหน้าโครงการ

ชื่อ นายประเสริฐ ไศภน

คุณวุฒิ Ph.D. (Cell Biology & Anatomy)

ตำแหน่ง ศาสตราจารย์

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

272 ถนนพระราม 6 เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400

**รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์**  
**โครงการวิจัยทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย (เมธีวิจัยอาวุโส สกว.)**  
(1 สิงหาคม 2544 – 30 กันยายน 2547)

**โครงการ**

1. การศึกษาพยาธิชีววิทยา การสังเคราะห์และวิเคราะห์คุณลักษณะของแอนติเจนและยีนของพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* ที่มีศักยภาพในการพัฒนาวิธีตรวจสอบการติดเชื้อและวัคซีน

Immunopathobiology, syntheses and characterizations of *Fasciola gigantica* antigens and encoding genes with diagnostic and vaccine potentials

2. การควบคุมกระบวนการสร้างและหลังเซลล์สืบพันธุ์โดยประสาทฮอร์โมนในหอยเป๋าฮื้อ

Neuroendocrine controls of gametogenesis and spawning in a tropical abalone, *Haliotis asinina*

**คณะผู้วิจัย**

- |                                               |                                              |
|-----------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 1. ศ.ดร. ประเสริฐ โศภณ <sup>1</sup>           | 2. รศ.ดร. ชัยทิพย์ วนิชานนท์ <sup>1</sup>    |
| 3. รศ.ดร. ประไพร์ เศรษฐรักษ์ <sup>1</sup>     | 4. รศ.ดร. จิตติพันธุ์ ชวเดช <sup>1</sup>     |
| 5. ผศ.ดร. สุขศิริ วิชาศรี กรามส์ <sup>2</sup> | 6. ผศ.ดร. พรจันทร์ สายทองดี <sup>1</sup>     |
| 7. อ.ดร. วัฒนา วีระชาติยานุกูล <sup>1</sup>   | 8. รศ.ดร.นพ. สมพงศ์ สหพงศ์ <sup>3</sup>      |
| 9. นายวิชัย ลั่นทอง <sup>1</sup>              | 10. อ.ดร. อัมพร ทองภูเกียรติกุล <sup>4</sup> |
| 11. อ.ดร. วิฑูร ชาวสุข <sup>5</sup>           | 12. อ.ดร. อาตุร มีพูล <sup>5</sup>           |
| 13. Dr. Hans Rudi Grams <sup>6</sup>          | 14. อ.ดร. เสมอ ถาน้อย <sup>7</sup>           |

<sup>1</sup> ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

<sup>2</sup> ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

<sup>3</sup> ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

<sup>4</sup> ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

<sup>5</sup> ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

<sup>6</sup> คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

<sup>7</sup> ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์

**สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย**  
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## สารบัญ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| บทคัดย่อ (Abstract) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 1   |
| บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive summary) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 12  |
| ผลงานวิจัย                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |     |
| โครงการที่ 1 การศึกษาพยาธิชีววิทยา การสังเคราะห์และวิเคราะห์คุณลักษณะของแอนติเจนและยีนของพยาธิใบไม้ตับ <i>Fasciola gigantica</i> ที่มีศักยภาพในการพัฒนาวิธีตรวจสอบการติดเชื้อและวัคซีน (Immunopathobiology, syntheses and characterizations of <i>Fasciola gigantica</i> antigens and encoding genes with diagnostic and vaccine Potentials) ..... | 41  |
| หัวข้อเรื่องที่ 1.1 พยาธิชีววิทยาของการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในหนูทดลอง แฮมสเตอร์หนูแรท และหนูเม้าส์ .....                                                                                                                                                                                                                                          | 41  |
| คำอธิบายประกอบผลการวิจัยหัวข้อเรื่องที่ 1.1 .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 61  |
| หัวข้อเรื่องที่ 1.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภูมิคุ้มกัน ระดับแอนติบอดี และคุณลักษณะของแอนติเจนในช่องท้องและกระแสโลหิตของหนูทดลองที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจนจากพยาธิตัวเต็มวัย .....                                                                                                                                                      | 66  |
| คำอธิบายประกอบผลการวิจัยหัวข้อเรื่องที่ 1.2 .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 91  |
| หัวข้อเรื่องที่ 1.3 การสังเคราะห์ คุณลักษณะ การกระจายและประสิทธิภาพการเป็นวัคซีนของยีน cathpsin B .....                                                                                                                                                                                                                                            | 94  |
| คำอธิบายประกอบผลการวิจัยหัวข้อเรื่องที่ 1.3 .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 108 |
| หัวข้อเรื่องที่ 1.4 การสังเคราะห์ คุณลักษณะ การกระจายและประสิทธิภาพการเป็นวัคซีนของ cathepsin L .....                                                                                                                                                                                                                                              | 111 |
| คำอธิบายประกอบผลการวิจัยหัวข้อเรื่องที่ 1.4 .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 114 |
| หัวข้อเรื่องที่ 1.5 การสังเคราะห์ การศึกษาคุณลักษณะ การกระจาย และการทดสอบศักยภาพการเป็นวัคซีนของโปรตีน Glutathione S-transferase (GST) .....                                                                                                                                                                                                       | 115 |
| คำอธิบายประกอบผลการวิจัยหัวข้อเรื่องที่ 1.5 .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 126 |
| หัวข้อเรื่องที่ 1.6 การสังเคราะห์ การศึกษาคุณลักษณะ การกระจาย และการทดสอบศักยภาพการเป็นวัคซีนของ Fatty acid binding protein (FABP) .....                                                                                                                                                                                                           | 129 |
| คำอธิบายประกอบผลการวิจัยหัวข้อเรื่องที่ 1.6 .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 140 |

|                                                                                                                                                                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| หัวข้อเรื่องที่ 1.7 การสังเคราะห์ การศึกษาคุณลักษณะ และการกระจายของโปรตีน 14-3-3 .....                                                                                                                        | 146 |
| คำอธิบายสรุปประกอบผลการวิจัยหัวข้อเรื่องที่ 1.7 .....                                                                                                                                                         | 156 |
| หัวข้อเรื่องที่ 1.8 การสังเคราะห์ การศึกษาคุณลักษณะ การแสดงออกของยีน Vitelline B<br>และการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อโปรตีน vitelline B เพื่อพัฒนาวิธี<br>การตรวจสอบการติดเชื้อพยาธิ .....                     | 159 |
| คำอธิบายสรุปประกอบผลการวิจัยหัวข้อเรื่องที่ 1.8 .....                                                                                                                                                         | 170 |
| <br>โครงการที่ 2 การควบคุมกระบวนการสร้างและหลังเซลล์สืบพันธุ์โดยประสาทฮอโมนใน<br>หอยเป่าฮื้อ (Neuroendocrine controls of gametogenesis and spawning in a tropical<br>Abalone, <i>Haliotis asinina</i> ) ..... | 173 |
| คำอธิบายสรุปประกอบผลการวิจัยหัวข้อเรื่องที่ 2 .....                                                                                                                                                           | 175 |
| หัวข้อเรื่องที่ 2.1 การศึกษาลักษณะการกระจายของสารสื่อประสาท serotonin ในปม<br>ประสาทของหอยเป่าฮื้อตัวเต็มวัย .....                                                                                            | 176 |
| คำอธิบายสรุปประกอบผลการวิจัยหัวข้อเรื่องที่ 2.1 .....                                                                                                                                                         | 178 |
| หัวข้อเรื่องที่ 2.2 การศึกษาการกระจายตัวของสารสื่อประสาท GABA ในปมประสาทและ<br>อวัยวะรับสัมผัสพิเศษของหนวดในหอยเป่าฮื้อตัวเต็มวัย .....                                                                       | 180 |
| คำอธิบายสรุปประกอบผลการวิจัยหัวข้อเรื่องที่ 2.2 .....                                                                                                                                                         | 183 |
| หัวข้อเรื่องที่ 2.3 การศึกษาลักษณะการกระจายของสารสื่อประสาท FMRFamide ในปม<br>ประสาทและอวัยวะรับสัมผัสพิเศษของหนวดในหอยเป่าฮื้อตัวเต็มวัย .....                                                               | 188 |
| คำอธิบายสรุปประกอบผลการวิจัยหัวข้อเรื่องที่ 2.3 .....                                                                                                                                                         | 189 |
| หัวข้อเรื่องที่ 2.4 การสังเคราะห์ การแสดงออก และการศึกษาลักษณะการกระจายของ<br>ฮอโมนกระตุ้นการตกไข่ (egg-laying hormone) ในปมประสาทและรังไข่<br>ของหอยเป่าฮื้อตัวเต็มวัย .....                                 | 193 |
| คำอธิบายสรุปประกอบผลการวิจัยหัวข้อเรื่องที่ 2.4 .....                                                                                                                                                         | 204 |
| หัวข้อเรื่องที่ 2.5 อิทธิพลของ serotonin, FMRFamide, prostaglandin E (PGE <sub>2</sub> ) และ egg-<br>laying hormone (aELH) ต่อการเจริญเติบโตและการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์<br>ในหอยเป่าฮื้อ .....                  | 210 |
| คำอธิบายสรุปประกอบผลการวิจัยหัวข้อเรื่องที่ 2.5 .....                                                                                                                                                         | 217 |
| หัวข้อเรื่องที่ 2.6 กระบวนการปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์สุจิกับเซลล์ไข่ในหอยเป่าฮื้อ .....                                                                                                                        | 218 |
| คำอธิบายสรุปประกอบผลการวิจัยหัวข้อเรื่องที่ 2.6 .....                                                                                                                                                         | 228 |

|                                                                                 |     |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----|
| ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการ .....                                                   | 232 |
| ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ .....                                       | 232 |
| การเสนอผลงานในที่ประชุมระดับนานาชาติ .....                                      | 234 |
| รหัสพันธุกรรมในฐานข้อมูล .....                                                  | 237 |
| นักวิจัยในโครงการที่ได้รับทุนอื่นในระหว่างรับทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย .....        | 238 |
| การผลิตบุคลากรและนักวิจัย .....                                                 | 239 |
| ผลิตภัณฑ์ที่ได้ซึ่งมีโอกาสนำไปประยุกต์ในเชิงพาณิชย์หรือเชิงสาธารณะในอนาคต ..... | 239 |

#### ภาคผนวก

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ
2. ผลงานในที่ประชุมระดับนานาชาติ
3. รหัสพันธุกรรมในฐานข้อมูล NCBI
4. บทความสำหรับการเผยแพร่

## บทคัดย่อ

**โครงการที่ 1 การศึกษาพยาธิชีววิทยา การสังเคราะห์และวิเคราะห์คุณลักษณะของแอนติเจนและยีนของพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* ที่มีศักยภาพในการพัฒนาวัคซีนตรวจสอบการติดเชื้อและวัคซีน**

### 1.1. พยาธิชีววิทยาของการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในหนูทดลองแฮมสเตอร์ หนูแรท และหนูเม้าส์

การศึกษาพยาธิสภาพของการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ออกแบบการทดลองการติดเชื้อพยาธิในสัตว์ทดลอง 3 ชนิดคือ หนูแฮมสเตอร์ หนูแรท และหนูเม้าส์ เพื่อหาสัตว์ทดลองขนาดเล็กที่สามารถใช้เป็นตัวอย่งในการทดสอบวัคซีนและยา ผลจากการทดลองติดเชื้อพยาธิในหนูทดลองทั้ง 3 ชนิด แสดงให้เห็นว่าหนูแฮมสเตอร์มีความต้านทานต่อการติดเชื้อพยาธิน้อยที่สุด จึงง่ายต่อการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับมากที่สุด โดยพบจำนวนพยาธิในตับและพยาธิสภาพของตับซึ่งถูกทำลายมากที่สุด สัตว์ทดลองที่มีความต้านทานสูงกว่าคือหนูเม้าส์ ในขณะที่หนูแรทมีความต้านทานต่อการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับมากที่สุด โดยมีจำนวนพยาธิในตับหลังการติดเชื้อพยาธิน้อยที่สุด และยังพบว่าตับของหนูแรทมีพยาธิสภาพน้อยที่สุดด้วย ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการสร้างภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะและแบบจำเพาะของหนูแรทนั้นมีประสิทธิภาพดีกว่าหนูทดลองชนิดอื่น ดังนั้นผลการทดลองจึงบ่งชี้ว่าหนูเม้าส์มีความสามารถในการสร้างภูมิคุ้มกันในระดับปานกลางซึ่งน่าจะเหมาะสมที่จะนำหนูชนิดนี้มาใช้ในการทดสอบวัคซีน โดยที่หนูแฮมสเตอร์น่าจะเหมาะสมที่จะใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของยาฆ่าพยาธิได้

### 1.2. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภูมิคุ้มกัน ระดับแอนติบอดี และคุณลักษณะของแอนติเจนในช่องท้องและกระแสโลหิตของหนูทดลองที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจนจากพยาธิตัวเต็มวัย

การเพิ่มจำนวนอย่างมีนัยสำคัญของอีโอซิโนฟิลและระดับของแอนติบอดีที่พบได้อย่างชัดเจนในหนูแรท (ระดับแอนติบอดีในหนูแรทมีค่าสูงกว่าในหนูเม้าส์ถึง 5.5 เท่า) น่าจะเป็นลักษณะสำคัญที่ทำให้หนูแรทมีความต้านทานต่อการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับมากกว่าหนูเม้าส์ นอกจากนี้การวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลองทำให้สรุปได้ว่า หนูแรทมีภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (innate immunity) ที่สามารถต้านทานการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับได้ดี แม้ว่าไม่เคยได้รับเชื้อพยาธิชนิดนี้มาก่อน ในขณะที่หนูเม้าส์มีภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะไม่เพียงพอที่จะต้านทานการติดเชื้อพยาธิดังกล่าวได้เช่นหนูแรท แต่ก็มีการสร้างภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเช่นการสร้างแอนติบอดีได้ในระดับหนึ่ง ดังนั้นการทดลองเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนป้องกันการติดเชื้อพยาธิจึงควรเลือกใช้หนูเม้าส์เพื่อที่จะได้แสดงประสิทธิภาพของวัคซีนได้อย่างชัดเจน

### 1.3. การสังเคราะห์ คุณลักษณะ การกระจายและประสิทธิภาพการเป็นวัคซีนของ cathpesin B

เราได้ทำการสังเคราะห์ cDNA และ recombinant proteins ของแอนติเจนหลายตัวที่น่าจะมีศักยภาพในการเป็นวัคซีนได้ โดยในลำดับแรกเราได้สังเคราะห์ยีน cathepsin B จากพยาธิใบไม้ตับ *F.*

*gigantica* ระยะตัวเต็มวัย ตัวอ่อน (NEJ) และระยะ metacercariae cDNAs ที่สังเคราะห์ได้ถูกกำหนดชื่อเป็น FG catB-1 FG catB-2 และ FG catB-3 ซึ่งแสดงความเหมือนกันประมาณ 64% ถึง 79% พบว่า FG catB-1 แสดงออกในพยาธิทุกระยะ ขณะที่ FG catB-2 และ FG catB-3 แสดงออกในพยาธิระยะ metacercariae ระยะตัว NEJ และระยะตัวอ่อนเท่านั้น โดยแสดงออกในเซลล์เนื้อเยื่อบุท่อทางเดินอาหาร ในเซลล์ที่อยู่ติดท่อทางเดินอาหารส่วนต้น และในเซลล์ชั้นผิว นอกจากนี้ยังพบในเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์ซึ่งรวมถึงเซลล์ของ Mehlis และ vitelline อัณฑะและไข่ ซึ่งอาจสรุปได้ว่าเอนไซม์ cathepsin B2, B3 มีบทบาทในการย่อยเนื้อเยื่อของโฮสต์เพื่อการไชและเคลื่อนผ่านไปสู่ตับของพยาธิตัวอ่อน และเอนไซม์ cathepsin B1 อาจทำหน้าที่ย่อยอาหารทั่วไปเพื่อให้ได้สารอาหารแก่พยาธิอีก โดยเฉพาะพยาธิตัวเต็มวัย หนูเม้าส์สามารถถูกกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Cat B โดยการฉีดกระตุ้นด้วย Cat B cDNA-pCI vector constructs ประสิทธิภาพการเป็นวัคซีนของ cathepsin B cDNA สามารถป้องกันการติดเชื้อในหนูเม้าส์ที่ใช้ทดสอบได้ 26% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

#### 1.4. การสังเคราะห์ คุณลักษณะ การกระจายและประสิทธิภาพการเป็นวัคซีนของ cathepsin L

ยีน cathepsin L ถูกสังเคราะห์จากพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระยะตัวเต็มวัยระยะตัวอ่อน (NEJ) และระยะ metacercariae โดยยีน FG catL-1G และ FG catL-1H แสดงออกในระยะ metacercaria และ NEJ ส่วนยีน FG catL-1A แสดงออกในพยาธิตัวเต็มวัย ลำดับกรดอะมิโนของยีนทั้งสามนี้แสดงความเหมือนกันประมาณ 70% ถึง 75% พบว่า cathepsin L แสดงออกเฉพาะในเซลล์เนื้อเยื่อบุท่อทางเดินอาหาร cathepsin L จึงน่าจะมีบทบาทหลักในการย่อยอาหารของพยาธิ หนูเม้าส์สามารถถูกกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Cat L โดยใช้ Cat L cDNA-pCI vector constructs ประสิทธิภาพการเป็นวัคซีนของ cathepsin L cDNA สามารถป้องกันการติดเชื้อในหนูทดลองได้ 40% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

#### 1.5. การสังเคราะห์ การศึกษาคุณลักษณะ การกระจาย และการทดสอบศักยภาพการเป็นวัคซีนของโปรตีน Glutathione S-transferase (GST)

ยีนของโปรตีน GST ถูกสังเคราะห์มาจากพยาธิตัวเต็มวัยโดยวิธี RT-PCR ทำให้ได้ cDNA ซึ่งนำมาสังเคราะห์โปรตีน recombinant GST (rGST) แล้วนำมาฉีดกระตุ้นในหนูเม้าส์เพื่อเก็บโพลีโคลนัล แอนติบอดี (PoAb) จากการตรวจสอบการกระจายของ GST ในเนื้อเยื่อของพยาธิใบไม้ตับระยะต่างๆ โดยวิธี Immunoperoxidase พบว่าโปรตีน GST มีปริมาณมากที่สุดเนื้อเยื่อ parenchyma ในทุกระยะของพยาธิ นอกจากนี้ในพยาธิตัวเต็มวัยยังสามารถเห็นปริมาณและการกระจายตัวของโปรตีน GST ในเซลล์ของเนื้อเยื่อ parenchyma เป็น 3 ระดับ คือ ระดับสูง ระดับปานกลาง และระดับต่ำ นอกจากเนื้อเยื่อ parenchyma แล้ว ยังพบว่าโปรตีน GST กระจายตัวอยู่ในระดับต่ำอยู่เนื้อเยื่ออัณฑะและรังไข่ของพยาธิตัวเต็มวัย แต่ไม่พบว่ามีโปรตีน GST อยู่ในชั้นผิว (tegument), caecum หรือ vitelline gland เลย ส่วนในตัวอ่อนสามารถพบการกระจายของโปรตีน GST ใน tegument ที่ระดับปานกลาง พบว่าหนู

เมาส์ที่ได้รับการฉีดวัคซีน rGST แบบ intradermal มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับลดลง 84.16% เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนพยาธิที่นับได้ในหนูชุดควบคุมที่ไม่ได้รับการฉีดวัคซีน นอกจากนี้พบว่า rGST จากพยาธิใบไม้ตับสามารถลดการติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือดได้ 58.08%

#### 1.6. การสังเคราะห์ การศึกษาคุณลักษณะ การกระจาย และการทดสอบศักยภาพการเป็นวัคซีนของ Fatty acid binding protein (FABP)

Fatty acid binding protein (FABPs) เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งซึ่งมีหน้าที่ช่วยในการขนส่งกรดไขมันและคอเรสเตอรอลเข้าไปในตัวพยาธิเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการสร้างไขมันของตัวพยาธิเอง จึงคาดว่า FABP น่าจะเป็นโมเลกุลที่สำคัญในการนำมาศึกษาประสิทธิภาพในการเป็นวัคซีนเพื่อป้องกันโรคพยาธิใบไม้ตับได้ เราได้สังเคราะห์ cDNA ของโปรตีน FABP โดยวิธี RT-PCR จากการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของพยาธิใบไม้ตับชนิดนี้กับลำดับกรดอะมิโนจากโฮสต์ของพยาธิ เช่น หนูเมาส์ และมนุษย์ พบว่ามีความเหมือนเพียง 23-32% จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำ FABP มาใช้เป็นวัคซีนในการป้องกันการติดเชื้อพยาธิโดยไม่น่าจะเกิดปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันทำลายตัวเองของโฮสต์ ผลการผลิตโปรตีน FABP โดยวิธีทางพันธุวิศวกรรมในแบคทีเรียทำให้ได้โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 14.5 กิโลดาลตัน โปรตีนดังกล่าวได้ถูกนำมาใช้ในการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี (MoAb) เมื่อใช้ MoAb ตรวจสอบการกระจายพบว่า FABP ปรากฏอยู่อย่างหนาแน่นมากที่สุดในเซลล์ของเนื้อเยื่อพาราเรนาโคมา โดยเฉพาะในเซลล์พาราเรนาโคมาชนิดที่ 2 (Pc2) จึงเป็นไปได้ว่า Pc2 มีหน้าที่ในการควบคุมกระบวนการเมตาบอลิซึมของไขมันเป็นหลัก นอกจากนี้ยังพบว่า MoAb ต่อ FABP มีความจำเพาะต่อพยาธิชนิดนี้และต่อพยาธิใบไม้เลือด ในการทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันการติดเชื้อพยาธิในหนูเมาส์ โดยใช้ FABPcDNA พบว่าหนูเมาส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นโดยวิธี intradermal และวิธี intramuscular สามารถลดปริมาณการติดเชื้อพยาธิได้ 55.88% และ 43.13% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีน FABPcDNA

#### 1.7. การสังเคราะห์ การศึกษาคุณลักษณะ และการกระจายของโปรตีน 14-3-3

เราได้ผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนชั้นผิวของพยาธิใบไม้ตับที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 29-30 kDa พร้อมกับการผลิต โพลีโคลนัลแอนติบอดีต่อแอนติเจนจากชั้นผิว เพื่อนำไปใช้ในการเสาะหาชิ้นที่จำเพาะต่อผิวพยาธิใบไม้ตับของตัวเต็มวัย โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อน้ำหนักโมเลกุลที่ 28.5 kDa ซึ่งสามารถพบได้ในทุกระยะของพยาธิ ยกเว้นสภาวะคดหลัง โพลีโคลนัลแอนติบอดีต่อชั้นผิวพยาธิสามารถ screen พบยีนของ Fg14-3-3 protein, zeta isoform แต่ไม่พบยีนที่มีความจำเพาะต่อชั้นผิว โดยการให้โมโนโคลนัลแอนติบอดีเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับความเหมือนของกรดอะมิโนระหว่าง Fg14-3-3 และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดต่างๆ พบว่ามีค่าความเหมือนของกรดอะมิโนอยู่ในช่วง 55.0-57.8% การวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่ายีน Fg14-3-3 protein อยู่ในกลุ่มเดียวกับ *Schistosoma mansoni* protein1 และ *S. japonicum* protein1 พบการแสดงออกของยีน

(mRNA transcripts) ในเซลล์เยื่อทางเดินอาหาร, เซลล์เนื้อเยื่อพาราเรนาโคมา และในเซลล์ชั้นผิวพยาธิ แต่ไม่พบในเซลล์กล้ามเนื้อ นอกจากนี้ยังพบในเซลล์ต่อมลูกหมากและอวัยวะของอวัยวะสืบพันธุ์ในเพศผู้ รวมถึงเซลล์ของ Mehlis' gland, vitelline และไข่ในเพศเมีย หลังจากนั้นได้สังเคราะห์โปรตีน 14-3-3 ที่ติดฉลากด้วย Histidine (rFg14-3-3-6xHistagged fusion protein) พบว่าโปรตีนที่สังเคราะห์ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 30 kDa เพื่อนำไปผลิตโพลีโคลนัลแอนติบอดีต่อโปรตีนในกระต่าย โพลีโคลนัลแอนติบอดีสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีน 14-3-3 ซึ่งในทุกระยะของพยาธิได้แก่ ระยะ metacercariae, NEJ, ตัวอ่อน 4 และ 7 สัปดาห์ และตัวเต็มวัย สามารถตรวจพบแอนติบอดีต่อ Fg14-3-3 จากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ในกระต่ายตั้งแต่ระยะ 2 สัปดาห์หลังการติดเชื้อในกระต่ายและปฏิกิริยายังคงพบต่อเนื่อง จนถึงระยะสิ้นสุดการทดลองที่ 10 สัปดาห์ ดังนั้นแอนติเจนนี้ค่อนข้างมีความจำเพาะ และอาจสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อแบบ immunodiagnosis ได้

#### 1.8. การสังเคราะห์ การศึกษาคุณลักษณะ การแสดงออกของยีน Vitelline B และการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อโปรตีน vitelline B เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบการติดเชื้อพยาธิ

ผลการสังเคราะห์ยีนของโปรตีน vitelline B โดยวิธี RT-PCR ทำให้ได้ cDNA ที่มีขนาด 810 คู่เบส เมื่อนำมาผ่านการแปลงเป็นลำดับกรดอะมิโนและเปรียบเทียบกับ vitelline B1 และ vitelline B2 ของพยาธิใบไม้ตับสายพันธุ์ *F. hepatica* พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน 93% และ 83% ตามลำดับ จากการศึกษาโดยวิธี *in situ* hybridization ตรวจพบ mRNA ของยีน vitelline B อยู่ในเซลล์ ของ vitelline gland จากนั้นได้ทำการตัดต่อพันธุกรรมเข้าไปในแบคทีเรีย และกระตุ้นด้วยสาร IPTG เพื่อให้แบคทีเรียผลิตโปรตีน vitelline B เมื่อนำโปรตีนที่ได้มาผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA-agarose affinity column และตรวจแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE และ immunoblotting พบ Vit B โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 31 กิโลดาลตัน นำ vitelline B มาใช้ในการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี และนำโมโนโคลนัลแอนติบอดีมาใช้ในการตรวจหาการกระจายของโปรตีน vitelline B ในเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้ตับ ระยะตัวเต็มวัยพบว่าการกระจายของโปรตีน vitelline B จำเพาะอยู่ใน eggshell granule, eggshell globule ของเซลล์ vitelline ที่เจริญเต็มที่ รวมทั้งในไข่และเปลือกไข่ด้วย

จากการศึกษาดังกล่าวข้างต้น แอนติเจนและยีนที่น่าจะมีศักยภาพในการเป็นวัคซีนสูงคือ Cat L, GST และ FABP ส่วนโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่น่าจะนำไปพัฒนาวิธีตรวจสอบสภาพติดเชื้อได้คือ MoAb ต่อ FABP และ MoAb ต่อแอนติเจนในชั้นผิวที่ 28.5 กิโลดาลตัน

#### โครงการที่ 2 การควบคุมกระบวนการสร้างและหลังเซลล์สืบพันธุ์โดยประสาทฮอร์โมนในหอยเป่าฮื้อ

จากการศึกษาด้วยวิธี dot-blot ELISA ทำให้ทราบว่าสารสื่อประสาทและสารขยายสัญญาณประสาทหลักที่มีอยู่ในปมประสาทคือ เซโรโทนิน (5HT), GABA และ FMRFamide พบว่ามี 5HT และ

FMRFamide ในปมประสาทที่อันทะและรังไข่ ส่วน GABA พบในปมประสาทและปมรับสัมผัสที่กระจายอยู่ตามหนดแต่ไม่พบในอันทะและรังไข่ นอกจากนี้ยังพบ prostaglandin E2 ในปมประสาทและ gonad แต่ไม่พบฮอร์โมนเพศ dihydrotestosterone และ estradiol อยู่เลย

## 2.1. การศึกษาลักษณะการกระจายของสารสื่อประสาท serotonin ในปมประสาทของหอยเป่าชื่อตัวเต็มวัย

พบการกระจายของเซลล์ประสาทเซโรโทนินในปมประสาทของหอยเป่าชื่อ *H. asinina* ซึ่งเป็นเซลล์ประสาทสองชนิดในปมประสาทซีรีบรัล (cerebral), พลูโรพีดัล (pleuropedal) และ วิสเซอร์ลัล (visceral) ซึ่งเป็นเซลล์ขนาดใหญ่และเซลล์ขนาดกลาง เซลล์ประสาทขนาดใหญ่มีแขนงประสาท (axon) ยื่นยาวออกจากตัวเซลล์จึงน่าจะเป็น motor neuron ส่วนเซลล์ขนาดกลางน่าจะเป็น neurosecretory cell เนื่องจากไม่พบแขนงประสาทออกจากตัวเซลล์ จำนวนของเซลล์ประสาทเซโรโทนินพบมากในปมประสาทซีรีบรัลและพลูโรพีดัล แต่ในปมประสาทวิสเซอร์ลัลมีจำนวนของเซลล์ประสาทน้อยกว่า นอกจากนี้ยังพบเซโรโทนินกระจายอยู่ในถุงหุ้มและแผ่นเยื่อเกี่ยวพันของรังไข่โดยเฉพาะใน proliferative และ premature stages จากผลการศึกษาดังกล่าวสรุปได้ว่า เซโรโทนินเป็นสารสื่อประสาทที่สำคัญใน *H. asinina* โดยอาจมีบทบาททั้งในการเคลื่อนไหวและการสืบพันธุ์

