

บทบาทของภูมิคุ้มกันต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคพยาธิใบไม้ตับ

ในสัตว์ทดลอง

ROLE OF HOST IMMUNE RESPONSE ON PATHOGENESIS
OF OPISTHORCHIASIS IN LABORATORY ANIMAL

นายสมพงษ์ สิทธิพรหม

๖๑๐๗๓๗๘๖

๖๑๑๐๘๓๓๙๗๓

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

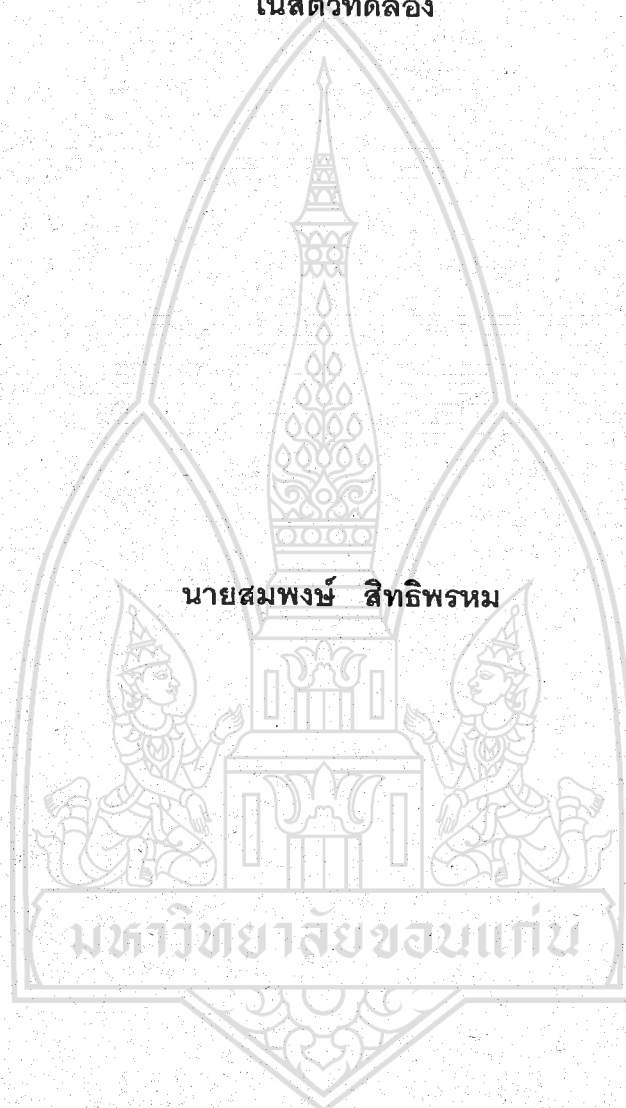
วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

พ.ศ. 2538

ISBN 974 - 556 - 917 - 3

บทบาทของภูมิคุ้มกันต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคพยาธิใบไม้ตับ
ในสัตว์ทดลอง



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาปรสิตวิทยา

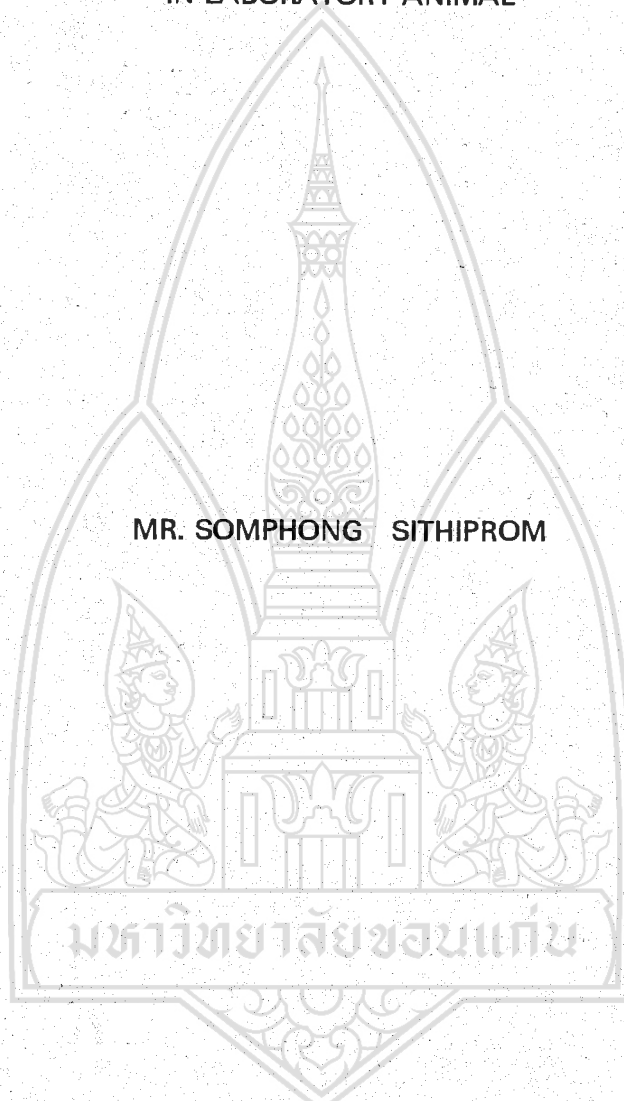
ออกนันทนาการจาก บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

พ.ศ. 2538

ISBN 974 - 556 - 917 - 3

**ROLE OF HOST IMMUNE RESPONSE ON PATHOGENESIS OF OPISTHORCHIASIS
IN LABORATORY ANIMAL**

MR. SOMPHONG SITHIPROM

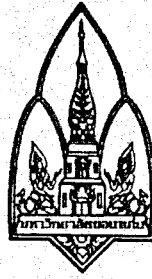


**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN PARASITOLOGY**

GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY

1995

ISBN 974 - 556 - 917 - 3



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

បរិស្ថាន

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชาประสิทธิวิทยา

ชื่อวิทยานิพนธ์ บทบาทของภูมิคุ้มกันต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรค
 พยาธิใบไม้ตับในสัตว์ทดลอง

ชื่อผู้ทำวิทยานิพนธ์ นายสมพงษ์ สิทธิพรหม

ได้พิจารณาเห็นชอบโดยคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รศ.ดร.ไพฑูริย์ สิทธิถาวร)

..... กรรมการ

(รศ.นพ.ชวลิต ไพโรจน์กุล)

..... กรรมการ
(ผศ.ดร.พวงรัตน์ ยางฉิมชัย)

..... กรรมการ
(รศ.สมาน เทตนา)

..... กรรมการ
(ผศ.นพ.พิศาล ไผ่เรียง)

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

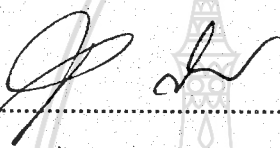
..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(วศ.ดร.สมพงษ์ จันทรวิทักษ์)

วันที่ 12 เดือน มกราคม พ.ศ. 2538

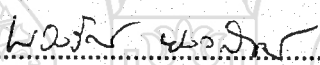
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ชื่อวิทยานิพนธ์ บทบาทของภูมิคุ้มกันต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรค
พยาธิใบไม้ตับในสัตว์ทดลอง
ชื่อผู้ทำวิทยานิพนธ์ นายสมพงษ์ สิทธิพรหม

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รศ.ดร.ไพฑูรย์ สิทธิถาวร)


..... กรรมการ
(รศ.นพ.ชวลิต ไพโรจน์กุล)


..... กรรมการ
(ผศ.ดร.พวงรัตน์ ยงวณิชย์)

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทคัดย่อ

เนื่องจากกลไกที่เกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของระบบท่อน้ำดีที่เกิดจากพยาธิ
ใบไม้ตับ (*Opisthorchis viverrini*) ยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างชัดเจน โดยเฉพาะเกี่ยวกับ
บทบาทของภูมิคุ้มกันของโฮสต์ต่อพยาธิสภาพที่เกิดขึ้น ดังนั้นการศึกษครั้งนี้จึงมี
วัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาผลกระทบและอิทธิพลของภูมิคุ้มกันของโฮสต์ว่ามีผลต่อ

สรีรพยาธิวิทยาของตับและระบบท่อน้ำดีที่เกิดจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ (*O. viverrini*) อย่างไร โดยใช้หนูแฮมสเตอร์เป็นสัตว์ทดลอง

ในการทดลองนี้ใช้หนูแฮมสเตอร์เพศผู้ อายุ 6-8 สัปดาห์ แบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่ม immunized ซึ่งได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับก่อน 1 เดือนแล้วจึงป้อนพยาธิ 50 metacercaria/หนู 1 ตัว กลุ่มที่ 2 คือกลุ่ม naïve เป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแต่ได้รับพยาธิเท่ากับกลุ่ม immunized กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับแอนติเจนและพยาธิ หนูทั้งหมดจะถูกนำมาเก็บข้อมูลต่าง ๆ ที่ 1, 2, 4 และ 6 เดือนหลังจากติดเชื้อพยาธิ

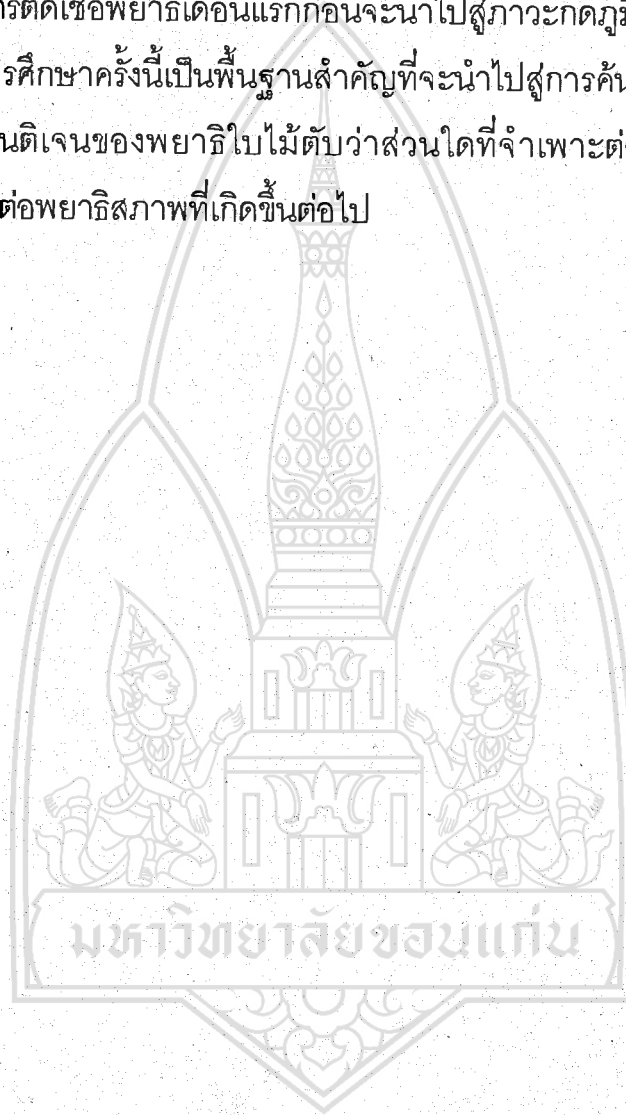
ผลการศึกษาพบว่าในกลุ่ม immunized มีลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาประกอบด้วย periductal fibrosis ทั้งบริเวณ second order duct, second order main duct และ secondary biliary cirrhosis มีความรุนแรงสูงกว่ากลุ่ม naïve อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยเฉพาะในช่วงเดือนที่ 1-2 หลังการติดเชื้อ นอกจากนี้ยังพบว่าที่เวลา 2 เดือนภายหลังการติดเชื้อระดับเอนไซม์ ในซีรัมคือ ALT และ AST ในกลุ่มนี้ยังมีค่าสูงกว่ากลุ่ม naïve อย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน

ในทางตรงกันข้ามก็พบว่าลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา คือ mononuclear cell infiltration, lymphoid follicle ของกลุ่ม naïve มีค่าความรุนแรงสูงกว่ากลุ่ม immunized อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยเฉพาะในช่วงตั้งแต่เดือนที่ 2 หลังการติดเชื้อพยาธิ เป็นต้นไป

ส่วนผลทางจุลพยาธิวิทยาอื่นเช่น จำนวนเซลล์อีโอซิโนฟิล (eosinophil), เยื่อเมือกท่อน้ำดีหนาขึ้น (epithelial hyperplasia), พังผืดรอบ lobule ของตับ (portal fibrosis), การเพิ่มจำนวนท่อน้ำดีเล็ก (bile ductule proliferation), มี granuloma และแผลในท่อน้ำดีใหญ่และส่วนแขนงของท่อน้ำดีใหญ่ (ulceration of second order duct and second order main duct with granuloma) และมี granuloma รอบไข่หรือรอบตัวพยาธิ (egg or parasite granuloma) รวมถึงระดับของ ALP ในซีรัมไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างกลุ่มการทดลองทั้ง 2 กลุ่ม

สำหรับข้อมูลด้านประวัติศาสตร์นั้น พบว่าการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนของ พยาธิใบไม้ตับไม่มีผลต่อจำนวนพยาธิและจำนวนไข่ที่ผลิตได้แต่อย่างใด

ผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าผลของการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการฉีด แอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับมีผลทั้งการส่งเสริมให้พยาธิสภาพของระบบท่อน้ำดีรุนแรง ขึ้น ในระหว่างการติดเชื้อพยาธิเดือนแรกก่อนจะนำไปสู่ภาวะกดภูมิคุ้มกันได้ในเวลาต่อมา ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้เป็นพื้นฐานสำคัญที่จะนำไปสู่การค้นหามาเพื่อแยกแยะองค์ ประกอบของแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับว่าส่วนใดที่จำเพาะต่อการกระตุ้นหรือกด ภูมิคุ้มกันและผลต่อพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นต่อไป



THESIS TITLE : ROLE OF HOST IMMUNE RESPONSE ON PATHOGENESIS OF
OPISTHORCHIASIS IN LABORATORY ANIMAL.

