

บทที่ 5

อภิปรายผล และสรุปผลการศึกษา

การจัดเรียงตัวของ sensory papilla ของระยะเมตาเซอ์คาร์เรียของพยาธิใบไม้ตับ

Opisthorchis viverrini

การศึกษาการจัดเรียงตัวของ sensory papilla ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา นิยมศึกษาด้วยการย้อม silver nitrate มีรายงานการศึกษาการจัดเรียงตัวในพยาธิหลายชนิดและหลายระยะ เช่น การศึกษาในระยะไมราซีเดียมของ *Echinostoma trivolvis* (Dimitrov et al., 1995) และใน *Echinostoma paraensei* (Pinheiro et al., 2005), ศึกษาในระยะเซอ์คาร์เรียของ *Himasthla secunda* (Chapman, Wilson, 1970), *Echinostoma revolutum* (Fried, Fujino, 2003), *Echinoparyphium* sp. (Dimitrov et al., 2001) และ *Echinostoma caproni* (Nakano et al., 2003) รายงานการศึกษาการจัดเรียงตัวของ sensory papilla ในระยะเมตาเซอ์คาร์เรียและตัวเต็มวัยพบค่อนข้างน้อย การศึกษาการจัดเรียงตัวของ sensory papilla ในพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ระยะเมตาเซอ์คาร์เรียด้วยการย้อม silver nitrate ทำโดยการดองตัวอ่อนในอัลกอฮอล์ 50% เป็นเวลา 10 นาที และ re-hydration ในอัลกอฮอล์ 5% เป็นเวลา 10 นาที และนำกลั่น ก่อนนำไปย้อมด้วย silver nitrate 0.1% เป็นเวลา 10-30 นาที ซึ่งต่างจากงานวิจัยของ Nakano และคณะ (2003) แช่พยาธิใน silver nitrate 2% ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำหลอดไฟส่องเป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วนำมาศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์ ในขณะที่การศึกษาใน *Himasthla secunda* ระยะเซอ์คาร์เรีย ย้อมพยาธิด้วย silver nitrate 2% และแช่ทิ้งไว้ใน silver nitrate 2% เป็นเวลา 2 วันก่อนนำมาศึกษา (Chapman, Wilson, 1970) แม้ว่าความเข้มข้นที่ใช้ในการย้อม sensory papilla ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เพียง silver nitrate 0.1% แต่พบว่าลักษณะการติดสีของ sensory papilla นั้นเป็นเม็ดกลมขนาดประมาณ 1-2 ไมโครเมตร สีน้ำตาลดำ ตรงกลางติดสีจางซึ่งคล้ายกับ sensory papilla ของระยะเซอ์คาร์เรียของพยาธิ *Echinostoma revolutum* (Fried, Fujino, 1987) และ *Himasthla secunda* (Chapman, Wilson, 1970) แต่การจัดเรียงตัวเป็นแบบไม่สมมาตรกันระหว่างซ้ายขวา รวมทั้งที่พบบริเวณ oral sucker ที่พบ papilla แบบกลุ่ม 2 กลุ่ม (แต่ละกลุ่มประกอบด้วยปุ่มย่อย 5 ปุ่ม) และพบแบบเดี่ยว 1 ปุ่ม ที่บริเวณ ventral sucker พบ papilla 2 ปุ่ม การจัดเรียงตัวเป็นแบบไม่สมมาตรนี้พบใน *Echinostoma caproni* ระยะเซอ์คาร์เรียที่บริเวณ oral และ ventral sucker เช่นกัน (Nakano et al., 2003) ในการศึกษาจำนวนและรูปแบบการจัดเรียงตัวของ *O. viverrini* พบ papilla แบบเดี่ยว 41 ดุ่ม แบบกลุ่ม 36 กลุ่ม ซึ่งการศึกษาจำนวนและรูปแบบการจัดเรียงตัวของ papilla ในพยาธิใบไม้มีเพียงการศึกษาใน *Himasthla secunda* ระยะเซอ์คาร์เรียพบ papilla ประมาณ 100 ปุ่ม พบที่บริเวณ ventral sucker ประมาณ 20 ปุ่ม (Chapman, Wilson, 1970) ความแตกต่างของ

การศึกษาครั้งนี้อาจเนื่องมาจากหลายปัจจัย เช่น วิธีการเตรียมตัวอย่าง ความเข้มข้นของ silver nitrate คุณสมบัติการย้อมติดสีของ papilla แต่ละชนิดหรือแต่ละระยะของพยาธิ เป็นต้น นอกจากนี้การย้อมหรือหัดตัวของพยาธิที่ไม่เท่ากันอาจมีผลต่อตำแหน่งของ sensory papilla ด้วย แม้ว่าการศึกษาการจัดเรียงตัวของ sensory papilla ในพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ด้วยการย้อม silver nitrate พบว่าไม่สมมาตรกัน แต่จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่าการจัดเรียงตัวสมมาตรกันซ้ายขวา และพบเรียงตัวเป็นวงรอบลำตัว