## 2.2. การศึกษาการกระจายตัวของสารสื่อประสาท GABA ในปมประสาทและอวัยวะรับสัมผัสของหนดในหอยเป่าชื่อตัวเต็มวัย

พบการกระจายของ GABA ในปมประสาท cerebral, pleuropedal และ visceral ซึ่งส่วนใหญ่เป็น neurosecretory แบบ NS<sub>2</sub> โดยมีจำนวนมากที่สุดในปมประสาท cerebral และน้อยที่สุดในปมประสาท visceral ไม่พบ GABA ใน gonad แต่พบการกระจายของ GABA ในหนดโดยเฉพาะใน neuroepithelial cells ซึ่งเป็นเซลล์รับรู้ความรู้สึกที่บริเวณปมรับรู้สื่อกบนผิวของหนด

## 2.3. การศึกษาลักษณะการกระจายของสารสื่อประสาท FMRFamide ในปมประสาทและอวัยวะรับสัมผัสพิเศษของหนดในหอยเป่าชื่อตัวเต็มวัย

พบว่า FMRFamide เซลล์ในปมประสาท cerebral, pleuro-pedal และ visceral ganglion โดยเซลล์เหล่านี้เป็น neurosecretory cells (NS) 3 ชนิดคือ NS1, NS2 และ NS3 จำนวนเซลล์มีมากที่สุดในปมประสาท pleuro-pedal และมีน้อยที่สุดในปมประสาท visceral นอกจากนี้ยังพบ FMRF ในใยประสาท ใน capsule และ trabeculae ของรังไข่และ testis และเส้นประสาทส่วนปลายที่ไปเลี้ยง atrium, gill, intestine และ กล้ามเนื้อ pedal สันนิษฐานว่า FMRFamide มีบทบาทในการควบคุมการเคลื่อนไหวที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของอวัยวะหลายระบบรวมทั้งอวัยวะสืบพันธุ์

## 2.4. การสังเคราะห์ การแสดงออก และการศึกษาลักษณะการกระจายของฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่ (egg-laying hormone) ในปมประสาทแวงรังไข่ของหอยเป่าชื่อตัวเต็มวัย

เราได้สังเคราะห์โปรตีน Egg-laying-hormone ในหอยเป่าชื่อ (aELH) โดยการเชื่อมต่อกับ *Schistosoma japonicum* GST ซึ่งเรียกว่า GST-aELH ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 33 กิโลดาลตัน แล้ว

นำโปรตีนไปฉีดกระต่ายเพื่อผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน GST-aELH และดูดซับด้วยโปรตีน GST จนมีความจำเพาะต่อ aELH เท่านั้น จากผลการศึกษาการกระจายตัวโดยใช้แอนติบอดีดังกล่าวพบว่ามี aELH อยู่ใน neurosecretory (NS) cells ชนิดที่ 1 และ 2 ใน neurite ของ neuropil และช่องเลือดภายในแผ่นเยื่อเกี่ยวพันรอบปมประสาท cerebral, pleuropedal และ visceral โดยเซลล์ที่พบส่วนใหญ่จะอยู่ในปมประสาท pleuropedal และมีจำนวนเพียงเล็กน้อยในปมประสาท visceral นอกจากนี้ยังพบการกระจายในกลุ่มเซลล์ของ statocyst และเส้นประสาทที่เกี่ยวข้องด้วย ส่วนในรังไข่พบ aELH ใน granular cells ในแผ่นเยื่อเกี่ยวพัน trabeculae และบริเวณถุงหุ้มรังไข่ ฮอริโมนชนิดนี้ซึ่งน่าจะมีส่วนควบคุมการตกไข่มีการติดสีปานกลางในไฮโดพลาสซึมของไข่ระยะพัฒนาเต็มที่และเซลล์ลอมโซ่ที่อยู่ข้างเคียง

## 2.5. อิทธิพลของ serotonin, FMRFamide, prostaglandin E ( $PG_E$ ) และ egg-laying hormone (aELH) ต่อการเจริญเติบโตและการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในหอยเป่าฮือ

ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาผลของสารสื่อประสาท serotonin และฮอริโมนประสาท egg-laying hormone (ELH), FMRFamide และ prostaglandin ( $PG_E$ ) ที่คาดว่าน่าจะมีผลต่อการกระตุ้นการปล่อยน้ำเชื้อและไข่ รวมถึงผลในการเร่งการเจริญเติบโตในหอยเป่าฮือ สรุปได้ว่า ฮอริโมนประสาททั้ง 4 ชนิดสามารถใช้กระตุ้นการปล่อยน้ำเชื้อและไข่ในหอยเป่าฮือชนิดนี้ได้ การฉีดกระตุ้นด้วย serotonin ที่ความเข้มข้น  $10^{-3}$  M สามารถกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ทั้งในหอยเพศผู้และเพศเมีย โดยในหอยเพศผู้พบการปล่อยของน้ำเชื้อหลังการฉีดกระตุ้นประมาณ 3-4 ชั่วโมง ส่วนหอยเพศเมียพบการปล่อยของไข่หลังการฉีดกระตุ้นประมาณ 5 ชั่วโมง ส่วนการฉีดกระตุ้นด้วยฮอริโมนประสาท ELH ที่ความเข้มข้น  $100 \mu g$  สามารถกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย สำหรับการกระตุ้นด้วยฮอริโมนประสาท FMRFamide ที่ความเข้มข้น  $10^{-3}$  M และ  $10^{-6}$  M และ  $PG_E$  ที่ความเข้มข้น  $10^{-3}$  M สามารถกระตุ้นได้เฉพาะการปล่อยของน้ำเชื้อหลังการฉีดกระตุ้นประมาณ 2-4 ชั่วโมง นอกจากช่วยกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์แล้วยังพบว่า ฮอริโมนประสาทเหล่านี้สามารถเร่งการเจริญเติบโตในหอยเป่าฮือตัวอ่อนได้ด้วยเมื่อเทียบกับกลุ่มหอยที่ไม่ได้รับการฉีดด้วยฮอริโมน โดยสารฮอริโมนที่มีอิทธิพลมากที่สุดคือ FMRFamide ที่ความเข้มข้น  $200 \text{ ng/g body weight (BW)}$  ลำดับรองลงมาคือฮอริโมน  $PG_E$  ที่ความเข้มข้น  $20 \text{ ng/g BW}$ , สารสื่อประสาท serotonin ที่ความเข้มข้น  $20 \text{ ng/g BW}$  และ ELH ที่ความเข้มข้น  $200 \text{ ng/g BW}$  หอยที่ได้รับ serotonin และ aELH มีการพัฒนาของต่อมอวัยวะและรังไข่เร็วขึ้นถึงแม้จะมีขนาดตัวเล็กกว่า

## 2.6. กระบวนการปฏิสนธิระหว่างเซลล์สุจิกับเซลล์ไข่ในหอยเป่าฮือ

ผลการบันทึกเวลาขณะทำการผสมเซลล์สุจิกับเซลล์ไข่พบว่าเซลล์สุจิว่ายผ่านชั้น jelly ของไข่และไปจับกับชั้น vitelline envelope พร้อมเกิด acrosome reaction ภายใน 3 นาที จากนั้นไข่เกิด first polar body และ second polar body ที่ 8 และ 10 นาทีแล้วไข่ก็เริ่มการแบ่งเซลล์ที่เวลา 20 นาที โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุด (75%) เมื่อผสมเซลล์ไข่กับอสุจิในอัตราส่วน 1:200 โปรตีนที่แยกจากชั้น jelly (EJ) และ vitelline envelope (VE) ของไข่เป็นไกลโคโปรตีนขนาดใหญ่ พบว่าโปรตีนสกัดจาก EJ

ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิด acrosome reaction ได้แม้ว่าจะใช้ที่ความเข้มข้นของโปรตีนที่ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรถึง 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แต่ EJ ที่ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรสามารถกระตุ้นให้เซลล์สุจิว่ายน้ำเร็วขึ้น ส่วนโปรตีนจาก VE สามารถกระตุ้น acrosome reaction ได้เมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

## ABSTRACT

### 1. Immunopathobiology, syntheses and characterizations of *Fasciola gigantica* antigens and encoding genes with diagnostic and vaccine potentials

#### 1.1. Immunopathobiology of *Fasciola gigantica* infection in small laboratory animals

In order to find appropriate small laboratory animals suitable for testing vaccine candidates for fasciolosis by *F. gigantica*, immunopathological as well as humoral immune responses of hamsters, mice, and rats were evaluated. It was found that rats were the most resistant to parasite infection probably because they possess strong innate as well as acquired immunity, whereas hamsters were the most susceptible because they could generate only weak immune response against the parasites. Mice exhibited intermediate susceptibility to the infection and could produce certain level of immune responses.

#### 1.2. Profiles of immune cells and antibody levels in response to infection by *Fasciola gigantica* adult antigens in small laboratory animals

The strong immune responses in rats were characterized by high levels of immune cells, especially eosinophils, and antibody. Hence rats and hamsters were not suitable for vaccine testing, but hamsters may be good model for testing the effect of drug because of their low resistance. Mice were considered to be the most suitable small animals for vaccine testing because of their intermediate resistance.

#### 1.3. Molecular cloning, characterization, localization, and vaccine potential of cathepsin B

Several vaccine candidates have been cloned and characterized. Cathepsin B possesses three genes in a single family, i.e., FG catB-1, FG catB-2, and FG catB-3. FG catB-1 was expressed in all stages, while FG catB-2 and FG catB-3 were expressed in metacercariae and newly excysted juvenile (NEJ), and older juvenile, respectively. The enzymes were detected principally in the caecal epithelial cells, tegumental cells and cells of Mehlis and vitelline gland. The enzymes could be responsible for parasite's tissue invasion (FG catB-2, FG catB-3) and general digestion (FG catB-1), and in as yet undefined reproductive process. When cDNA-pCI vector were tested for vaccine efficacy in mice it showed 26% protection.

#### 1.4. Molecular cloning, characterization, localization, and vaccine potential of cathepsin L

Three genes encoding cathepsin L were also cloned and characterized. CatL-1G and CatL-1H were expressed in NEJ and metacercaria, while CatL-1A was expressed in adult

stage. These enzymes were detected exclusively in cells of caecal epithelium, thus may function mainly in digestion of nutrients. cDNA-pCI vector construct exhibited 40% protection.

#### 1.5 Molecular cloning, characterization, localization, and vaccine potential of Glutathione S-Transferase (GST)

A gene encoding glutathione S-transferase (GST) was cloned, characterized, and recombinant GST synthesized. GST was presented in all stages of the parasite and was most concentrated in the parenchyma, while its level in the tegument and caecum was decreased as the parasites grow older. Recombinant GST exhibited good vaccine potential with 84%, 80% and 79% protection for intradermal, subcutaneous and intramuscular injections. Further, it also exhibited strong cross protection against *Schistosoma mansoni* (58%).

#### 1.6. Molecular cloning, characterization, localization and vaccine potential of fatty acid binding protein

A gene encoding fatty acid binding protein (FABP) was cloned, characterized, and the recombinant protein was expressed. Monoclonal antibody against FABP was produced and used for FABP localization. FABP was detected in all stages of the parasite, and was most concentrated in parenchymal cells. In the adult, these cells were classified into 3 types based on the quantity of FABP in their cytoplasm and ultrastructural features. cDNA-pCI construct could provide 56% and 43% protection by intradermal and intramuscular routes, respectively. MoAb exhibited cross reaction only with FABP of *Schistosoma* spp. hence is quite specific and may be a good candidate for immunodiagnosis.

#### 1.7. Molecular cloning, characterization and localization of *Fasciola gigantica* 14-3-3 protein

A gene encoding 14-3-3 protein was cloned and characterized, and the recombinant protein expressed. An equivalent native protein was presented in the cells of all tissues of all stages except muscle. It was highly concentrated in the tegument where it may have a role in signal transduction. Because of its consistent presence in most tissues and fairly low identity with the mammalian protein, it could be another vaccine candidate. A monoclonal antibody against 28.5 kDa tegumental protein was produced. This protein was quite unique and abundant in the tegument, and appeared to be quite distinct from 14-3-3 protein. Since this MoAb was quite specific to tegumental protein at 28.5 kDa and showed limited cross reaction only with similar protein in *Schistosoma* spp., it is another good candidate for immunodiagnosis.

#### 1.8. Molecular cloning, characterization and localization of *Fasciola gigantica* eggshell proteins

A gene encoding an egg-shell protein, vitelline B1, was cloned and characterized, and the recombinant protein expressed. MoAb against recombinant vitelline B1 was produced and used for localizing the protein, which was presented in vitelline cells in vitelline gland and vitelline cells as well as egg shell protein in and around the mature ovum. This MoAb may also be a good candidate for immunodiagnosis in detecting the egg or egg shell antigens.

## **2. Neuroendocrine controls of gametogenesis and spawning in a tropical abalone, *Haliotis asinina***

By dot-blot ELISA it was determined that the major neurotransmitters and neuromodulators in the neural ganglia of the abalone were 5-HT, GABA, FMRFamide. 5-HT and FMRFamide were also strongly present in the gonad, while GABA was presented in the epipodial tentacles.

### **2.1. Distribution of serotonergic neurons and fibers in the nervous system, and gonad**

Serotonergic neurons were immunohistochemically localized in the cerebral, pleuropedal, and visceral ganglia. All were large size neurons which were the giant neurons (NR<sub>1</sub>) and medium size neurosecretory cells (NS<sub>1</sub>). The 5-HT cells were most abundant in cerebral and pleuropedal ganglia and least abundant in visceral ganglia. In addition, 5-HT was presented in nerve fibers within the neuropil of all ganglia. In the gonad 5-HT was detected in the connective tissue trabeculae and capsule of ovary, especially at proliferative and premature stages, while the testis exhibited only low amount of 5-HT.

### **2.2. Distribution of GABAergic neurons and fibers in the nervous system and sensory organs of tentacles**

GABAergic neurons were also detected in the cerebral, pleuropedal, and visceral ganglia, with the highest number in cerebral and visceral ganglia and lowest number in pleuropedal ganglia. Most appeared to be neurosecretory cells (NS<sub>2</sub>). GABA could not be detected in the gonad but was strongly presented in the neuroepithelial cells in the sensory papillae of the tentacles, and in the nerve fibers within the tentacular core.

### **2.3. Distribution of FMRFamide neurons and fibers in the nervous system and sensory organs of tentacles**

FMRFamidergic neurons were presented in all three ganglia, with the most numerous number in pleuropedal and least numerous in cerebral ganglia. Most appeared to be

neurosecretory cells (NS<sub>1</sub>, NS<sub>2</sub> and NS<sub>3</sub>). Strong immunoreactivity was also detected in the ovarian and testicular capsule, and weak immunoreactivity detected in trabeculae.

#### **2.4. Cloning, expression and localization of abalone egg-laying hormone (aELH) in the neural ganglia and ovary**

A recombinant abalone egg-laying hormone (aELH) was expressed as a fusion protein GST-aELH from cDNA of *Haliotis* spp. AntiGST-aELH was produced by immunizing rabbit with the recombinant protein. This antibody was vigorously preabsorbed with GST, so that only anti-aELH activity remained and used for localizing aELH. It was found that aELH was localized in neurosecretory cells (NS<sub>1</sub>, NS<sub>2</sub>), neurites in the neuropil, and blood sinuses in the connective tissue sheath of cerebral, pleuropedal and visceral ganglia. The positive cells were most numerous in cerebral and pleuropedal ganglia and least numerous in visceral ganglia. Immunoreactivity to aELH was also detected in ovarian capsule and granular cells in trabeculae, and follicular cells adjacent to mature oocytes, as well as in the cytoplasm of the latter.

#### **2.5. Effects of serotonin, FMRFamide, prostaglandin E (PG<sub>E</sub>) and egg-laying hormone (aELH) on growth, and spawning induction**

Administration of the 5-HT, aELH could stimulate the release of both sperm and eggs in sexually mature male and female, while FMRF and PG<sub>E2</sub> could induce only spermiation. FMRF tended to stimulate more somatic growth while 5-HT and aELH tended to promote maturation of gonad early than usual.

#### **2.6. The process of sperm-egg interaction in *Haliotis asinina***

When mature sperm and eggs were released, they fertilized externally, and the process is completed within 10 minutes. The zygote began to cleave within 20 minutes. The highest yield of fertilization (70%) was obtained at the ratio of egg to sperm at 1:200. The egg was covered by jelly coat (EJ) and vitelline membrane (VJ). EJ most likely play role in stimulating sperm chemoattraction and sperm motility, while VJ could stimulate acrosomal reaction.

## บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

**โครงการที่ 1 การศึกษาพยาธิชีววิทยา การสังเคราะห์และวิเคราะห์คุณลักษณะของแอนติเจนและยีนของพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* ที่มีศักยภาพในการพัฒนาวิธีตรวจสอบการติดเชื้อและวัคซีน**

### 1.1. พยาธิชีววิทยาของการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในหนูทดลองแฮมสเตอร์ หนูแรท และหนูเมาส์

การศึกษาพยาธิสภาพของการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ออกแบบการทดลองโดยทำการติดเชื้อพยาธิในสัตว์ทดลอง 3 ชนิดคือ หนูแฮมสเตอร์ หนูแรท และหนูเมาส์ การทดลองในหนูแฮมสเตอร์ทำโดยนำหนูสายพันธุ์ Golden Syrian Hamster เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ มาแบ่งออกเป็นสองกลุ่มในกลุ่มที่ 1 จัดเป็นกลุ่มควบคุม ประกอบด้วยหนูแฮมสเตอร์จำนวน 48 ตัว โดยแต่ละตัวถูกป้อนด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ในปริมาณ 1 มิลลิลิตรต่อตัว ในกลุ่มที่ 2 สัตว์ทดลองทั้งหมด 60 ตัว แต่ละตัวถูกติดเชื้อพยาธิโดยการป้อนด้วยพยาธิใบไม้ตับระยะ metacercaria ในปริมาณตัวละ 15 metacercariae หลังจากนั้นจึงทำการสุ่มเลือกสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ 1 ครั้งละ 8 ตัว และในกลุ่มที่ 2 ครั้งละ 10 ตัว จำนวน 6 ครั้ง คือในวันที่ 1, 4, 7, 21, 35 และ 49 หลังการติดเชื้อพยาธิ (Day post infection, DPI) เพื่อนำมาตรวจหาพยาธิสภาพ จากการทดลองสามารถพบพยาธิสภาพที่ตับของหนูทดลองในกลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับเชื้อพยาธิ โดยที่ 4 DPI พบ hemorrhagic foci บริเวณขอบของตับ ที่ 7 DPI พบ migratory tract ที่ชัดเจนขึ้น ที่ 21 DPI สามารถพบ grayish-white irregular line ทั้งด้านนอกและด้านในของตับ รวมทั้งพบ fibrin และ fibrinopurulent exudates ติดอยู่กับขอบด้านนอกของตับใกล้เคียงกับกระบังลม ที่ 35 DPI พบตับมีขนาดใหญ่ขึ้นและยังพบเลือดออกในช่องท้องของหนูทดลองด้วย ที่ 49 DPI ตับของหนูทดลองมีนิ่วขรุขระ และมีการหดตัวของตับอันเนื่องมาจากการดึงรั้งของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สะสมมากขึ้นทำให้ตับมีรูปร่างผิดปกติ การตรวจสอบพยาธิสภาพระดับเนื้อเยื่อ พบว่าที่ 4 DPI มีเซลล์เม็ดเลือดแดงและซากเซลล์ตับอยู่ใน migratory tract โดยพบเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลอยู่ร่วมด้วยเล็กน้อย ที่ 7 DPI พบว่าที่ migratory tract มีการตอบสนองแบบ acute inflammation ซึ่งสามารถจำแนกลักษณะดังกล่าวนี้ได้โดยการพบ hemorrhage และนิวโทรฟิล เมื่อการติดเชื้อพยาธิเป็นเวลานานขึ้น ที่ 21 DPI พบว่ามีอิโอสินอฟิลเข้ามาใน migratory tract มากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า migratory tract มีขนาดกว้างขึ้นซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการที่พยาธิมีขนาดใหญ่ขึ้น ที่ 35 DPI พบว่ามี acute และ chronic inflammation ของ migratory tract ทั้งทั้งพูของตับ และสามารถพบลักษณะของ hepatic cirrhosis ได้ที่ 49 DPI จากการเปรียบเทียบค่าทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม พบว่าหนูทดลองที่ติดเชื้อพยาธิมี eosinophilia เกิดขึ้นตั้งแต่ที่ 21 DPI และคงอยู่จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่ลักษณะของ anemia เริ่มเห็นชัดเจนที่เวลา 35 DPI จากการตรวจวัดระดับเอนไซม์ในเซรัม พบว่าระดับของเอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT) มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่ที่ 21 DPI ไปจน

สิ้นสุดการทดลอง ในทางกลับกันโปรตีนอัลบูมินในเซรัมมีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ที่ในช่วงเวลาเดียวกันกับการตรวจวัดระดับของเอนไซม์ ALT จากการตรวจนับจำนวนพยาธิในตับของหนูแฮมสเตอร์ ทั้งหมดในกลุ่มที่ติดเชื้อนี้พบว่าที่ 21 DPI มีจำนวนเฉลี่ยของพยาธิสูงสุด คือ 47.77%

การทดลองในหนูแรทและหนูเมาส์ถูกออกแบบการทดลองโดยวิธีการเดียวกันกับการทดลองในหนูแฮมสเตอร์ โดยนำหนูแรท สายพันธุ์ Wistar Rat เพศผู้ อายุ 5 สัปดาห์ และหนูเมาส์สายพันธุ์ ICR Mouse เพศผู้ อายุ 6 สัปดาห์ มาแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มในหนูแต่ละชนิด โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม มีหนูทดลองทั้งหมด 60 ตัว และในกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มทดลองติดเชื้อพยาธิ มีหนูทดลองทั้งหมด 72 ตัว จากนั้นสุ่มเลือกหนูทดลองในกลุ่มที่ 1 จำนวน 10 ตัว และหนูทดลองในกลุ่มที่ 2 จำนวน 12 ตัว มาทำการตรวจหาพยาธิสภาพ ที่ช่วงเวลาเดียวกันกับที่ทดลองในหนูแฮมสเตอร์ ในหนูแรทที่ได้รับการติดเชื้อพยาธิ เริ่มพบความผิดปกติที่ 7 DPI โดยเห็นเป็น hemorrhagic foci ในช่วงเวลาต่อมาที่ 21, 35 และ 49 DPI พบว่ามีพยาธิสภาพคล้ายคลึงกันกับที่พบในตับของหนูแฮมสเตอร์ แต่พบว่ามี ความรุนแรงน้อยกว่า การตรวจสอบที่ระดับจุลทรรศน์ธรรมดา ที่ 7 DPI พบ migratory tract ที่บริเวณขอบตับ โดยใน migratory tract พบเซลล์เม็ดเลือดแดง ซากเซลล์ตับ และเม็ดเลือดขาวชนิดอีโอซิโนฟิล ที่ 21 DPI พบว่า migratory tract ที่พบในตับของหนูแรทคล้ายคลึงกับที่พบในตับของหนูแฮมสเตอร์ โดยพบว่ามีอีโอซิโนฟิล นิวโทรฟิล และมาโครฟาจ เข้ามาอยู่ใน migratory tract ที่ 35 และ 49 DPI แม้ว่า migratory tract ที่พบในตับของหนูแรทมีลักษณะคล้ายคลึงกับที่พบในตับของหนูแฮมสเตอร์ แต่เซลล์หลักที่พบในการเกิด acute inflammation คือ อีโอซิโนฟิล นอกจากนี้ปริมาณอีโอซิโนฟิลในกระแสเลือดของหนูแรทที่ติดเชื้อพยาธิมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณอีโอซิโนฟิลของหนูในกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามการเปรียบเทียบทางสถิติระหว่างหนูแรทในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม พบว่าไม่มีความแตกต่างของปริมาณเอนไซม์ alanine aminotransferase และ alkaline phosphatase รวมทั้งไม่มีความแตกต่างของปริมาณโปรตีนในเซรัมของหนูทั้งสองกลุ่มด้วย ซึ่งบ่งชี้ว่าเนื้อเยื่อตับไม่ถูกทำลาย และเมื่อตรวจนับจำนวนพยาธิในตับของหนูแรททั้งหมดในกลุ่มที่ติดเชื้อพบว่าที่ 35 DPI มีจำนวนเฉลี่ยของพยาธิสูงสุด คือ 17.33%

ในหนูเมาส์พบว่าพยาธิสภาพของตับที่ 4 DPI เห็นเป็น hemorrhagic foci ขนาดเล็กที่บริเวณขอบตับ ที่ 7 DPI พบจุดขาวที่มีขนาดประมาณ 0.5 มิลลิเมตร ที่ 21 DPI พยาธิสภาพที่พบในตับของหนูเมาส์มีลักษณะคล้ายคลึงกันกับพยาธิสภาพที่พบในตับของหนูแฮมสเตอร์ ที่ 35 DPI ตับที่ติดเชื้อพยาธิหดเล็กและมีรูปร่างผิดปกติ รวมทั้งมีเลือดออกในช่องท้องอย่างรุนแรงด้วย การตรวจสอบในระดับเนื้อเยื่อพบว่าที่เวลา 4, 7, 21 และ 35 DPI เนื้อเยื่อตับของหนูเมาส์มีพยาธิสภาพคล้ายคลึงกันกับที่พบในหนูแฮมสเตอร์ แต่พบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวที่พบมากใน migratory tract คือ นิวโทรฟิล และหนูทดลองที่ติดเชื้อพยาธิยังแสดงลักษณะ anemia ด้วยที่เวลา 35 DPI และที่ช่วงเวลาเดียวกันนี้ยังพบการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณเอนไซม์ alanine aminotransferase ร่วมด้วยการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติของปริมาณโปรตีนอัลบูมินในกระแสเลือดด้วย จากการตรวจนับจำนวนพยาธิในตับของหนูเมาส์ ทั้งหมดในกลุ่มที่ติดเชื้อพบว่าที่ 35 DPI มีจำนวนเฉลี่ยของพยาธิสูงที่สุด คือ 26.67%

ผลจากการทดลองติดเชื้อพยาธิในหนูทดลองทั้ง 3 ชนิด แสดงให้เห็นว่าหนูแฮมสเตอร์มีความต้านทานต่อการติดเชื้อพยาธิน้อยซึ่งทำให้ง่ายต่อการติดเชื้อพยาธิไปไม้ตับมากที่สุด โดยพบจำนวนพยาธิในตับและพยาธิสภาพของตับในระดับสูงที่สุด และสัตว์ทดลองที่มีความต้านทานมากขึ้นคือหนูเมาส์ ในขณะที่หนูแรทมีความต้านทานต่อการติดเชื้อพยาธิไปไม้ตับมากที่สุด โดยจำนวนพยาธิที่พบในตับของหนูแรทหลังการติดเชื้อพยาธิมีปริมาณน้อยที่สุดในหนูทั้งสามชนิด และยังพบว่าหนูแรทมีพยาธิสภาพน้อยที่สุดด้วย ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากการสร้างภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของหนูแรทนั้นมีประสิทธิภาพดีกว่าหนูทดลองชนิดอื่น ดังนั้นผลการทดลองน่าจะบอกได้ว่าในการทดสอบวัคซีนเพื่อป้องกันการติดเชื้อพยาธิในหนูเมาส์น่าจะมีความเหมาะสมที่จะใช้ในการทดสอบวัคซีนได้ดีที่สุด โดยที่หนูแฮมสเตอร์อาจเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของยาฆ่าพยาธิ แต่ไม่ควรนำหนูแรทไปเป็นตัวอย่างในการทดสอบทั้งสองประเด็นเนื่องจากมีความต้านทานสูงมาก

## 1.2. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภูมิคุ้มกัน ระดับแอนติบอดี และคุณลักษณะของแอนติเจนในช่องท้องและกระแสโลหิตของหนูทดลองที่ได้รับแอนติเจนจากพยาธิตัวเต็มวัย