AUTHOR : MR. SOMPHONG SITHIPROM

THESIS ADVISORY COMMITTEE :



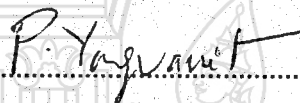
..... Chairman

(Associate Professor Dr. Paiboon Sithithaworn)



..... Member

(Associate Professor Dr. Chawalit Pairojkul)



..... Member

(Assistant Professor Dr. Puangrat Yongvanit)

มหาวิทยาลัยบูรพา
ABSTRACT

Since the mechanism involving pathogenesis of biliary tract in liver fluke (*Opisthorchis viverrini*) infection is not fully understood, particularly on the role of host immunological response on bile duct pathology. This study is therefore conducted to examine the impact and consequence of host immune response on the pathophysiology of liver and biliary tract of the hamster infected with the liver fluke.

9

The experimental animals are divided into 3 groups. Group 1 is the immunized group which received antigen of *O. viverrini* (OV) 1 month prior to infection with 50 metacercaria/hamster. Group 2 is the naive group which received only OV infection with the dose identical to group 1 while group 3 is the control group which received neither OV antigen nor OV infection. The animals were sampled for data collection at 1, 2, 4 and 6 months post infection.

The results revealed that the histopathological findings in the immunized group which consisted of periductal fibrosis both in second order and second order main duct and secondary biliary cirrhosis were more pronounced than those of the naive group especially at 1-2 month post infection ($p < 0.05$). At two month of infection the levels of liver enzyme, aspartate amino transferase (AST) and alanine amino transferase (ALT) of the immunized group, were significantly higher than the naive group ($p < 0.05$).

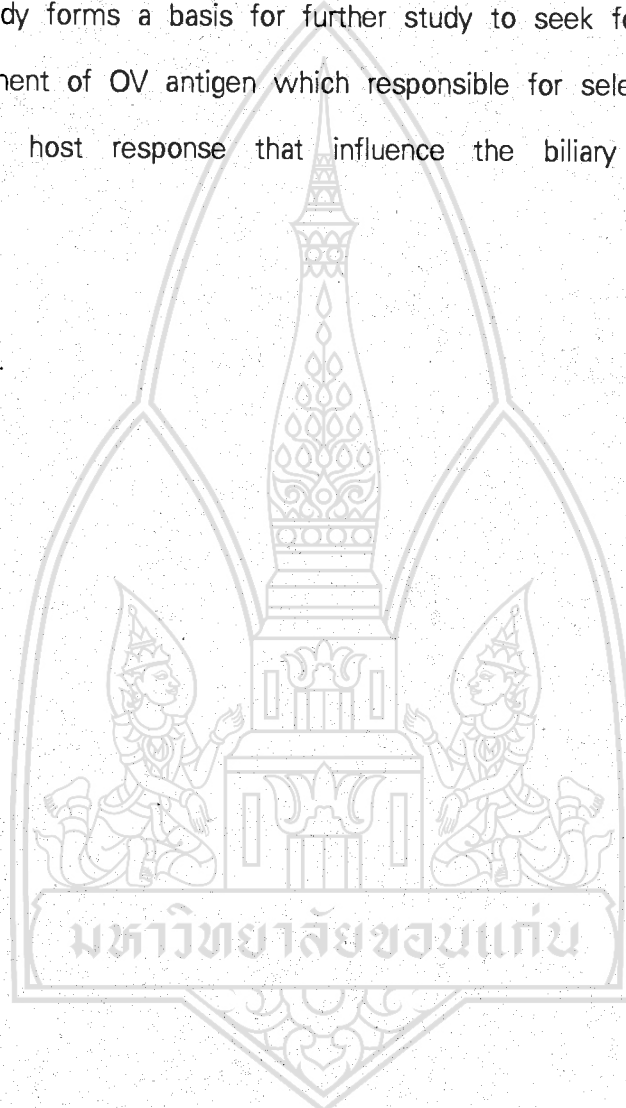
On the contrary, some of the histopathological features were less severe in the immunized group than the naive group ($p < 0.05$). These features included mononuclear cell infiltration and lymphoid follicle and the differences were obvious beginning from 2 month post infection.

Other pathological features examined such as eosinophil, epithelial hyperplasia, portal fibrosis, bile ductule proliferation, ulceration of second order duct and second order main duct with granuloma, egg or parasite granuloma showed no difference between immunized and naive group. Levels of alkaline phosphatase (ALP) also showed no difference between these two experimental groups.

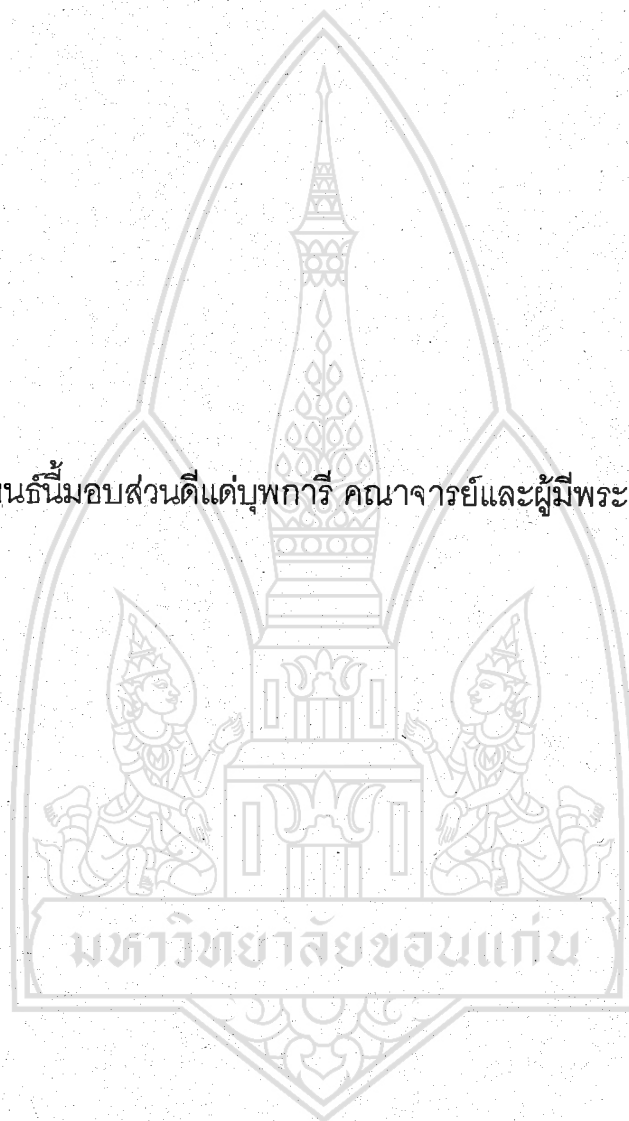
Immunization with OV antigen did not have significant influence on the parasitological observations, ie. worm recovery and egg production in the immunized group are comparable to the naive group.

The results of this study suggested that stimulation of host immune response by using OV antigen appeared to begin by enhancing the severity of bile duct pathology in infected animals and then induced a considerable degree of cellular immunosuppression.

This study forms a basis for further study to seek for an existence of a specific component of OV antigen which responsible for selective stimulations or suppression of host response that influence the biliary tract pathology in opisthorchiasis.



งานนิพนธ์นี้มอบส่วนดีแด่บุพการี คณาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่าน



กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดีเพราะได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจาก
รองศาสตราจารย์ ดร. ไพบุลย์ สิทธิถาวร ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
รองศาสตราจารย์นายแพทย์ชวลิต ไพโรจน์กุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พงรัตน์
ยงวณิช กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้สนับสนุนช่วยเหลือให้ความรู้ แนวความ
คิดและกำลังใจตลอดระยะเวลาในการศึกษาวิจัย เป็นสิ่งที่ผู้วิจัยซาบซึ้งและขอกราบ
ขอขอบคุณเป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาประวัติศาสตร์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย
ขอนแก่น ทุกท่านที่ให้ความรู้ คำแนะนำและกำลังใจตลอดระยะเวลา ขอขอบพระคุณ
รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์วิทยา ธรรมวิทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย
มหิดล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิงจุไรรัตน์ กุหลาบแก้ว และผู้ช่วยศาสตราจารย์
บรรจบ ศรีภา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้คำ
ปรึกษาและคำแนะนำในการวินิจฉัยทางจุลพยาธิวิทยาของตับและท่อน้ำดี

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำ
วิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ คุณอภิรมย์ เจริญไทย ที่ช่วยเหลือในการวิเคราะห์ข้อมูลและแก้ไข
วิทยานิพนธ์

ผู้ที่จะลืมมิได้คือ นางทอง สิทธิพรหม มารดา และคุณอมรศรี สิทธิพรหม ซึ่ง
คอยเป็นกำลังใจให้ด้วยดีเสมอมา รวมทั้งบุคคลและคณะบุคคลที่ไม่ได้กล่าวถึงทั้งหมด
ซึ่งมีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลงได้ ผู้วิจัยขอระลึกถึงและขอขอบคุณเป็นอย่างยิ่ง
ไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

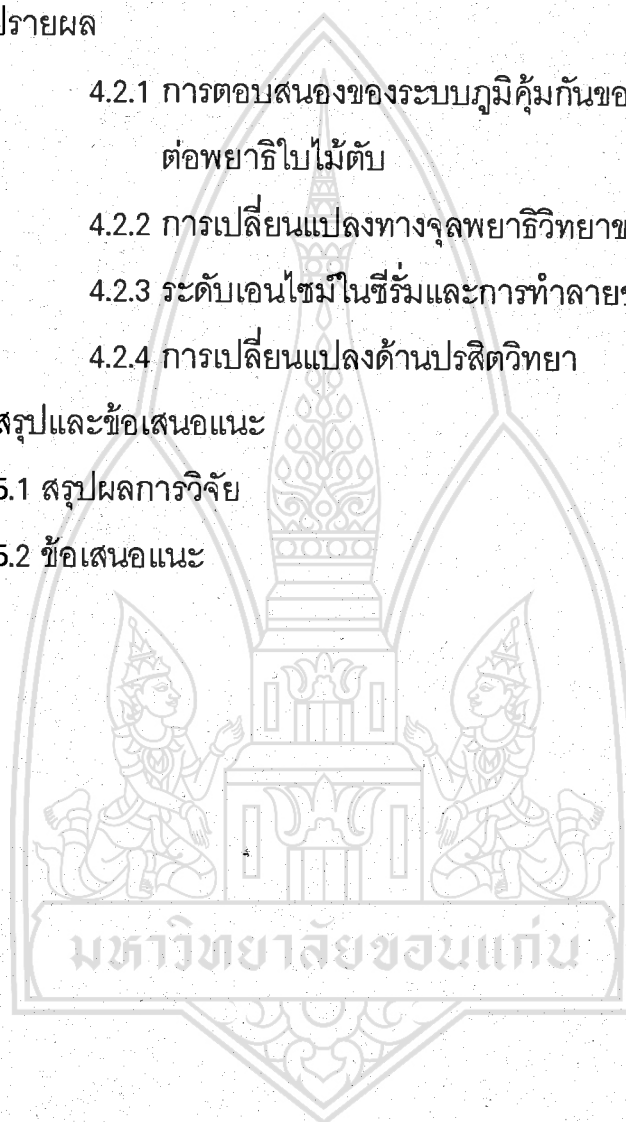
สมพงษ์ สิทธิพรหม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
คำอุทิศ	ช
กิตติกรรมประกาศ	ช
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญรูป	ฐ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ด
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ขอบเขตและข้อจำกัดของการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 พยาธิใบไม้ตับ	5
2.2 ประวัติการค้นพบพยาธิใบไม้ตับ (<i>Opisthorchis viverrini</i>)	7
2.3 รูปร่างลักษณะและชีววิทยา	7
2.4 วงจรชีวิต	8
2.5 ภูมิคุ้มกันวิทยา	10
2.6 พยาธิวิทยา	13
2.7 พยาธิวิทยาโรคพยาธิใบไม้ตับในสัตว์ทดลอง	15
2.8 ความสัมพันธ์ของโรคพยาธิใบไม้ตับกับมะเร็งท่อน้ำดี	16