รูปร่างและลักษณะของ sensory papilla ที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

sensory papilla ที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของพยาธิใบไม้ *O. viverrini* พบว่า จำนวน รูปร่างและลักษณะมีความแตกต่างกันในแต่ละระยะและสายพันธุ์ เช่น ระยะเซอร์คาเรียของ *Echinostoma revolutum* (Fried, Fujino, 1987), *Crepidostomum* sp. พบ sensory papilla 7 ชนิด (Bogea, Caira, 2001), *Echinostoma caproni* พบ sensory papilla 2 ชนิด (Nakano, Fujino, 2003) ในระยะเมตาเซอร์คาเรีย มีการศึกษาใน *Metagonimus miyatai* พบ sensory papilla 2 ชนิด (Chai et al., 1998), *Himasthla alincia* และตัวเต็มวัย พบ sensory papilla 2 ชนิด (Han et al., 2003) และ พยาธิใบไม้ตับ *Clonorchis sinensis* ระยะตัวอ่อนที่เพิ่งออกจากถุงหุ้ม, ระยะตัวอ่อน 1 สัปดาห์ และตัวเต็มวัย (Fujino, 1979a) จากการศึกษาพยาธิใบไม้ *O. viverrini* ระยะเมตาเซอร์คาเรียในครั้งนี้พบ sensory papilla ทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่ 1 มี cilium ยาวเส้นเดียวยื่นออกมาจากฐานที่มีลักษณะเป็นปุ่มนูนเล็กมีฐานกว้างประมาณ 1.35-1.62 ไมโครเมตร และ ชนิดที่ 2 เป็นปุ่มนูนใหญ่รูปกรวยคว่ำขนาดฐานกว้างประมาณ 0.62-2.50 ไมโครเมตร ซึ่งทั้งชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 คล้ายกับ ชนิด A ที่มี cilium ยาวเส้นเดียวที่ทำการศึกษาโดย Apinhasmit และคณะ (1993) แต่มีฐานที่ใหญ่กว่า (3.12 ไมโครเมตร) แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า cilium มีความยาวแตกต่างกัน จึงแบ่ง unilate papilla เป็น 2 ชนิด คือ ชนิดที่ 1 มีความยาวประมาณ 1.35-1.62 ไมโครเมตร และชนิดที่ 2 มีความยาวประมาณ 2.90-5.61 ไมโครเมตร

รูปร่างของ sensory papilla ชนิดที่ 2 เป็นปุ่มนูนใหญ่รูปกรวยคว่ำ คล้ายกับ sensory papilla ที่พบใน *Clonorchis sinensis* (Fujino et al., 1979) และ *F. hepatica* (Bennett, 1975a, b)

unilate papilla ที่มี cilium ยาวเส้นเดียว (ชนิดที่ 1) พบที่บริเวณรอบๆ excretory pore เหมือนกับ ชนิด A ที่ทำการศึกษาโดย Apinhasmit และคณะ (1993) แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบ unilate papilla ชนิดนี้ที่ด้านท้องบริเวณ 1/5 ทางด้านท้ายของลำตัวด้วย ส่วนชนิดที่ 2 ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ มีการจัดเรียงตัวเป็นแถวตามแนวยาวของลำตัว พบทั้งด้านหลัง ด้านท้อง และ ด้านข้างของลำตัว

sensory papilla ชนิดที่ 3 ซึ่งมีรูปร่างเป็นปุ่มนูน 2-4 ปุ่ม ตั้งอยู่บนฐาน dome shape ขนาดใหญ่อันเดียวกัน มีฐานกว้างประมาณ 2.90-5.90 ไมโครเมตร ซึ่งขนาดและรูปร่าง คล้ายกันกับ ชนิด B ที่เป็นกลุ่ม papilla 2-4 ปุ่ม วางอยู่บนฐานที่มีรูปร่าง dome shape (ขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.41-5.0 ไมโครเมตร) ที่ศึกษาโดย Apinhasmit และคณะ (1993) และ sensory papilla ชนิดนี้ยังคล้ายกับที่พบในพยาธิใบไม้ตับชนิด *Clonorchis sinensis* (Fujino et al., 1979a) อีกด้วย