จากการวิจัยในหัวข้อเรื่อง 1.1 ข้อมูลจากการศึกษาการติดเชื้อพยาธิไปไม้ตับในสัตว์ทดลองขนาดเล็กที่ได้รับเชื้อพยาธิเป็นครั้งแรก (primary infection) ทำให้สามารถแบ่งสัตว์ทดลองออกได้เป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มสัตว์ทดลองที่มีความต้านทานต่อการติดเชื้อพยาธิสูง ได้แก่ หนูแรท และสัตว์ทดลองที่มีความต้านทานต่อเชื้อพยาธิต่ำ คือ หนูแฮมสเตอร์ ในขณะที่การตอบสนองต่อการติดเชื้อพยาธิไปไม้ตับของหนูเมาส์มีประสิทธิภาพมากกว่าหนูแฮมสเตอร์แต่น้อยกว่าหนูแรท จากข้อมูลดังกล่าวจึงได้เลือกหนูแรทและหนูเมาส์มาใช้เป็นสัตว์ทดลองในการทดลองนี้ เพื่อค้นหาสาเหตุที่สามารถอธิบายความแตกต่างดังกล่าวได้ โดยนำสัตว์ทดลองแต่ละชนิดมาแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม หนูในกลุ่มแรกถูกฉีดด้วยแอนติเจนของพยาธิไปไม้ตับเข้าช่องท้องในปริมาณ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หนูในกลุ่มที่สองถูกฉีดด้วยแอนติเจนชนิดเดียวกันและปริมาณเดียวกันกับที่ใช้ในกลุ่มแรกแต่ถูกกระตุ้นซ้ำอีกครั้งหนึ่งโดยทั้งให้มีระยะห่างจากการกระตุ้นครั้งแรกสองสัปดาห์ โดยที่ชุดควบคุมของหนูทั้งสองกลุ่มนี้ถูกฉีดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ หลังการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันจึงทำการเก็บตัวอย่างน้ำล้างช่องท้อง และเลือด โดยนำเซลล์ภูมิคุ้มกันในช่องท้องและเซลล์เม็ดเลือดขาวมานับปริมาณ และจำแนกสัดส่วนของเซลล์แต่ละชนิดโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา แล้วจึงนำมาตรวจวัดระดับของแอนติบอดีโดยวิธี ELISA นอกจากนี้ น้ำล้างช่องท้องและเซรุ่มยังถูกนำมาใช้ในการตรวจหาคุณลักษณะของสารโปรตีนที่สามารถเป็นแอนติเจนในการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกัน humoral immunity อีกด้วย

การนับเซลล์ในช่องท้องของหนูชุดควบคุมที่ไม่ได้รับแอนติเจนทำให้ทราบว่าหนูแรทมีปริมาณของเซลล์ภูมิคุ้มกันในช่องท้องมากกว่าหนูเมาส์ หลังจากการฉีดแอนติเจนพบว่าเซลล์ภูมิคุ้มกันในช่องท้อง

ของหนูทั้งสองชนิดนี้มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นกว่าที่พบในหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงเวลาของการทดลอง ในขณะที่การเปรียบเทียบระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดของหนูในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมหลังจากการฉีดกระตุ้นไม่พบว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการจำแนกชนิดของเซลล์พบว่า โมโนไซต์/มาโครฟาจ มีสัดส่วนมากที่สุดในช่องท้องของหนู ในขณะที่พอลิมโฟไซต์ได้ทั่วไปในกระแสโลหิต โดยหลังจากที่ได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจนพบว่า อีโอซิโนฟิลในช่องท้องรวมทั้งในกระแสโลหิตของหนูแรทเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่การเพิ่มขึ้นของอีโอซิโนฟิลในหนูเมาส์ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ การตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันแบบ humoral immunity พบว่าหนูเมาส์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนมีระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 28 ถึง 49 วันหลังการฉีดกระตุ้น ซึ่งการตอบสนองโดยแอนติบอดีในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นซ้ำพบการเพิ่มขึ้นของระดับแอนติบอดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 7 และ 14 วันหลังการฉีดกระตุ้น เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทพบว่าระดับแอนติบอดีในหนูแรททั้งในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นครั้งเดียวและในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นซ้ำมีระดับแอนติบอดีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงเวลาที่ทำการศึกษา การตรวจหาโปรตีนที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยวิธี SDS-PAGE และ Immunoblotting พบโปรตีนหลักในหนูเมาส์คือ 135, 115, 100 และ 66 กิโลดาลตัน ในขณะที่ในหนูแรทคือโปรตีนหลักที่ 200, 115, 97, 72, 66, 45, 21 และ 6 กิโลดาลตัน

การเพิ่มจำนวนอย่างมีนัยสำคัญของอีโอซิโนฟิลและระดับของแอนติบอดีที่พบได้อย่างชัดเจนในหนูแรท (ระดับแอนติบอดีหลังการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในหนูแรทมีค่าสูงกว่าในหนูเมาส์ถึง 5.5 เท่า) น่าจะเป็นลักษณะที่สำคัญที่ทำให้หนูแรทมีความต้านทานต่อการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับได้ดีกว่าหนูเมาส์ นอกจากนี้การวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลองทำให้สรุปได้ว่า หนูแรทมีภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (innate immunity) ที่สามารถต้านทานต่อการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับได้ดี แม้ว่าไม่เคยได้รับเชื้อพยาธิชนิดนี้มาก่อน ในขณะที่ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของหนูเมาส์ไม่สามารถต้านทานการติดเชื้อพยาธิดังกล่าวได้ ดังนั้นในการทดลองเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของวัคซีนในการป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับจึงควรเลือกใช้หนูเมาส์เพื่อที่จะได้แสดงประสิทธิภาพของวัคซีนได้อย่างชัดเจน

### 1.3. การสังเคราะห์ คุณลักษณะ การกระจายและประสิทธิภาพการเป็นวัคซีนของ cathpesin B

คณะผู้วิจัยได้สังเคราะห์ยีน cathepsin B จากพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระยะตัวเต็มวัย ตัวอ่อนระยะ NEJ และระยะ metacercariae cDNAs ที่สังเคราะห์ได้ถูกกำหนดชื่อเป็น FG cat-B1 FG cat-B2 FG cat-B3 ซึ่งแสดงความเหมือนกันประมาณ 64% ถึง 79% เมื่อนำมาเทียบกับยีน cathepsin B จากสิ่งมีชีวิตใกล้เคียงพบว่าตำแหน่งเฉพาะที่สำคัญในการทำหน้าที่ของยีนปรากฏในยีน cathepsin B เหล่านี้ การวิเคราะห์โดยวิธี Southern blot แสดงยีน 6 ตัวในกลุ่ม family ของยีน cathepsin B ของพยาธิใบไม้ตับ การวิเคราะห์โดย Northern blot แสดงขนาดของ mRNA transcripts ที่ยาวประมาณ 1400 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งแสดงออกมากในพยาธิระยะ metacercaria และตัวอ่อน NEJ การแสดงออกของ

พยาธิใบไม้ตับ การวิเคราะห์โดย Northern blot แสดงขนาดของ mRNA transcripts ที่ยาวประมาณ 1400 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งแสดงออกมากในพยาธิระยะ metacercaria และตัวอ่อน NEJ การแสดงออกของยีนที่จำเพาะต่อพยาธิระยะต่างๆ ศึกษาได้โดยวิธี RT-PCR จากคู่ primers ที่จำเพาะและการยัดเกาะด้วย cathepsin B probe ซึ่งพบว่า FG cat-B1 transcripts แสดงออกในพยาธิทุกระยะ ขณะที่ FG cat-B2 และ FG cat-B3 แสดงออกในพยาธิระยะ metacercariae ระยะ NEJ และระยะตัวอ่อนเท่านั้น การทดสอบโดยวิธี RNA *in situ* พบว่า cathepsin B transcripts ถูกแสดงออกในเซลล์เยื่อบุท่อทางเดินอาหาร ในเซลล์ที่อยู่ใต้ต่อชั้นบุท่อทางเดินอาหารส่วนต้น และในเซลล์ชั้นผิว นอกจากนี้ยังพบในเซลล์ของอวัยวะสืบพันธุ์ซึ่งรวมถึงเซลล์ของต่อมลูกหมาก Mehlis และ vitelline อัณฑะและไข่ เมื่อศึกษาตำแหน่งการกระจายของโปรตีน cathepsin B โดยวิธี indirect immunoperoxidase และ immunofluorescence ก็พบว่ามีความสัมพันธ์กับการกระจายตัวของยีน transcripts โปรตีน cathepsin B พบในไซโตพลาสซึมของเซลล์เนื้อเยื่อบุท่อทางเดินอาหาร เซลล์ชั้นผิว ขอบนอกสุดของชั้นผิว และในเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์เหมือนที่พบในการศึกษาโดยวิธี RNA *in situ* hybridization ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์ cathepsin B (โดยเฉพาะ FG cat-B2 และ FG cat-B3) มีบทบาทในการย่อยเนื้อเยื่อของโฮสต์เพื่อช่วยให้พยาธิระยะตัวอ่อนสามารถไชและเคลื่อนผ่านไปสู่ตับ ส่วน FG cat-B3 อาจทำหน้าที่การย่อยอาหารทั่วไปเพื่อให้ได้สารอาหารแก่พยาธิอีกด้วย หนู mice สามารถถูกกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Cat B โดยใช้ Cat B cDNA-pCI vector constructs วัคซีนโดยใช้ cathepsin B cDNA สามารถป้องกันการติดเชื้อในสัตว์ทดลองได้ 26% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

#### 1.4. การสังเคราะห์ คุณลักษณะ การกระจายและประสิทธิภาพการเป็นวัคซีนของ cathepsin L

เราได้ทำการสังเคราะห์ยีน cathepsin L จากพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ระยะตัวเต็มวัย ตัวอ่อน (NEJ) และระยะ metacercariae cDNA ที่สังเคราะห์ได้จากพยาธิระยะตัวเต็มวัยมีความเหมือนกับ FG cat-L1A ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นโดย Grams และคณะในปี 2001 ถึง 100% ขณะที่ cDNA ที่สังเคราะห์จากพยาธิระยะ NEJ และระยะ metacercariae มีความแตกต่างจากยีน FG cat-L1A จึงได้กำหนดชื่อยีนทั้งสองเป็น FG cat-L1G และ FG cat-L1H ลำดับกรดอะมิโนของยีนทั้งสามนี้แสดงความเหมือนกันประมาณ 70% ถึง 75% เมื่อนำมาเทียบกับยีน cathepsin L จากสิ่งมีชีวิตใกล้เคียงพบว่าตำแหน่งเฉพาะที่สำคัญในการทำหน้าที่ของยีนยังปรากฏในยีน cathepsin L เหล่านี้ด้วย การทดสอบโดยวิธี RNA *in situ* พบว่า cathepsin L transcripts แสดงออกเฉพาะในเซลล์เยื่อบุท่อทางเดินอาหาร และตรวจไม่พบการแสดงออกของ cathepsin L ในเนื้อเยื่อบริเวณอื่นของพยาธิเลย แม้ในเซลล์เยื่อบุท่อทางเดินอาหารส่วนต้นหรือในเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์ต่างๆ ซึ่งแตกต่างจากการกระจายของ cathepsin B ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์ cathepsin L มีบทบาทหลักในการย่อยอาหารของพยาธิ การใช้ Cat L cDNA-pCI vector constructs กระตุ้นให้หนูเมาส์สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Cat L ได้ และมี

ประสิทธิภาพเป็นวัคซีน ซึ่งสามารถป้องกันการติดเชื้อในสัตว์ทดลองที่ทดสอบได้ 40% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

#### 1.5. การสังเคราะห์ การศึกษาคุณลักษณะ การกระจาย และการทดสอบศักยภาพการเป็นวัคซีนของโปรตีน Glutathione S-transferase (GST)

ทำการสังเคราะห์ cDNA ของโปรตีน GST โดยวิธี RT-PCR ที่มีขนาด 657 คู่เบส เมื่อนำมาตัดต่อพันธุกรรมเข้ากับ DNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ pBluescript SK(-) เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA แล้ว จึงทำการตัดต่อ DNA อีกครั้งเพื่อย้ายให้เข้าไปอยู่ในแบคทีเรีย pET-21b(+) และกระตุ้นให้แบคทีเรียสร้างโปรตีน GST ออกมาให้ได้ปริมาณมาก แล้วจึงนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ glutathione beads

นำโปรตีนที่ได้จากการผลิตในแบคทีเรีย (rGST) มาฉีดกระตุ้นหนูเมาส์เพื่อผลิตสารโพลีโคลนัล แอนติบอดี (PoAb) จากเซรุ่ม เมื่อนำ PoAb มาตรวจสอบคุณลักษณะโดยวิธี Immunoblot พบว่าสามารถทำปฏิกิริยากับ rGST ที่ผลิตได้ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 28 กิโลดาลตัน เมื่อตรวจสอบการกระจายของ GST ในเนื้อเยื่อของพยาธิใบไม้ตับระยะต่างๆ โดยวิธี Immunoperoxidase พบว่าโปรตีน GST มีปริมาณสูงที่สุดในเนื้อเยื่อ parenchyma ที่ทุกระยะของพยาธิ นอกจากนี้ในพยาธิตัวเต็มวัยยังพบการกระจายของโปรตีน GST ในเนื้อเยื่อ parenchyma เป็น 3 ระดับ คือ ระดับสูง ระดับปานกลาง และระดับต่ำ นอกจากเนื้อเยื่อ parenchyma แล้ว ยังพบว่าโปรตีน GST กระจายอยู่ที่ระดับต่ำในเนื้อเยื่ออวัยวะและรังไข่ของพยาธิตัวเต็มวัย แต่ไม่พบว่ามีโปรตีน GST อยู่ในชั้นผิว (tegument) ลำไส้ (caecum) หรือ vitelline gland เลย อย่างไรก็ตามในระยะตัวอ่อนของพยาธิสามารถพบการกระจายตัวของโปรตีน GST ในชั้น tegument ที่ระดับปานกลาง

เมื่อนำ rGST มาทดสอบประสิทธิภาพการเป็นวัคซีน พบว่าหนูเมาส์ที่ได้รับการฉีด rGST แบบ intradermal มีการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับลดลง 84.16% เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนพยาธิที่นับได้จากตับของหนูในชุดควบคุมที่ไม่ได้ฉีดวัคซีน (โดยให้หนูแต่ละตัวได้รับเชื้อพยาธิใบไม้ตับตัวละ 30 เมตาเซอคาเรีย) นอกจากนี้การฉีดวัคซีนโดยทาง subcutaneous และ intramuscular ยังสามารถลดการติดเชื้อพยาธิได้ 80.45% และ 78.80% ตามลำดับ

การทดลองในครั้งนี้อาจได้ทดสอบประสิทธิภาพของ rGST ในการป้องกันโรคพยาธิใบไม้เลือด *Schistosoma mansoni* อีกด้วย โดยหลังจากที่มีการฉีดกระตุ้นในหนูเมาส์ด้วย rGST แล้ว จึงติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือดจำนวน 200 เซอคาเรียต่อหนูเมาส์หนึ่งตัว จากการตรวจนับจำนวนพยาธิใบไม้เลือดในหนูทดลองแต่ละกลุ่มพบว่ากลุ่มที่ได้รับ rGST สามารถลดการติดเชื้อพยาธิใบไม้เลือดได้ 58.08%

นอกจากนี้เรายังได้แสดงให้เห็นว่าการนำเซรุ่มจากหนูทดลองที่ได้รับการกระตุ้นโดยการฉีด rGST มาฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal injection) ให้กับหนูทดลองที่ไม่เคยได้รับเชื้อพยาธิมาก่อน ก็สามารถป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับได้ถึง 47.76% โดยคาดว่าน่าจะมีกลไกที่อาศัยแอนติบอดี เช่น ปฏิกิริยา ADCC ในช่องท้องที่สามารถทำลายพยาธิก่อนที่จะเข้าไปเจริญเติบโตในตับได้

## 1.6. การสังเคราะห์ การศึกษาคุณลักษณะ การกระจาย และการทดสอบศักยภาพการเป็นวัคซีนของ Fatty acid binding protein (FABP)

Fatty acid binding protein (FABPs) เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งซึ่งมีหน้าที่ช่วยในการขนส่งกรดไขมันและคอเรสเตอรอลเข้าไปในตัวของพยาธิเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการสร้างไขมันของตัวพยาธิเอง จึงคาดว่า FABP น่าจะเป็นโมเลกุลที่สำคัญในการนำมาศึกษาประสิทธิภาพการเป็นวัคซีนเพื่อป้องกันโรคพยาธิใบไม้ตับได้ การสังเคราะห์ยีนของโปรตีน FABP โดยวิธี RT-PCR ทำให้ได้ cDNA ที่มีขนาด 397 คู่เบส ซึ่งจากการใช้โปรแกรมทางชีวสารสนเทศทำให้คาดได้ว่าเป็นยีนที่เก็บรหัสสำหรับโปรตีนซึ่งมีขนาด 14.6 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 132 ตัวและมีค่า isoelectric point เท่ากับ 5.2 จากการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนของพยาธิใบไม้ตับชนิดนี้กับพยาธิใบไม้ตับอีกสายพันธุ์หนึ่งคือ *F. hepatica* พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน 66-89% เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนจากพยาธิใบไม้เลือด (*Schistosoma sp.*) พบว่ามีความเหมือนประมาณ 42% และมีความเหมือน 27% เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนจากพยาธิตัวตืด (*E. granulosus*) นอกจากนี้ยังได้นำลำดับกรดอะมิโนของพยาธิใบไม้ตับมาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนจากโฮสต์ของพยาธิ เช่น หนูแรท และมนุษย์ พบว่ามีความเหมือนเพียง 23-32% ข้อมูลดังกล่าวทำให้ทราบว่าลำดับกรดอะมิโนของ FABP จากพยาธิมีความแตกต่างจากลำดับกรดอะมิโนของ FABP จากโฮสต์ค่อนข้างมาก จึงไม่น่ามีปัญหาในส่วนของ cross reaction ระหว่างโปรตีนของพยาธิและโปรตีนของโฮสต์ ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะนำ FABP มาใช้เป็นวัคซีนป้องกันการติดเชื้อพยาธิโดยไม่เกิดปัญหามีภูมิคุ้มกันทำร้ายตัวเองในโฮสต์

การผลิตโปรตีน FABP โดยวิธีทางพันธุวิศวกรรมในแบคทีเรียทำให้ได้โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 14.5 กิโลดาลตัน โปรตีนดังกล่าวได้ถูกนำมาใช้ในการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี จากนั้นนำโมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ได้มาใช้ในการศึกษาการกระจายของโปรตีน FABP ในเนื้อเยื่อของพยาธิใบไม้ตับระยะต่างๆ ด้วยวิธี immunocytochemistry พบว่า FABP ปรากฏอยู่อย่างหนาแน่นที่ปริมาณสูงสุดในเนื้อเยื่อพาราเรโนไคมา (parenchyma tissue) การศึกษาเพิ่มเติมในระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและ immunoelectron microscopy จากโครงสร้างละเอียดและปริมาณการสะสมของ FABP ทำให้สามารถแบ่งเซลล์พาราเรโนไคมาออกได้เป็น 3 ชนิด เซลล์พาราเรโนไคมาชนิดที่ 1 (Pc1) เป็นเซลล์ที่มีไมโทคอนเดรียจำนวนเล็กน้อยกระจายอยู่ในไซโตพลาสซึมแต่มีไกลโคเจนและเส้นใย cytokeratin สะสมอยู่มาก จึงคาดว่า Pc1 มีหน้าที่เป็นทั้งเซลล์ค้ำจุนและเป็นเซลล์ที่สะสมและทำงานเกี่ยวกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของไกลโคเจนและกลูโคส เซลล์พาราเรโนไคมาชนิดที่ 2 (Pc2) มีลักษณะของไซโตพลาสซึมคล้ายกับที่พบใน Pc1 แต่มีไมโทคอนเดรียอยู่เป็นจำนวนมากในไซโตพลาสซึม ในขณะเดียวกันพบว่าการสะสมของ FABP อยู่ในปริมาณสูงมาก ซึ่งเป็นไปได้ว่า Pc2 มีหน้าที่ในการควบคุมกระบวนการเมตาบอลิซึมของไขมันเป็นหลัก เซลล์พาราเรโนไคมาชนิดที่ 3 (Pc3) มีไซโตพลาสซึมติดสี electron stain เข้ม ภายในพบร่างแหเอนโดพลาสมิก (Endoplasmic reticulum) ไรโบโซม (ribosome) กอลจิคอมเพล็กซ์ และกรานูล (Golgi complexes and

granules) รวมทั้งยังพบมีไมโทคอนเดรียอยู่หนาแน่นมากโดยเห็นกระจายทั่วทั้งเซลล์ ดังนั้นเซลล์ชนิดนี้จึงอาจเกี่ยวข้องกับระบบการสร้างโปรตีนที่ประกอบเป็นเส้นใย (reticular fibers) ที่รวมเป็นกรอบหรือโครงค้ำจุน เซลล์พาราเนโคมาซึ่งเป็นเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ของตัวพยาธิ

ในการทดสอบประสิทธิภาพการป้องกันการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในหนูเมาส์ โดยใช้ FABPcDNA พบว่าหนูเมาส์ที่ถูกฉีดกระตุ้นโดยวิธี intradermal สามารถลดปริมาณการติดเชื้อพยาธิได้ 55.88% และการนับจำนวนพยาธิในตับของหนูที่ได้รับการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยวิธี intramuscular ยังพบว่าปริมาณพยาธิลดลง 43.13% อีกด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยวัคซีน FABPcDNA

### 1.7. การสังเคราะห์ การศึกษาคุณลักษณะ และการกระจายของโปรตีน 14-3-3

ในการศึกษาส่วนนี้เราได้ผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี (MoAb) ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนจากชั้นผิวของพยาธิใบไม้ตับที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 29-30 kDa พร้อมกับการผลิตโพลีโคลนัลแอนติบอดี (PoAb) ต่อแอนติเจนรวมจากชั้นผิวพยาธิ เพื่อนำไปใช้ในการ screen หาชิ้นที่จำเพาะต่อผิวพยาธิใบไม้ตับของตัวเต็มวัย โมโนโคลนัลแอนติบอดีที่ผลิตได้มีความจำเพาะต่อโปรตีนจากชั้นผิวที่มีน้ำหนักโมเลกุล 28.5 kDa ซึ่งสามารถพบได้ในทุกระยะของพยาธิ ยกเว้นในสัปดาห์ที่ 1 หลังจากนั้นก็ทำการเสาะหาชิ้นของโปรตีนชั้นผิวโดยการทำ immunoscreening ใน adult cDNA library และสามารถพบยีนของ Fg14-3-3 protein, zeta isoform โดยการใช้โพลีโคลนัลแอนติบอดีต่อแอนติเจนชั้นผิวพยาธิ แต่ไม่พบยีนที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนในชั้นผิวจากการใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดี เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับความเหมือนของกรดอะมิโนระหว่าง Fg14-3-3 และโปรตีนชนิดเดียวกันในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดต่างๆ พบว่ามีค่าความเหมือนของกรดอะมิโนอยู่ในช่วง 55.0-57.8% การวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่ายีน Fg14-3-3 protein อยู่ในกลุ่มเดียวกับ *Schistosoma mansoni* protein1 และ *S. japonicum* protein1 การวิเคราะห์โดยวิธี Southern blot แสดงยีน 1 ตัวในกลุ่ม zeta isoform การวิเคราะห์โดย Northern blot แสดงขนาดของ RNA transcript ที่ยาวประมาณ 1,250 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งพบในระยะตัวเต็มวัยและตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์ การทดสอบโดยวิธี RNA in situ พบ Fg14-3-3 transcript ในพยาธิระยะ NEJ, ตัวอ่อนอายุ 4 สัปดาห์, และตัวเต็มวัย ในลักษณะที่คล้ายคลึงกันคือ มีการแสดงออกในเซลล์เยื่อทางเดินอาหาร, เซลล์ในเนื้อเยื่อพาราเนโคมา และในเซลล์ชั้นผิว แต่ไม่พบในเซลล์กล้ามเนื้อ นอกจากนี้ยังพบ Fg14-3-3 ในเซลล์ต่อมลูกหมากและอวัยวะของอวัยวะสืบพันธุ์ในเพศผู้ และเซลล์ของ Mehlis' gland, vitelline และไข่ของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย หลังจากนั้นได้สังเคราะห์โปรตีน 14-3-3 โดยการติดฉลากกับ Histidine (rFg14-3-3-6xHistagged fusion protein) พบว่าโปรตีนที่สังเคราะห์ได้นี้มีน้ำหนักมวลโมเลกุล 30 kDa นำโปรตีนไปผลิตโพลีโคลนัลแอนติบอดีในกระต่าย โพลีโคลนัลแอนติบอดีสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีน 14-3-3 ในทุกระยะของพยาธิได้แก่ ระยะ metacercariae, NEJ, ตัวอ่อน 4 และ 7 สัปดาห์ และตัวเต็มวัย รวมถึงแอนติเจนของชั้นผิวพยาธิซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลที่ 29 kDa ขณะที่ใน

สารคัดหลั่งก็พบโปรตีน 14-3-3 มีน้ำหนักโมเลกุลที่ 28 kDa โปรตีน 14-3-3 แสดง cross-reaction กับ พยาธิในกลุ่ม trematode นอกจากนี้ยังพบโปรตีน 14-3-3 ในเนื้อเยื่อของหนูซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่าง กัน โปรตีนสังเคราะห์ Fg14-3-3 สามารถตรวจจับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ตั้งแต่ระยะ 2 สัปดาห์หลังการติดเชื้อในกระต่ายและยังคงพบแอนติบอดีต่อเนื่องจนถึงระยะ สิ้นสุดการทดลองที่ 10 สัปดาห์หลังการติดเชื้อ การศึกษาดำเนินการกระจายของแอนติเจน 14-3-3 โดย วิธี immunostaining พบว่าสัมพันธ์กับการกระจายของ Fg14-3-3 transcripts โดยวิธี *in situ* hybridization โดยพบทั่วไปในตัวของพยาธิทุกระยะรวมทั้งในชั้นผิว ยกเว้นกล้ามเนื้อ, spines และ นิวเคลียสของทุกเซลล์ อีกทั้งยังพบในเซลล์ของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียเช่นเดียวกัน โมโนโคลนัล แอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจน 28.5 kDa ซึ่งแม้จะไม่สามารถหาขึ้นได้แต่ก็สามารถใช้ศึกษาการ กระจายของโปรตีนที่ 28.5 kDa จากชั้นผิว โดยพบการกระจายของแอนติเจนชนิดนี้ในชั้นผิว ไฮโดรปลา สซึมและแขนงของเซลล์ชั้นผิว รวมทั้งในเซลล์เยื่อผิวหนังที่คล้ายชั้นผิวพยาธิ (tegumental-type epithelium) ที่บุทางเดินอาหารส่วนต้น เซลล์ต่อมลูกหมาก, เซลล์ Mehlis' gland และเซลล์ไข่ (oocyte) ดังนั้น แอนติเจนนี้ค่อนข้างมีความจำเพาะ จึงอาจจะนำมาพัฒนาวิธีตรวจสอบการติดเชื้อได้

#### 1.8. การสังเคราะห์ การศึกษาคุณลักษณะ การแสดงออกของยีน Vitelline B และการผลิตโมโน โคลนัลแอนติบอดีต่อ vitelline B เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบการติดเชื้อพยาธิ

เมื่อพยาธิใบไม้ตับเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยในท่อน้ำดีของโฮสต์ พยาธิสามารถสร้างไข่ แล้วปล่อยออกมาที่อุจจาระของโฮสต์ในปริมาณสูงมาก โดยตัวอ่อนที่อยู่ภายในไข่แต่ละใบมีเปลือกไข่ที่ แข็งแรงล้อมรอบอยู่เพื่อป้องกันอันตรายจากน้ำย่อยหรือเอนไซม์จากโฮสต์ และอันตรายจากสิ่งแวดล้อม ภายนอกได้ พบว่าในการสร้างเปลือกไข่ที่สมบูรณ์นั้นมีโปรตีน vitelline B เป็นองค์ประกอบหลัก โดย โปรตีนชนิดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลที่ 31 กิโลดาลตัน จึงคิดว่าการศึกษาในส่วนนี้จะสามารถนำโปรตีน vitelline B มาใช้ประโยชน์ในการพัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยสัตว์ที่เป็นโรคพยาธิใบไม้ตับได้