บทที่ 3	วิธีการดำเนินการวิจัย	18
	3.1 สัตว์ทดลอง	18
	3.2 การเตรียมตัวอ่อนพยาธิและการป้อนพยาธิให้สัตว์ทดลอง	18
	3.3 การตรวจนับพยาธิตัวแก่	19
	3.4 การเตรียมแอนติเจน	19
	3.5 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันแฮมสเตอร์	20
	3.6 การวัดระดับแอนติบอดีต่อพยาธิ	20
	3.7 การตรวจวัดเอนไซม์ในซีรัม	21
	3.8 การนับจำนวนไข่พยาธิในมูลสัตว์ทดลอง	22
	3.9 การตรวจเนื้อเยื่อตับสัตว์ทดลอง	22
	3.10 การวิเคราะห์ข้อมูล	24
	3.11 การวางแผนการทดลอง	24
บทที่ 4	ผลการวิจัยและอภิปรายผลการทดลอง	26
	4.1 ผลการวิจัย	26
	4.1.1 น้ำหนักสัตว์ทดลอง	26
	4.1.2 จำนวนพยาธิตัวแก่	27
	4.1.3 จำนวนไข่พยาธิในมูลสัตว์ทดลอง	28
	4.1.4 การออกไข่ของพยาธิไปไม้ตับ	29
	4.1.5 ระดับแอนติบอดีจำเพาะต่อพยาธิไปไม้ตับ	30
	4.1.6 ระดับเอนไซม์ในซีรัม	31
	4.1.7 พยาธิสภาพของท่อน้ำดี	34
	4.1.8 Mononuclear cell infiltration	47
	4.1.9 Eosinophil infiltration	48
	4.1.10 Lymphoid follicle	49
	4.1.11 การเปลี่ยนแปลงเพิ่มจำนวนเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดี	50

4.1.12	การเปลี่ยนแปลง periductal fibrosis ที่ท่อน้ำดี	52
4.1.13	การเปลี่ยนแปลงเพิ่มจำนวนท่อน้ำดีเล็ก	54
4.1.14	การเปลี่ยนแปลงของ secondary biliary cirrhosis	55
4.1.15	ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาอื่นที่ตรวจพบ	56
4.2	อภิปรายผล	58
4.2.1	การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ ต่อพยาธิใบไม้ตับ	58
4.2.2	การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับ	59
4.2.3	ระดับเอนไซม์ในซีรัมและการทำลายของเซลล์ตับ	60
4.2.4	การเปลี่ยนแปลงด้านปรสิตวิทยา	61
บทที่ 5	สรุปและข้อเสนอแนะ	63
5.1	สรุปผลการวิจัย	63
5.2	ข้อเสนอแนะ	65
เอกสารอ้างอิง		66
ภาคผนวก		75
ประวัติผู้เขียน		94



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	25
แผนการทดลองแสดงกลุ่มการทดลองจำนวนพยาธิที่ป้อน แก๊สตัวทดลอง และจำนวนสัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่ม รวม หนูแฮมสเตอร์ทั้งหมด 120 ตัว	
ตารางที่ 2	47
แสดงจำนวนความถี่ของ mononuclear cell infiltration บริเวณที่เกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อตับรอบท่อน้ำดี second order duct และ second order main duct ในตับหนูแฮมสเตอร์ กลุ่ม immunized และ naive	
ตารางที่ 3	48
แสดงจำนวนความถี่ของเซลล์ eosinophils บริเวณที่มี การอักเสบของเนื้อเยื่อตับรอบท่อน้ำดี second order duct และ second order main duct ในตับหนูแฮมสเตอร์ ในช่วงเวลาต่าง ๆ ระหว่างกลุ่ม immunized และ naive	
ตารางที่ 4	49
แสดงจำนวนความถี่ของ lymphoid follicle บริเวณที่มีการ อักเสบของเนื้อเยื่อตับรอบท่อน้ำดี second order duct และ second order main duct ในตับหนูแฮมสเตอร์กลุ่ม immunized และ naive	
ตารางที่ 5	50
แสดงความถี่ในการเพิ่มจำนวนเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial hyperplasia) บริเวณท่อน้ำดี second order main duct ของงกลุ่ม immunized และ naive	

ตารางที่ 6	แสดงความถี่ในการเพิ่มของเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial hyperplasia) ที่ท่อน้ำดี second order duct ในแต่ละช่วงเวลาของกลุ่ม immunized และ naive	51
ตารางที่ 7	แสดงความถี่ของการเปลี่ยนแปลง periductal fibrosis รอบท่อน้ำดี second order main duct ในแต่ละช่วงเวลาของกลุ่ม immunized และ naive	52
ตารางที่ 8	แสดงความถี่ของการเปลี่ยนแปลง periductal fibrosis รอบท่อน้ำดี second order duct ในแต่ละช่วงเวลาของกลุ่ม immunized และ naive	53
ตารางที่ 9	แสดงความถี่การเปลี่ยนแปลงการเพิ่มท่อน้ำดีเล็ก (ductular proliferation) ในกลุ่ม immunized และ naive ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ กัน	54
ตารางที่ 10	แสดงความถี่ของการเปลี่ยนแปลงของ secondary biliary cirrhosis ในตับหนูแฮมสเตอร์กลุ่ม immunized และ naive ในช่วงเวลาต่าง ๆ	55
ตารางที่ 11	แสดงเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับและท่อน้ำดีของหนูแฮมสเตอร์กลุ่ม immunized และ naive ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน	56

สารบัญรูป

		หน้า
ภาพที่ ก.1	แสดงวงจรชีวิตของ <i>Opisthorchis viverrini</i>	9
ภาพที่ 1	เปรียบเทียบน้ำหนักเฉลี่ยของสัตว์ทดลองระหว่างกลุ่ม control, immunized และ naive ในช่วงเวลา 1, 2, 4 และ 6 เดือน หลังจากติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ	26
ภาพที่ 2	จำนวนเฉลี่ยพยาธิใบไม้ตับ (log worm recovery) ที่ตรวจพบในแต่ละช่วงเวลาภายหลังการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ 50 metacercaria/hamster ของกลุ่ม immunized และ naive	27
ภาพที่ 3	แสดงค่าเฉลี่ยของการออกไข่ของพยาธิใบไม้ตับ (log epg) ที่ตรวจพบในมูลแฮมสเตอร์ เปรียบเทียบกันในแต่ละช่วงเวลา ระหว่างกลุ่ม immunized และ naive	28
ภาพที่ 4	แสดงค่าเฉลี่ยการออกไข่ของพยาธิใบไม้ตับ (log epg/worm) เปรียบเทียบในแต่ละช่วงเวลาระหว่างกลุ่ม immunized และ naive	29
ภาพที่ 5	เปรียบเทียบระดับแอนติบอดีจำเพาะ IgG ต่อแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับระหว่างกลุ่ม control, immunized และ naive ภายหลังการติดเชื้อพยาธิ	30
ภาพที่ 6	เปรียบเทียบระดับ Aspartate amino transferase (AST) (IU/L) ในแต่ละช่วงเวลาของกลุ่ม control, immunized และ naive	31
ภาพที่ 7	เปรียบเทียบระดับ Alanine aminotransferase (ALT) (IU/L) ในแต่ละช่วงเวลาของกลุ่ม control, immunized และ naive	32

ภาพที่ 8	เปรียบเทียบระดับ Alkaline phosphatase (ALP) (IU/L) ในแต่ละช่วงเวลาของกลุ่มกลุ่ม control, immunized และ naive	33
ภาพที่ 9	แสดง sucker ของพยาธิยีสต์เกาะที่เยื่อผนังท่อน้ำดีทำให้เซลล์ของเยื่อท่อน้ำดีเพิ่มจำนวนมากขึ้นและมี inflammatory cell แทรกตัวเข้ามา (9 A; H&E, 3.3 x 4 X; naive group at 2 nd month) มีการหลุดลอก (desquamation) ของเยื่อผนังท่อน้ำดี (9 B; H&E, 3.3x4X; naive group at 1 st month) fibrous tissue แทรกตัวเข้ามา ในชั้น submucosa ของท่อน้ำดีบางบริเวณพบการตายของเซลล์ตับ	36
ภาพที่ 10	แสดงการเปลี่ยนแปลง เพิ่มจำนวนเซลล์เยื่อผนังท่อน้ำดี (cell proliferation) และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เป็นชนิด goblet cell metaplasia ที่เยื่อผนังท่อน้ำดีชั้น submucosa ของท่อน้ำดีพบ fibrous tissue หนาตัวมากขึ้น เป็นวงรอบท่อน้ำดี และพบ bile ductule proliferation และพบการชุมนุมกันของเซลล์จำพวก mononuclear cell (10 A; H&E, 3.3x4X, naive group at 2 nd month) บริเวณที่อยู่ห่างจาก second order duct ออกไป จะพบท่อน้ำดีขนาดเล็ก (bile ductule) ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาที่พบ คือ เกิดการอักเสบของท่อน้ำดีขนาดเล็กมี inflammatory cell มาชุมนุมรอบท่อน้ำดี และพบท่อน้ำดีเพิ่มจำนวนมากขึ้น (bile ductule proliferation) (10 B; H&E, 3.3x4, naive group at 1 st month)	38
ภาพที่ 11	แสดงการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อบริเวณรอบ ๆ hepatocyte lobule พบ fibrous tissue แทรกตัวเข้ามาเกิดลักษณะ second billiary chirrosis (11 A; H&E, 3.3x4X, immunized group at 4 th month) ในรายที่มีลักษณะพยาธิสภาพรุนแรงพบ fibrous tissue, mononuclear cell infiltraion, regeneration nodule และ ductule	40

	proliferation เกิดขึ้นทั่วไปของเนื้อเยื่อตับ (11 B; H&E, 3.3x4X, immunized group 4 th month)	
ภาพที่ 12	แสดงการรวมกลุ่มของ mononuclear cell ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็น เซลล์จำพวก lymphocyte รวมกลุ่มกันเป็น lymphoid follicle (12 A; H&E 3.3x4X; immunized group at 4 th month) พบ mononuclear cell และซากเซลล์ที่ตายรอบ ๆ ตัวพยาธิใน ท่อน้ำดี (12 B; H&E 3.3x4X; naive group at 4 th month)	42
ภาพที่ 13	แสดงการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเยื่อผนังท่อน้ำดีล้อมรอบ ไข่พยาธิ (13 A; H&E 3.3x10X; immunized group at 4 th month) mononuclear cell, epithelioid cell และ fibrous tissue ล้อมรอบไว้ มีลักษณะเป็นก้อนกลมซึ่งเรียกว่า egg granuloma (13 B; H&E 3.3x10X; immunized group at 4 th month)	44
ภาพที่ 14	การติดเชื้อพยาธิที่เกิดขึ้นเป็นระยะเวลานาน granuloma ก็ยังคงปรากฏอยู่ (14 A; H&E 3.3x4X; immunized group at 6 th month) การรวมตัวของ mononuclear cell พบได้น้อยที่ บริเวณรอบท่อน้ำดี second order main duct ที่มีตัวพยาธิอาศัยอยู่ ส่วนชั้น submucosa ของท่อน้ำดีพบ fibrous tissue มีความหนา ลดน้อยลง (14 B; H&E 3.3x4X; immunized group at 6 th month)	46
ภาพที่ 15	แผนภาพแสดงสมมุติฐานพยาธิกำเนิดของโรคพยาธิใบไม้ตับ ในสัตว์ทดลอง	64

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ALP	=	Alkaline phosphatase
ALT	=	Alanine aminotransferase
ANOVA	=	One way analysis of variance
AST	=	Aspartate aminotransferase
BD	=	bile ductule
BV	=	blood vessels
CCA	=	Cholangiocarcinoma
CFA	=	Complete Freud's Adjuvant
CMIR	=	Cell mediated immune response
CV	=	Central vein
DMN	=	dimethyl nitrosamine
EH	=	epithelial hyperplasia
ELISA	=	Enzyme-linked immunosorbent assay
EO	=	Eosinophils
EPG	=	Egg per gram faeces
ES	=	egg shell
F	=	Fibroblast cell
FT	=	Fibrous tissue
gm.	=	gram
GM	=	granuloma
HC	=	hepatocyte
HCC	=	hepatocellular carcinoma

HIR	=	Humoral immune response
IU/L	=	International Unit per litre
log	=	logarithm
MO	=	mononuclear cell
nm	=	nanometer
OD	=	Optical density
OV	=	<i>Opisthorchis viverrini</i>
ppm	=	part per million
PT	=	portal triads
RN	=	Regenerative nodule
S	=	Sucker
SD	=	Standard deviation
Spp	=	species
µg/ml.	=	microgram per millilitre
µl	=	microlitre.
%	=	percentage

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทที่ 1

บทนำ

(Introduction)

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคพยาธิใบไม้ตับที่เกิดจาก *Opisthorchis viverrini* เป็นโรคหนอนพยาธิที่เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ผลการสำรวจโดยกระทรวงสาธารณสุขพบว่ามีความชุกของโรคเฉลี่ยทั่วประเทศ 15.2 % หรือประมาณ 8.6 ล้านคน (Jongsuksantigul et. al., 1992) ซึ่งมีการระบาดของพยาธิในภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยมีอัตราความชุกสูงถึง 24 % ภาคเหนือ 22.8 % ภาคกลาง 7.3 % และภาคใต้ 0.3 % การสำรวจครั้งล่าสุดก็ยังพบว่าในภาคตะวันออกเฉียงเหนือนี้ยังมีความชุกของโรคสูงถึง 34 % (Elkins et. al., unpublished.)