sensory papilla ชนิดที่ 4 เป็นปุ่มนูนเดี่ยวขนาดใหญ่ไม่มี cilium ความกว้างฐานประมาณ 2.38-3.57 ไมโครเมตร รูปร่างเช่นนี้เหมือนกับ ชนิด C (เส้นผ่านศูนย์กลางยาว 3.21 ไมโครเมตร) ในการศึกษาของ Apinhasmit และคณะ (1993) และ sensory papilla ชนิดนี้ยังมี รูปร่างคล้ายกับ sensory papilla ที่พบในพยาธิใบไม้ตับชนิด *Clonorchis sinensis* (Fujino et al., 1979) และ *F. hepatica* (Bennett, 1975a, b) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า sensory papilla ชนิดที่ 4 มีการกระจายตัวเป็นวงที่ขอบของ oral และ ventral sucker ขณะที่รายงานการศึกษาอื่นๆ พบเฉพาะที่ ventral sucker เท่านั้น (Bennett, 1975a, b; Fujino et al., 1979, Apinhasmit et al., 1993)

sensory papilla ชนิดที่ 1-3 เป็นชนิดที่มี cilium เชื่อว่า sensory papilla เหล่านี้ทำหน้าที่ เป็น mechanoreceptor และ tangoreceptor สำหรับ light touch (Apinhasmit et al., 1993) ในขณะที่ sensory papilla ชนิด non-ciliate ซึ่งพบที่ตำแหน่ง oral และ ventral sucker นั้น จึง น่าจะทำหน้าที่รับความรู้สึกเกี่ยวกับแรงกด (pressure) และ รับความรู้สึกเกี่ยวกับการสัมผัส ระหว่างพยาธิกับโฮสต์ (Apinhasmit et al., 1993)

จากการศึกษาในระยะตัวเต็มวัยของพยาธิ *Clonorchis sinensis* (Fujino et al., 1979) และ *O. viverrini* (Apinhasmit et al., 1993) พบว่ามีชนิดของ sensory papilla เหมือนในระยะ เมตาเซอร์คาเรีย แต่มีขนาดใหญ่ขึ้น ส่วนการกระจายและการจัดเรียงตัวของ sensory papilla คง เดิม ซึ่งอาจสรุปได้ว่าการจัดเรียงตัวของ sensory papilla ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* มีรูปแบบ ที่แน่นอน

รูปร่างและลักษณะของ sensory papilla ที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

การศึกษาจุลกายวิภาคของ sensory papilla ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ในพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในระยะเมตาเซอร์คาเรียยังไม่พบว่ามีผู้ศึกษามาก่อน ผล การศึกษาครั้งนี้จำแนก sensory papilla ออกเป็น 2 ชนิด คือชนิด A เป็น sensory papilla ที่มี cilium เส้นเดี่ยว และชนิด B ซึ่งไม่พบ cilium ชนิด A แบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้อีก 3 กลุ่ม คือ A1 พบที่บนขอบนอกของ lip ของ oral sucker มี cilium ยื่นออกมาจาก bulbous ending ทะลุผ่าน ผนังลำตัวพยาธิขึ้นมา papilla ยกตัวสูงขึ้นจากผนังลำตัว พบ electron dense area ที่ปลายของ cilium ภายใน bulbous ending ประกอบด้วย cross-striated rootlet พบ basal body ที่ฐานของ