ผลการสังเคราะห์ cDNA ของโปรตีน vitelline B โดยวิธี RT-PCR ทำให้ได้ cDNA ที่มีขนาด 810 คู่เบส เมื่อนำมาผ่านการแปลงเป็นลำดับกรดอะมิโนและเปรียบเทียบกับ vitelline B1 และ vitelline B2 ของพยาธิใบไม้ตับสายพันธุ์ *F. hepatica* พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน 93% และ 83% ตามลำดับ จาก การศึกษาโดยวิธี *in situ* hybridization พบว่า mRNA ของยีน vitelline B กระจายอยู่ในเซลล์ vitelline จากนั้นได้ทำการตัดต่อ cDNA เข้าไปในแบคทีเรีย *Escherichia coli* และกระตุ้นด้วยสาร IPTG เพื่อให้ แบคทีเรียผลิตโปรตีน vitelline B แล้วนำโปรตีนที่ได้มาผ่านกระบวนการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA-agarose affinity column และตรวจสอบคุณสมบัติของโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE และ immunoblotting ทำให้ทราบว่าเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 31 กิโลดาลตัน นอกจากนี้ได้นำ โปรตีน vitelline B มาใช้ในการผลิตโมโนโคลนัลแอนติบอดี และนำโมโนโคลนัลแอนติบอดีมาใช้ในการ ตรวจหาการกระจายของโปรตีน vitelline B บนเนื้อเยื่อพยาธิใบไม้ตับระยะตัวเต็มวัย พบว่ามีการ

กระจายตัวของโปรตีน vitelline B จำเพาะอยู่ใน eggshell granule, eggshell globule ของเซลล์ vitelline ที่เจริญเต็มที่ รวมทั้งในไข่และเปลือกไข่ด้วย ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะนำโมโนโคลนัล แอนติบอดีที่ได้ไปพัฒนาวิธีการตรวจสอบปริมาณ egg antigen ในน้ำปัสสาวะหรืออุจจาระ หรือนำไป ย้อมไข่ม้วนที่มีอยู่ในอุจจาระของสัตว์ที่ติดเชื้อ ทำให้การวิเคราะห์สภาพติดเชื้อสะดวกขึ้น

## โครงการที่ 2 การควบคุมกระบวนการสร้างและหลั่งเซลล์สืบพันธุ์โดยประสาท ฮอร์โมนในหอยเป่าฮือ

จากการศึกษาด้วยวิธี dot-blot ELISA ทำให้ทราบว่าสารสื่อประสาทและสารขยายสัญญาณประสาทหลักที่มีอยู่ในปมประสาทคือ เซโรโทนิน (5HT), GABA และ FMRFamide พบว่ามี 5HT และ FMRFamide ในอวัยวะและรังไข่ ส่วน GABA พบในปมรับสัมผัสที่กระจายอยู่ตามหนวด นอกจากนั้นยังพบ prostaglandin E2 ในปมประสาทและ gonad แต่ไม่พบฮอร์โมนเพศ dihydrotestosterone และ estradiol อยู่เลย

### 2.1. การศึกษาลักษณะการกระจายของสารสื่อประสาท serotonin ในปมประสาทของหอยเป่าฮือตัวเต็มวัย

การศึกษาการกระจายของเซลล์ประสาทเซโรโทนินในระบบประสาทของหอยเป่าฮือ *H. asinina* ด้วยวิธี immunoperoxidase พบว่ามี การกระจายของเซลล์ประสาททั้งสองชนิดในปมประสาทซีรีบรัล (cerebral), พลูโรพีดัล (pleuropedal) และ วิสเซอร์ัล (visceral) ซึ่งมีสองขนาดคือ เซลล์ขนาดใหญ่ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10x20 ไมโครเมตร และเซลล์ขนาดกลางที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 7x10 ไมโครเมตร แต่ไม่พบการติดสีในเซลล์ประสาทขนาดเล็ก ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า หรือ ประมาณ 6x8 ไมโครเมตร เซลล์ประสาทขนาดใหญ่มีนิวเคลียสที่มีลักษณะกลมรี ซึ่งประกอบด้วยใยเส้นโครมาตินแบบ euchromatin และมีแขนงประสาท (axon) ยื่นยาวออกจากตัวเซลล์ ส่วนเซลล์ขนาดกลาง ซึ่งน่าจะเป็น neurosecretory cell มีนิวเคลียสที่มีลักษณะกลม ซึ่งประกอบไปด้วยกลุ่มของใยเส้นโครมาตินแบบ heterochromatin กระจายอยู่ภายใน และไม่มีแขนงประสาทออกจากตัวเซลล์ ในปมประสาทซีรีบรัล ส่วนใหญ่พบการกระจายตัวของเซลล์ประสาทเซโรโทนิน ที่บริเวณครึ่งบนของขอบด้านในของปมประสาท ส่วนในปมประสาทพลูโรพีดัล พบการกระจายตัวของเซลล์ประสาทเซโรโทนิน ที่บริเวณขอบด้านบน และด้านล่างของปมประสาทที่มีลักษณะเป็นเขา (horn) สำหรับปมประสาทวิสเซอร์ัล พบเซลล์ประสาทเซโรโทนินที่บริเวณขอบด้านล่างขวาของปมประสาท จำนวนของเซลล์ประสาทเซโรโทนินมีมากในปมประสาทซีรีบรัล และพลูโรพีดัล โดยในปมประสาทซีรีบรัลมีจำนวนของเซลล์ประสาทเซโรโทนินประมาณ 70/2300 เซลล์ต่อหนึ่งแผ่นตัดขวางตรงกลาง ส่วนในปมประสาทพลูโรพีดัลมีจำนวนของเซลล์ประสาทเซโรโทนินประมาณ 120/2700 เซลล์ ต่อหนึ่งแผ่นตัดขวางตรงกลาง แต่ในปมประสาทวิสเซอร์ัล พบจำนวนของเซลล์ประสาทได้น้อยกว่าในปมประสาทซีรีบรัลและพลูโรพีดัล โดยพบจำนวนของเซลล์ประสาทเซโรโทนิน

ประมาณ 50/400 เซลล์ ต่อหนึ่งแผ่นตัดขวางตรงกลาง จากผลการศึกษาดังกล่าวสรุปได้ว่า เซโรโทนินเป็นสารสื่อประสาทหลักที่น่าจะมีความสำคัญในระบบประสาทของ *H. asinina* ซึ่งมีอยู่ในเซลล์ประสาทขนาดใหญ่ และขนาดกลางเท่านั้น ซึ่งเซลล์ประสาทขนาดใหญ่น่าจะเกี่ยวข้องกับการควบคุมกล้ามเนื้อในการเคลื่อนไหวของส่วนต่างๆ ในร่างกาย ส่วนเซโรโทนิน ที่พบใน neurosecretory cells น่าจะเกี่ยวข้องกับการควบคุมการหลั่งสารฮอร์โมนประสาทชนิดต่างๆ เช่น aELH เพื่อออกไปควบคุมกระบวนการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ นอกจากนี้ในปมประสาทแล้วเซโรโทนินยังปรากฏอยู่ในรังไข่โดยเฉพาะในถุงหุ้มและแผ่นเยื่อเกี่ยวพัน trabeculae ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่เซโรโทนินมีบทบาทในการควบคุมการพัฒนาของไข่และการปล่อยฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องเช่น aELH ออกมาเพื่อกระตุ้นการปล่อยไข่ (spawning)

## 2.2. การศึกษาการกระจายตัวของสารสื่อประสาท GABA ในปมประสาทและอวัยวะรับสัมผัสของหนวดในหอยเป่าชื่อตัวเต็มวัย

จากการศึกษาการกระจายของ GABA ในเนื้อเยื่อประสาท และในหนวดด้วยวิธี immunoperoxidase พบว่ามีการกระจายของเซลล์ประสาทที่มี GABA ในทั้งปมประสาท cerebral และ pleuropedal โดยมีการกระจายทั่วไปตามขอบของปมประสาท ปมประสาท visceral จะพบเซลล์ย้อมติดมากที่ขอบด้านซ้ายและด้านใน และเซลล์ที่มี GABA คือ เซลล์ neurosecretory ประเภท NS<sub>2</sub> ในปมประสาท cerebral มีจำนวนเซลล์ย้อมติดต่อเซลล์ทั้งหมดในแผ่นตัดขวางตรงกลางจำนวน 27/1585 ใน pleuropedal มีจำนวน 11/2269 และในปมประสาท visceral มีจำนวน 22/596 ซึ่งโดยรวมแล้วมีจำนวน GABAergic cells ในปมประสาทน้อยกว่าเซลล์เซโรโทนิน การศึกษาการกระจายของ GABA ในหนวดทั้งสองชนิด (cephalic tentacle และ epipodial tentacle) พบว่าเซลล์ที่มี GABA คือ เซลล์ neuroepithelium ซึ่งเป็นเซลล์รูปร่างคอลัมน์ยาวอยู่บริเวณกึ่งกลางของยอดปุ่มรับความรู้สึก (sensory papilla) ที่ส่วนปลายของเซลล์ชนิดนี้มีซีเลียที่ใช้รับความรู้สึกอยู่หนาแน่น นอกจากนั้นที่เซลล์รับความรู้สึกที่บริเวณฐานของปุ่มรับความรู้สึกก็ติดสีด้วย โดยพบได้เฉพาะในไซโตพลาสซึมของเซลล์เท่านั้น นอกจากนั้นกลุ่มเส้นประสาทในแกนของหนวดก็ติดสีด้วยเช่นกัน ส่วนในอذنหะและรังไข่ไม่พบว่ามี GABA หรือ GABAergic cells กระจายอยู่เลย ดังนั้น GABA น่าจะเกี่ยวข้องกับการรับสัมผัสหรือสารเคมี

## 2.3. การศึกษาลักษณะการกระจายของสารสื่อประสาท FMRFamide ในปมประสาทและอวัยวะรับสัมผัสพิเศษของหนวดในหอยเป่าชื่อตัวเต็มวัย

การทดสอบการกระจายของ FMRFamide ในเนื้อเยื่อของปมประสาทและอวัยวะต่างๆ ด้วยวิธีการย้อม immunoperoxidase พบว่ามี FMRFamide ในเซลล์ของปมประสาท cerebral, pleuropedal และ visceral ganglion โดยมีการย้อมติด FMRFamide ใน granule และ cytoplasm ของ neurosecretory cells (NS) ซึ่งมี 3 ชนิดคือ NS1, NS2 และ NS3 จำนวนเซลล์ย้อมติดต่อเซลล์ทั้งหมดต่อแผ่นตัดขวางตรงกลางมีจำนวน 76/2000 ในปมประสาท cerebral และมีจำนวน 130/2500 ในปมประสาท pleuro-pedal และในปมประสาท visceral มีจำนวนเซลล์ที่ติดสี 60/1050 FMRFamide cells

กระจายอยู่ใน cortex และมีจำนวนหนาแน่นบริเวณขอบหลังและขอบหน้าของปมประสาท cerebral แต่มีจำนวนน้อยที่บริเวณขอบข้าง และด้านในของขอบหลัง ส่วนในปมประสาท pleuro-pedal พบเซลล์ที่ย้อมติด FMRFamide ซึ่งเป็น neurosecretory cell เกาะกลุ่มที่บริเวณ 1/3 ของขอบหลังของ dorsal horn และ ขอบหลังของ body ขณะที่ส่วน ventral horn และ ขอบหน้าของ body มีจำนวนน้อยกว่า ในปมประสาท visceral พบ FMRFamide ที่บริเวณด้านซ้ายและขวาของขอบด้านหน้า จากผลการศึกษาที่สรุปได้ว่า FMRFamide เป็นสารสื่อประสาทหลักอีกชนิดหนึ่งในปมประสาท ส่วนในอวัยวะสืบพันธุ์พบว่ามี FMRFamide ในไยประสาทใน capsule และ trabeculae ของรังไข่และ testis และมีเส้นประสาทส่วนปลายที่มี FMRFamide ไปเลี้ยง atrium, gill, intestine และ กล้ามเนื้อ pedal สันนิษฐานว่า FMRFamide อาจมีบทบาทร่วมในการควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้อในอวัยวะหลายระบบรวมทั้งใน gonad ด้วย

#### 2.4. การสังเคราะห์ การแสดงออก และการศึกษาลักษณะการกระจายของฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่ (egg-laying hormone) ในปมประสาทและรังไข่ของหอยเป่าชื่อตัวเต็มวัย

โปรตีน Egg-laying-hormone ในหอยเป่าชื่อ (aELH) ถูกสร้างโดยการเชื่อมต่อกับ *Schistosoma japonicum* GST ซึ่งเรียกว่า GST-aELH ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 33 กิโลดาลตัน นำ GST-aELH ไปฉีดในกระต่ายเพื่อผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน GST-aELH แล้วทำการดูดซับแอนติบอดีด้วยโปรตีน GST พบว่าแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อแถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุล 33 กิโลดาลตันซึ่งเป็นตำแหน่งของโปรตีน GST-aELH เท่านั้น โดยไม่มีการติดที่แถบโปรตีน GST เลย ดังนั้นหลังทำการดูดซับด้วยโปรตีน GST พบว่าแอนติบอดีมีความจำเพาะต่อ aELH อย่างเดียว นอกจากนี้ยังไม่พบว่ามี การจับกันของแอนติบอดีกับโปรตีนของแบคทีเรียด้วย ผลดังกล่าวจึงยืนยันความจำเพาะของแอนติบอดีต่อ aELH

จากการศึกษาการกระจายตัวของ aELH โดยใช้แอนติบอดีดังกล่าวพบว่ามี aELH อยู่ในเม็ดแกรนูลขนาดเล็กของ neurosecretory (NS) cells ชนิดที่ 1 และ 2, ใน neurite ของ neuropil, และในช่องเลือดภายในแผ่นเยื่อเกี่ยวพันที่หุ้มปมประสาท cerebral, pleuropedal และ visceral จำนวนเซลล์ NS ที่ย้อมด้วยแอนติบอดีและติดสีชัดเจน ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับระยะวงจรของรังไข่ โดยเซลล์ที่พบส่วนใหญ่จะอยู่ในปมประสาท pleuropedal และมีจำนวนเพียงเล็กน้อยในปมประสาท visceral นอกจากนี้ยังพบการกระจายในกลุ่มเซลล์ของ statocyst และเส้นประสาทที่เกี่ยวข้องด้วย ส่วนในรังไข่พบการกระจายมากที่เซลล์ล้อมไข่ข้างเคียงเซลล์ไข่ที่เจริญเต็มที่ และใน granular cells ของเยื่อเกี่ยวพัน trabeculae และบริเวณงูหนุ้มของรังไข่ และมีการย้อมติดสีระดับปานกลางในไซโตพลาสซึมของไข่ระยะพัฒนาเต็มที่ ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าปมประสาท cerebral pleuropedal และ visceral เป็นบริเวณที่อยู่ของเซลล์ที่สร้าง aELH โดยมีเซลล์จำนวนมากที่สุดในปมประสาท pleuropedal ส่วนในรังไข่อาจมีการสร้าง aELH อยู่บ้าง เพื่อใช้งานเฉพาะในการปล่อยไข่และการพัฒนาของไข่เอง

#### 2.5. อิทธิพลของ serotonin, FMRFamide, prostaglandin E (PG<sub>E</sub>) และ egg-laying hormone (aELH) ต่อการเจริญเติบโตและการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในหอยเป่าชื่อ

การเพิ่มผลผลิตของหอยเป่าฮือ *H. asinine* จะมีประสิทธิภาพมากขึ้นถ้าหากสามารถช่วยกระตุ้นการปล่อยน้ำเชื้อและไข่ให้เกิดพร้อมกัน และถ้าหากสามารถกระตุ้นการพัฒนาและการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในช่วงนอกฤดูการผสมพันธุ์ได้ นอกจากนั้นแล้วปัจจัยที่ช่วยเร่งการเจริญเติบโตในลูกหอยก็มีส่วนสำคัญในการเพิ่มผลผลิต ในการทดลองนี้เราได้ทำการศึกษากลไกของฮอร์โมนประสาทประเภท สารสื่อประสาท serotonin และ FMRFamide และฮอร์โมนประสาทแบบเปปไทด์ egg laying hormone (aELH) และ prostaglandin ( $PG_E$ ) ที่คาดว่าน่าจะมีผลต่อการกระตุ้นการปล่อยน้ำเชื้อ และไข่ รวมถึงผลในการเร่งการเจริญเติบโตของหอยเป่าฮือชนิดนี้ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าฮอร์โมนประสาททั้ง 4 ชนิด สามารถใช้กระตุ้นการปล่อยน้ำเชื้อ และไข่ ในหอยเป่าฮือชนิดนี้ได้ การฉีดกระตุ้นด้วย serotonin ที่ความเข้มข้น  $10^{-3}$  M สามารถกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ทั้งในหอยเพศผู้ และเพศเมีย ในหอยเพศผู้พบว่าการปล่อยน้ำเชื้อหลังการฉีดกระตุ้นประมาณ 3-4 ชั่วโมง ส่วนหอยเพศเมียพบการปล่อยของไข่หลังการฉีดกระตุ้นประมาณ 5 ชั่วโมง ส่วนการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนประสาท aELH ที่ความเข้มข้น  $100 \mu g$  ให้ผลเช่นเดียวกับการกระตุ้นด้วย 5-HT คือสามารถกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย สำหรับการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนประสาท FMRFamide ที่ความเข้มข้น  $10^{-3}$  M และ  $10^{-6}$  M สามารถกระตุ้นได้เฉพาะการปล่อยของน้ำเชื้อ โดยพบการปล่อยน้ำเชื้อหลังการฉีดกระตุ้นประมาณ 2-4 ชั่วโมง ส่วนการกระตุ้นด้วย  $PG_E$  ที่ความเข้มข้น  $10^{-3}$  M สามารถกระตุ้นได้เฉพาะการปล่อยน้ำเชื้อเช่นเดียวกับการกระตุ้นด้วย FMRFamide นอกจากการช่วยกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์แล้ว ยังพบว่าฮอร์โมนประสาทเหล่านี้สามารถเร่งการเจริญเติบโตในหอยเป่าฮือตัวอ่อนได้ด้วย เมื่อเทียบกับกลุ่มหอยที่ไม่ได้รับการฉีดด้วยฮอร์โมน สารสื่อประสาทที่มีอิทธิพลในการเร่ง somatic growth มากที่สุดคือ FMRFamide ที่ความเข้มข้น  $200 \text{ ng/g body weight (BW)}$  ลำดับรองลงมาคือ  $PG_E$  ที่ความเข้มข้น  $20 \text{ ng/g BW}$ , สารสื่อประสาท serotonin ที่ความเข้มข้น  $20 \text{ ng/g BW}$  และ aELH ที่ความเข้มข้น  $200 \text{ ng/g BW}$  การกระตุ้นด้วยเซโรโทนินและ aELH มีผลให้เกิด somatic growth น้อยกว่าแต่หอยมีการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์เร็วขึ้นเนื่องจากมีการกระตุ้น reproductive growth ด้วย จากผลการทดลองดังกล่าวสรุปได้ว่าฮอร์โมนประสาททั้ง 4 ชนิดสามารถกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในเพศผู้และเพศเมีย โดย serotonin และ aELH สามารถกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้ทั้งในเพศผู้ และเพศเมีย แต่ FMRFamide และ  $PG_E$  สามารถกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้เฉพาะในเพศผู้ นอกจากนี้ฮอร์โมนทั้งสี่ชนิดยังสามารถช่วยเร่งการเจริญเติบโตของหอยเป่าฮือตัวอ่อนได้อีกด้วย โดย FMRFamide เร่ง somatic growth ส่วน serotonin และ aELH เร่ง reproductive growth ซึ่งประโยชน์จากผลการทดลองนี้อาจนำมาใช้เพื่อพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยง และการเพาะพันธุ์ของหอยเป่าฮือชนิดนี้ได้ในอนาคต

## 2.6. กระบวนการปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์อสุจิกับเซลล์ไข่ในหอยเป่าฮือ

หอยเป่าฮือปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ลงสู่ทะเลแล้วเกิดการปฏิสนธิภายนอกเช่นเดียวกับสัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นๆ ได้มีการพัฒนาเทคนิค *in vitro fertilization (IVF)* เพื่อเพิ่มผลผลิตลูกหอยอย่างต่อเนื่อง กระนั้นก็ยังมีความต้องการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและชีวเคมีระหว่างการมีปฏิสัมพันธ์ของ

เซลล์สืบพันธุ์กับระยะเวลาที่แน่นอนน้อยมาก ดังนั้นงานวิจัยส่วนนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษากระบวนการปฏิสัมพันธ์ของเซลล์สุจิและไข่ในหอยเป่าชื่อ *Halotis asinina* โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงช่วงก่อน ระหว่างและหลังเกิดการปฏิสนธิ ผลการบันทึกเวลาพบว่าเซลล์สุจิว่ายผ่านชั้น jelly ของไข่เข้าไปจับกับชั้น vitelline envelope พร้อมการเกิด acrosome reaction ของเซลล์สุจิภายใน 3 นาที จากนั้นไข่ที่ผสมแล้วเกิด first polar body และ second polar body ที่ 8 และ 10 นาทีตามลำดับ และไข่ก็เริ่มต้นการแบ่งเซลล์ในเวลา 20 นาที โดยพบว่าได้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุด (75%) เมื่อผสมเซลล์ไข่กับเซลล์สุจิในอัตราส่วน 1:200

ผลการศึกษาโครงสร้างละเอียดของเซลล์สุจิที่ถูกปล่อยออกมาพบว่ามีถุงอะโครโซมขนาดใหญ่ปกคลุมด้านหน้าของนิวเคลียส ในนิวเคลียสมีการอัดตัวแน่นของโปรตีนโครมาตินจากการที่มีโปรตีน protamine-like protein (PL) เกาะแน่นกับสาย DNA ผลจากอิเล็กโตรโฟรีซิสและการย้อมโดยวิธีอิมมูโนพบว่า PL เริ่มถูกสร้างในเซลล์อันดับขั้น secondary spermatocytes และพบมากขึ้นในขั้น spermatids จนถึงขั้น spermatozoa โครมาตินในนิวเคลียสของเซลล์สุจิจะถูกคลี่ออกเป็นเส้นใยที่ขดตัวเป็นก้อนเล็กๆ โดยใช้น้ำกลั่นซึ่งแสดงถึงการยืดกันระหว่างก้อนโครมาตินด้วยพันธะอ่อน ๆ การวิเคราะห์โปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์สุจิพบว่าประกอบด้วยโปรตีนหลายขนาดคือ กลุ่มโปรตีน 30-60 กิโลดาลตันพบในกลุ่มโปรตีนที่อยู่ด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์สุจิ และกลุ่มโปรตีน 40-60 กิโลดาลตันโดยมีแถบขนาด 50 กิโลดาลตันเด่นชัดที่สุดอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์สุจิ ขณะที่โปรตีนที่แยกได้จากชั้น jelly (EJ) และ vitelline envelope (VE) ของไข่เป็นไกลโคโปรตีนขนาดใหญ่ จากการศึกษาด้วยวิธี immunoblotting พบว่า ทั้ง EJ และ VE มีส่วนประกอบที่เหมือนกันแต่ต่างกันที่การแสดงออกของโปรตีน โดยที่ EJ มีกลุ่มโปรตีนขนาดใหญ่ (100-200 กิโลดาลตัน) ส่วน VE มีกลุ่มโปรตีนขนาดเล็ก (30-100 กิโลดาลตัน) โดยโปรตีนใน EJ และ VE มีน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส และฟูโคส เป็นน้ำตาลหลัก ผลการย้อมโดยวิธี immunofluorescence บ่งชี้ว่าโปรตีนทั้งสองชนิดเริ่มมีการสร้างในเซลล์ไข่ระยะที่ 3 โดยถูกส่งออกมาและสะสมมากที่ขอบเซลล์ระยะที่ 4 และ 5 แล้วประกอบเป็นโครงสร้าง EJ และ VE ในระยะสมบูรณ์ การศึกษาด้วย TEM และ SEM พบว่า EJ จากไข่มีลักษณะเป็นชั้นร่างแหหนาแน่นกันไปมา ส่วน VE เป็นแผ่นเนื้อเยื่อเหนียวที่หุ้มไข่ไว้และยังมีเส้นใยของ EJ ติดอยู่ที่ขอบด้านนอกด้วย ในไซโตพลาสซึมของไข่ที่พัฒนาเต็มที่และถูกปล่อยออกมาพบว่ามีก้อนไขมัน แกรนูลและไมโทคอนเดรียขนาดเล็กจำนวนมาก ในขณะที่ไม่พบ cortical granule เลย ที่ขอบเซลล์ไข่มี microvilli ซึ่งน่าจะเป็นบริเวณที่เซลล์สุจิใช้เกาะเพื่อเชื่อมเยื่อหุ้มเซลล์ของไข่และอสุจิเข้าด้วยกันระหว่างการปฏิสนธิ นอกจากนี้ยังพบมีการสลายตัวของเยื่อหุมนิวเคลียสของไข่ที่ถูกปล่อยออกมาด้วย ซึ่งเรียกว่า germinal vesicle breakdown (GVBD) ผลการทดสอบ acrosome reaction (AR) ที่เกิดในเซลล์สุจิพบว่าโปรตีนของ EJ ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิด AR ได้แม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นของโปรตีนที่ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรถึง 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร อย่างไรก็ตาม

ตามพบว่าเมื่อใช้โปรตีนของ EJ สูงถึง 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรเซลล์สุจิสามารถว่ายน้ำเร็วขึ้น ส่วนโปรตีนของ VE สามารถกระตุ้น AR ได้เมื่อใช้ความเข้มข้นที่ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

## Executive Summary

### 1. Immunopathobiology, syntheses and characterizations of *Fasciola gigantica* antigens and encoding genes with diagnostic and vaccine potentials

#### 1.1. Immunopathobiology of *Fasciola gigantica* infection in small laboratory animals

Pathobiology of *Fasciola gigantica* infection was studied using hamsters, rats and mice as the models. One hundred and eight, eight-week-old male golden Syrian hamsters were randomly divided into two groups: group 1 comprising forty eight and group 2 comprising sixty animals. Each animal in group 2 was orally infected with 15 metacercariae of *F. gigantica*. Group 1 received only 0.5 ml of 0.85% NaCl solution (NSS) and served as the uninfected control. Eight animals from group 1 and ten animals from group 2 were sacrificed at 1, 4, 7, 21, 35, and 49 days post infection (DPI). Hepatic lesions were initially observed in group 2 at 4 DPI, when hemorrhagic foci were seen beneath the liver capsule especially in the left and median lobes. By 7 DPI, the migratory tracks became wider, deeper, and paler. At 21 DPI, the liver showed greyish-white irregular lines on the external and cut surfaces. Fine strands of fibrin and fibrinopurulent exudate adhered to the liver capsules at the diaphragmatic surface. At 35 DPI, the liver was markedly swollen; many grooves and sinuses were seen in both visceral and parietal surfaces. The abdominal cavity of infected hamsters showed a high degree of hemoperitoneum. At 49 DPI, the livers were markedly distorted with irregular surface and border, and appeared much smaller when compared to the control. Histopathologically, at 4 DPI the fluke tracks contained red blood cells, some necrotic hepatocytes, and few infiltrating neutrophils. At the longer periods of infection, the migratory tracks became wider corresponding to the size of the flukes. At 7 DPI, acute inflammatory response of the migratory tracks was characterized by hemorrhage and marked neutrophil infiltration. The increasing number of eosinophils in the tracks was observed at 21 DPI. At 35 DPI, acute and chronic inflammation of the migratory tracks was found throughout the hepatic lobes. Hepatic cirrhosis was quite evident at 49 DPI. Eosinophilia occurred from 21 DPI ( $p = 0.00$ ) and remained elevated throughout the experiment. By 35 DPI, infected hamsters showed a degree of anemia. There was a significant increase in serum alanine aminotransferase (ALT,  $p = 0.00$ ) at 21 DPI which remained significantly elevated until the end of the experiment, while serum albumin was significantly decreased from 21 DPI. Fluke recovery rate was highest at 21 DPI at 47.77%.

One hundred and thirty-two, five-week-old male Wistar rats and 132, six-week-old ICR mice were randomly divided into two groups each: group 1 comprising of sixty and group 2 comprising of seventy-two animals. They were treated by the same procedure as in the hamster experiment. Ten animals from group 1 and twelve animals from group 2 in both rat and mouse models were sacrificed at the same time intervals as in hamster experiment. In rats, gross pathology of the liver was initially observed at 7 DPI. The migratory tracks appeared as hemorrhagic foci at the left and median lobes. By 21, 35 and 49 DPI, the pathology of the rats' liver was similar to that of the hamsters, but there was a lesser degree of hemoperitoneum and peritonitis. Histopathologically, the migratory tracks were found at 7 DPI, they appeared beneath the hepatic capsule and composed mainly of necrotic hepatocytes, red blood cells and eosinophils. By 21 DPI, histopathology of the tracks in rats was similar to those in hamsters, which were characterized by infiltration with eosinophils, neutrophils and macrophages. At 35 and 49 DPI, the appearance of the rats' migratory tracks looked similar to that appearing in the hamsters' liver, except that the acute inflammatory cells consisting mainly of eosinophils. Blood eosinophils was significantly increased from 21 DPI ( $p = 0.00$ ). There was no difference in serum alanine aminotransferase, alkaline phosphatase and serum albumin between the control and the infected animals. Fluke recovery rate was highest at 35 DPI, which was only at 17.33 %.