เนื่องจากตัวแก่พยาธิใบไม้ตับชนิดนี้อาศัยอยู่ในถุงน้ำดีและท่อน้ำดีของตับ (Tansurat, 1971; Sithithaworn et al., 1991) ดังนั้นพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นจึงเป็นความผิดปกติของท่อน้ำดี เช่น เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อหรือมีการติดเชื้อมาทำให้ท่อน้ำดีอักเสบ ท่อน้ำดีเล็กอุดตัน น้ำดีคั่ง ท่อน้ำดีขยายตัว เยื่อบุผิวหลุดลอก (Tansurat, 1971; Harinasuta et. al., 1984; Pungpak et. al., 1988) มี mononuclear cell, neutrophil, eosinophil infiltration, goblet cell metaplasia นำไปสู่ adenomatous hyperplasia และพยาธิสภาพในขั้นสุดท้ายจะมี collagen เพิ่มขึ้นเกิดเป็น periductal fibrosis

Hou (1955) ได้ตั้งสมมุติฐานเกี่ยวกับพยาธิกำเนิดของโรคพยาธิใบไม้ตับที่เกิดจาก *Clonorchis sinensis* เอาไว้ 3 ประการ ประการแรกเกิดจาก mechanical irritation ของตัวพยาธิในท่อน้ำดี ประการที่สองเกิดจาก chemical irritation จาก metabolic products ของพยาธิและประการสุดท้ายเกิดจาก host immunological response ต่อพยาธิ จากผลการศึกษาในเวลาต่อมาสนับสนุนสมมุติฐานในสองประการแรกทั้ง mechanical และ chemicals irritation จากตัวพยาธิ อาจจะเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการอักเสบของระบบ

ท่อน้ำดี (Tansurat, 1971; Bhamarapavati et al., 1978; Kim, 1984) เหตุผลก็คือ การอักเสบของท่อน้ำดีเกิดขึ้นได้ทั่วไปทั้งในบริเวณที่มีและไม่มีพยาธิอาศัยอยู่ สามารถพบพยาธิสภาพนี้ได้ตั้งแต่ถุงน้ำดีจนถึงผิวหนังสุดของตับ (Pairojkul et al., 1991)

แม้ว่าพยาธิใบไม้ตับจะอาศัยอยู่ในท่อน้ำดีและไม่ได้ไชเข้ามาในเนื้อเยื่อของโฮสต์โดยตรง แต่ก็พบว่าโฮสต์มีการสร้างภูมิคุ้มกันในรูปแบบของแอนติบอดีต่อพยาธิได้ทั้งในสัตว์ทดลองและคน (Wongratanacheewin et al., 1988a; Chawengkirttikul and Sirisinha, 1988; Elkins et al., 1991; Haswell-Elkins et al., 1991)

ส่วนการตอบสนองของ T - cell ต่อการติดเชื้อพยาธินั้นพบว่า lymphocyte ที่เลี้ยงในหลอดทดลองมีการตอบสนองต่อ mitogen โดยมีการแบ่งตัวได้น้อยลง (Wongratanacheewin et al., 1988b) และการตอบสนองโดยแบ่งตัวมากขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ (Haswell-Elkins et al., unpublished) การศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า ถ้าหากสัตว์ทดลองอยู่ในภาวะพร่องหรือ T - cell ต่ำ (T - cell deprived animal) พยาธิสภาพที่เกิดจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับจะมีความรุนแรงน้อยกว่าหนูที่มี T - cell ปกติ (Flavell & Flavell, 1986)

นอกจากนั้นแล้วผลการตรวจวัดระดับภูมิคุ้มกันโรค ในผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้ตับในแหล่งระบาดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบว่า specific IgG antibody ในซีรัมมีความสัมพันธ์กับความรุนแรงของพยาธิสภาพของระบบท่อน้ำดี (Elkins et al., 1991; Haswell-Elkins et al., 1992) สันนิษฐานได้ว่าพยาธิกำเนิดของโรคพยาธิใบไม้ตับนอกจากตัวพยาธิจะเป็นสาเหตุโดยตรงแล้ว ระบบภูมิคุ้มกันโรคของร่างกายอาจจะมีส่วนทำให้เกิดพยาธิสภาพของระบบท่อน้ำดีและตับ ซึ่งเป็นพื้นฐานที่สำคัญต่อความเข้าใจของขบวนการการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาหาผลกระทบและอิทธิพลของภูมิคุ้มกันต่อพยาธิใบไม้ตับต่อการติดเชื้อพยาธิและการเกิดพยาธิสภาพของท่อน้ำดีในหนูแฮมสเตอร์โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างหนูแฮมสเตอร์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันกับหนูกลุ่มซึ่งไม่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกัน โดยศึกษาถึง

1. การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของระบบท่อน้ำดี ซึ่งได้แก่การระดมของ mononuclear cell, eosinophil และ lymphocyte, การเพิ่มจำนวนท่อน้ำดีเล็ก (bile ductule proliferation), ผนังฝึครอบท่อน้ำดีหนาขึ้น (periductal fibrosis) และลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาอื่น ๆ
2. ระดับของเอนไซม์ Aspartate amino transferase (AST), Alanine amino transferase (ALT) และ Alkaline phosphatase (ALP) ที่เกี่ยวกับการทำงานของตับในซีรัม
3. ระดับของแอนติบอดี IgG ต่อพยาธิใบไม้ตับหลังจากการได้รับเชื้อพยาธิ
4. จำนวนพยาธิใบไม้ตับและการออกไข่ของพยาธิ

1.3 ขอบเขตและข้อจำกัดของการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการทดลองในห้องปฏิบัติการโดยใช้สัตว์ทดลองเป็นกลุ่มตัวอย่างเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของท่อน้ำดีในตับหนูแฮมสเตอร์และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันระหว่างหนูแฮมสเตอร์สองกลุ่มคือกลุ่มที่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนจากตัวแก่พยาธิใบไม้ตับ และกลุ่มที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นโดยเปรียบเทียบกันในระยะเวลาต่าง ๆ ภายหลังการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับทำให้สามารถติดตามและเปรียบเทียบพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นได้ แต่ข้อจำกัดสำหรับการวิจัยครั้งนี้ได้แก่

ปรสิต ตัวอ่อนระยะติดต่อพยาธิ (metacercaria) ของ *O. viverrini* ที่ใช้ในการทดลองได้มาโดยการย่อยจากปลาที่ได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ ในแหล่งที่มีการระบาดของพยาธิใบไม้ตับ ดังนั้นการหาได้ย่อมขึ้นกับฤดูกาล

สัตว์ทดลอง หนูแฮมสเตอร์ที่ใช้ในการทดลองได้จากการเลี้ยงและขยายพันธุ์ของหน่วยสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยจะใช้หนู golden

syrian hamster outbred strain เพศผู้อายุ 6-8 สัปดาห์ เกิดจากพ่อแม่ที่มาจาก population ต่างกัน ซึ่งมีความแปรปรวนของลักษณะทางพันธุกรรมที่อาจมีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันได้แตกต่างกัน การเลี้ยงหนูจะให้น้ำและอาหารสำเร็จรูปตามปกติ

การศึกษาและการแปลผลทางพยาธิวิทยา โดยวิธี semi-quantitative เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งต้องใช้ความแม่นยำและความชำนาญในการแปลผล ถ้าเนื้อเยื่อตับและท่อน้ำดีมีการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาที่รุนแรงมากก็ให้ค่าคะแนนมากที่สุด แต่ถ้าพบการเปลี่ยนแปลงน้อยก็ให้ค่าคะแนนลดลงเรื่อย ๆ จนถึงต่ำสุด ซึ่งหมายถึงไม่พบการเปลี่ยนแปลง แล้วจึงใช้วิธีการทางสถิติทดสอบความแตกต่างของข้อมูล

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

กลไกในการเกิดพยาธิสภาพของพยาธิใบไม้ตับมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนว่าส่วนหนึ่งเกิดจาก mechanical และ chemical irritation จากพยาธิ แต่บทบาทของภูมิคุ้มกันโฮสต์ต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคพยาธิใบไม้ตับยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างชัดเจน ดังนั้นการศึกษานี้จะทำให้สามารถทราบข้อมูลเบื้องต้นถึงกลไกการเกิดพยาธิสภาพของโรคพยาธิใบไม้ตับในสัตว์ทดลอง ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อสำหรับศึกษากลไกการเกิดพยาธิสภาพของโรคพยาธิใบไม้ตับและการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขที่สำคัญของประเทศไทยต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review)

2.1 พยาธิใบไม้ตับ

พยาธิใบไม้ตับที่เป็นสาเหตุของโรคพยาธิใบไม้ตับในคนประกอบด้วยหนอนพยาธิใน Genus *Opisthorchis*, *Clonorchis* และ *Fasciola* ซึ่งมีระบาดในภูมิภาคต่าง ๆ ทั่วโลก ส่วนพยาธิใบไม้ตับอีกสองชนิด คือ *Dicrocoelium dendriticum* และ *Eurytrema pancreaticum* มีรายงานประปราย ส่วนใหญ่ทำให้เกิดโรคระบาดในสัตว์ประเภทยุง แมลง และ วัว ควาย (Bunnag et al., 1989)

พยาธิใบไม้ตับของ Genus *Opisthorchis* คือ *Opisthorchis viverrini* และ *O. felinus* มีรูปร่าง การแพร่พันธุ์และวงจรชีวิตคล้ายคลึงกันแต่มีแหล่งระบาดแตกต่างกัน คือ *O. viverrini* ระบาดอยู่ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้บริเวณสองฝั่งแม่น้ำโขงตอนล่างได้แก่ ประเทศไทย ลาว และกัมพูชา (Preuksaraj, 1984) ส่วน *O. felinus* ชุกชุมอยู่ในกลุ่มประเทศรัสเซียแถบตะวันตกและยุโรปตะวันออก สำหรับในประเทศไทยเชื่อว่ามีการกว่า 8 ล้านคนเป็นโรคพยาธิใบไม้ตับจากพยาธิ *O. viverrini* (Jongsuksantigul et al., 1992) และประชากรประมาณ 2-3 ล้านคนในกลุ่มประเทศรัสเซียเป็นโรคพยาธิใบไม้ตับจากการติดพยาธิ *O. felinus* (ตระหนักจิต หารินสุต, 2536)

สาเหตุของโรคพยาธิใบไม้ตับอีกชนิดหนึ่ง คือ *Clonorchis sinensis* เป็นพยาธิใบไม้ตับที่ตัวเต็มวัยมีขนาดโตกว่า *O. viverrini* เล็กน้อยและมีลักษณะของอวัยวะภายในตัวพยาธิแตกต่างกันแต่มีวงจรชีวิตจะคล้ายกันเพียงแต่อาศัยโฮสต์กึ่งกลางซึ่งเป็นหอยและปลาต่างชนิดกัน โรคพยาธิใบไม้ตับชนิดนี้พบได้ทั่วไปในกลุ่มประเทศอินโดจีน ประเทศจีน ฮองกง ไต้หวัน เกาหลีและ ญี่ปุ่น เชื่อว่าประชากรกว่าสิบล้านคนเป็นโรคพยาธิใบไม้ตับชนิดนี้ (Choi, 1984)

โรคพยาธิใบไม้ตับอีกกลุ่มหนึ่งเป็นโรคพยาธิใบไม้ตับแกะคือ *Fasciola hepatica* และ *F. gigantica* ระยะตัวเต็มวัยของพยาธิทั้งสองชนิดนี้มีขนาดใหญ่กว่าพยาธิใบไม้ตับของคน มีการระบาดชุกชุมในประเทศที่มีการเลี้ยงแกะเป็นอุตสาหกรรม (Facey et al., 1960) *F. hepatica* พบระบาดกว้างขวางกว่า *F. gigantica* บริเวณที่พบโรคนี้ชุกชุมคือ กลุ่มประเทศลาตินอเมริกาหลายประเทศในอเมริกาเหนือ ยุโรป และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ส่วนโรคพยาธิใบไม้ตับที่เกิดจากพยาธิ *F. gigantica* พบมีระบาดชุกชุมในบางประเทศแถบแอฟริกาฝั่งตะวันตกของคาบสมุทรแปซิฟิกและหมู่เกาะฮาวาย วงจรชีวิตของพยาธิสองชนิดนี้เหมือนกันต้องอาศัยหอยและพืชน้ำเป็นโฮสต์กึ่งกลาง คนติดโรคพยาธิใบไม้ตับแกะเพราะรับประทานพืชผักที่มีตัวอ่อนของพยาธิ *Fasciola* เข้าไป ในประเทศไทยมีรายงานพบผู้ป่วยโรคนี้อย่างน้อย 11 ราย ระบุว่า เป็น *Fasciola* spp. 3 ราย (ไพโรจน์ ปาริชาติกานนท์และอำนาจ สารสาส 2527; วีระยุทธ แดนสีแก้ว, 2533) *F. hepatica* 2 ราย (Khamboonruang and Sakulwong, 1971; Wong et al., 1985) และระบุว่า เป็น *F. gigantica* 6 ราย (สุวัชร วัชรเสถียรและวิเชียร สุนทรศิริ, 2522; สุชาติ ปริยานนท์และสมาน เทศนา, 2529; อรทัย พาชีรัตน์และคณะ 2532 ;Tesjaroen et al., 1988 ; Tesana et al., 1989)