cilium และเชื่อมต่อกับ cross-striated rootlet ปรากฏ electron dense collar หนึ่งอันตรงตำแหน่งที่มีการเชื่อมต่อกันระหว่าง bulbous ending กับ tegumentary membrane โดย septate desmosome พบ electron lucent vesicle บรรจุอยู่ใน bulbous ending เป็นจำนวนมาก ที่บริเวณใกล้ส่วนล่างของ bulbous ending พบโครงสร้างที่มีลักษณะของ nerve process ยื่นต่อเนื่องไปยัง bulbous ending โดยทอดตัวผ่านชั้น basal lamina และชั้นกล้ามเนื้อ ซึ่งคล้ายกับ papilla receptor ของ *Clonorchis sinensis* ชนิด A (Fujino et al., 1979) ชนิด A2 มี cilium สั้นยื่นทะลุผ่านผนังชั้นนอกขึ้นมาที่ปลายสุดของ cilium มีแถบสีดำเข้ม tegument collar ยื่นตัวสูงพอกับ cilium พบ electron lucent vesicle บรรจุอยู่ในช่องว่างระหว่างผนังชั้นนอกแต่ละข้างที่ยื่นตัวสูงขึ้น ภายใน bulbous ending ประกอบด้วย mitochondria, electron lucent vesicle มี electron dense collar สองอันที่ด้านบนของ bulbous ending ช่วยยึด cilium ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ใกล้กับ basal body แต่ไม่พบ rootlet มีการเชื่อมต่อระหว่างเซลล์ผนังลำตัวกับ bulbous ending ด้วย septate desmosome และพบ dense plaque ที่ตำแหน่งเหนือต่อโครงสร้างดังกล่าว ซึ่งคล้ายกับ *Nicolla gallica* ในระยะเซอร์คาเรีย (Pariselle, Matricon-Gondran, 1985) และ *Diplostomum pseudospathaceum* ระยะเซอร์คาเรีย (Czubaj, Niewiadomska, 1996) unciliate papilla ชนิด A3 มี tegument collar ค่อนข้างหนาและสูงล้อมรอบ cilium อยู่ มี electron dense area ที่ปลายสุดของ cilium ภายใน bulbous ending ประกอบด้วย mitochondria, electron lucent vesicle, electron dense collar ขนาดใหญ่สองอัน basal body และ basal plate บางๆ วางตั้งฉากกับ axoneme สัมพันธ์กับรายงานการศึกษาใน *Diplostomum pseudospathaceum* ระยะเซอร์คาเรีย (Czubaj, Niewiadomska, 1996) และ *Bunodera* sp. (Bogea, Cairra, 2001) ชนิด B เป็น sensory papilla แบบ nonciliate papilla พบที่บริเวณด้านหน้าส่วนหลังของลำตัวพยาธิ papilla ชนิดนี้ไม่พบ cilium และ basal body ผนังลำตัวชั้นนอกของพยาธิถูก bulbous ending ดันสูงขึ้นจากแนวลำตัวปกติ ภายใน bulbous ending ประกอบด้วย rootlet, electron lucent vesicle, septate desmosome และ electron dense collar สองวงที่ส่วนบนของ bulbous ending นอกจาก sensory papilla ชนิดนี้ไม่มี cilium แล้วยังพบว่าไม่มีช่องทางที่ติดกันระหว่างภายในกระเปาะและสิ่งแวดล้อมภายนอกอีก พบ non-ciliate sensory papilla ที่มีลักษณะคล้ายกันนี้ในระยะเมตาเซอร์คาเรียของ *Clonorchis sinensis* (Fujino et al., 1979) และ *Diplostomum pseudospathaceum* ระยะเซอร์คาเรีย (Czubaj, Niewiadomska, 1996) จากการศึกษาพบว่าที่ฐานของ bulbous ending ของ sensory papilla

จากโครงสร้างภายในของ sensory papilla และตำแหน่งที่พบสันนิษฐานได้ว่า โครงสร้างเหล่านี้มีหน้าที่รับความรู้สึกเกี่ยวกับรับความรู้สึกสัมผัส (tangoreceptor) Czubaj และ Niewiadomska (1996) ศึกษาใน *Diplostomum pseudospathaceum* ระยะเซอร์คาเรีย แยก sensory papilla ได้ถึง 13 ชนิด

ผลการศึกษาจุลกายวิภาคของ sensory papilla ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) จากรูปร่างลักษณะภายนอกของ sensory papilla ไม่สามารถบอกความสัมพันธ์ระหว่าง sensory papilla ที่พบใน SEM กับ sensory papilla ที่พบในการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ได้อย่างชัดเจน ต้องอิงกับตำแหน่งที่พบ sensory papilla เป็นจุดสังเกตร่วมด้วย สันนิษฐานได้ว่า sensory papilla ชนิดที่ 2 ที่พบใน SEM น่าจะเป็นชนิดเดียวกันกับ unciliate sensory papilla ชนิด A1 ที่พบใน TEM เนื่องจากพบที่ตำแหน่งเดียวกันคือพบบนขอบของ oral sucker ส่วน sensory papilla ชนิดที่ 4 ที่พบใน SEM แม้ว่าจะมีลักษณะเป็น non-ciliate คล้ายกันกับชนิด B ที่พบในการศึกษาด้วย TEM แต่ตำแหน่งที่พบไม่สัมพันธ์กันจึงไม่สามารถบอกได้ว่าเป็น sensory papilla ชนิดเดียวกัน sensory papilla ที่แสดงในภาพที่ 4-11 แม้ไม่อาจจำแนกได้ว่าเป็น unciliate papilla ชนิดใดแต่เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับผลการศึกษาด้วย SEM พบว่าน่าจะเป็นชนิดเดียวกันกับ sensory papilla ชนิดที่ 3 เนื่องจากมีปุ่ม papilla 2 ปุ่ม ตั้งอยู่บนฐานนูนใหญ่