In mice, gross pathology of the liver was observed at 4 DPI. The minute hemorrhage foci were found at the periphery of the left lobe. At 7 DPI, the white foci about 0.5 mm were seen at the left and median lobes. By 21 DPI, the pathology of the mouse liver was similar to that of the hamster. By 35 DPI, the infected liver became shrunken and distorted with severe degree of hemoperitoneum. Histopathology of the mouse liver at 4, 7, 21 and 35 DPI was similar to that of the hamster, but the main inflammatory cell type found in the migratory tract was neutrophils. Infected mice showed a degree of anemia at 35 DPI. There was a significant increase in serum alanine aminotransferase at 35 DPI ( $p = 0.049$ ), whereas serum albumin was decreased at the same period. Fluke recovery rate was highest at 35 DPI at 26.67%.

This study showed that hamsters were the most susceptible to *F. gigantica* infection with the severest pathological response and maximum number of parasite recovery. Rats were the most resistant that showed the least severe pathological response and lowest parasite recovery. Eosinophil infiltration around the migratory tract was the major characteristics and this could be the primary immune effector cells that conferred innate resistance in rats. Mice

were more susceptible than rats but more resistant than hamster. Thus mice may be a good small animal model for testing the efficacies of vaccines as they could generate a certain level of immune responses, while hamster could be used for testing drug efficacy, but not for vaccine testing because of their poor immune responses.

### **1.2. Profiles of immune cells and antibody levels in response to infection by *Fasciola gigantica* adult antigens in small laboratory animals**

In the primary infection of *Fasciola gigantica* in small laboratory animals (section 1.1), it was found that rat was the most resistant host due to its innate immunity, whereas hamster appeared to be the most susceptible animal that may mount minimal immune response against the parasites. Mouse appeared to be in the middle which could generate certain level of immunity. To find out the cause of innate immune resistance, mice and rats were selected as the models in this investigation. Each species was divided into two groups. In the first group, the animals were intraperitoneally injected once with 250 µg of crude extract from whole body of adult *F. gigantica*. In another group, animals were intraperitoneally injected twice with 250 µg of this crude antigen at two-week intervals. The control groups were injected once or twice with sterile PBS. The number of immune cells, antibody levels and characteristics of antigenic proteins in the peritoneal lavage fluid and serum were determined at days 4, 7, 14, 21, 28, 35, 49 after immunization. In the control group, the mean number of rat peritoneal cells was higher than that of mice. After immunization, both mice and rats showed significant increase of peritoneal cells at all experimental periods when compared with the control. However, there was no significant difference in the number of total white blood cells between control and experimental groups. Monocytes/macrophages were the highest cell types in the peritoneal cavity, while lymphocyte was the most common cell in the blood. The immunization by the adult parasite antigen caused significant increase of eosinophils in the peritoneal cavity and blood of rats, but not in mice. By using indirect ELISA technique, antibody levels in the peritoneal cavity of the immunized mice were significantly increased from the control at 28 to 49 days post-immunization (DPI). The antibody response in the peritoneal cavity of double-immunized mice was significant different from the control at 7 and 14 DPI. In contrast, the antibody level of the single and double immunized rats increased from the control with significant difference at all periods of immunization. The results from SDS-PAGE and immunoblotting showed that many antigenic proteins were found in various patterns at different

periods of immunization. The antigenic bands in rats were observed at earlier periods than those found in mice. The major bands of antigenic proteins screened by immunoblotting using mouse antiserum were at 135, 115, 100 and 66 kDa, while the strong bands characterized by rats' antiserum were at 200, 115, 97, 72, 66, 45, 21 and 6 kDa.

In summary, the significant increase of eosinophils as well as the high level of antibody production (reflecting intense humoral immune response) in rats (which was 5.5-fold higher than that found in mice) might be the key factors that resulted in rats having strong innate resistance to *F. gigantica*, while mice are more susceptible to the parasite infection. In this respect mice could also be used as an experimental model for testing vaccines, and because of its innate resistance rat is not a suitable model.

### 1.3. Molecular cloning, characterization, localization, and vaccine potential of cathepsin B

The transcriptional products of *F. gigantica* genes encoding cathepsin B proteases were cloned from adult, newly excysted juvenile (NEJ), and metacercarial stages. The obtained cDNAs were named FG cat-B1, FG cat-B2, and FG cat-B3. The deduced amino acid sequences of FG cat-B2 and FG cat-B3 showed identities at 64% to 79% compared to that of FG cat-B1 from adult. Sequence comparison with homologous proteins showed that all functional important residues formerly described for cathepsin B are conserved. Southern blot analysis confirmed the presence of a family of related cathepsin B genes in the genome of *F. gigantica*. Northern blot analysis revealed a common transcript size of 1400 nucleotides with abundant cathepsin B transcripts detected in metacercarial and NEJ stages. Stage-specific gene expression was investigated by RT-PCR using gene-specific primers and hybridization with a labeled cathepsin B probe. FG cat-B1 transcripts were detected in all stages, whereas FG cat-B2 and FG cat-B3 transcripts were expressed in metacercariae, NEJ and juvenile parasites only. Cathepsin B transcripts were localized by RNA *in situ* hybridization in the caecal epithelial cells, in cells underlining the proximal part of the digestive tract, and in the tegumental cells underlining the surface tegument. Furthermore, transcripts were detected in the tissues of the reproductive system including cells of the prostate, Mehlis, and vitelline glands, the testis, and the eggs. The localization of cathepsin B proteases by indirect immunoperoxidase and immunofluorescence also correlated with the distribution of the mRNA transcripts. Cathepsin B proteases were localized in the cytoplasm of the caecal epithelial cells, the tegumental cells, and the outermost layer of surface tegument. The proteases were also

detected in the tissues of the reproductive organs as found by the *in situ* hybridization. The results implicate that these enzymes may be involved in digesting host tissues during penetration and migration to the liver, general digestive function for parasites' nutrition, and in as yet unknown reproductive processes. Mice immunized with Cat B cDNA-pCI vector constructs could elicit antibodies against cathepsin B and the vaccine potential of these constructs revealed 26% protection in challenged experimental animals when compared to the unimmunized control.

#### 1.4. Molecular cloning, characterization, localization, and vaccine potential of cathepsin L

The transcriptional products of *F. gigantica* genes encoding cathepsin L proteases were cloned from adult, newly excysted juvenile (NEJ), and metacercarial stages. The obtained cDNA from adult worm exhibited 100% identity to the FG cat-L1A which has been cloned by Grams *et al.*, 2001. The cDNAs obtained from NEJ and metacercariae were different from previous report and were named FG cat-L1G, and FG cat-L1H, respectively. Their deduced amino acid sequences showed identities at 70% to 75% compared to that of adult. Sequence comparison with homologous proteins showed that all functional important residues formerly described for cathepsin L were conserved. Cathepsin L RNA transcripts were localized by *in situ* hybridization in only the caecal epithelial cells, and it was not detected in other parasite tissues. The results implicate that these enzymes may have the main function in digestion of food for parasites' nutrition. Mice immunized with Cat L cDNA-pCI vector constructs could elicit antibodies, and the vaccine potential of these constructs was at 40% protection in challenged experimental animals when compared to the unimmunized control.

#### 1.5 Molecular cloning, characterization, localization, and vaccine potential of Glutathione S-Transferase (GST)

A 657 bp cDNA fragment encoding a GST of *F. gigantica* was cloned by RT-PCR. It was reamplified by PCR to introduce a *Nde I* recognition sequence at the 5' end of the fragment. The reamplified GST DNA fragment was inserted in pBluescript SK (-) (Stratagene) and, after sequence verification, isolated from the vector by digestion with endonucleases *Nde I* and *Bam HI*. Subsequently, it was subcloned into the *Nde I* and *Bam HI* sites of the expression vector pET -21b(+) (Novagene). Upon induction by IPTG (1mM), rGST was detected by SDS-PAGE analysis in the soluble protein fraction. The fusion protein was purified by glutathione beads.

A polyclonal antibody (PoAb) against the recombinant glutathione S-transferase (rGST) of *F. gigantica* was produced in ICR mice. The PoAb reacted with rGST at a molecular weight of 28 kDa. The localization of GST in newly excysted juvenile (NEJ), 1,3,5,7 week-old juveniles and adult *F. gigantica* was performed by immunoperoxidase techniques, using polyclonal antibody (PoAb) as probes. The parenchymal tissue in all stages of the parasite showed high concentration of GST as revealed by the staining with PoAb. The parenchymal cells in the adult stage showed three different staining intensities, high, medium and low, which might imply the existence of subpopulations of this cell type. In adult stage the light staining appeared in the testis and ovary, but no staining in the tegument, caecum and vitelline gland was noted. In juvenile stages the moderate staining was present in the tegument, in addition to the parenchymal tissue. The tegument of 3 week-old juvenile was stained relatively more intense with PoAb than in other stages.

The rGST was evaluated as a vaccine candidate in combination with Freund's adjuvant in mice infected with *F. gigantica* via intradermal, subcutaneous and intramuscular routes. All mice were challenged with 30 metacercariae of *F. gigantica* and killed 4 weeks after challenge. The worm recovery was reduced significantly in all three groups, i.e. 84.16 %, 80.45 % and 78.80 % for intradermal, subcutaneous and intramuscular routes, respectively.

The rGST was also evaluated as a cross-protective vaccine against *S. mansoni* infection by intradermal and intramuscular route. All mice were challenged with 200 cercariae of *S. mansoni* and killed 8 weeks after challenge. The worm recovery was reduced significantly in the group vaccinated with rGST via intradermal route (58.08%).

In addition, passive intraperitoneal transfer of sera from rGST-immunized mice showed the protection in naive mice from *F. gigantica* infection; the worm reduction was at 47.76%, suggesting the parasite killing mechanism within the peritoneal cavity that was dependent on the presence of specific antibody.

#### 1.6. Molecular cloning, characterization, localization and vaccine potential of fatty acid binding protein

Fatty acid binding proteins (FABPs) are candidate molecules for vaccines against several parasitic platyhelminths including *Schistosoma* spp. and *Fasciola* spp.. A cDNA encoding a specific isoform of fatty acid binding protein in *Fasciola gigantica* was cloned by RT-PCR. The nucleotide sequence of the cDNA fragment contained 397 bp ORF, encoding a

protein with a predicted molecular weight of 14.6 kDa and isoelectric point of 5.2. The deduced amino acid sequence (132 residues) was compared by alignment with FABP from other species, including *F. hepatica*, *Schistosoma* sp., *E. granulosus* and mammalian hosts. The FABP showed 66-89%, 42%, 27% and 23-32% identity with the corresponding proteins from these respective species.

The recombinant FABP (rFABP) was expressed in the bacterial expression system, and the expressed protein exhibited molecular weight (MW) at 14.5 kDa. A monoclonal antibody (MoAb) was produced against rFABP. This MoAb reacted with native FABP also at MW 14.5 kDa. It showed cross reaction only with FABP of *Schistosoma* spp., but not that of *Eurytrema* spp. and *Paraphistomum* spp. Hence, it is believed to be a good candidate for immunodiagnosis. MoAb was also used for localization of FABP by immunocytochemical techniques in each developmental stage of parasites. FABP was present with the highest concentration in parenchymal cells. Parenchymal cells were, therefore, investigated by transmission electron microscopy and immunogold labeling. The parenchymal cells could be classified into 3 types based on their ultrastructural features and the different quantity of FABP being stored, which could be related to their putative functions. Parenchymal cell type 1 (Pc<sub>1</sub>) contained few mitochondria, numerous glycogen particles, and pale cytoplasm which was enmeshed with a large amount of cytokeratin fibers. This cell type might be specialized in the storage and metabolism of glycogen and glucose. Parenchymal cell type 2 (Pc<sub>2</sub>) has similar cytoplasmic features as Pc<sub>1</sub> but contained a lot more mitochondria, and showed high density of immunogold labeling with MoAb against rFgFABP. It may, thus, specialize in the storage and metabolism of fatty acids and lipid molecules. Parenchymal cell type 3 (Pc<sub>3</sub>) has dense cytoplasm containing large amount of ER, Golgi complex and mitochondria, which were distributed throughout the cytoplasm. However, it has very little glycogen and exhibited no positive staining by MoAb. It could, thus, be concerned with the synthesis of fibers, which form the scaffold supporting the parenchyma. These observations implicate that each type of parenchymal cells might have different important functions, and that Pc<sub>2</sub> may be the primary target for damaging affected by FABP vaccine. When mice were vaccinated with FABPcDNA the average protection (worm reduction) is 55.88% in the intradermal group and 43.13% in the intramuscular group when compared with the control mice.

### 1.7. Molecular cloning, characterization and localization of *Fasciola gigantica* 14-3-3 protein

Monoclonal antibody (MoAb) against tegumental antigen (TA) at 28-29 kDa range and polyclonal antibody (PoAb) against TA fraction were used for screening the genes encoding specific TA antigens. MoAb against tegumental antigen at 28.5 kDa was genus-specific, and reacted with the corresponding protein in all developmental stages of the parasite. By immunoscreening adult cDNA library with MoAb and PoAb against TA, a zeta class Fg14-3-3 gene encoding one major protein in TA was picked up by PoAb, whereas no specific gene encoding TA was picked up by MoAb. Fg14-3-3 showed high amino acid sequence identity with 14-3-3 zeta class isoform from various species, including mammals (55.0-57.8%). A phylogenetic analysis grouped Fg14-3-3 protein, *Schistosoma japonicum* protein 1 and *Schistosoma mansoni* protein 1 in one cluster. Southern blot analysis of genomic DNA indicated that only a single Fg14-3-3 zeta class gene exists. Northern blot analysis of total RNA from adult and 4 week-old juvenile parasites showed a single transcriptional product of 1250 nucleotides in length.

Fg14-3-3 RNA transcripts were found, by *in situ* hybridization, in NEJ, juveniles and adult parasites; and they were distributed in the caecal epithelial cells, parenchymal cells, as well as tegumental cells underlining the tegumental surface, but absent in muscle cells and the tegument. Moreover, transcripts were detected in cells of the male reproductive organs, including the prostate gland and testes, and in female reproductive organs, including Mehlis gland, vitelline glands, ovum and cells in the ovaries.

The rFg14-3-3-6xHis-tagged fusion protein could be expressed in prokaryotic system at the predicted size of 30 kDa. The rabbit anti-rFg14-3-3 was produced, which recognized this native protein in various developmental stages of *F. gigantica*, including Met, NEJ, 4 week- and 7 week-old juvenile, adult worm, tegumental extract at molecular weight of 29 kDa. And it also recognized this native protein in the ES at a slightly smaller molecular weight of 28 kDa. Fg14-3-3 showed cross-reaction with the native protein in other trematode parasite extracts, and in all mouse tissues with different intensities and molecular weights. Antibody against Fg14-3-3 protein was detected in the serum of rabbits as early as 2 weeks after infecting the animals with metacercariae of *F. gigantica*, and the antibody titer became increasingly elevated as the experiment progressed over the course of ten weeks.

Corresponding with the distribution of Fg14-3-3 transcripts, immunostaining with anti-rFg14-3-3 showed the corresponding native protein distributed throughout the body and the tegument, but not in muscle, spines of the tegument of adult worm, 4 week-old juvenile, NEJ as well as Met. In addition, Fg14-3-3 protein was present in both male and female reproductive organs. Because of its consistent presence in most parasitic tissues, and fairly low identity with mammalian protein, it could be considered as one strong vaccine candidate. Eventhough MoAb against 28.5 kDa protein could not pick up genes encoding TA antigens, it was shown that 28.5 kDa TA antigen was observed only in the tegument, tegumental cells, their processes, and the tegumental-type epithelium. It was also detected in the cells of prostrate gland of male and Mehlis'gland cells and oocyte in the ovary of female. This MoAb showed limited cross reaction with similar proteins in *Schistosoma* spp., but not with *Eurytrema* spp. and *Paraphistomum* spp. Therefore, this antigen and corresponding MoAb are quite specific to *Fasciola* and *Schistosoma* spp. and thus may be a good candidate for immunodiagnosis.

#### 1.8. Molecular cloning, characterization and localization of *Fasciola gigantica* eggshell proteins

*Fasciola gigantica*, as other trematode parasites, is a prolific producer of eggs. The embryo develops inside the egg which is covered by a strong eggshell. Eggshell formation is a crucial step in the reproductive success of this parasite. Eggshell formation appears to involve the orderly formation of soluble eggshell proteins by quinone-tanning process. At least 3 structural proteins precursors of eggshell proteins are synthesized and stockpiled in vitelline cells. One of these, vitelline B is the major eggshell precursor protein that represent 6-7% of the total protein in the mature *F. gigantica*, and it has molecular weight of 31000 Da. Understanding the eggshell formation is important as it could be applied in the development of new diagnosis and vaccine development.

cDNA encoding a complete eggshell precursor protein, vitelline B1, was cloned and characterized. This cDNA had an open reading frame of 810 bp, and the deduced amino acid sequence shared similarity with vitelline B1 and B2 from *F. hepatica* at 93% and 83%, respectively. The mRNA transcripts of vitelline B1 was detected specifically in the vitelline cells within vitelline glands.

Vitelline B1 protein was expressed in *Escherichia coli* as a His-tag fusion protein. The recombinant protein was purified using Ni-NTA-agarose affinity column, and the apparent molecular weight of recombinant protein was determined to be 31,000 Da by SDS-

polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Immunoblotting of this protein showed the band at the same molecular weight as found in SDS-PAGE when probed by anti-Flag M2 monoclonal antibody and/or antiserum against eggshell precursor proteins.

Monoclonal antibody (MoAb) against this protein was produced, and it showed specific binding to eggshell antigen at the molecular weight 31,000 Da in Western blot. In immunolocalization experiment, this MoAb bound to the eggshell granules and globules of the developing, and mature vitelline cells in vitelline gland, and in the eggshell of mature egg. Thus, this MoAb may be used in immunodiagnosis aimed at detecting the eggshell antigen.

## 2. Neuroendocrine controls of gametogenesis and spawning in a tropical abalone, *Haliotis asinina*

It was determined by dot-blot ELISA that the major neurotransmitters and neuromodulators in the nervous system, especially the neuroganglia of *H. asinina* were serotonin (5HT), GABA and FMRFamide. 5HT and FMRFamide were also present in the gonad, while GABA was not. However, GABA was present in the epipodial tentacles. Prostaglandin E2 was present in both neural ganglia and gonad, while dihydrotestosterone and estradiol could not be detected in either tissues.

### 2.1. Distribution of serotonergic neurons and fibers in the nervous system, and gonad

The neurons containing serotonin were immunohistochemically localized in the cerebral, pleuropedal and visceral ganglia of *Haliotis asinina*. The large (about 10x20  $\mu\text{m}$  in diameter) and medium size (about 7x10  $\mu\text{m}$  in diameter) neurons of these three ganglia contained immunoreactivity to antibody against serotonin, while the more numerous small-size neurons (<6x8  $\mu\text{m}$  in diameter) did not show this immunoreactivity. The large neurons had oval-shaped nuclei containing mostly euchromatin and long cytoplasmic processes, whereas the medium size neurons, which could be neurosecretory cells, contained round nuclei with patches of heterochromatin, and lacked processes. The serotonin immunoreactive cells were concentrated in upper half of the medial edge of cerebral ganglion, the edge of ventral and dorsal horns of pleuropedal ganglion, and the right latero-ventral edge of visceral ganglion. The 5-HT cells were most numerous in cerebral (about 70/2300 cells per section), and pleuropedal ganglia (about 120/2700 cells per section), while they were least numerous in visceral ganglion (about 50/400 cells per section). In addition, 5HT was present in nerve fibers

within the neuropil of all ganglia. The present study suggests that serotonin is a major neurotransmitter in the neural ganglia, with only the large- and medium-sized neurons involved in the production and storage. In the gonad 5HT was detected in the connective tissue trabeculae and capsule of ovary, especially at proliferative and premature stages, while the testis exhibited only low amount of 5HT.

## **2.2. Distribution of GABAergic neurons and fibers in the nervous system and sensory organs of tentacles**

In the nervous system, positive staining for GABA in the cerebral ganglion was detected in granules of neurosecretory cells type NS<sub>2</sub>. The total numbers of immunoreactive cells were 27/1585 cells in a cross section of the ganglion. In the pleuropedal ganglion, GABA was detected in the neurosecretory cells and the total number of immunoreactive cells in the cross section was 11/2269 cells. In the visceral ganglion, GABA immunostaining was found in neurosecretory cells at 22/596 cells per a cross section. The GABA immunoreactive cells in cerebral and pleuropedal ganglia were distributed all over the cortex of the ganglia. In the visceral ganglion, GABA immunoreactive cells were found in the left lateral and ventro-medial edges. Immunoreactivity to GABA in tentacles was observed within the cytoplasm of neuroepithelial cells concentrated in the middle part of the papillae and in neuroepithelial cells scattered in the simple columnar epithelium covering the tentacles. In addition, GABA immunoreactivity was also observed in fibers within the nerve bundle in the neuropil of neural ganglia, and in the cores of the tentacles.

## **2.3. Distribution of FMRFamide neurons and fibers in the nervous system and sensory organs of tentacles**

Immunohistochemical staining with antibody against FMRFamide revealed the presence of neurons containing FMRFamide in the neural ganglia of *H. asinina*, including cerebral, pleuro-pedal, and visceral ganglia. And FMRFamide immunoreactivity was also detected in the peripheral tissues, including gonad, atrium, gill, intestine and foot muscle. The immunoreactivity was detected in the nerve cell bodies located in the cortical region, in the neuropil of the ganglia, and in the sheathes of blood sinuses around the ganglia. The number of immunoreactive cells per total neurons in the mid-ganglion section were 76/2000, 130/2500, and 60/1050 cells in cerebral, pleuro-pedal, and visceral ganglia, respectively. Histologically, the FMRFamidergic neurons constituted three types of neurosecretory cells (NS1, NS2, and

NS3). In non-neural tissues, strong immunoreactive nerve fibers were detected in the ovarian capsule, whereas weak reactivity was localized in its trabeculae. The other peripheral tissues that exhibited immunoreactivity were the varicosed nerve fibers in the neuropils of ganglia. This finding suggests that the cerebral, pleuro-pedal, and visceral ganglia may be the main sites of FMRFamide production. The presence of FMRFamide in the gonadal tissues also suggests that this amide may also be involved in the regulation of the reproductive process, especially spawning.

#### 2.4. Cloning, expression and localization of abalone egg-laying hormone (aELH) in the neural ganglia and ovary

The recombinant abalone egg-laying hormone (aELH) of *Haliotis* spp. was expressed as a fusion protein with *Schistosoma japonicum* GST, termed GST-aELH, with molecular weight at 33 kDa. Anti GST-aELH was produced by immunizing rabbits with the recombinant protein. The obtained antiserum showed immunoreactivity to both GST-aELH and GST protein. Preabsorbed anti GST-aELH with GST recognized only an intense single band of approximately 33 kDa which was the marked size of GST-aELH fusion protein but not to GST band, hence the preabsorbed antibody was specific only to aELH. No cross-reactivity with other bacterial lysate protein was observed. This result confirmed the success of GST-aELH expression in the bacterial system and its purification process.

Immunoreactivity against aELH was detected in the fine granules of type 1 and 2 neurosecretory (NS<sub>1</sub>, NS<sub>2</sub>) cells, neurites in the neuropil, and blood sinuses in the connective tissue sheathes of the cerebral, pleuropedal, and visceral ganglia. The number of positive NS cells, and the intensity of staining in the ganglia, varied, and might be related to the stage of ovarian cycle. At any stage, positive cells were most numerous in the pleuropedal, and least numerous in the visceral ganglion. In addition, several cells of the statocyst and associated nerves also exhibited the immunoreactivity. In the ovary, the most intense reactivity was detected in the follicular cells adjacent to mature oocytes, in granular cells within trabeculae and the ovarian capsule. The cytoplasm of mature oocytes was also moderately stained. The results indicated that the cerebral, pleuropedal, and visceral ganglia were the main sites of aELH-producing neurosecretory cells. The ovary might also produce aELH locally and might be the target organ that was affected by aELH.

## 2.5. Effects of serotonin, FMRFamide, prostaglandin E (PG<sub>E</sub>) and egg-laying hormone (ELH) on growth, and spawning induction

To study the gonadal maturation and spawning of *H. asinina*, the stimulating effects of several neuroendocrine factors were investigated. In this experiment, we studied the effect of four neuroendocrine factors, including serotonin (5-HT), FMRFamide, prostaglandin (PG<sub>E</sub>), and egg laying hormone (aELH) on growth, gonadal maturation and spawning induction. For spawning, administration of all four factors could induce the release of eggs and sperm.  $10^{-3}$  M 5-HT induced spawning in male approximately 2 to 4 hours after the injection, whereas the release of eggs occurred at least 5 hours after the injection. As well, gametes were released from both sexes at similar intervals after the injection with 100 µg aELH. Injection of  $10^{-3}$  M and  $10^{-6}$  M FMRFamide induced spawning only in male. Sperms were released after 2 to 4 hours after the injection. Injection with  $10^{-3}$  M PG<sub>E</sub> caused the release of only sperms similar to the effect of FMRFamide injection. Besides, the effect of 5-HT, FMRFamide, aELH and PG<sub>E</sub> on the abalone body growth was studied in juveniles. In comparison with the control group, the higher body growth (both in size and weight) could be induced by these four neurohormones. The order of effectiveness in stimulating growth are 200 ng/g BW FMRFamide, 20 ng/g BW PG<sub>E</sub>, 200 ng/g BW 5-HT and 200 ng/g BW aELH, respectively. These results indicated that neurohormones can play roles to induce spawning in both male and female abalone as in other gastropods, and also stimulate growth juvenile stage. FMRFamide could stimulate somatic growth while 5-HT and aELH tended to stimulate reproductive growth over somatic growth, since the animals tended to be smaller in body size and reached sexual maturity earlier than those receiving FMRFamide.

## 2.6. The process of sperm-egg interaction in *Haliotis asinina*

*Haliotis asinina*, like other marine invertebrates, has a broadcast spawning followed by external fertilization in seawater. High rate of *in vitro* fertilization has been attempted to improve the production of seeding in other abalone species. However, the exact timing as well as sequence of gamete interactions is still lacking. This study, therefore, aims to investigate the process of sperm-egg interaction, especially their morphological changes before, during and after fertilization. It was estimated that sperm swam through the egg jelly coat, and became bound to vitelline envelope with the occurrence of sperm acrosome reaction within 3 minutes. Fertilized eggs extruded the first and second polar bodies in 8-10 minutes and then began

cleavage at 20 minutes. The highest yield of fertilization (75%) was obtained when the ratio of egg to sperm in the incubation was at 1:200.

The spawned sperm exhibited a very large acrosomal vesicle covering the anterior end of nucleus in which condensed chromatin was tightly packed by protamine-like proteins (PL). Electrophoresis and immunolocalization indicated that PL began to be synthesized at the secondary spermatocyte step and increased in developing spermatids until spermatozoa. The chromatin fibers were composed of 60-nm globules linked together. These fibers were easily dispersed from the decondensed sperm nucleus by distilled water, implying that weak interactions might be involved in the packaging of chromatin. Sperm membrane contained major bands of peripheral membrane proteins that ranged from 40 to 60 kDa, and integral membrane proteins that ranged from 30-60 kDa, and the most predominant of which was at 50 kDa.

The major proteins from the two covering layers of spawned eggs, i.e., jelly coat (EJ) and vitelline envelope (VE), consisted of large glycoproteins at MW 107 and 178 kDa. EJ and VE glycoproteins contained mainly glucose, galactose, and fucose as indicated by Western blot and lectin. The large proteins (100-200 kDa) were predominantly present in EJ, whereas small proteins (40-100 kDa) were expressed mainly in VE. Immunofluorescence study suggested that the syntheses of EJ and VE began in ovarian oocytes stage 3; thereafter these proteins were sorted and accumulated at the periphery of stages 4-5 oocytes, and formed the fully stable structures in spawned eggs. By SEM and TEM, EJ of spawned eggs exhibited meshes of thick fibers, whereas VE was a tough, dense envelope with anchoring fibers linking it to EJ. The spawned egg has numerous lipid droplets, yolk granules, and small mitochondria in its cytoplasm, but no cortical granule was observed. There was also extension of microvilli at the periphery, which could be the site where the sperm was bound to and became fused with the egg plasma membrane at fertilizing step. Germinal vesicle breakdown was also observed in the spawned eggs.

Sperm acrosome reaction was not induced by EJ proteins, at the increasing concentrations from 10  $\mu$ g/ml to 1 mg/ml, but the sperm motility was increased at 1 mg/ml. Acrosome reaction was, however, induced by VE proteins at the concentration of 1 mg/ml. This suggested the different roles played by EJ and VE.