นอกจากนี้ มีรายงานพบว่าคนเป็นโรคพยาธิใบไม้ตับเนื่องจาก *D. dendriticum* และ *E. pancreaticum* โดยคนติดโรคจากสัตว์ โรคพยาธิใบไม้ตับที่เกิดจากพยาธิ *D. dendriticum* ระบาดในหมู่ปศุสัตว์ประเทศโปแลนด์ วงจรชีวิตของพยาธิทั้งสองชนิดนี้ ต้องผ่านหอยและมดเป็นโฮสต์กลาง (el - Shiek Mohamad et al., 1990) ในประเทศไทย ยังไม่มีรายงานพยาธิชนิดนี้

2.2 ประวัติการค้นพบพยาธิใบไม้ตับ (*O. viverrini*)

พยาธิใบไม้ตับ (*O. viverrini*) ในประเทศไทยตรวจพบครั้งแรกเมื่อพ.ศ. 2454 ขณะชันสูตรศพนักโทษ 2 รายที่จังหวัดเชียงใหม่ ได้รับการวินิจฉัยในขณะนั้นว่าเป็น *O. felinus* (Leiper, 1911) หลังจากนั้นอีก 16 ปีต่อมา Promas (1927) ก็ได้พบพยาธิชนิดเดียวกันนี้จากการผ่าศพผู้ป่วยซึ่งเป็นชายวัย 17 ปี มีภูมิลำเนาอยู่ที่จังหวัดร้อยเอ็ด และพบผู้ป่วยโรคนี้อีก 3 คน ซึ่งทุกคนมีภูมิลำเนาอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในเวลาต่อมาเมื่อพ.ศ. 2498 Sadun et al. (1955) ก็ได้พิสูจน์ว่าชนิดพยาธิใบไม้ตับในประเทศไทยคือ *O. viverrini* Wykoff et al. (1965) ก็ได้ยืนยันข้อพิสูจน์ดังกล่าวว่าพบพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ระบาดอยู่โดยทั่วไปในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและมีอยู่ประปรายในภาคเหนือ จากการศึกษาในระยะเวลาต่อมา Upatham et al. (1982; 1984), Preuksaraj (1984), Jongsuksantigul et al. (1992) และครั้งล่าสุดในปีค.ศ. 1992 การศึกษาของ Elkins et al. (unpublished) ก็ได้รายงานว่าภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยยังพบพยาธิใบไม้ตับระบาดอยู่อย่างชุกชุม

2.3 รูปร่างลักษณะ และชีววิทยา

พยาธิใบไม้ตับ (*O. viverrini*) มีการเจริญเติบโตหลายระยะแต่ละระยะก็มีรูปร่างลักษณะที่แตกต่างกัน (Beaver et.al., 1984)

ตัวแก่ ระยะตัวแก่เต็มวัยของพยาธิใบไม้ตับในคนมีขนาดเฉลี่ยยาว 7-10 มิลลิเมตร กว้าง 1-2 มิลลิเมตร เมื่ออยู่ในสุนัขและแมวตลอดจนในสัตว์ทดลองจะมีขนาดเล็กลง

ไข่ ในคนพยาธิออกไข่เฉลี่ยวันละประมาณ 53.3 ฟองต่อพยาธิ 1 ตัวในอุจจาระ 1 กรัม (Sithithaworn et al., 1991) ไข่พยาธิใบไม้ตับเป็นไข่ขนาดเล็กมีขนาดเฉลี่ย 26.7 X 15 ไมโครเมตร มีฝาปิด (operculum) และมีบ่า (shoulder) รองรับ สีออกเหลืองเข้ม เนื่องจากสีของน้ำดี ภายในไข่จะมีตัวอ่อนระยะ miracidium บรรจุอยู่

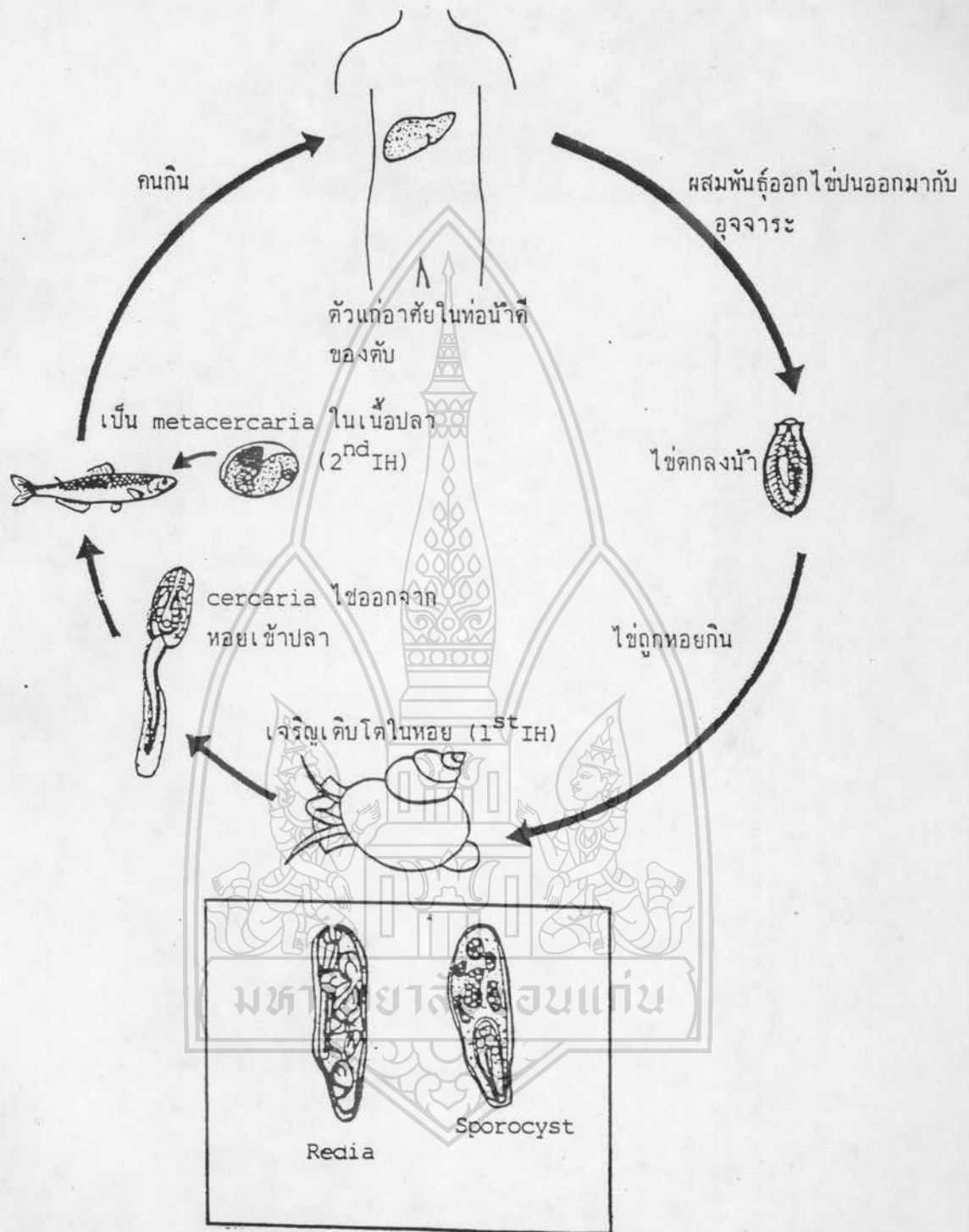
Cercaria มีขนาดตัวเฉลี่ย 154 X 75 ไมโครเมตร มี spine เล็ก ๆ ทั่วตัว และมี sensory hairs ตามลำตัว มีตา 1 คู่อยู่ใต้ oral sucker ส่วนหางยาวเฉลี่ย 392 ไมโครเมตร

มีครีบน้ำตาลตลอดปลายหาง ขณะพัก cercaria จะมีรูปร่างคล้ายกิ้งกือยาตัว และแขวนตัวอยู่กับผิวน้ำโดยห้อยส่วนหัวลง

Metacercaria เป็นตัวอ่อนที่เจริญมาจากระยะ cercaria ขดตัวอยู่ใน cyst มีลักษณะรูปไข่ ขนาดเฉลี่ย 200 X 167 ไมโครเมตร ตัวพยาธิจะเคลื่อนไหวอย่างรุนแรง อยู่ภายใน cyst ถ้าอยู่ในอุณหภูมิต่ำ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะมองเห็น sucker และ excretory bladder สีดำชัดเจน เปลือก cyst ชั้นนอกหนา 3-8 ไมโครเมตร ส่วนเปลือกชั้นในบางมากจะสังเกตเห็นได้ยาก

2.4 วงจรชีวิต

พยาธิใบไม้ตับมีการเจริญเติบโตและการพัฒนาการในวงจรชีวิตค่อนข้างสลับซับซ้อน ต้องอาศัยโฮสต์ซึ่งเป็นผู้เอื้อเพื่ออาหารและที่อยู่อาศัยให้กับระยะต่าง ๆ ของพยาธิอยู่ถึง 3 ชนิด (ภาพที่ ก.1) โฮสต์ชนิดแรกคือ definitive host ซึ่งอาจเป็นคนหรือสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น แมวและสุนัข ซึ่งเป็น reservoir host ในโฮสต์เหล่านี้พยาธิใบไม้ตับสามารถเจริญเป็นตัวแก่เต็มวัยและสืบพันธุ์ได้โดยอาศัยอยู่ในท่อน้ำดีของตับและตับอ่อน (Tansurat, 1971; Sithithaworn et al., 1991) เมื่อพยาธิตัวแก่ออกไข่ ไข่จะปะปนกับน้ำดีออกมาสู่ลำไส้แล้วถูกขับออกจากร่างกายผ่านลำไส้สู่สิ่งแวดล้อมภายนอกพร้อมกับอุจจาระ เมื่ออุจจาระถูกพัดพาลงแหล่งน้ำไข่พยาธิก็จะถูกกินโดยหอยพาหะกึ่งกลาง (snail intermediate host) โฮสต์ชนิดที่สองนี้เป็นหอยน้ำจืด Genus *Bithynia* ในภาคเหนือคือ *B. funiculata* ภาคกลางคือ *B. siamensis siamensis* ส่วนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือคือ *B. s. goniomphalos* หอย *Bithynia* spp. เป็นหอยมีฝาขนาดค่อนข้างเล็กมีความยาวของเปลือก 6.5-7 มิลลิเมตร (Wykoff et al., 1966) หลังจากไข่พยาธิ ในหอยฟักตัวให้ miracidium แล้วจะเจริญเติบโตและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศได้เป็นตัวอ่อนระยะ sporocyst และ redia จนในที่สุดกลายเป็น cercaria เมื่อสภาวะสิ่งแวดล้อมเหมาะสม เช่น มีอุณหภูมิและแสงแดดพอเหมาะ cercaria จะไชออกจากหอยมาในน้ำแล้วจึงหาทางไชเข้าสู่ปลาจำพวกมีเกล็ด (cyprinoid fish) ซึ่งเป็นพาหะกึ่งกลางชนิดที่สอง (โฮสต์ชนิดที่สาม) เมื่อไชเข้าสู่ปลาได้แล้ว cercaria จะสลัดหางทิ้ง



ภาพที่ ก.1 แสดงวงจรชีวิตของ *Opisthorchis viverrini*

สร้างผนังมาล้อมรอบส่วนลำตัวกลายเป็นระยะ metacercaria ฝังตัวอยู่ในกล้ามเนื้อส่วนต่าง ๆ ของปลา (Vajrasthira et al., 1961; Harinasuta et al., 1961; Harinasuta and Harinasuta, 1984) และใช้เวลาประมาณ 21 วันจึงเป็น metacercaria ระยะสมบูรณ์ เมื่อคนกินปลาปรุงดิบ ๆ สุก ๆ metacercaria ปนเปื้อนในอาหารจะฟักตัวที่กระเพาะอาหารและจะคืบคลานเข้าไปในท่อน้ำดีในตับเจริญเป็นตัวแก่ภายในเวลาประมาณ 4-6 สัปดาห์ (Wykoff et al., 1965)