## ผลงานวิจัย

โครงการที่ 1 การศึกษาพยาธิชีววิทยา การสังเคราะห์และวิเคราะห์คุณลักษณะของแอนติเจนและยีนของพยาธิใบไม้ตับ *Fasciola gigantica* ที่มีศักยภาพในการพัฒนาวิธีตรวจสอบการติดเชื้อและวัคซีน (Immunopathobiology, syntheses and characterizations of *Fasciola gigantica* antigens and encoding genes with diagnostic and vaccine potentials)

### 1.1. พยาธิชีววิทยาของการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในหนูทดลองแฮมสเตอร์ หนูแรท และหนูเมาส์

โรคพยาธิใบไม้ตับ (Fasciolosis หรือ Fascioliasis) เป็นโรคพยาธิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่กินหญ้าหรือพืชน้ำเป็นอาหาร เช่น โค, กระบือ, แพะ, แกะ, และสุกร เป็นต้น การติดเชื้อพยาธิทำให้สัตว์เหล่านี้น้ำหนักตัวลด สุขภาพทรุดโทรม แคระแกรน โลหิตจางและตายในที่สุด ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพและผลผลิตของสัตว์ไม่ว่าจะเป็นคุณภาพเนื้อสัตว์ ปริมาณน้ำนม และความสมบูรณ์พันธุ์ ก่อให้เกิดความเสียหายแก่เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์และเกิดความสูญเสียต่อเศรษฐกิจของประเทศเป็นอย่างมาก นอกจากนั้นพยาธิชนิดนี้ยังสามารถติดเชื้อในคนซึ่งกินน้ำหรือพืชน้ำที่มีตัวอ่อนของพยาธิติดอยู่ ทำให้เกิดโรคพยาธิใบไม้ในตับซึ่งมีอาการและความรุนแรงมากกว่าโรคพยาธิตับจาก *Opisthorchis viverrini* พยาธิที่เป็นสาเหตุของโรคนี้คือพยาธิใบไม้ตับ Genus *Fasciola* และในประเทศไทยได้แก่ *Fasciola gigantica* การรักษาโรคพยาธิใบไม้ตับ Fasciolosis จากอดีตจนถึงปัจจุบันทำได้โดยการใช้ anthelmintic drugs โดยเฉพาะ triclabendazole แต่ก็มีรายงานว่าพยาธิมีการดื้อต่อยาเมื่อใช้เป็นเวลานานๆ และการใช้ยาจำเป็นต้องกระทำอย่างสม่ำเสมอ จึงทำให้ต้องใช้ค่าใช้จ่ายมาก นอกจากนี้ยาจะทำให้เกิดสารปนเปื้อนตกค้างในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ด้วย เพราะฉะนั้นการพัฒนาวัคซีนจึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะทำให้สามารถทำการป้องกันการติดเชื้อได้ค่อนข้างถาวร

สัตว์ทดลองที่นิยมใช้เป็น experimental model ในการศึกษาการติดเชื้อพยาธิได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวางใน *Fasciola hepatica* ซึ่งเป็นพยาธิในตระกูลเดียวกันแต่มักจะอยู่ในเขตอบอุ่นโดยใช้หนู rat สำหรับการศึกษาด้านพยาธิกำเนิด, พยาธิสภาพของ host ภายหลังจากการติดพยาธิ, ภูมิคุ้มกันของ host ภายหลังการติดพยาธิ, การทดสอบประสิทธิภาพของยาถ่ายพยาธิ ตลอดจนการทดสอบประสิทธิภาพวัคซีนต่อโรค fasciolosis แต่สำหรับพยาธิ *F. gigantica* นั้น ปัจจุบันข้อมูลเกี่ยวกับ experimental model ที่เหมาะสมยังมีน้อยมาก ในปี ค.ศ. 1972, Mango และคณะ พบว่าสัตว์ทดลองขนาดเล็กได้แก่ rat, mouse, guinea pig, hamster และ rabbit สามารถติดพยาธิ *F. gigantica* ได้ โดยที่ hamster มี susceptibility มากที่สุด รองลงมาคือ guinea pig, mouse, และ rabbit ส่วน rat มีความต้านทาน (resistance) ต่อ *F. gigantica* สูงสุดแต่จากการศึกษาของ Mango ในครั้งนั้นไม่มีข้อมูล

เกี่ยวกับ gross pathology, histopathology และ clinical pathology การทดลองในส่วนนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา susceptibility, พยาธิสภาพของหนูแฮมสเตอร์, หนูแรท และหนูเม้าส์ ภายหลังจากการติดพยาธิ *F. gigantica* โดยดูผลของ gross pathology, histopathology และ clinical pathology โดยการเปรียบเทียบกัน ทั้งนี้เพื่อจะได้ชี้บ่งว่าสัตว์ทดลองขนาดเล็กตัวใดที่จะเหมาะสมที่สุดในการใช้เป็น experimental model เพื่อทดสอบวัคซีนและยาที่ใช้รักษาโรคพยาธินี้

#### 1.1.1. วิธีการทดลองเพื่อศึกษาพยาธิชีววิทยาของการติดเชื้อพยาธิในหนูแฮมสเตอร์

นำ Golden Syrian hamster เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ จำนวน 168 ตัว มาแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 จำนวน 48 ตัว กลุ่มที่ 2 และ 3 จำนวนกลุ่มละ 60 ตัว ให้สัตว์ทั้งหมดอดอาหาร 16 ชั่วโมงก่อนการติดเชื้อจากนั้นป้อน metacercaria ของ *F. gigantica* โดยใช้ feeding tube เบอร์ 18

สัตว์ทดลองในกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ได้รับสารละลาย 0.85% NaCl ตัวละ 1.0 มิลลิลิตร

สัตว์ทดลองในกลุ่มที่ 2 ได้รับ *F. gigantica* metacercaria จำนวนตัวละ 15 metacercariae ในสารละลาย 0.85% NaCl 1.0 มิลลิลิตร

สัตว์ทดลองในกลุ่มที่ 3 ได้รับ *F. gigantica* metacercaria จำนวนตัวละ 30 metacercariae ในสารละลาย 0.85% NaCl 1.0 มิลลิลิตร

จากนั้นสุ่ม สัตว์ทดลองมาครั้งละ 28 ตัว โดยนำมาจากกลุ่มที่ 1 จำนวน 8 ตัว, กลุ่มที่ 2 และ 3 จำนวน กลุ่มละ 10 ตัว ซึ่งนำมาฆ่า ณ 1 วัน, 4 วัน, 7 วัน, 21 วัน, 35 วัน, และ 49 วันหลังติดเชื้อ (Days post infection; DPI) โดยก่อนการฆ่าแต่ละครั้ง มีการชั่งน้ำหนักตัวสัตว์ แล้วทำให้สัตว์หมดความรู้สึกโดยให้ดม diethyl ether และทำการเก็บเซลล์จากช่องท้องโดยวิธี peritoneal lavage จากนั้นทำการผ่าซากสัตว์ และเก็บตัวอย่างเลือดจากหัวใจ เพื่อทำการนับเม็ดเลือด (complete blood count) และเก็บเซรัมเพื่อตรวจวัดค่า hepatic enzymes (alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase alkaline phosphatase), total protein และ Albumin จากนั้นตรวจดูความผิดปกติและ lesion ที่อวัยวะต่าง ๆ โดยเฉพาะที่ตับ โดยนำตับของสัตว์ทดลองทั้ง 3 กลุ่ม กลุ่มละ 2 อันตรึง (fix) ในสารละลาย 10% buffered formalin แล้วเตรียมโดยวิธีพาราฟิน เพื่อตรวจทางจุลพยาธิวิทยา ตับที่เหลือจะถูกฉีกเป็นชิ้นเล็กๆ และแช่ในสารละลาย 0.85% NaCl เพื่อตรวจนับจำนวนพยาธิ (worm recovery)

#### ผลการทดลอง

Rate of infection, mortality และ worm recovery (ผลการวิจัยได้สรุปไว้ในตารางที่ 1.1-1)

ตารางที่ 1.1-1 Rate Of infection, mortality, and worm recovery in hamster

| Parameters                         | 1 DPI |    | 4 DPI |    | 7 DPI      |         | 21 DPI            |                   | 35 DPI                                      |                                  | 49 DPI                |            |
|------------------------------------|-------|----|-------|----|------------|---------|-------------------|-------------------|---------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------|------------|
|                                    | 15    | 30 | 15    | 30 | 15         | 30      | 15                | 30                | 15                                          | 30                               | 15                    | 30         |
| No. of metacercariae/animal        | 15    | 30 | 15    | 30 | 15         | 30      | 15                | 30                | 15                                          | 30                               | 15                    | 30         |
| No. of animals/group               | 10    | 10 | 10    | 10 | 10         | 10      | 10                | 10                | 10                                          | 10                               | 10                    | 10         |
| No. of infected animal             | *     | *  | *     | *  | 10         | 10      | 10                | 10                | 10                                          | 10                               | 10                    | 10         |
| % of infection                     | *     | *  | *     | *  | 100        | 100     | 100               | 100               | 100                                         | 100                              | 100                   | 100        |
| Vol. of hemoperitonium/animal (ml) | 0     | 0  | 0     | 0  | 0          | 0       | *                 | *                 | 4.0, 1.8, 0.5, 5.5, 0.5, 1.0, 1.5, 7.0, 1.0 | 4.5 6.0, 8.0, 8.0, 1.5, 7.0, 3.0 | 11.0, 3.0, 25.0, 15.0 | 10.0, 11.0 |
| No. of dead animal                 | 0     | 0  | 0     | 0  | 0          | 0       | 0                 | 0                 | 0                                           | 1                                | 5                     | 8          |
| % mortality                        | 0     | 0  | 0     | 0  | 0          | 0       | 0                 | 0                 | 0                                           | 10                               | 50                    | 80         |
| No. of fluke recovery/animal       | *     | *  | *     | *  | 1, 2, 5    | 1, 2, 6 | 5, 7, 12, 9, 7, 3 | 6, 22, 18, 11, 10 | 6, 4, 4, 4, 10, 10                          | 13, 11, 13, 19, 11               | 3, 7, 3, 3            | 6          |
| % of fluke recovery                | *     | *  | *     | *  | *          | *       | 47.77             | 44.66             | 42.22                                       | 44.66                            | 26.66                 | 20         |
| Mean size of fluke (mm)            |       |    |       |    | ~ 0.2x 0.5 |         | 1.0x3.5           |                   | 2.5x8.0                                     |                                  | 4.0x13.0              |            |

DPI = days post infection

\* = ไม่สามารถวัดปริมาณได้

โดยพบว่าหนูแฮมสเตอร์มีการติดเชื้อรุนแรง โดยสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ 2 และ 3 (สัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่มได้รับ 15 และ 30 metacercariae ตามลำดับ) มีเปอร์เซ็นต์แสดงการติดเชื้อถึง 100% ตั้งแต่วันที่ 7 ขึ้นไป และมีปริมาตร hemoperitoneum exudate สูงทั้งสองกลุ่มตั้งแต่วันที่ 35 เป็นต้นไป หนูในกลุ่มที่สาม (ที่ติดเชื้อ metacercaria 30 เม็ด ต่อหนู 1 ตัว) เริ่มตายเมื่อ 35 วันหลังติดเชื้อ โดยมีอัตราการตาย (% mortality) 10% และเมื่อวันที่ 49 หลังติดเชื้ออัตราการตายเพิ่มขึ้นทั้งสองกลุ่ม โดยกลุ่มที่สองมีอัตราการตาย 50% และกลุ่มที่สามจะมีอัตราการตายสูงกว่า 50% นอกจากนั้นแล้ว พบว่า percent fluke recovery ของพยาธิมีจำนวนมากถึง 47% ในวันที่ 21 หลังติดเชื้อในทั้งสองกลุ่ม และ 42-44% ในวันที่ 35 หลังติดเชื้อ percent recovery มีจำนวนอยู่ระหว่าง 20-26% ในวันที่ 49 หลังติดเชื้อเนื่องจากพยาธิที่พบแต่ละตัวมีขนาดใหญ่ขึ้นมากถึง  $4 \times 13$  มม. จึงอาจจะเบียดบังและทำให้พยาธิที่มีขนาดเล็กกว่าตายไปก่อนหน้านี้จึงทำให้ % recovery ของพยาธิลดลง

#### Gross pathology

หลังจากติดเชื้อได้ 4 วัน พบจุดสีแดง (hemorrhagic foci) ที่ขอบของตับโดยเฉพาะที่ left lobe และ median lobe ของสัตว์ทดลองกลุ่ม 2 และกลุ่ม 3

หลังจากติดเชื้อพยาธิ 7 วัน พบว่ามีจุดขาว ๆ (white foci) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 – 1.0 มิลลิเมตรที่บริเวณขอบของตับส่วน left lobe และ median lobe ของสัตว์ทดลองกลุ่ม 2 และกลุ่ม 3 จุดขาว ๆ เหล่านี้อาจเป็นแนวที่พยาธิไชเข้าไปและเริ่มเคลื่อนไปเป็นแนวในเนื้อตับ (migratory tract)

หลังจากติดเชื้อ 21 วัน (รูปที่ 1.1-2B) พบว่ามี migratory tracks ปรากฏเป็นแถบสีขาวขนาดความกว้างประมาณ 1.0 มิลลิเมตร ที่ผิวตับส่วน median lobe และ left lobe ของสัตว์ทดลองกลุ่ม 2 และ มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นในกลุ่ม 3 พบ fibrinopurulent exudate ปกคลุม capsule ของตับเป็นหย่อม ๆ ทางด้าน diaphragmatic surface ในช่องท้องพบ serosanguinous fluid ปริมาณเล็กน้อย ซึ่งไม่สามารถวัดปริมาตรได้

หลังจากติดเชื้อได้ 35 วัน (รูปที่ 1.1-2C) พบ necrotic area ในตับซึ่งมีรูปร่างที่ผิดไปจากปกติ เนื่องจากการหดตัวของ median lobe และ left lobe นอกจากนี้ยังพบร่อง (groove) และรูเปิด (sinus) เนื่องจากการ migration ของพยาธิที่ผิวของตับทั้งที่ด้านบนและด้านล่าง ในช่องท้องและ scrotal sac พบ serosanguineous fluid ในปริมาณมากจนทำให้ scrotal sac บวมเต่งอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 1.1-1B, 2C) ม้ามมีขนาดโตกว่าปกติประมาณ 1 เท่า มีการอักเสบของเยื่อช่องท้อง (peritonitis) พบ fibrinopurulent exudate ปกคลุมถุงหุ้ม (capsule) ของตับ และมีการเชื่อมติดแน่น (adhesion) ระหว่างตับกับกระบังลม และลำไส้เล็ก

หลังจากติดเชื้อได้ 49 วัน (รูปที่ 1.1-2D) พบว่าการเปลี่ยนแปลงเหมือนกับที่พบเมื่อ 35 วันหลังติดเชื้อ แต่มีความรุนแรงมากกว่าและพบการเชื่อมติดกันของตับแต่ละ lobe กับกระบังลมและลำไส้ทำให้ตับมีรูปร่างที่ผิดไปจากปกติ เนื่องจากแต่ละ lobe ของตับมีขนาดเล็กและฝ่อลง และมีพังผืด (fibrosis)

เกิดขึ้นภายในมากจึงดึงและรั้งให้ผิวตับมีลักษณะขรุขระ ในช่องท้องพบserosanguinous fluid พร้อมทั้งมี fibrino-purulent exudate ปกคลุมผนังลำไส้อยู่เป็นจำนวนมาก ม้ามมีขนาดโตกว่าปกติมาก

#### Histopathology

เมื่อ 4 DPI พบว่ามี migratory tracks ที่ subcapsular area มีลักษณะเป็นจุด (foci) เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.2 มม. ตรงกลางพบ necrosis ของเซลล์ตับ (hepatocyte) และมี hemorrhage

ที่ 7 DPI (รูปที่ 1.1-3) migratory tracks ที่ subcapsular area มีขนาดใหญ่ขึ้น เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 มม. ตรงกลางพบ necrosis ของเซลล์ตับ และ inflammatory cells ส่วนใหญ่เป็น polymorpho-nuclear leucocytes (PMN) ซึ่งล้อมรอบด้วย macrophage (รูปที่ 1.1-3A, B) migratory track ที่เกิดขึ้นก่อนมักจะเต็มไปด้วยเซลล์ macrophage และพบ multinucleated giant cells (foreign body type) ที่ขอบของ track (รูปที่ 1.1-3B)

เมื่อ 21 DPI (รูปที่ 1.1-4) migratory tracks มีขนาดแตกต่างกันและมีขนาดใหญ่ขึ้นจนกระจายเข้าไปในเนื้อตับ (hepatic parenchyma) ที่ส่วนกลางของ liver lobe มี tracks ที่เพิ่งเกิดขึ้นใหม่ซึ่งมีความกว้างใกล้เคียงกับขนาดตัวพยาธิ ภายในพบเซลล์เม็ดเลือดแดงจำนวนมาก (รูปที่ 1.1-4B) tracks ที่เกิดก่อนจะมีขนาดเล็กกว่าและภายในเต็มไปด้วย necrotic debris, PMN, fibroblasts และที่ขอบมักจะพบ multinucleated giant cells (รูปที่ 1.1-4C, D) tracks บาง tracks ที่เกิดในช่วงแรกถูกแทนที่ด้วย collagen fiber และมีขนาดเล็กลงมากพร้อมทั้งมีการดึงรั้งให้ผิวตับหดตัวทำให้มีลักษณะเป็นร่อง ๆ ทำให้ผิวตับขรุขระ และมักจะพบ granuloma formation กับ multinucleated giant cells อยู่ที่ขอบนอกเป็นจำนวนมาก (รูปที่ 1.1-4A) เซลล์ hepatocytes ที่ล้อมรอบ juvenile flukes ใน tract ที่เกิดใหม่จะถูกกดให้แบน (รูปที่ 1.1-4B) hepatic sinusoid รอบ ๆ central vein มีความกว้างมากขึ้น ที่ portal tract พบ bile duct proliferation และ hyperplasia ของเยื่อหุ้มน้ำดี (รูปที่ 1.1-4C) และพบ lymphocytes สะสมอยู่จำนวนมาก capsule ของตับหนาตัวขึ้นและมีการเพิ่มจำนวนของ fibrin และ PMN ในชั้น capsule (รูปที่ 1.1-4A)

เมื่อ 35 DPI (รูปที่ 1.1-5) migratory tracks มีขนาดใหญ่ขึ้น โดยมีขนาดแตกต่างกันไปเป็นผลให้เกิดการทำลายเนื้อตับส่วน hepatic parenchyma เกือบทั่วทั้ง lobe (รูปที่ 1.1-5B) tracks ที่เพิ่งเกิดขึ้นใหม่จะมีความกว้างใกล้เคียงกับขนาดตัวพยาธิ ภายในจะเต็มไปด้วย red blood cells (รูปที่ 1.1-5B) บาง tracks มีขนาดเล็กกว่าและภายในบรรจุด้วย inflammatory cells พบ healing tracks เพิ่มมากขึ้น และมีการเชื่อมต่อของ tracks ที่อยู่ใกล้เคียงกันดึงรั้งให้ผิวตับหดตัวลงและมีลักษณะขรุขระ, พบว่ามี sinusoid dilatation ทั่วไปทั้ง lobe, พบ juvenile flukes อยู่ตรงกลางของกลุ่มเซลล์ hepatocytes ที่กำลังสลายตัว และไม่พบว่ามี inflammatory cells ล้อมรอบอยู่อย่างหนาแน่น (รูปที่ 1.1-5D) ใน portal tract พบ bile duct proliferation และ hyperplasia เกิดขึ้นพร้อมทั้งมี inflammatory cells infiltration ซึ่ง

ส่วนใหญ่เป็นเซลล์ lymphocytes PMN และเซลล์ eosinophils ส่วน macrophages มีจำนวนน้อย บาง tract พบ collagen fiber ล้อมรอบ capsule ของตับหนาตัวขึ้นและมีการเพิ่มปริมาณของ fibrous tissue และ lymphocytes ในชั้น capsule มากขึ้นด้วย (รูปที่ 1.1-5B, C)

49 วันหลังติดเชื้อ (รูปที่ 1.1-6) พบ migratory tracks ขนาดแตกต่างกันทั่วทั้ง lobe โดยพบว่า tracks ที่เพิ่งเกิดใหม่มีขนาดใหญ่ที่สุด และภายในเต็มไปด้วยเซลล์เม็ดเลือดแดง healing tracks มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นและมักเชื่อมต่อกัน ที่ portal tract พบ bile duct proliferation และ hyperplasia มี inflammatory cells infiltration ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเซลล์ lymphocytes และพบเซลล์ eosinophils จำนวนเล็กน้อยสะสมอยู่ (รูปที่ 1.1-6B) บาง portal tract พบ collagen fiber เพิ่มมากขึ้นและมีการเชื่อมต่อกัน ทำให้มีลักษณะคล้ายเป็น lobules เล็ก ๆ ขนาดต่าง ๆ กันซึ่งมีลักษณะผิดไปจากโครงสร้างปกติ hepatic sinusoids มีขนาดกว้างมากขึ้น, hepatic capsule หนาตัว และพบใยเยื่อเกี่ยวพันเป็นจำนวนมาก ที่ capsule บางแห่งพบกลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะของเนื้อเยื่อ granulation เนื้อตับ (hepatic parenchyma) เหลืออยู่น้อยมาก (รูปที่ 1.1-6A)

**การตรวจทางโลหิตวิทยา (Hematological examination) และการตรวจวัดค่า hepatic serum enzymes และ serum proteins ในสัตว์ทดลอง**

#### **การตรวจทางโลหิตวิทยา**

การตรวจทางโลหิตวิทยาเพื่อหาค่าตรวจนี้ซึ่งบ่งการเปลี่ยนแปลงของเลือดได้แก่ การนับจำนวนเม็ดเลือดแดง (red blood cell count), การนับจำนวนเม็ดเลือดขาว (white blood cell count), การวัดปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit), การวัดค่าฮีโมโกลบิน (hemoglobin), และการนับและแยกชนิดเม็ดเลือดขาว (differential cell count) โดยกรรมวิธีดังนี้

#### **การนับจำนวนเม็ดเลือดแดง**

ผสมเลือดในขวดเก็บเลือดให้เข้ากันอย่างนุ่มนวล เจือจางตัวอย่างเลือดในอัตราส่วน 1:200 เท่า ด้วยน้ำยาเจือจางเม็ดเลือดแดง (erythrocyte diluting fluid) โดยใช้ automatic pipette ดูดเลือดจำนวน 5 ไมโครลิตร ใส่ในน้ำยาเจือจางเม็ดเลือดแดงจำนวน 995 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex ประมาณ 2 นาที จากนั้นหยดตัวอย่างเลือดที่เจือจางแล้วลงใน hemocytometer ที่แห้งและสะอาด ตั้งทิ้งไว้ 2 นาทีเพื่อให้เซลล์หยุดนิ่ง นำไปนับด้วยกล้องจุลทรรศน์ (light microscope) โดยใช้เลนส์วัตถุ 10x ดูบริเวณที่นับคือ central square of the large 9 squares จากนั้นเปลี่ยนเลนส์วัตถุเป็น 40x นับจำนวนเม็ดเลือดแดงใน 5 ช่องของทั้งหมด 25 small squares ทำการนับเม็ดเลือดแดงทั้ง 2 แทนของ hemocytometer

$$\text{จำนวนเม็ดเลือดแดง (RBC)} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดแดงทั้ง 10 small squares}}{10} \times 10000$$

### การนับจำนวนเม็ดเลือดขาว

ผสมเลือดในขวดเก็บเลือดให้เข้ากันอย่างนุ่มนวล เจือจางตัวอย่างเลือดในอัตราส่วน 1:20 ด้วยน้ำยาเจือจางเม็ดเลือดขาว (leucocyte diluting fluid) โดยใช้ automatic pitette ดูดเลือดจำนวน 50 ไมโครลิตร ใส่ในน้ำยาเจือจางเม็ดเลือดขาวจำนวน 0.95 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex ประมาณ 2 นาที จากนั้นหยดตัวอย่างเลือดที่เจือจางแล้วลงใน hemocytometer ที่แห้งและสะอาด ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที เพื่อให้เซลล์หยุดนิ่ง นำไปนับด้วยกล้องจุลทรรศน์ (light microscope) โดยใช้เลนส์วัตถุ 10 x นับจำนวนเม็ดเลือดขาวที่มุมทั้ง 4 ด้าน (4 large squares) ทำการนับเม็ดเลือดขาวทั้ง 2 แทนของ hemocytometer

$$\text{จำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC)} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้ง 8 large squares}}{2} \times 50$$

2

### การวัดปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit, Hct)

หาปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่นโดยวิธี microhematocrit ผสมเลือดในขวดเก็บเลือดให้เข้ากัน เอา capillary tube ความยาวประมาณ 75 มิลลิเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร ใส่ในขวดเลือด เอียงขวดให้เลือดไหลเข้ามาใน capillary tube โดย capillary attraction ให้เลือดเกือบเต็มหลอด นำไปดูดปลายด้วยดินน้ำมัน จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่อง micro-centrifuge ความเร็ว 12,800 รอบต่อนาที นาน 5 นาที อ่านค่าปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น โดยเทียบกับ hematocrit chart

### การวัดค่าฮีโมโกลบิน (Hemoglobin, Hb)

กระทำโดยใช้วิธี cyanmethemoglobin ใส่ตัวอย่างเลือดปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในสารละลาย Drabkin ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ไม่ต่ำกว่า 3 นาที นำไปวัด OD. ที่ 540 nm ใช้ blank set "0" ค่า OD ที่อ่านได้นำไปเทียบกับกราฟค่ามาตรฐาน ของฮีโมโกลบิน จะได้ค่าฮีโมโกลบิน หน่วยเป็น กรัม ต่อ เดซิลิตร

### การจำแนกชนิดเม็ดเลือดขาว

กระทำโดยใช้ thin blood smear, fixed ใน methanol นาน 3 นาที ทำให้แห้งอย่างรวดเร็ว แล้วย้อม blood smear ด้วยสีย้อม Dip Quick (Clinac Co; Ltd, Bangkok Thailand) ทำการนับและแยกชนิดเม็ดเลือดขาวได้แก่ neutrophil (segment&band), lymphocyte, monocyte, eosinophil, basophil จำนวน 200 เซลล์ ค่าที่ได้นำมาหาร 2 จะได้ค่า relative value ของเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิดหน่วยเป็น %

### การวัดค่า hepatic serum enzymes และ serum proteins

ค่า ทาง clinical pathology ซึ่งบ่งชี้ถึงภาวะที่ตับถูกทำลายได้แก่การปลดปล่อยเอนไซม์ serum alanine aminotransferase (Alt), serum aspartate aminotransferase (Ast), และ serum alkaline phosphatase (AP) ออกสู่เลือด และการหาระดับ total protein (TP), และ serum albumin (Alb)

### การวัดระดับ Serum alanine aminotransferase (Alt)

วัดปริมาณของเอนไซม์ alanine aminotransferase ในเซรัมของสัตว์ทดลองโดยวิธีของ Reitman and Frankel (1957) โดยใช้ reagent ของ Bio-Medical Laboratory, Thailand วิธีการทดลองกระทำตามตารางที่ 1.1-2

ตารางที่ 1.1-2 การหาค่า serum alanine aminotransferase

| Tube                                      | Test (ml) |
|-------------------------------------------|-----------|
| ALT substrate                             | 0.5       |
| Incubate at 37 °C , 5 นาที                |           |
| เติม Serum                                | 0.1       |
| Mix, Incubate at 37 °C , 30 นาที          |           |
| เติม Phenylhydrazine                      | 0.5       |
| Mix, ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง, 20 นาที  |           |
| เติม NaOH                                 | 5.0       |
| Mix , ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง , 5 นาที |           |

อ่านค่า OD. ที่ 505 nm, ใช้น้ำกลั่น ตั้งค่า blank ที่ “0” แล้วนำค่า OD ที่อ่านได้นำมาเทียบกับกราฟของค่ามาตรฐาน pyruvate solution (ใช้ Alt substrate) ได้ค่า serum Alt มีหน่วยเป็นยูนิต ต่อ ลิตร (U/L)

### การวัดระดับ Serum aspartate aminotransferase (Ast)

การวัดปริมาณของเอนไซม์ aspartate aminotransferase ในเซรัมทำโดยวิธีของ Reitman and Frankel (1957) โดยใช้ reagent ของ Bio-Medical Laboratory, Thailand วิธีการทดลองตามตารางที่ 1.1-3

ตารางที่ 1.1-3 การหาค่า serum aspartate aminotransferase

| Tube                                     | Test (ml) |
|------------------------------------------|-----------|
| AST substrate                            | 0.5       |
| Incubate at 37 °C , 5 นาที               |           |
| เติม Serum                               | 0.1       |
| Mix, Incubate at 37 °C , 60 นาที         |           |
| เติม Phenyl hydrazine                    | 0.5       |
| Mix ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง, 20 นาที  |           |
| เติม NaOH                                | 5.0       |
| Mix, ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง , 5 นาที |           |

อ่านค่า OD. ที่ 505 nm, ใช้น้ำกลั่นตั้งค่า blank ที่ “0” แล้วนำ ค่า OD. ที่อ่านได้นำมาเทียบกับกราฟของค่ามาตรฐาน pyruvate solution (ใช้ Ast substrate) ได้ค่า serum Ast มีหน่วยเป็นยูนิตต่อลิตร (U/L)

**การวัดระดับ Serum alkaline phosphatase (AP)**

วัดปริมาณเอนไซม์ alkaline phosphatase ในเซรัมโดย phenolphthalein monophosphate method โดยใช้ reagent ของ Bio-Medical Laboratory, Thailand วิธีการทดลองตามตารางที่ 1.1-4

ตารางที่ 1.1-4 การหาค่า serum alkaline phosphatase

| Tube                             | Test   | Blank  |
|----------------------------------|--------|--------|
| Substrate                        | 1 drop | 1 drop |
| เติม Distilled water             | 1.0 ml | 1.1 ml |
| Incubate at 37 °C , 5 นาที       |        |        |
| เติม Serum                       | 0.1 ml | -      |
| Incubate at 37 °C , 20 นาที      |        |        |
| เติม Alkaline phosphatase buffer | 5.0    | 5.0    |
| Mix                              |        |        |

อ่านค่า OD. ที่ 550 nm, ตั้งค่า blank ที่ “0” แล้วนำค่า OD. ที่อ่านได้นำมาเทียบกับกราฟของค่ามาตรฐาน phenolphthalein ได้ค่า serum AP มีหน่วยเป็นยูนิตต่อลิตร (U/L)

### การวัด Total protein

วัดปริมาณของ total protein ในเซรัมของสัตว์ทดลองโดย Biuret method โดยใช้ reagent ของ Bio-Medical Laboratory, Thailand วิธีการทดลองตามตารางที่ 1.1-5

ตารางที่ 1.1-5 การหาค่า total protein

| Tube                                       | Test (ml) | Blank (ml) |
|--------------------------------------------|-----------|------------|
| Color reagent                              | 2.5       | 2.5        |
| เติม Serum                                 | 0.05      | -          |
| เติม Distilled water                       | -         | 0.05       |
| Mix, ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที |           |            |

อ่านค่า OD. ที่ 550 nm, ตั้งค่า blank ที่ “0” แล้วนำค่า OD. ที่อ่านได้นำมาเทียบกับกราฟของค่ามาตรฐาน total protein ได้ค่า serum total protein หน่วยเป็น กรัม ต่อ เดซิลิตร (g/dl)

### การวัด Serum albumin

วัดปริมาณของ albumin ในเซรัมของสัตว์ทดลองโดย Bromocresol green method โดยใช้ reagent ของ Bio-Medical Laboratory, Thailand ตามวิธีการทดลองในตารางที่ 1.1-6

ตารางที่ 1.1-6 การหาค่า serum albumin

| Tube          | Test (ml) | Blank (ml) |
|---------------|-----------|------------|
| Color reagent | 2.5       | 2.5        |
| เติม Serum    | 0.01      | -          |

อ่านค่า OD. (ภายใน 10 นาที) ที่ 635 nm, ตั้งค่า blank ที่ “0” แล้วนำค่า OD. ที่อ่านได้นำมาเทียบกับกราฟของค่ามาตรฐาน albumin ได้ค่า serum albumin มีหน่วยเป็นกรัมต่อเดซิลิตร (g/dl)

### การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากสัตว์ทดลองทั้ง 3 กลุ่ม จะนำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างโดย ANOVA (pros hoc test โดยวิธีของ Scheffe) ที่  $p$  value  $< 0.05$  เพื่อแปลผลว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

### ผลการทดลอง

ค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่ได้จากหนูแฮมสเตอร์ แต่ละกลุ่ม ในแต่ละช่วงเวลาของทุกพารามิเตอร์แสดงในตารางที่ 1.1-7 และค่า  $p$  value ที่ได้จากการวิเคราะห์โดยวิธี ANOVA แสดงในตารางที่ 1.1-8

ตารางที่ 1.1-7 ค่าเฉลี่ยของ Parameters ต่างๆ ที่ทำการตรวจวัดเพื่อตรวจสภาพของหนูแฮมสเตอร์

| Time after infection | Group    | n  | Parameters           |                |                                  |                                    |                     |                     |                |                          |              |                      |                |                 |                 |               |
|----------------------|----------|----|----------------------|----------------|----------------------------------|------------------------------------|---------------------|---------------------|----------------|--------------------------|--------------|----------------------|----------------|-----------------|-----------------|---------------|
|                      |          |    | Complete blood count |                |                                  |                                    |                     |                     |                | Serum protein and enzyme |              |                      |                |                 |                 |               |
|                      |          |    | Hemoglobin (g/dl)    | Hematocrit (%) | Red cell (x10 <sup>6</sup> cell) | White cell (x10 <sup>3</sup> cell) | Seg. Neutrophil (%) | Band Neutrophil (%) | lymphocyte (%) | eosinophil (%)           | monocyte (%) | Total protein (g/dl) | Albumin (g/dl) | AST (U/L)       | ALT (U/L)       | AP (U/L)      |
| 1 day                | Control  | 9  | 11.13 ± 0.33         | 49.44 ± 4.45   | 8.09 ± 0.84                      | 4.1 ± 0.74                         | 32.22 ± 3.86        | 0.11 ± 0.33         | 63.3 ± 2.73    | 0.67 ± 0.707             | 3.67 ± 2.34  | -                    | -              | -               | -               | -             |
|                      | 15 Meta. | 10 | 11.03 ± 0.89         | 51.70 ± 4.36   | 8.36 ± 0.64                      | 5.64 ± 1.92                        | 30.10 ± 3.14        | 0.3 ± 0.48          | 63.40 ± 2.79   | 1.50 ± 0.70              | 4.70 ± 1.76  | -                    | -              | -               | -               | -             |
|                      | 30 Meta. | 9  | 11.27 ± 0.57         | 52.00 ± 2.34   | 8.62 ± 0.80                      | 3.98 ± 1.91                        | 30.77 ± 1.98        | 0.11 ± 0.33         | 6.0 ± 2.29     | 1.44 ± 0.88              | 4.46 ± 1.65  | -                    | -              | -               | -               | -             |
| 4 days               | Control  | 9  | 10.45 ± 0.62         | 55.88 ± 3.17   | 8.63 ± 0.49                      | 4.67 ± 1.17                        | 28.55 ± 3.77        | 0.11 ± 0.33         | 67.00 ± 4.09   | 1.11 ± 0.60              | 3.22 ± 1.20  | -                    | -              | -               | -               | -             |
|                      | 15 Meta. | 9  | 10.80 ± 0.53         | 57.0 ± 2.39    | 8.82 ± 0.15                      | 5.37 ± 0.93                        | 26.22 ± 3.63        | 0.11 ± 0.33         | 68.0 ± 2.0     | 1.33 ± 0.70              | 4.33 ± 1.87  | -                    | -              | -               | -               | -             |
|                      | 30 Meta. | 9  | 10.78 ± 0.57         | 56.44 ± 2.45   | 8.55 ± 0.40                      | 4.56 ± 1.10                        | 26.33 ± 3.35        | 0.33 ± 0.54         | 67.11 ± 2.00   | 1.55 ± 0.88              | 4.33 ± 1.32  | -                    | -              | -               | -               | -             |
| 7 days               | Control  | 9  | 12.71 ± 1.07         | 53.44 ± 7.43   | 8.32 ± 0.99                      | 6.14 ± 2.41                        | 31.22 ± 1.78        | 0.22 ± 0.44         | 64.77 ± 1.20   | 1.44 ± 0.52              | 2.33 ± 0.70  | 4.67 ± 0.37          | 3.97 ± 0.36    | 88.88 ± 15.25   | 99.88 ± 62.57   | 76.88 ± 7.44  |
|                      | 15 Meta. | 10 | 12.83 ± 1.04         | 54.30 ± 2.98   | 9.29 ± 0.74                      | 6.38 ± 1.7                         | 42.40 ± 1.71        | 0.40 ± 0.51         | 52.80 ± 2.44   | 1.90 ± 0.56              | 2.50 ± 0.70  | 4.42 ± 0.34          | 3.84 ± 0.22    | 114.40 ± 27.35  | 107.00 ± 21.39  | 80.85 ± 8.22  |
|                      | 30 Meta. | 10 | 12.45 ± 0.81         | 53.80 ± 4.63   | 8.37 ± 0.97                      | 6.17 ± 1.87                        | 46.80 ± 1.54        | 0.60 ± 0.69         | 47.70 ± 1.82   | 2.50 ± 0.52              | 2.40 ± 0.69  | 4.38 ± 0.28          | 4.13 ± 0.17    | 88.8 ± 22.43    | 98.00 ± 28.07   | 75.3 ± 3.34   |
| 21 days              | Control  | 9  | 11.42 ± 1.09         | 49.33 ± 3.8    | 7.17 ± 0.51                      | 6.31 ± 1.04                        | 34.10 ± 1.96        | 0.44 ± 0.52         | 62.77 ± 1.20   | 1.11 ± 0.33              | 1.55 ± 1.01  | 5.25 ± 0.26          | 4.16 ± 0.75    | 115.66 ± 18.3   | 52.22 ± 15.41   | 64.88 ± 9.95  |
|                      | 15 Meta. | 10 | 11.21 ± 0.58         | 45.40 ± 2.63   | 6.68 ± 0.41                      | 8.57 ± 1.34                        | 45.90 ± 3.57        | 1.40 ± 0.69         | 43.40 ± 4.5    | 5.30 ± 1.16              | 4.10 ± 1.37  | 5.41 ± 0.22          | 3.48 ± 0.26    | 272.70 ± 72.64  | 273.25 ± 41.53  | 44.60 ± 4.74  |
|                      | 30 Meta. | 10 | 11.59 ± 0.77         | 47.90 ± 4.65   | 6.26 ± 2.08                      | 9.52 ± 2.47                        | 47.70 ± 3.77        | 2.50 ± 1.17         | 38.0 ± 5.07    | 6.50 ± 1.35              | 5.30 ± 1.33  | 5.90 ± 1.42          | 3.53 ± 0.33    | 340.80 ± 170.13 | 228.90 ± 128.11 | 48.35 ± 9.43  |
| 35 days              | Control  | 8  | 10.98 ± 0.97         | 49.00 ± 1.30   | 8.94 ± 0.38                      | 3.84 ± 0.45                        | 34.0 ± 1.51         | 0.37 ± 0.51         | 63.62 ± 2.38   | 1.12 ± 0.35              | 0.87 ± 0.64  | 4.66 ± 0.24          | 3.90 ± 0.27    | 142.90 ± 44.87  | 58.25 ± 10.36   | 41.18 ± 7.52  |
|                      | 15 Meta. | 10 | 9.14 ± 1.88          | 40.50 ± 4.17   | 6.37 ± 1.26                      | 8.05 ± 3.06                        | 48.80 ± 4.18        | 4.10 ± 1.96         | 37.0 ± 5.0     | 6.80 ± 1.13              | 3.30 ± 0.48  | 4.66 ± 0.35          | 3.12 ± 0.34    | 298.50 ± 89.4   | 568.80 ± 169.3  | 32.55 ± 15.11 |
|                      | 30 Meta. | 10 | 7.87 ± 1.09          | 37.35 ± 4.79   | 5.80 ± 1.26                      | 7.27 ± 1.67                        | 48.40 ± 4.47        | 4.50 ± 1.26         | 36.80 ± 5.51   | 7.50 ± 1.08              | 2.80 ± 1.03  | 4.58 ± 0.52          | 2.90 ± 0.36    | 415.80 ± 199.5  | 865.45 ± 371.33 | 27.75 ± 8.73  |
| 49 days              | Control  | 8  | 10.86 ± 0.88         | 47.81 ± 1.88   | 7.23 ± 0.44                      | 6.77 ± 0.58                        | 38.25 ± 3.05        | 1.00 ± 0.75         | 58.00 ± 3.89   | 1.62 ± 0.74              | 3.12 ± 1.35  | 4.74 ± 0.59          | 3.77 ± 0.33    | 167.25 ± 71.80  | 52.50 ± 23.43   | 54.87 ± 7.77  |
|                      | 15 Meta. | 5  | 6.64 ± 2.22          | 31.2 ± 8.55    | 3.46 ± 1.27                      | 21.57 ± 17.22                      | 58.20 ± 7.25        | 8.00 ± 2.0          | 22.60 ± 9.5    | 8.80 ± 2.94              | 2.40 ± 0.54  | 4.26 ± 0.69          | 2.40 ± 0.98    | 776.0 ± 677.3   | 603.0 ± 202.65  | 234.5 ± 267.3 |
|                      | 30 Meta. | 4  | 5.92 ± 0.74          | 33.75 ± 3.2    | 3.33 ± 0.50                      | 12.28 ± 6.24                       | 52.50 ± 5.0         | 5.25 ± 1.70         | 28.75 ± 7.5    | 8.50 ± 2.51              | 5.00 ± 0.81  | 5.01 ± 0.62          | 2.50 ± 0.26    | 634.33 ± 246.54 | 64.66 ± 158.77  | 35.33 ± 4.16  |

Meta = Metacercariae

ตารางที่ 1.1-8 แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติโดยวิธี ANOVA เปรียบเทียบค่าทางโลหิตวิทยา, clinical pathology ระหว่าง หนูแฮมสเตอร์ ทั้ง 3 กลุ่มในแต่ละระยะเวลาของการทดลอง

| Time after infection | Groups |    | Significance (p) |      |       |       |        |      |      |      |      |      |
|----------------------|--------|----|------------------|------|-------|-------|--------|------|------|------|------|------|
|                      |        |    | HCT              | Hb   | RBC   | WBC   | Eosin. | TP   | Alb  | Ast  | Alt  | AP   |
| 1 day                | 0      | 15 | .458             | .942 | .743  | .278  | .382   | -    | -    | -    | -    | -    |
|                      | 0      | 30 | .389             | .896 | .361  | .993  | .382   | -    | -    | -    | -    | -    |
|                      | 15     | 30 | .986             | .713 | .774  | .229  | 1.000  | -    | -    | -    | -    | -    |
| 4 days               | 0      | 15 | .953             | .995 | 1.000 | .188  | .862   | -    | -    | -    | -    | -    |
|                      | 0      | 30 | .595             | .989 | .101  | .999  | .133   | -    | -    | -    | -    | -    |
|                      | 15     | 30 | .771             | .999 | .098  | .174  | .296   | -    | -    | -    | -    | -    |
| 7 days               | 0      | 15 | .939             | .998 | .146  | .968  | 1.000  | .275 | .551 | .818 | .997 | .017 |
|                      | 0      | 30 | .989             | .758 | .997  | 1.000 | .110   | .182 | .432 | .789 | .926 | .000 |
|                      | 15     | 30 | .978             | .694 | .100  | .973  | .110   | .965 | .062 | .407 | .882 | .165 |
| 21 days              | 0      | 15 | .097             | .815 | .724  | .446  | .000   | .927 | .020 | .043 | .000 | .000 |
|                      | 0      | 30 | .716             | .911 | .342  | .028  | .000   | .278 | .032 | .007 | .000 | .001 |
|                      | 15     | 30 | .352             | .559 | .803  | .263  | .702   | .450 | .979 | .785 | .882 | .607 |
| 35 days              | 0      | 15 | .000             | .035 | .000  | .070  | .000   | .999 | .000 | .066 | .001 | .285 |
|                      | 0      | 30 | .000             | .000 | .000  | .635  | .000   | .896 | .000 | .001 | .000 | .058 |
|                      | 15     | 30 | .212             | .150 | .519  | .312  | .665   | .905 | .371 | .166 | .026 | .637 |
| 49 days              | 0      | 15 | .000             | .000 | .000  | .039  | .012   | .588 | .076 | .027 | .000 | .291 |
|                      | 0      | 30 | .001             | .000 | .000  | .655  | .012   | .827 | .019 | .230 | .000 | .974 |
|                      | 15     | 30 | .467             | .965 | 1.000 | .272  | 1.000  | .405 | .786 | .671 | .761 | .329 |

มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ  $p < 0.05$

กลุ่มสัตว์ทดลอง 0 = กลุ่มควบคุม,

15 = กลุ่มที่ได้รับ 15 metacercariae,

30 = กลุ่มที่ได้รับ 30 metacercariae

Hct = Hematocrit, Hb = Hemoglobin, RBC = red blood cell, WBC = white blood cell

Eosin. = Eosinophil, TP = Total protein, Alb = albumin, Ast = Aspartate aminotransferase,

Alt = alanine aminotransferase, AP = Alkaline phosphatase

รูปที่ 1.1-7 แสดงกราฟเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลการตรวจทางโลหิตวิทยา ของหนูแฮมสเตอร์ ทั้ง 3 กลุ่มในแต่ละช่วงเวลาตลอดจนสิ้นสุดการทดลอง เมื่อสัปดาห์ที่ 3 หลังจากสัตว์ทดลองได้รับ metacercariae เปอร์เซ็นต์ของ eosinophils ในกลุ่มสัตว์ทดลองที่ได้รับ 15 และ 30 metacercariae ต่อตัวเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญกว่ากลุ่มควบคุม และยังเพิ่มสูงขึ้นจนสิ้นสุดการทดลอง

จำนวนเม็ดเลือดแดง, ปริมาณฮีโมโกลบิน, และ ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ในกลุ่มทดลองที่ได้รับ 15 และ 30 metacercariae ลดลงอย่างมีนัยสำคัญกว่ากลุ่มควบคุมเมื่อสัปดาห์ที่ 5 จนสิ้นสุดการทดลอง

จำนวนเม็ดเลือดขาวในกลุ่มสัตว์ทดลองที่ได้รับ 15 และ 30 metacercariae เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญกว่ากลุ่มควบคุมที่สัปดาห์ที่ 5 ไปจนสิ้นสุดการทดลอง

รูปที่ 1.1-8 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ hepatic serum enzymes และ serum protein ของหนูแฮมสเตอร์ ทั้ง 3 กลุ่มในแต่ละช่วงเวลาตลอดจนสิ้นสุดการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับค่า  $p$  value ในตารางที่ 1.1-8 พบว่าค่า serum alkaline phosphatase ในกลุ่มสัตว์ทดลองที่ได้รับ 15 และ 30 metacercariae ลดลงอย่างมีนัยสำคัญกว่ากลุ่มควบคุมที่สัปดาห์ที่ 1 และ 3 ของการทดลอง

serum Ast และ serum Alt ในกลุ่มสัตว์ทดลองที่ได้รับ 15 และ 30 metacercariae เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญกว่ากลุ่มควบคุมที่สัปดาห์ที่ 3 ไปจนสิ้นสุดการทดลอง

ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่า serum protein ในสัตว์ทดลองทั้ง 3 กลุ่มแต่ค่า serum albumin ในกลุ่มสัตว์ทดลองที่ได้รับ 15 และ 30 metacercariae ลดลงอย่างมีนัยสำคัญกว่ากลุ่มควบคุมที่สัปดาห์ที่ 3 ไปจนสิ้นสุดการทดลอง

ผลจากการทดลองสรุปได้ว่าหนูแฮมสเตอร์ มี susceptibility ต่อการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *F. gigantica* ที่สูงมากกว่าหนูแรท และหนูเมาส์ ซึ่งน่าจะเป็นสัตว์ทดลองที่สามารถใช้ติดเชื้อเพื่อทดสอบวัคซีนและทดสอบยาได้ แต่ที่ควรทำการศึกษาต่อคือ หนูแฮมสเตอร์ สามารถสร้างภูมิคุ้มกันต่อพยาธิได้หรือไม่ ถ้าหากได้ก็น่าจะเป็นสัตว์ทดลองเพื่อการทดสอบวัคซีนได้

#### 1.1.2. วิธีการทดลองเพื่อศึกษาพยาธิชีววิทยาของการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในหนูแรท

ใช้หนู Wistar rat เพศผู้ อายุ 5 สัปดาห์ จำนวน 132 ตัว โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 จำนวน 60 ตัว, กลุ่มที่ 2 จำนวน 72 ตัว ให้สัตว์ทดลองทั้งหมดอดอาหาร 16 ชั่วโมงก่อนการติดเชื้อพยาธิ จากนั้นป้อนด้วย metacercaria ของ *F. gigantica* โดยใช้ feeding tube เบอร์ 18

สัตว์ทดลองในกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ได้รับสารละลาย 0.85% NaCl ปริมาณตัวละ 1.0 ml

สัตว์ทดลองในกลุ่มที่ 2 ได้รับ metacercaria ของ *F. gigantica* จำนวนตัวละ 15 metacercariae

จากนั้นสุ่มสัตว์ทดลองมาครั้งละ 22 ตัว โดยนำมาจากกลุ่มที่ 1 จำนวน 10 ตัว, กลุ่มที่ 2 จำนวน 12 ตัว เพื่อเก็บตัวอย่างเมื่อเวลา 1, 4, 7, 21, 35, และ 49 วันหลังการติดเชื้อ Days post infection (DPI)

โดยที่ในการฆ่าแต่ละครั้ง ทำให้สัตว์หมดความรู้สึกโดยให้ดม diethyl ether ก่อนจนสลบ ทำการผ่าซาก สัตว์ แล้วเก็บตัวอย่างเลือดจากหัวใจ เพื่อทำการนับเม็ดเลือด (complete blood count) และเก็บเซรัม เพื่อตรวจวัดค่า hepatic enzymes (alanine aminotransferase, alkaline phosphatase) และ albumin จากนั้นดูความผิดปกติและ lesion ที่อวัยวะต่างๆ โดยเฉพาะที่ตับ โดยนำตับของสัตว์ทดลองทั้ง 2 กลุ่ม กลุ่มละ 2 ตัว fix ในสารละลาย 10% buffered formalin แล้วเตรียมโดยวิธีพาราฟิน เพื่อตรวจทางจุลพยาธิวิทยา ตับที่เหลือนจะถูกฉีกเป็นชิ้นเล็กๆ ในสารละลาย 0.85% NaCl เพื่อตรวจนับจำนวนพยาธิ

#### การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากสัตว์ทดลองทั้ง 2 กลุ่ม จะถูกนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบเพื่อหาความแตกต่างของ ค่าเฉลี่ยโดยใช้สถิติ Independent T-test ที่  $p$  value  $< 0.05$  ว่ามีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่

#### ผลการทดลอง

Rate of infection, mortality และ worm recovery (แสดงในตารางที่ 1.1-9)

หนูแรท มีการติดพยาธิ *F. gigantica* ในสัตว์ทดลองกลุ่มที่ 2 ตั้งแต่วันที่ 7 เป็นต้นไป โดยมีอัตราการติดเชื้อ 0.16% ที่ 7 DPI, 58.33 % เมื่อ 21 DPI และเพิ่มเป็น 100% ที่ 35 และ 49 DPI ไม่มีการตายของหนูแรท ตลอดการทดลองนี้ จำนวน worm recovery สูงสุดที่ 35 DPI มีค่า 17.33 %

ตารางที่ 1.1-9 Rate of infection, mortality, and worm recovery in rat

| Results                      | 1 DPI |    | 4 DPI |    | 7 DPI |    | 21 DPI |           | 35 DPI |                     | 49 DPI |                       |
|------------------------------|-------|----|-------|----|-------|----|--------|-----------|--------|---------------------|--------|-----------------------|
| No. of metacercariae/animal  | 0     | 15 | 0     | 15 | 0     | 15 | 0      | 15        | 0      | 15                  | 0      | 15                    |
| No. of animals/group         | 10    | 12 | 10    | 12 | 10    | 12 | 10     | 12        | 10     | 12                  | 10     | 12                    |
| No. of infected animals      |       |    |       |    | 0     | 2  | 0      | 7         | 0      | 12                  | 0      | 12                    |
| % of infection               |       |    |       |    | 0.16  | 0  | 58.33  | 0         | 100    | 0                   | 100    | 0                     |
| No. of dead animals          | 0     | 0  | 0     | 0  | 0     | 0  | 0      | 0         | 0      | 0                   | 0      | 0                     |
| % of mortality               | 0     | 0  | 0     | 0  | 0     | 0  | 0      | 0         | 0      | 0                   | 0      | 0                     |
| No. of fluke recovery/animal |       |    |       |    | 0     | -  | 0      | 1,1,2,1,1 | 0      | 3,3,1,2,3,4,2,2,5,1 | 0      | 2,4,2,1,2,2,3,2,3,4,1 |
| % of fluke recovery          |       |    |       |    |       | -  | 0      | 8.0       | 0      | 17.33               | 0      | 15.76                 |
| Mean length of fluke (mm.)   |       |    |       |    |       |    | 2.58   |           | 7.4    |                     | 12.34  |                       |

DPI = Days post infection

### Gross pathology

ที่ 7 DPI พบ hemorrhagic foci เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 - 1.0 มิลลิเมตรที่บริเวณ ขอบของตับ โดยเฉพาะที่ left lobe และ median lobe ของสัตว์ทดลองกลุ่มที่ 2

ที่ 21 DPI พบลักษณะของ migratory tracks เป็นทางชัดเจนขึ้นที่ผิวตับด้านล่าง และเริ่มกระจายเข้าไปในบริเวณกลางของตับ

ที่ 35 DPI พบ migratory tracks ที่ผิวตับด้านหน้าและด้านล่างในส่วน median lobe และ left lobe พบ fibrinopurulent exudate ปกคลุม capsule ของตับ ในช่องท้องพบ serosanguineous fluid ปริมาณเล็กน้อย

ที่ 49 DPI มีการเปลี่ยนแปลงเหมือนกับที่พบ 35 DPI แต่มีความรุนแรงมากกว่า ที่ผิวตับด้านล่าง ส่วน median lobe และ left lobe มีพื้นผิวขรุขระพบร่อง (groove) และ cyst ซึ่งภายในมี juvenile parasite อยู่ มีการหดตัวที่ส่วนปลายของ median lobe และ left lobe และมีการยึดติดกันของส่วน right และ caudate lobe ทำให้ตับมีรูปร่างที่ผิดไปจากปกติ และมีขนาดเล็กลงเล็กน้อย พบ fibrinopurulent exudate ปกคลุม capsule ของตับเป็นหย่อมๆ ทางด้านหน้าและด้านล่าง ในช่องท้องพบ serosanguineous fluid และ mild degree ของ peritonitis

### Histopathology

ที่ 7 DPI พบ migratory tracks ที่ subcapsular area ลักษณะเป็นจุดๆ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.2 มิลลิเมตร ตรงกลางพบ necrosis ของ hepatocyte, red blood cells และ eosinophils จำนวนเล็กน้อย (รูปที่ 1.1-9A-D)

ที่ 21 DPI migratory tracks มีขนาดแตกต่างกันและมีขนาดใหญ่ขึ้น กระจายเข้าไปใน hepatic parenchyma ส่วนกลางของ lobe, tracks ที่เพิ่งเกิดขึ้นใหม่จะมีความกว้างใกล้เคียงกับขนาดตัวของ juvenile fluke ภายใน track พบ red blood cells จำนวนมาก (รูปที่ 1.1-9E), tracks ที่เกิดก่อนจะมีขนาดเล็กกว่าและภายในเต็มไปด้วย fibrins และ inflammatory cells ส่วนใหญ่เป็น eosinophils รองลงมาคือ neutrophils (รูปที่ 1.1-9F), Migratory track (Mt) ที่เกิดก่อนจะมีการเปลี่ยนแปลงแบบ chronic inflammation (รูปที่ 1.1-9G), hepatic sinusoid รอบๆ central vein มีความกว้างมากขึ้น, ที่ portal tract พบท่อน้ำดีขนาดเล็ก (bile ductule) มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นและมี eosinophils จำนวนเล็กน้อย (รูปที่ 1.1-9H), capsule ของตับหนาตัวขึ้นและมีการเพิ่มจำนวนของ fibrin และ PMN ในชั้น capsule

ที่ 35 DPI พบว่า migratory tracks มีขนาดใหญ่ขึ้น และมีขนาดแตกต่างกันและมีการทำลาย hepatic parenchyma เกือบจะทั่วทั้ง lobe (รูปที่ 1.1-10A), tracks ที่เพิ่งเกิดขึ้นใหม่มีขนาดใหญ่มาก และมีความกว้างใกล้เคียงกับขนาดตัวพยาธิ ภายในจะเต็มไปด้วย red blood cells, hepatocytes ที่ล้อมรอบ juvenile flukes จะถูกกดทำให้แบน, พบ migratory tracks ที่เกิดขึ้นก่อน อยู่บริเวณใกล้เคียง

กัน (รูปที่ 1.1-10B) ภายในประกอบด้วย macrophages, fibroblasts และ collagen fibers (รูปที่ 1.1-10C) พบ healing tracks เพิ่มมากขึ้นและมีการเชื่อมต่อของ tracks ที่อยู่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 1.1-10D) ดึงรั้งให้ผิวตับหดตัวลงและมีลักษณะขรุขระ, sinusoid dilatation เกิดทั่วไปทั้ง lobe ของตับ, ใน portal tract พบ bile duct proliferation และ มี, eosinophils จำนวนมาก