2.5 ภูมิคุ้มกันวิทยา

ส่วนใหญ่แล้วการศึกษาทางภูมิคุ้มกันวิทยาของผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้ตับ จะมุ่งเน้นไปในเรื่องของการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรคทางน้ำเหลืองวิทยา (Janechaiwat et al., 1980; Srivatanakul et al., 1985; Boonpucknavig et al., 1986; Sirisinha et al., 1983; Wongratanacheewin and Sirisinha, 1987; Wongratanacheewin et al., 1988 a, 1988 b) และมีนักวิจัยบางกลุ่มได้ศึกษาและอธิบายกลไกการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของพยาธิว่าเป็นไปได้ไม่ตื้นนัก เนื่องจากพยาธิใบไม้ตับตัวแก่ซึ่งอาศัยอยู่ในท่อน้ำดี second order bile duct โอกาสที่พยาธิจะสัมผัสหรือกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเป็นไปได้น้อย แต่ในผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้ตับ *C. sinensis* สามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ excretory-secretory แอนติเจนของพยาธิและแอนติเจนของพยาธิตัวแก่ (adult worm crude extract) (Sun et al., 1968) นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบแอนติบอดีดังกล่าวในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ (*C. sinensis*) อีกด้วย (Sun and Gibson, 1969a; 1969 b) ในกรณีของผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ก็เช่นเดียวกันพบว่าการสร้างแอนติบอดีจำเพาะ IgG และ IgA (Elkins et al., 1991) สันนิษฐานว่าการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์เกิดจาก metabolic products หรือ soluble antigen ที่ออกจากตัวพยาธิขณะที่อาศัยอยู่ในท่อน้ำดี จะสามารถซึมผ่าน epithelial lining ของท่อน้ำดีเข้าไปกระตุ้น immunocompetent cells ให้เกิดการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน อนึ่งก่อนที่จะเกิดภูมิคุ้มกันต่อพยาธิ แฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อ *O. viverrini* จะพบว่าการตายของเซลล์ตับ (necrosis of liver parenchyma), cellular infiltration และ bile ductule proliferation ภายใน

เวลา 3 วันหลังจากได้รับเชื้อพยาธิ (Bhamarapavati et al., 1978) หลักฐานอันนี้แสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อพยาธิ *O. viverrini* ทำให้เกิด mechanical irritation ซึ่งจะนำไปสู่ epithelial cell damage เป็นผลให้แอนติเจนของพยาธิสามารถเล็ดลอดเข้าไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้

การศึกษาในระยะต่อมาพบว่าแอนติบอดีที่จำเพาะต่อตัวพยาธิใบไม้ตับระยะต่าง ๆ มีทั้งชนิด IgG, IgA, IgE และ IgM โดยผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้ตับส่วนใหญ่จะมี IgG antibody ต่อ *O. viverrini* antigen ในซีรัมได้มากกว่าชนิดอื่น ส่วน specific IgA antibody ตรวจพบได้ทั้งในน้ำดีและซีรัม (Wongratanacheewin et al., 1988a) แสดงให้เห็นว่าพยาธิตัวนี้สามารถกระตุ้นได้ทั้งแบบ systemic และ local immune responses ทั้งที่พยาธิชนิดนี้ไม่ได้บุกรุกเข้าไปในเนื้อเยื่อของร่างกายโดยตรงและในหนูแฮมสเตอร์สามารถตรวจพบแอนติบอดีในซีรัมได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ของการติดเชื้อ (Chawengkirttikul and Sirisinha 1988; Sirisinha et al., 1983a) ซึ่งเป็นช่วงที่พยาธิอยู่ในระยะ juvenile fluke แสดงว่า excysting metacecaria และ developing juvenile fluke สามารถปล่อยแอนติเจนออกมาจำนวนมากพอที่จะทำให้เกิดการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้

นอกจากนี้ยังมีหลักฐานยืนยันว่าพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ cell mediated immune response ในหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิได้เช่นกัน ซึ่งจะพบ granulomatous response ต่อตัวพยาธิและไข่พยาธิ และพบว่ามี cellular infiltration จำพวก eosinophil, neutrophil, mononuclear cells และ macrophages ในบริเวณที่มีการตายของเซลล์ตับและการอักเสบของเนื้อเยื่อตับ (Bhamarapavati et al., 1978; Harinasuta 1984) ซึ่งต่อมา Flavell และ Flavell (1986) พบว่า inflammation ในหนูแฮมสเตอร์ที่อยู่ในภาวะกดภูมิคุ้มกัน (T - cell deprived) โดยตัดเอาม้ามออกพบว่าการอักเสบของท่อน้ำดีในหนูกลุ่มนี้ได้น้อยกว่าหนูกลุ่มที่ติดเชื้อพยาธิแต่ไม่ได้ถูกตัดม้ามออก ซึ่งเป็นหลักฐานยืนยันว่า พยาธิสภาพนี้เกิดจาก immune response ของร่างกายโฮสต์เอง การเปลี่ยนแปลงนี้พบได้เช่นเดียวกันกับผู้ป่วยที่เป็นโรคพยาธิใบไม้ตับ *C. sinensis* (Sun, 1980)

แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้ตัวพยาธิจะสามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ได้ ทั้งระบบ humoral immune response (HIR) และ cell mediated immune response (CMIR) จากหลักฐานการศึกษาพบว่าระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นไม่สามารถป้องกันการติดเชื้อครั้งที่สองหรือครั้งต่อ ๆ ไปได้ (Bunnag and Harinasuta, 1989; Sornmani et al., 1984; Upatham et al., 1982) Flavell และ Pattanapanyasat (1980) พยายามศึกษา protective immunity โดยการ transfer immune spleen cells หรือ immune sera จากหนูแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับไปยังหนูแฮมสเตอร์ปกติ แล้วป้อนตัวอ่อนพยาธิใบไม้ตับ ในหนูกลุ่มที่ได้รับ immune cell หลังจากนั้นฆ่าหนูและนับจำนวนพยาธิในท่อน้ำดี เพื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ไม่ได้รับ immune cell ซึ่งพบว่าจำนวนพยาธิไม่ได้ลดลงเลย แสดงว่า immune cells หรือ serum นั้น ๆ ไม่สามารถป้องกันการติดเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้แล้ว Sirisinha et al (1983b) ได้พยายามศึกษา protective immunity เช่นกันโดยการป้อน metacercaria จำนวนต่าง ๆ แก่แฮมสเตอร์และทำซ้ำหลาย ๆ ครั้ง หรือครั้งเดียวก่อนแล้วป้อน metacercaria แก่หนูอีกครั้งหนึ่งเพื่อดูว่าการติดเชื้อพยาธิครั้งแรกและครั้งต่อ ๆ ไป หลาย ๆ ครั้ง จะมีผลให้การติดเชื้อครั้งต่อไปลดลงหรือไม่ ผลที่ได้จำนวน worm recovery ไม่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อนำตัวพยาธิตัวแก่มาเลี้ยงไว้ในหลอดทดลองร่วมกับซีรัมผู้ป่วยพบว่าซีรัมคนที่เป็นโรคพยาธิใบไม้ (*O. viverrini*) ไม่สามารถที่จะฆ่าพยาธิตัวแก่ได้ (Sirisinha et al., 1986)

จากการศึกษา specific antigen ของ *O. viverrini* โดยวิธี radioimmuno precipitation, SDS-PAGE และ autoradiography แล้วพบว่าโปรตีนขนาด 89 กิโลดาลตัน (kD) มีศักยภาพที่จะเป็น specific antigen โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามพวกกับหนอนพยาธิชนิดอื่น เช่น *F. hepatica*, *Paragonimus africanus*, *P. uterobilateralis*, *Schistosoma* spp. และ *Gnathostoma* spp. และสามารถพบโปรตีนตัวนี้ใน adult somatic antigen, ES antigen และ metacercaria antigen แต่จะพบใน ES antigen เป็นส่วนมาก และจากผลการทำ localization ของแอนติเจน นี้โดยใช้ rabbit - anti ES และ monoclonal anti - 89 kD ร่วมกับ immunofluorescence technique พบว่าแอนติเจนอยู่บริเวณที่ เป็น

reproductive organ, tegument และรอบ ๆ ไช้ของพยาธิ (Wongratanacheewin and Sirisinha, 1987; Wongratanacheewin et al., 1988b)

2.6 พยาธิวิทยา

Upatham et al. (1982, 1984) ได้รายงานการศึกษาใน 2 หมู่บ้านจังหวัดขอนแก่น พบว่าในกลุ่มประชากรที่อายุเกิน 20 ปีเกือบทุกคนตรวจพบไช้พยาธิในอุจจาระ ร้อยละ 95-100 และมีเพียงร้อยละ 5-10 เท่านั้น ที่มีอาการและอาการแสดงของโรคซึ่งมีความสัมพันธ์กับการมีพยาธิ เช่นท้องอืด ท้องเฟ้อ เจ็บท้องบริเวณใต้ชายโครง เบื่ออาหาร อ่อนเพลียโดยไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างอาการตับโตกับจำนวนไช้พยาธิที่พบในอุจจาระ การศึกษาเปรียบเทียบพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในท่อน้ำดีกับจำนวนพยาธิที่ตรวจได้ในตับและไช้ที่ตรวจพบในอุจจาระผู้ป่วยที่เสียชีวิตจากอุบัติเหตุ จำนวน 50 ราย ตรวจพบพยาธิ *O. viverrini* ในตับ 40 ราย และตรวจพบพยาธิสภาพซึ่งแสดงถึงการคั่ง (stasis) ของน้ำดีเกิด bile lake 15 ราย ซึ่งมีความสัมพันธ์กับไช้ที่ตรวจพบในอุจจาระ และจำนวนพยาธิในตับ (Pairojkul et al., 1991) และจากการตรวจผู้ป่วยที่เสียชีวิตเนื่องจากสาเหตุอื่นทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ที่โรงพยาบาลเวชศาสตร์เขตร้อน (Riganti et al., 1989) พบมีพยาธิสภาพของโรคพยาธิใบไม้ตับคล้ายคลึงกันคือร้อยละ 55 พบว่าเกิด bile lake ท่อน้ำดีบริเวณใต้เปลือกตับพองโตขึ้นเห็นชัดเจน ท่อน้ำดีภายในตับขยายตัวและผนังหนาขึ้น ผู้ป่วยจำนวน 1 ใน 4 มี fibrosis ที่บริเวณขั้วตับ ร้อยละ 24 พบว่าถุงน้ำดีโตขึ้น มีผนังหนาซึ่งแสดงถึงการอักเสบเรื้อรัง พยาธิสภาพของถุงน้ำดีอักเสบพบได้เฉพาะในผู้ป่วยผู้ใหญ่เท่านั้น ผู้ป่วยเด็กไม่พบความผิดปกติของถุงน้ำดี การอักเสบของท่อน้ำดีเกิดขึ้นเฉพาะ ท่อน้ำดีขนาดใหญ่ (second order duct) ส่วนท่อน้ำดีขนาดเล็ก (bile ductule) ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาพบว่าทุกรายมีการเปลี่ยนแปลงของท่อน้ำดีเป็นการอักเสบแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง คือเยื่อบุท่อน้ำดีหนาขึ้น (hyperplasia) มีเซลล์ประเภท mononuclear cell, eosinophil และ plasma cellแทรกตัวเข้ามา goblet cell เพิ่มจำนวนมากขึ้น เยื่อบุท่อน้ำดีมีการหลุดลอกออก (desquamation) และมีการ

แบ่งตัวเพิ่มขึ้น (proliferation) จนกระทั่งมีลักษณะเหมือนนิ้วมือยื่นเข้าไปในรูท่อน้ำดีผนังท่อน้ำดีชั้นกล้ามเนื้อหนาขึ้น และมี fibrous tissue แทรกอยู่ การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา ของท่อน้ำดีขึ้นอยู่กับความรุนแรงและระยะเวลาของโรค (Riganti et al., 1989) ในระยะต้น ๆ จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นที่ทางเดินน้ำดีภายในตับ เยื่อบุทางเดินน้ำดีจะยังคงเป็น columnar epithelium ชั้นเดียวไม่มี fibrous tissue แต่ในระยะที่มีการติดเชื้อเรื้อรังจะพบการเพิ่มจำนวนของเยื่อบุทางเดินน้ำดีและบางแห่งจะตีบตันบางแห่งจะโป่งพอง มีตัวพยาธิและไข่พยาธิปรากฏให้เห็นในท่อน้ำดีที่โป่งพอง (Bhamarapravati et al., 1978)

อรุณ เผ่าสวัสดิ์ (2529) ได้ทำการตรวจและรักษาผู้ป่วยระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2524 ถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2528 มีผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้ตับจำนวน 196 ราย เป็นชาย 152 ราย และหญิง 44 ราย เป็นอัตราส่วนชายต่อหญิงประมาณ 3.5 ต่อ 1 อายุระหว่าง 27-65 ปี อายุเฉลี่ยประมาณ 41 ปี พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของทางเดินน้ำดี ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ระยะคือ

ระยะที่ 1 Early stage เป็นระยะแรกเริ่ม เริ่มมี fibrosis เกิดขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณที่เป็นจุดร่วมของทางเดินน้ำดี เช่น ที่ท่อน้ำดี จุดเริ่มของท่อน้ำดีร่วมและส่วนปลายของท่อน้ำดีร่วม บางรายมีการโป่งพองของทางเดินน้ำดีโดยทั่ว ๆ ไปตั้งแต่ท่อน้ำดีร่วมไปจนถึงทางเดินน้ำดีภายในตับ ท่อน้ำดีโตขึ้นอย่างมาก บางรายมีการอุดตันของท่อน้ำดี บางรายยังไม่มีเปลี่ยนแปลงในลักษณะนี้พบ 56 รายใน 192 ราย (ร้อยละ 28.6) และในจำนวนนี้ (38 รายจาก 192 ราย, ร้อยละ 19.4) มีสภาวะดีซ่านร่วมด้วย ท่อน้ำดีมีการอักเสบทั้งเรื้อรังและเฉียบพลัน

ระยะที่ 2 Intermediate stage เป็นระยะกลางจะมีพังผืดเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะบริเวณท่อน้ำดีและท่อน้ำดีร่วม สภาพท่อน้ำดีเหมือนกับระยะแรก ทางเดินน้ำดีภายในตับโป่งพองมากขึ้น ท่อน้ำดีร่วมตีบแคบลง ซึ่งพบผู้ป่วยในระยะนี้ได้น้อย มีเพียง 15 ใน 196 ราย (ร้อยละ 7.6) ทุกรายมีสภาวะดีซ่านทั้งหมด

ระยะที่ 3 Late stage เป็นระยะที่มีมะเร็งเกิดขึ้นอาจจะเป็นเฉพาะที่ท่อน้ำดีหรือที่ท่อน้ำดีร่วม ท่อน้ำดีร่วม และอีกหลาย ๆ แห่งภายในตับ พบผู้ป่วยระยะนี้ถึง 125

ราย จาก 196 ราย (ร้อยละ 63.8) ในระยะต่าง ๆ ของการเปลี่ยนแปลงทางเดินน้ำดีนี้ไม่ได้ขึ้นอยู่กับอายุของผู้ป่วย

2.7 พยาธิวิทยาโรคพยาธิใบไม้ตับในสัตว์ทดลอง

พยาธิสภาพของท่อน้ำดีที่แตกต่างกันชัดเจนระหว่างการเปลี่ยนแปลงในคนกับหนูแฮมสเตอร์ คือในคนจะไม่พบการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นที่ bile ductule เลย แต่ในหนูแฮมสเตอร์จะมีการเพิ่มทั้งจำนวน (ductular proliferation) และ collagen โดยรอบ bile ductule (cholangiofibrosis) และ มักจะมีการอักเสบเกิดขึ้นด้วยเสมอ การเปลี่ยนแปลงนี้เชื่อว่าเกิดจากพยาธิทำให้เกิดการอุดตันในท่อน้ำดีของแฮมสเตอร์ และหลังการอุดตันจะมีการอักเสบเกิดตามมา การอักเสบเรื้อรังมีผลทำให้เกิดการผลัดเปลี่ยนของเยื่อบุผิวตลอดเวลาซึ่งน่าจะเป็นปัจจัยร่วม (promoting factor) อันหนึ่งของขั้นตอนการเกิดมะเร็ง นอกเหนือจากพยาธิและสาร dimethyl nitrosamine ซึ่งมีผลให้เกิดมะเร็ง จากการทดลองในแฮมสเตอร์พบมะเร็งท่อน้ำดีเกิดขึ้นในอัตราค่อนข้างสูง ส่วนการเพิ่มจำนวนของ bile ductules ในตับคนจะตรวจพบได้ในตับที่เป็นมะเร็งซึ่งเกิดจากการอุดตันของ segmental bile duct ในบริเวณนั้น (Thamavit et al., 1987)

การศึกษาในแมวที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับ *C. sinensis* ก็พบว่าการเปลี่ยนแปลงของท่อน้ำดี second order bile duct เกิดขึ้นในลักษณะเดียวกันกับในแฮมสเตอร์ที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* นอกจากนี้ยังพบว่าในระยะท้าย ๆ ของการทดลองความหนาของท่อน้ำดีมีแนวโน้มที่ลดลงและ adenomatous tissue ก็ลดลงด้วย ในบางบริเวณจะเห็นเยื่อบุผิวเป็น cuboidal cell เพียงชั้นเดียว (Hou, 1965a) และนอกจากนี้ในสุนัขที่ได้รับพยาธิใบไม้ตับ *C. sinensis* (Hou, 1964; 1965b) พบมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์บริเวณเยื่อบุผิวท่อน้ำดี second order bile duct จาก hyperplastic adenomatous tissue เปลี่ยนเป็น adenocarcinoma ที่เกิดขึ้นในทำนองเดียวกันกับในคนที่ป่วยเป็นโรคพยาธิใบไม้ตับ Clonorchiasis

Bhamarapravati et al. (1978) ศึกษาพยาธิสภาพของตับแฮมสเตอร์ที่ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ได้แบ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเป็น 2 ระยะคือ

ระยะที่ 1 เป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในช่วงระยะเวลาดังแต่ metacercaria เคลื่อนที่ไปถึง second order bile duct และพัฒนาไปเป็น juvenile flukes (28 วันหลังการติดเชื้อพยาธิ) ส่วนใหญ่จะพบพยาธิใน second order bile duct ที่อยู่ใกล้กับ portal hepatis นอกจากนี้พบ hemorrhage และ coagulative necrosis ของเซลล์ตับเป็นหย่อมขนาดต่าง ๆ กัน และพบปฏิกิริยาการอักเสบทั้งระยะ acute และ subacute ในบริเวณ portal areas เซลล์การอักเสบที่พบในบริเวณนี้ส่วนใหญ่จะเป็น eosinophil นอกจากนั้นก็เป็น neutrophils และ mononuclear cell

ระยะที่ 2 พบว่าตัวพยาธิเจริญไปเป็นตัวเต็มวัยและเริ่มพบไข่ใน uterus ของพยาธิ (30 วันหลังการติดเชื้อ) การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของตับและท่อน้ำดี พบว่ามี periductal fibrosis และ liver lobule regeneration และ พบ parasite granuloma ในบริเวณ periductal area นอกจากนั้นยังพบ adenomatous hyperplasia ของเซลล์เยื่อท่อน้ำดีและ periductal fibrosis โดย Bhamarapravati et al. (1978) เชื่อว่าการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ดังกล่าวเป็นผลมาจากภูมิคุ้มกันของโฮสต์ต่อพยาธิ

2.8 ความสัมพันธ์ของโรคพยาธิใบไม้ตับกับมะเร็งท่อน้ำดี

จากการตรวจศพชาวฮ่องกง 30 รายที่เป็นโรคพยาธิใบไม้ตับ Clonorchiasis พบว่ามีอุบัติการณ์ของมะเร็งท่อน้ำดี (cholangiocarcinoma, CCA) รวมด้วย (Hou, 1956) สำหรับผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้ตับ (Opisthorchiasis) ในประเทศไทย จากการตรวจศพที่โรงพยาบาลศิริราชพบว่าอัตราส่วนของผู้ป่วยมะเร็งตับ (hepatocellular carcinoma, HCC) กับมะเร็งท่อน้ำดี (CCA) เป็น 4 ต่อ 1 และผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้ตับสัดส่วนของ HCC ต่อ CCA เป็น 8 ต่อ 1 (Sonakul et al., 1978) และการศึกษาตรวจศพผู้ป่วยอุบัติเหตุที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 50 ราย พบผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้ตับ 42 ราย ไม่พบมะเร็งท่อน้ำดีแต่พบพยาธิสภาพที่บ่งบอกถึงความสัมพันธ์ของพยาธิใบไม้ตับกับมะเร็งท่อน้ำดีคือมีลักษณะ cholangiofibrosis 35 ราย adenomatous hyperplasia 7 ราย และพบการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นทั้ง 2 ลักษณะที่กล่าวมา 14 ราย พบการเปลี่ยนแปลงก่อนเกิดเป็นมะเร็ง (dysplasia) 8 ราย และมะเร็งในระยะแรก

(carcinoma insitu) 1 ราย (Pairojkul et al., unpublished) การศึกษาที่อำเภอห้วยเม็ก จังหวัดกาฬสินธุ์พบผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้ตับ Opisthorchiasis 87 ราย ผลการตรวจอัลตราซาวด์พบว่าเป็นมะเร็งท่อน้ำดี 8 รายและมีผู้ป่วยถึงกว่า 40 รายจาก 87 รายมีความผิดปกติของตับและทางเดินน้ำดีร่วมกับการตรวจพบเป็นโรคพยาธิใบไม้ตับ (Elkins et al., 1990) มีข้อสังเกตว่ากลุ่มผู้ป่วยโรคพยาธิใบไม้ตับจะตรวจพบโรคมะเร็งร่วมด้วยเสมอ

การทดลองในสัตว์ทดลองก็พบความสัมพันธ์นี้เกิดขึ้นเช่นกัน โดยเมื่อหนูแฮมสเตอร์ติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับแล้วได้รับสารก่อมะเร็ง dimethyl nitrosamine (DMN) ในน้ำให้แก่วัตถุทดลองกิน ต่อมาฆ่าสัตว์ทดลองเพื่อตรวจพยาธิสภาพของตับพบว่า หนูแฮมสเตอร์เป็นโรคมะเร็งท่อน้ำดี (CCA) ได้ร้อยละ 40 ถึงแม้ว่าจะให้ตัวอ่อนพยาธิเพียง 12 metacercaria ร่วมกับ DMN 6.25 ppm เท่านั้น (Thamavit et al., 1987) จากหลักฐานที่ได้กล่าวมานี้ยืนยันได้ว่า โรคพยาธิใบไม้ตับมีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งท่อน้ำดี (CCA) ถึงแม้ว่ากลไกในการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีจะยังไม่เข้าใจกระจ่างชัด แต่การติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับจำนวนมากนับว่าเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญในการเกิดโรคมะเร็งท่อน้ำดี (CCA) (Haswel-Elkins et al., 1992)

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย (Research methodology)

3.1 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นหนูแฮมสเตอร์ (outbred golden syrian hamster) เพศผู้ อายุ 6-8 สัปดาห์ ผลิตโดยหน่วยสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 120 ตัว และแยกกรงขังรวมกัน 10 ตัว/กรง เลี้ยงในห้องปรับอากาศอุณหภูมิ 22-24°C โดยมีน้ำและอาหารเม็ดสำเร็จรูปให้กินตลอดเวลา

3.2 การเตรียมตัวอ่อนพยาธิ และการป้อนพยาธิให้สัตว์ทดลอง

ตัวอ่อนระยะติดต่อพยาธิใบไม้ตับ (metacercaria of *O. viverrini*) เตรียมจากการย่อยปลาขาว (*Cyclocheilichthys siaja*) ปลาแก้มขี้ (Puntius orphoides) และปลาตะเพียน (*P. leiakanthys*) จากอ่างเก็บน้ำอำเภอนบพิตำ และอำเภอบ้านไผ่ จังหวัดขอนแก่น ปลาที่ได้จะถูกผ่าเอาอวัยวะภายในออกทิ้งแล้วนำไปปั่นให้แหลกด้วยเครื่องปั่นผลไม้ ในสารละลายเปปซิน (0.25 % Pepsin A. in 0.85 % NaCl) เป็นเวลา 3-5 นาที ผสมเนื้อปลาที่แหลกละเอียดด้วยสารละลายเปปซินอีกครั้งหนึ่งในอัตราส่วน 4 : 6 โดยปริมาตรแล้วนำไปย่อยใน shaking water bath ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมงจากนั้นนำปลาที่ย่อยแล้วมากรองด้วยตะแกรงขนาดต่าง ๆ 4 ครั้ง ซึ่งมีขนาดรูตะแกรง 1,000 ไมโครเมตร, 425 ไมโครเมตร, 106 ไมโครเมตร และตะแกรงสุดท้าย 50 ไมโครเมตรตามลำดับ โดยใช้น้ำเกลือ (0.85 % NaCl) เป็นตัวทำให้เจือจาง นำตะกอนที่ได้มาตกตะกอนใน sedimentation jar เพื่อเลือกหา metacercaria ของพยาธิใบไม้ตับด้วยกล้อง stereomicroscope metacercaria ที่ได้จะถูกเก็บไว้ในน้ำเกลือ (0.85 % NaCl) ที่อุณหภูมิ 4°C เมื่อได้ครบตามจำนวนที่ต้องการจึงนำไปป้อนให้แฮมสเตอร์

นำ metacercaria ที่เตรียมไว้มาป้อนหนูแฮมสเตอร์ โดยดูพยาธิที่นับจำนวนไว้ในน้ำเกลือปริมาตรไม่เกิน 1 ml ป้อนพยาธิทางปากโดยสอดท่อ polyethylene tube ที่ต่อจากปลายเข็มเข้าทางปากไปจนถึงกระเพาะของหนูแล้วจึงปล่อยพยาธิเข้าไปขณะที่แฮมสเตอร์สลับจากการดมโอเทอร์ หลังจากนั้นประมาณ 1 - 3 นาทีแฮมสเตอร์ก็จะฟื้นกลับมาเป็นปกติ