ที่ 49 DPI hepatic parenchyma ถูกทำลายเพิ่มมากขึ้น พบ migratory tracks มีขนาดต่างๆกัน ขนาดใหญ่ที่สุดมีความกว้างประมาณ 0.8 มิลลิเมตร ภายในเต็มไปด้วย red blood cells, fibrin, necrotic debris และ inflammatory cells ส่วนใหญ่เป็น eosinophils (รูปที่ 1.1-10F), tracks ที่มีอายุมากกว่ามีขนาดเล็ก มี fibroblasts, collagen fiber และ macrophages อยู่ภายใน, ที่ portal tracts พบ bile ductules proliferation และ eosinophils จำนวนมากล้อมรอบ, capsule ของตับหนาตัวขึ้นและมีการเพิ่มปริมาณของ fibrous tissue และ lymphocytes ในชั้น capsule (รูปที่ 1.1-10E), migratory tracks ที่ซ่อมแซมแล้วที่ได้เยื่อหุ้มตับ ส่วนใหญ่จะถูกแทนที่ด้วย fibrous tissues และมีการดึงรั้งผิวตับ (รูปที่ 1.1-10G) ทำให้มีลักษณะคล้ายเป็น lobules ขนาดต่างๆ กันและผิดไปจากลักษณะปกติ, hepatic sinusoids มีขนาดกว้างมากขึ้น, portal tract มีขนาดใหญ่ขึ้นมากภายในพบ proliferation ของท่อน้ำดีขนาดเล็ก bile ductules พร้อมกับ inflammatory cells ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยเซลล์ eosinophils เป็นจำนวนมาก (รูปที่ 1.1-10H)

#### Clinical pathology

รูปที่ 1.1-11 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลการตรวจทางโลหิตวิทยา ของหนูแรท ทั้ง 2 กลุ่มในแต่ละช่วงเวลาตลอดจนสิ้นสุดการทดลอง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ จำนวนเม็ดเลือดขาว, เปอร์เซ็นต์ eosinophils และ เปอร์เซ็นต์ neutrophils

จำนวนเม็ดเลือดขาวในสัตว์ทดลองกลุ่ม 2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญกว่ากลุ่ม 1 ที่ 49 DPI ( $p = 0.00$ , รูปที่ 1.1-11A)

เปอร์เซ็นต์ของ eosinophils ในสัตว์ทดลองกลุ่ม 2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญกว่ากลุ่ม 1 ที่ 21 DPI ( $p = 0.00$ , รูปที่ 1.1-11B) หลังจากสัตว์ทดลองได้รับ metacercariae และยังคงเพิ่มสูงขึ้นไปจนสิ้นสุดการทดลอง, เปอร์เซ็นต์ของ neutrophils (segment) ในสัตว์ทดลองกลุ่ม 2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ 35 DPI ( $p = 0.00$ , รูปที่ 1.1-11C) และกลับเป็นปกติที่ 49 DPI และ เปอร์เซ็นต์ของ neutrophils (band) ในสัตว์ทดลองกลุ่ม 2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่ 35 DPI ( $p = 0.00$ , รูปที่ 1.1-11D) ไปจนสิ้นสุดการทดลอง

ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ จำนวนเม็ดเลือดแดง, ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น, serum Alt, serum alkaline phosphatase และ serum albumin ในสัตว์ทดลองทั้ง 2 กลุ่ม

### สรุปผลการทดลอง

หนูแรท สามารถที่จะติดพยาธิ *F. gigantica* ได้โดยมีอัตราการติดพยาธิ 0.16% ที่ 7 DPI 58.51% ที่ 21 DPI และ 100 % ที่ 35 DPI และ 49 DPI

% worm recovery สูงสุดที่ 35 DPI คือ 17.33 % แต่ไม่มีการตายของ หนูแรทตลอดการทดลองนี้

สัตว์ทดลองในกลุ่ม 2 มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของค่าทาง clinical pathology จำนวน 4 parameters และการเพิ่มจำนวนของ eosinophils ในกระแสเลือดมีความสัมพันธ์กับการพบ eosinophils infiltration ใน migratory tracks ซึ่งมีความเด่นชัดตั้งแต่ 21 DPI ตลอดจนถึงสิ้นสุดการทดลอง

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองในครั้งนี้กับผลการทดลองในแฮมสเตอร์ พบว่าหนูแรท มีความต้านทาน ต่อพยาธิ *F. gigantica* โดยธรรมชาติ (innate resistance) ที่สูงมากจึงไม่เหมาะที่จะใช้เป็น model ในการศึกษาเกี่ยวกับการติดพยาธิ *F. gigantica* เพื่อทดลองวัคซีนหรือยา

#### 1.1.3. วิธีการทดลองเพื่อศึกษาพยาธิชีววิทยาของการติดเชื้อพยาธิในหนูเมาส์

ใช้หนู ICR mouse เพศผู้ อายุ 6 สัปดาห์ จำนวน 132 ตัว โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 จำนวน 60 ตัว, กลุ่มที่ 2 จำนวน 72 ตัว ให้สัตว์ทดลองทั้งหมดอดอาหาร 16 ชั่วโมงก่อนการติดเชื้อพยาธิ จากนั้น ป้อนด้วย metacercaria ของ *F. gigantica* โดยใช้ feeding tube เบอร์ 19

สัตว์ทดลองในกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ได้รับสารละลาย 0.85% NaCl ปริมาณตัวละ 0.5 ml

สัตว์ทดลองในกลุ่มที่ 2 ได้รับ metacercaria ของ *F. gigantica* จำนวนตัวละ 15 metacercariae

สัตว์ทดลองทั้งสองกลุ่มถูกสุ่มมาฆ่าและเก็บตัวอย่าง ครึ่งละ 22 ตัว โดยนำมาจากกลุ่มที่ 1 จำนวน 10 ตัว, กลุ่มที่ 2 จำนวน 12 ตัว ในระยะเวลาและวิธีเดียวกันกับที่ปฏิบัติกับหนูแรท

#### การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากสัตว์ทดลองทั้ง 2 กลุ่ม ถูกนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของค่าเฉลี่ยโดยใช้สถิติ Independent T-test ที่  $p < 0.05$

#### ผลการทดลอง

Rate of infection, mortality และ worm recovery (แสดงในตารางที่ 1.1-10)

หนูเมาส์ มีการติดพยาธิ *F. gigantica* ในสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ 2 ตั้งแต่วันที่ 4 เป็นต้นไป โดยมีอัตราการติดเชื้อ 0.8% ที่ 4 DPI เพิ่มขึ้นเป็น 58.33 % ที่ 7 DPI และ 21 DPI และ 100% ที่ 35 DPI

พบอัตราการตายของหนูเมาส์ในกลุ่ม 2 ที่ 35 DPI มีค่า 33.33 % และทยอยตายลงหลังจาก 35 DPI จนตายหมดในวันที่ 40 หลังการติดเชื้อ พบ hemoperitoneal fluid ในช่องท้องของหนู เมาส์ในกลุ่ม 2 ทุกตัวและมีปริมาณมากที่สุดถึง 11 มิลลิลิตร จำนวน worm recovery สูงสุดที่ 35 DPI มีค่า 26.67 %

ตารางที่ 1.1-10 Rate of infection, mortality, and worm recovery in mouse

| Results                            | 1 DPI |    | 4 DPI |      | 7 DPI |       | 21 DPI |           | 35 DPI |                                  | 49 DPI |     |
|------------------------------------|-------|----|-------|------|-------|-------|--------|-----------|--------|----------------------------------|--------|-----|
| No. of metacercariae/animal        | 0     | 15 | 0     | 15   | 0     | 15    | 0      | 15        | 0      | 15                               | 0      | 15  |
| No. of animals/group               | 10    | 12 | 10    | 12   | 10    | 12    | 10     | 12        | 10     | 12                               | 10     | 12  |
| No. of infected animals            |       |    | 0     | 1    | 0     | 7     | 0      | 7         | 0      | 12                               | 0      | 12  |
| % of infection                     |       |    | 0     | 0.08 | 0     | 58.33 | 0      | 58.33     | 0      | 100                              | 0      | 100 |
| No. of dead animals                | 0     | 0  | 0     | 0    | 0     | 0     | 0      | 0         | 0      | 4                                | 0      | 0   |
| % of mortality                     | 0     | 0  | 0     | 0    | 0     | 0     | 0      | 0         | 0      | 33.33                            | 0      | 100 |
| Vol. of hemoperitoneal fluid (ml.) |       |    | -     | -    | -     | -     | -      | -         | -      | 6,1,1,8,1<br>.6,11,7,2<br>.2,3,6 | 0      | -   |
| No. of fluke recovery/animal       |       |    | 0     | -    | 0     | 1,2   | 0      | 1,3,2,3,2 | 0      | 6,1,1,1,2<br>,7,4,2              | 0      | -   |
| % of fluke recovery                |       |    | 0     |      | 0     | 4     | 0      | 12,22     | 0      | 26,67                            | 0      | -   |
| Mean length of fluke (mm.)         |       |    |       |      | 0.736 |       | 1.36   |           | 4.6    |                                  | -      |     |

DPI = Days post infection

### Gross pathology

ที่ 4 DPI พบ hemorrhagic foci เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณน้อยกว่า 1 มิลลิเมตรที่บริเวณ ขอบของตับ โดยเฉพาะที่ด้านหน้าของ left lobe ของสัตว์ทดลองกลุ่มที่ 2

ที่ 7 DPI พบลักษณะของ migratory tracks เป็นทั้งจุดสีขาว (white foci) และเป็นทางสีขาวยาวประมาณ 3 มิลลิเมตรที่ขอบตับส median lobe และเริ่มกระจายเข้าไปในบริเวณกลางของตับส่วน left lobe

ที่ 21 DPI พบ migratory tracks เป็นหย่อมเนื้อตายสีขาวขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 เซนติเมตร รวมทั้งมีลักษณะเป็นทางสีขาวยาว 0.5 เซนติเมตร ที่ผิวตับด้านหน้าและด้านล่างในส่วน median lobe และ left lobe ตับส่วน right lobe ด้านล่างพบ tracks เป็นทางสีขาว ในช่องท้องพบ serosanguineous fluid ปริมาณเล็กน้อย

ที่ 35 DPI ตับมีรูปร่างผิดไปจากปกติ และมีขนาดเล็กลงเล็กน้อย มีการยึดติดกันของทุก lobe ของตับ ที่ผิวตับด้านบนและล่างส่วน median lobe และ left lobe มีพื้นผิวขรุขระพบร่อง (groove) และ cyst ซึ่งภายในมี juvenile parasite อยู่ migratory tracks มีลักษณะเหมือนกับที่พบที่ 21 DPI แต่มีขนาดและความรุนแรงมากกว่า ในช่องท้องพบ serosanguineous fluid และ mild degree ของ peritonitis

### Histopathology

ที่ 4 DPI พบ migratory tracks ที่ subcapsular area ลักษณะเป็นจุดๆ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.2 มิลลิเมตร ภายในประกอบด้วย necrosis ของ hepatocyte , red blood cells และ neutrophils จำนวนเล็กน้อย (รูปที่ 1.1-12A-B)

ที่ 7 DPI migratory tracks มีขนาดใหญ่ขึ้นและมีลักษณะเป็นทาง กระจายเข้าไปใน hepatic parenchyma ส่วนกลางของ lobe ตรงกลางพบ necrosis ของ hepatocyte, hemorrhage, และ inflammatory cells ส่วนใหญ่เป็น neutrophils (รูปที่ 1.1-12C-G) และพบ macrophage เพิ่มจำนวนมากขึ้นในบาง tracks (รูปที่ 1.1-12H)

ที่ 21 DPI tracks ที่เพิ่งเกิดขึ้นใหม่จะมีความกว้างใกล้เคียงกับขนาดตัวของ juvenile fluke ภายใน track พบ necrosis ของ hepatocyte จำนวนมากและพบ inflammatory cells ส่วนใหญ่เป็น neutrophils (รูปที่ 1.1-13A, B) track ที่มีเกิดก่อนจะมีการเปลี่ยนแปลงแบบ chronic inflammation , portal tract มีขนาดใหญ่ขึ้น พบก้อน thrombus ใน hepatic portal vein ร่วมกับ hyperplasia ของท่อน้ำดีขนาดเล็ก และพบ inflammatory cells ส่วนใหญ่เป็น neutrophils (รูปที่ 1.1-13C, D)

ที่ 35 DPI พบว่า migratory tracks มีขนาดใหญ่ขึ้น และมีการทำลายเนื้อตับเกือบจะทั่วทั้ง lobe, tracks ที่เพิ่งเกิดขึ้นใหม่มีขนาดใหญ่มากและมีความกว้างใกล้เคียงกับขนาดตัวพยาธิ ภายในจะเต็มไปด้วย red blood cells, necrotic hepatocyte และ fibrin (รูปที่ 1.1-13F) พบ healing tracks เพิ่มมากขึ้นและมีการเชื่อมต่อของ tracks ที่อยู่ใกล้เคียงกัน ดึงรั้งให้ผิวตับหดตัวลงและมีลักษณะขรุขระ, sinusoid

dilatation เกิดทั่วไปทั้ง lobe ของตับ, capsule ของตับหนาตัวขึ้นและมีการเพิ่มปริมาณของ fibrin และ neutrophils ในชั้น capsule (รูปที่ 1.1-13E) ใน portal tract มีการเปลี่ยนแปลงเหมือนกับที่พบที่ 21 DPI (รูปที่ 1.1-13G) และมีการเพิ่มจำนวนของ macrophage และ fibroblast (รูปที่ 1.1-13H)

#### Clinical pathology

รูปที่ 1.1-14 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลการตรวจทางโลหิตวิทยา ของหนูเมาส์ ทั้ง 2 กลุ่มในแต่ละช่วงเวลาตลอดจนสิ้นสุดการทดลอง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ จำนวนเม็ดเลือดแดง, ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น และ จำนวนเม็ดเลือดขาว

จำนวนเม็ดเลือดแดงและปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นในสัตว์ทดลองกลุ่ม 2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญกว่ากลุ่ม 1 ที่ 21 DPI และ 35 DPI ( $p = 0.00, 0.00$  1.1-14A, B)

จำนวนเม็ดเลือดขาวในสัตว์ทดลองกลุ่ม 2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญกว่ากลุ่ม 1 ที่ 35 DPI ( $p = 0.00, 1.1-14C$ )

รูปที่ 1.1-15 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูล hepatic serum enzymes และ serum proteins ของหนูเมาส์ ทั้ง 2 กลุ่มในแต่ละช่วงเวลาตลอดจนสิ้นสุดการทดลอง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณเอนไซม์ Alt และปริมาณ albumin โดยที่ ปริมาณเอนไซม์ Alt ในเซรัมของสัตว์ทดลองกลุ่ม 2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ 35 DPI ( $p = 0.049$ , รูปที่ 1.1-15A) และ ปริมาณ albumin ในเซรัมของสัตว์ทดลองกลุ่ม 2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ 35 DPI ( $p = 0.047$ , รูปที่ 1.1-15B)

#### สรุปผลการทดลอง

หนูเมาส์ สามารถที่จะติดพยาธิ *F. gigantica* ได้โดยมีอัตราการติดพยาธิ 58.51% ที่ 7 DPI และ 21 DPI และ 100 % ที่ 35 DPI และ 49 DPI

เปอร์เซ็นต์ worm recovery สูงสุดที่ 35 DPI มีค่า 26.67 % อัตราการตายของหนูเมาส์ มีค่า 33.33 % ที่ 35 DPI และเป็น 100 % ที่ 49 DPI

สัตว์ทดลองในกลุ่ม 2 มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของค่าทาง clinical pathology จำนวน 5 parameter เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองในครั้งนี้กับผลการทดลองในแฮมสเตอร์และหนูแรท พบว่า หนูเมาส์ มีความสามารถที่จะติดพยาธิ *F. gigantica* ได้ดีกว่าหนูแรท แต่ด้อยกว่าหนูแฮมสเตอร์ นอกจากนี้อัตราการตายในหนูเมาส์ มีค่าสูงมากเมื่อติดเชื้อที่ระยะเวลานานเนื่องจากขนาดตัวและตับของ หนูเมาส์ มีขนาดเล็ก และไม่สามารถทนต่อการติดเชื้อได้เกิน 40 วัน (เมื่อได้รับพยาธิ 15 metacercaria)

โดยสรุปเมื่อเปรียบเทียบอัตราการติดพยาธิและอัตราการตายของสัตว์ทดลองแล้วพบว่าหนูแรทมีความต้านทานตามธรรมชาติ (innate resistant) สูงสุด หนูแฮมสเตอร์มีความต้านทานต่ำสุด และหนูเมาส์มีความต้านทานอยู่ระดับปานกลาง เนื่องจากหนูแฮมสเตอร์อาจสร้างภูมิคุ้มกันต่อการติดพยาธิน้อยมากจึงอาจไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ทดสอบวัคซีน แต่อาจจะใช้ทดสอบการออกฤทธิ์ของยาได้ ในขณะที่หนูเมาส์อาจเหมาะสมสำหรับการทดสอบวัคซีน

### คำอธิบายรูปประกอบผลการวิจัยหัวข้อเรื่องที่ 1.1

- รูปที่ 1.1-1** A. ลักษณะปกติ ภายนอกด้าน ventral ของหนูแฮมสเตอร์ เพศผู้ (กลุ่ม 1) แสดงหน้าท้อง (ab) และถุงอัณฑะ (sc)  
B. ลักษณะภายนอกด้าน ventral ของหนูแฮมสเตอร์ เพศผู้ 35 วันหลังได้รับพยาธิ (กลุ่ม 3) แสดงหน้าท้อง (ab) และถุงอัณฑะ (sc) มีขนาดบวมโตขึ้น อย่างเห็นได้ชัด
- รูปที่ 1.1-2** พยาธิสภาพระดับมหภาคภายในช่องท้อง ของหนูแฮมสเตอร์ที่สังเกตด้วยตาเปล่า  
A. หนูแฮมสเตอร์ (กลุ่ม 1) แสดงอวัยวะตามที่ตั้งปกติ  
B. หนูแฮมสเตอร์ (กลุ่ม 3) 21 วันหลังได้รับพยาธิ พบ fibrinopurulent exudate (ลูกศร) ปกคลุมผิวตับ (li)  
C. หนูแฮมสเตอร์ (กลุ่ม 3) 35 วันหลังได้รับพยาธิ เห็น migratory tracks (m) ชัดเจนที่ median lobe (Me) และ left lobe (Lt) และมี fibrinopurulent exudate (f) ปกคลุมผิวตับ, ม้าม (sp) มีขนาดโตประมาณ 2 เท่าของขนาดปกติ  
D. หนูแฮมสเตอร์ กลุ่ม 3, 49 วันหลังได้รับพยาธิ median lobe (Me) และ left lobe (Lt) ของตับมีขนาดเล็กลง ผิวภายนอกขรุขระ พร้อมทั้งเกิดพังผืดยึด lobe ต่าง ๆ ให้ติดกัน ตับมีขนาดเล็กลงและผิวขรุขระ
- รูปที่ 1.1-3** จุลพยาธิสภาพของตับของหนูแฮมสเตอร์ กลุ่ม 3 ที่สังเกต ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาเมื่อ 7 วันหลังได้รับพยาธิ  
A. พบ migratory tracks (m) ที่ใต้ เยื่อหุ้มตับ (c)  
B. พบ multinucleated giant cells ชนิด foreign body type (g) อยู่รอบๆ migratory track (m)  
C. พบ Juvenile fluke (J) อยู่ใน เนื้อเยื่อตับ (hp)
- รูปที่ 1.1-4** จุลพยาธิสภาพระดับจุลภาคของตับหนูแฮมสเตอร์ กลุ่ม 3 ที่สังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา เมื่อ 21 วันหลังได้รับพยาธิ  
A. เยื่อหุ้มตับ (c) หนาตัวขึ้น เนื่องจากมี fibrin และ inflammatory cells ส่วนใหญ่ ประกอบด้วย polymorphonuclear cells (PMN) เนื้อเยื่อตับ (hp) ส่วนใหญ่ยังดูปกติ  
B. สังเกตเห็น juvenile fluke (J) ชัดเจนในตับ เซลล์ตับโดยรวม (hp) มีขนาดเล็กลง เนื่องจากถูกกดด้วยตัวพยาธิ ทำให้เกิดการลดขนาดเซลล์ด้วย pressure atrophy

C. Portal tract มีขนาดใหญ่ขึ้นภายในพบมี proliferation และ hyperplasia ของท่อน้ำดีขนาดเล็ก (b) พร้อมกับ inflammatory cells ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยเซลล์ eosinophils กระจายอยู่รอบ ๆ เนื้อดีของตับ (liver parenchyma) มีขนาดลดลง  
D. ภาพนี้แสดงการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ granuloma อย่างชัดเจนโดยมีเซลล์ยักษ์ (g) หลายเซลล์อยู่บริเวณรอบนอกของ granuloma

รูปที่ 1.1-5 จุลพยาธิสภาพของตับหนูแฮมสเตอร์ กลุ่ม 3 ของตับสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา เมื่อ 35 วันหลังได้รับพยาธิ

- A. เยื่อหุ้มตับ (C) หนาตัวขึ้นมาก เนื่องจากมี lymphocyte และ fibroblast สะสมอยู่จำนวนมาก
- B. migratory track (m) ที่เพิ่งเกิดใหม่จะมีขนาดใหญ่ ภายในมี fibrin (fi) และ เม็ดเลือดแดง (RBC) สะสมอยู่
- C. Hepatic sinusoid (S) มีขนาดใหญ่ขึ้นและพบกระจายไปทั่วทั้ง lobe, เยื่อหุ้มตับ (C) หนาตัวขึ้น และประกอบด้วยใยเยื่อเกี่ยวพัน และ lymphocytes
- D. Juvenile fluke (J) ฝังอยู่ในเนื้อเยื่อตับ

รูปที่ 1.1-6 จุลพยาธิสภาพของตับหนูแฮมสเตอร์ กลุ่ม 3 สังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา เมื่อ 49 วันหลังได้รับพยาธิ

- A. เนื้อเยื่อตับ (hp) ฝ่อลงเนื่องจากส่วนใหญ่จะถูกแทนที่ด้วย fibrous tissues (ft)
- B. ใน Portal tract มี lymphocytes (ly) และ fibroblasts (fr) สะสมอยู่จำนวนมาก และท่อน้ำดีมีขนาดเล็กลง (b)

รูปที่ 1.1-7 กราฟแสดงค่าทางโลหิตวิทยาซึ่งประกอบด้วย ค่า hemoglobin, ค่า hematocrit, ค่า red cell count, และค่า white cell count ของหนูแฮมสเตอร์ ทั้ง 3 กลุ่ม ในแต่ละช่วงเวลาจนถึงสิ้นสุดการทดลอง

รูปที่ 1.1-8 แสดงค่า serum proteins (total protein และ albumin) และ hepatic serum enzymes (aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase และ alkaline phosphatase) เปรียบเทียบในแฮมสเตอร์ ทั้ง 3 กลุ่มในแต่ละช่วงเวลาจนถึงสิ้นสุดการทดลอง

- รูปที่ 1.1-9** พยาธิสภาพของตับของหนูแรท เมื่อสัมผัสด้วยกลองจุลทัศน์ธรรมดา (ย้อม H&E)  
A-D, 7 DPI
- A. พบ migratory tracks (m) ที่ใต้เยื่อหุ้มตับ, เนื้อเยื่อตับ (hp)
- B, C, D. เป็นภาพกำลังขยายสูงของภาพ A migratory track (m) ประกอบด้วย เม็ดเลือดแดง (RBC), necrotic hepatocytes และ eosinophils (eo)
- E-H, 21 DPI
- E. Migratory track (m) ที่เพิ่งเกิดใหม่จะมีขนาดใหญ่ ตามขนาดตัวของ Juvenile fluke (J) และมีการเปลี่ยนแปลงแบบ acute inflammation, เนื้อเยื่อตับ (hp)
- F. ภายใน track พบ fibrin (fi) และ inflammatory cells ส่วนใหญ่เป็น eosinophils (eo) และ neutrophils (ne)
- G. Migratory track (m) ที่เกิดก่อนจะมีการเปลี่ยนแปลงแบบ chronic inflammation, เนื้อเยื่อตับ (hp)
- H. Portal tract มีขนาดใหญ่ขึ้น ภายในมี proliferation ของท่อน้ำดีขนาดเล็ก bile ductules (b) พร้อมกับ inflammatory cells ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วย eosinophils (eo)
- รูปที่ 1.1-10** พยาธิสภาพของตับของหนูแรท ด้วยกลองจุลทัศน์ธรรมดา (ย้อม H&E)  
A-D, 35 DPI
- A. Migratory tracks (m) ที่เกิดใหม่มีขนาดใหญ่ และ กระจายลงไปในส่วนกลางของ lobe, เนื้อเยื่อตับ (hp)
- B. Migratory tracks(m) ที่เกิดขึ้นใหม่ และที่เกิดก่อน (ลูกศร) พบอยู่บริเวณใกล้เคียงกัน
- C. แสดงภาพขยายของ track ที่เกิดก่อนในภาพ 2B.ประกอบด้วย macrophages (ma), fibroblasts (fr) และ collagen fibers (co)
- D. Migratory tracks มีการซ่อมแซมภายหลังการอักเสบมีขนาดเล็กลง (ลูกศร) และ เชื่อมต่อกันกับ tracks ที่เกิดใหม่ (m) ทำให้ architecture ของตับผิดไปจากปกติ
- E-H, 49 DPI
- E. เยื่อหุ้มตับ (c) หนาตัวขึ้น เนื่องจากมี fibrin และ inflammatory cells ส่วนใหญ่ ประกอบด้วย PMN , เนื้อเยื่อตับ (hp)
- F. เนื้อเยื่อตับถูกทำลายเป็นบริเวณกว้าง พบ juvenile fluke (J) อยู่ในเนื้อเยื่อตับ (hp)
- G. Migratory tracks ที่ซ่อมแซมแล้วที่ได้เยื่อหุ้มตับ ส่วนใหญ่จะถูกแทนที่ด้วย fibrous tissues และมีการดึงรั้งผิวตับ (ลูกศร), เนื้อเยื่อตับ (hp)

H. Portal tract มีขนาดใหญ่ขึ้นภายในพบมี proliferation ของท่อน้ำดีขนาดเล็ก bile ductules (b) พร้อมกับ inflammatory cells ซึ่งส่วนใหญ่คือเซลล์ eosinophils (eo)

- รูปที่ 1.1-11** กราฟแสดงค่าทางโลหิตวิทยาที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของหนูแรท
- A. แสดงจำนวนเม็ดเลือดขาวของสัตว์ทดลองทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งมีการเพิ่มขึ้นของค่าเฉลี่ยในสัตว์ทดลองกลุ่ม 2 ที่ 49 DPI
- B. แสดงเปอร์เซ็นต์ eosinophils ของสัตว์ทดลองทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งมีการเพิ่มขึ้นของค่าเฉลี่ยในสัตว์ทดลองกลุ่ม 2 ตั้งแต่ 21 DPI ไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง
- C. แสดงเปอร์เซ็นต์ neutrophils(segment) ของสัตว์ทดลองทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งมีการเพิ่มขึ้นของค่าเฉลี่ยในสัตว์ทดลองกลุ่ม 2 ที่ 35 DPI
- D. แสดงเปอร์เซ็นต์ neutrophils (band) ในสัตว์ทดลองทั้ง 2 กลุ่ม ซึ่งมีการเพิ่มขึ้นของค่าเฉลี่ยในสัตว์ทดลองกลุ่ม 2 ที่ 35 DPI ไปจนถึงสิ้นสุดการทดลอง

- รูปที่ 1.1-12** พยาธิสภาพของตับของหนูเมาส์ เมื่อสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (ย้อม H&E)
- A-B, 4 DPI
- A. พบ migratory tracks (m) ที่ใต้เยื่อหุ้มตับ, เนื้อเยื่อตับ (hp)
- B. เป็นภาพกำลังขยายสูงของภาพ 1.1-12A migratory track (m) ประกอบด้วย เม็ดเลือดแดง (RBC), necrotic hepatocytes (arrow) และ neutrophils (ne)
- C-H, 7 DPI
- C, D. Migratory track (m) มีขนาดใหญ่ขึ้นและกระจายไปส่วนกลางของตับ, เนื้อเยื่อตับ (hp)
- E, F. ภายใน track พบ fibrin (fi), เม็ดเลือดแดง (RBC), และ inflammatory cells ส่วนใหญ่เป็น neutrophils (ne)
- G. เป็นภาพกำลังขยายสูงของภาพ 1.1-12F พบ fibrin (fi), เม็ดเลือดแดง (RBC), และ inflammatory cells ส่วนใหญ่เป็น และ neutrophils (ne)
- H. Migratory track ที่เกิดก่อนจะมีการเปลี่ยนแปลงแบบ chronic inflammation พบ macrophage (ma) จำนวนมากขึ้น, neutrophils (ne)

- รูปที่ 1.1-13** พยาธิสภาพของตับด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (ย้อม H&E)
- A-D, 21 DPI
- A. Migratory tracks (m) ที่เกิดใหม่มีขนาดใหญ่ และ กระจายลงไปในส่วนกลางของ lobe, เนื้อเยื่อตับ (hp)