3.3 การตรวจนับพยาธิตัวแก่

ภายหลังที่แฮมสเตอร์ได้รับพยาธิครบตามกำหนดเวลาและผ่านการเก็บข้อมูล เช่น น้ำหนัก, ซ้ำและมูลสัตว์ทดลองแล้วจะนำมาฆ่าโดยวิธีให้ดมโอเทอร์จนตาย เมื่อตายสนิทแล้ว จะทำการผ่าตัดเปิดช่องท้อง เพื่อตัดเอาตับและถุงน้ำดีออกมาใส่ในเพลทที่มีน้ำเกลือ ฉีกตับออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ เพื่อค้นหาพยาธิตัวแก่ที่อยู่ในถุงน้ำดี, ท่อน้ำดี และนับจำนวนพยาธิตัวแก่ที่พบในสัตว์ทดลองแต่ละตัว สำหรับพยาธิตัวแก่ที่ไม่สมบูรณ์ มีรอยฉีกขาดหรือขาดหายจะนับเฉพาะส่วนหัว (anterior) เท่านั้น เพื่อคำนวณหา worm recovery พยาธิตัวแก่ทั้งหมดที่ได้ เมื่อนับจำนวนแล้วจะรวบรวมใส่ไว้ในหลอดทดลองที่มีน้ำเกลือที่อุณหภูมิ -20°C สำหรับเตรียมแอนติเจนต่อไป

3.4 การเตรียมแอนติเจน

แอนติเจนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็น crude somatic extract ของ *O. viverrini* ซึ่งเตรียมจากพยาธิตัวแก่จากหนูแฮมสเตอร์ หลังจากวัดปริมาตรของพยาธิ แล้วเติม 0.1 mM. Phenyl methyl sulphonyl fluoride (PMSF) และ 0.1 mM. L-1-tosylamide-2-phenyl ethyl chloromethyl ketone (TPCK) 1 μl /1 ml. ของปริมาตรพยาธิตัวแก่ บดพยาธิรวมกันให้แตกละเอียดที่อุณหภูมิ 4°C โดยใช้ glass tissue grinder แล้วนำไป sonicate จนกระทั่งตัวพยาธิแตกโดยต้องพักทุก 1 นาทีแล้ว centrifuge ที่ 4°C ด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 30 นาที (Sirisinha et al., 1983b) แล้วตรวจวัดระดับโปรตีนโดยวิธี Lowry method (ภาคผนวก) นำแอนติเจนที่เตรียมได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้สำหรับการทดลองต่อไป

3.5 การกระตุ้นภูมิคุ้มกันแฮมสเตอร์

สัตว์ทดลองที่ต้องกระตุ้นภูมิคุ้มกันก่อนติดเชื้อพาราณั้นจะได้รับแอนติเจน 100 μg โดยผสมแอนติเจนกับ Complete Freund's Adjuvant (CFA) ในอัตราส่วน 1 : 1 ใน syringe ขนาด 5 ml. เมื่อผสมเข้ากันดีแล้วจะฉีดแอนติเจนโดยวิธี subcutaneous injection บริเวณโคนขาหลังที่ติดกับช่องท้อง และวิธี foot pad injection ที่ขาหลังทั้งสองข้างเพียง 1 ครั้ง หลังจากสัตว์ทดลองที่ได้รับแอนติเจนแล้วจะถูกนำไปเลี้ยงต่ออีก 4 สัปดาห์ก่อนจะนำไปเจาะเลือดเพื่อหาระดับ IgG ต่อพาราณั้นในซีรัมและค่าเคมีของเลือด

3.6 การวัดระดับของแอนติบอดีต่อพาราณั้น

เจาะเลือดแฮมสเตอร์จาก orbital plexus จากนั้นเก็บตัวอย่างเลือดไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 4-6 ชั่วโมง เพื่อให้เลือดแข็งตัวจึงนำไป centrifuge ที่ 1,000 rpm. เวลา 3 นาที แล้วดูดเอาส่วนซีรัมใส่ใน tube พร้อมติดสลากเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C สำหรับใช้ในการทดลองต่อไป

การตรวจหาแอนติบอดี (IgG) ต่อพาราณั้นในซีรัมใช้วิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดยมีค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการทดลองนี้ คือ ใช้แอนติเจน (crude somatic antigen ของ *O. viverrini*) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ซีรัมแฮมสเตอร์ (dilution of hamster sera) = 1 : 1,500 และ conjugate (horseradish peroxidase (HRP) conjugated Goat anti-Hamster IgG (Medac GmbH) = 1 : 4,000

ขั้นตอนของ ELISA เริ่มต้นด้วยการเจือจางแอนติเจนด้วย 0.05 M Carbonate buffer pH 9.6 ให้มีความเข้มข้น 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. แล้วดูดใส่ใน U-bottomed Immulon-2TM micro-ELISA plates (Dynatech Laboratories, Inc., Va., USA) หลุมละ 100 μl ยกเว้นหลุมที่เป็น blank จะใส่เฉพาะ 0.05 M Carbonate buffer pH 9.6 จำนวน 100 μl เก็บไว้ใน humidified chamber ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลานาน 12-16 ชั่วโมงแล้วจึงล้างออกด้วย washing buffer และ block โดยเติม 5 % skim milk in carbonate buffer pH 9.6 หลุมละ

200 μ l แล้ว incubate ใน humidified chamber ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงล้างออกแล้วดูด hamster sera ที่เจือจางแล้วใน 2 % skim milk in incubation buffer ความเข้มข้น 1: 1,500 รวมทั้งซีรัมของแฮมสเตอร์ positive control และ negative control หลุมที่เป็น blank จะเติม 2 % skim milk in incubation buffer หลุมละ 100 μ l เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วจึงล้างออก เสร็จแล้วเติม horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti-hamster IgG ที่เจือจางแล้วใน 2 % skim milk in incubation buffer ความเข้มข้น 1 : 4,000 ดูดใส่หลุม ๆ ละ 100 μ l เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงในระหว่างที่ incubate นี้ต้องเตรียม substrate solution 1,2-phenylenediamine (OPD; Dako. A/S) ก่อนใช้ประมาณ 15 นาทีในที่มืด เมื่อ incubated micro-ELISA plate ครบตามเวลาจะล้างด้วย washing buffer ซับให้แห้งแล้วจึงเติม substrate solution (OPD) หลุมละ 100 μ l เก็บไว้ที่ 37°C เป็นเวลา 15 นาที จะหยุดปฏิกิริยาด้วย 5 N. H_2SO_4 หลุมละ 100 μ l ทิ้งไว้ 15 นาทีจึงนำไปอ่านค่า OD (optical density) ที่ 490 nm ด้วยเครื่อง Microplate ELISA reader Model 450 (BIO-RAD., USA)

3.7 การตรวจวัดเอนไซม์ในซีรัม

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่ของตับ (liver function enzyme) ที่เลือกใช้ประกอบด้วย Aspartate amino transferase (AST), Alanine amino transferase (ALT) ซึ่งใช้เป็นตัวชี้วัดในการถูกทำลายของเซลล์ตับและ Alkaline phosphatase (ALP) จะใช้เป็นตัวชี้วัดในการอุดตันของท่อทางเดินน้ำดี ซึ่งเมื่อเซลล์ตับถูกทำลายและเกิดการอุดตันของท่อทางเดินน้ำดีเอนไซม์เหล่านี้ก็จะถูกปล่อยออกมาตาม กระแสเลือด ทำให้สามารถวัดระดับเอนไซม์นี้ได้ในซีรัม ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้วัดระดับของเอนไซม์จากปฏิกิริยา oxidation ของ NADH โดยใช้เครื่อง automated analyzer (Automate 550, Express, Ciba corning, USA) วัด absorbance ที่ 340 nm. โดยจะใช้ซีรัมแฮมสเตอร์ทุกตัว ตัวละ 0.20 ml. ดูดใส่ใน cuvettes แล้วเติมสารละลาย AST (GOT) reagent, ALT (GPT) reagent และ ALP reagent (TRACE SCIENTIFIC, Australia) อย่างละ 3 ml. ดูดใส่ไว้ใน reagent tray ป้อนคำสั่งให้เครื่องทำงาน แล้วบันทึกผลข้อมูลที่ได้

3.8 การนับจำนวนไข่พยาธิในมูลสัตว์ทดลอง

ก่อนที่จะถึงกำหนดการฆ่าสัตว์ทดลอง 1 วัน จะต้องแยกแฮมสเตอร์แต่ละตัวในกรงแยกพิเศษเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเก็บมูลสัตว์ทดลอง หลังจากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งน้ำหนักแล้วจึงนำไปทำการนับไข่พยาธิโดยวิธี modified formalin ethyl acetate technique เชย้าทำให้มูลสัตว์แตกสลายแล้วนำไป centrifuge ที่ 2,000 rpm. เวลา 5 นาทีเติมน้ำและกรองตะกอนด้วยผ้าก๊อซ centrifuge อีก 5 นาที ใช้สำลีเช็ดเศษอุจจาระและเท supernate ทิ้งนำเอาตะกอนที่ได้เติม 10 % formalin 2 ml. แล้วจึงสุ่มตัวอย่างมา 0.15 ml. เพื่อทำการตรวจนับไข่พยาธิ 4 ครั้งด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า เพื่อคำนวณหา egg per gram of faeces (epg) (ดูภาคผนวก)

3.9 การตรวจเนื้อเยื่อตับสัตว์ทดลอง

การศึกษาทางพยาธิวิทยากระทำได้โดยการเปิดช่องท้องแล้วตัดเอาตับและถุงน้ำดีออกแล้วดองใน 10 % neutral buffer formalin pH 7.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงหั่นเนื้อเยื่อตับออกเป็นชิ้น ๆ ตามแนวขวางกับท่อน้ำดีในตับ ความหนาประมาณ 2-3 มิลลิเมตร แยกใส่ในตลับขึ้นเนื้อพร้อมติดสลากนำไป process ในเครื่อง automatic tissue processor แล้วจึง embed ด้วย paraffin wax นำไปตัดให้เป็นแผ่นหนา 5 ไมโครเมตร ตัดเนื้อเยื่อบนแผ่นสไลด์แก้ว นำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงย้อมสไลด์ด้วย Hematoxyline & Eosin stain (ดูภาคผนวก) เพื่อทำเป็นสไลด์ถาวรสำหรับศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับและท่อน้ำดีภายในตับ

บันทึกข้อมูลกระทำได้แบบ semi-quantitative grading โดยดูที่ตำแหน่ง secondary order main duct และ second order duct โดยในชั้นแรกต้องดูสไลด์ทั้งหมดในทุกกลุ่มการทดลอง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สไลด์ที่มีการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยามากที่สุดให้ค่าคะแนนเท่ากับ 5 ถ้าเปลี่ยนแปลงน้อยก็ให้ลดหลั่นลงมาเรื่อย ๆ ถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงเลยจะให้ค่าคะแนนเท่ากับ 1 ดังนี้

- 1 หมายถึง ไม่พบการเปลี่ยนแปลง (not present)
- 2 หมายถึง พบการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก (mild)
- 3 หมายถึง พบการเปลี่ยนแปลงน้อย (moderate)
- 4 หมายถึง พบการเปลี่ยนแปลงปานกลาง (severe)
- 5 หมายถึง พบการเปลี่ยนแปลงมาก (very severe)

การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาจะศึกษาในเฉพาะหัวข้อต่อไปนี้ คือ

1. ปริมาณ mononuclear cell, eosinophils และ lymphoid follicle ที่อยู่รอบท่อน้ำดี second order duct และ second order main duct
2. การเปลี่ยนแปลง reactive hyperplasia ที่ second order duct, second order main duct
3. การเกิด periductal fibrosis ที่ second order duct และ second order main duct
4. การเพิ่มจำนวนท่อน้ำดี (bile ductule proliferation) ในเนื้อเยื่อตับ
5. การเปลี่ยนแปลง portal fibrosis และ secondary biliary cirrhosis
6. การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาอื่นๆ ได้แก่
 - portal fibrosis
 - Periductal cholangitis
 - ulceration of second order main duct with granuloma
 - ulceration of second order duct with granuloma
 - Egg granuloma with giant cell
 - Egg granuloma without giant cell
 - parasite granuloma

3.10 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่เก็บทั้งหมดจะนำมาเข้าโปรแกรมฐานข้อมูล Paradox 3.5 เพื่อทำการสรุปข้อมูลขั้นต้นก่อนจะนำไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยละเอียดด้วยโปรแกรม Panacea 2 ในการทดสอบทางสถิตินั้นใช้ Analysis of variance (ANOVA) และ T-test

3.11 การวางแผนการทดลอง

เพื่อทดสอบหาผลกระทบและอิทธิพลของภูมิคุ้มกันในโฮสต์ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับและท่อน้ำดีของโฮสต์ ใช้หนูแฮมสเตอร์เพศผู้ อายุ 6-8 สัปดาห์เป็นสัตว์ทดลองศึกษาเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มที่มีพยาธิเพียงอย่างเดียวกับกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันก่อนการได้รับพยาธิ โดยเปรียบเทียบกันกับกลุ่มควบคุมในระยะเวลาที่แตกต่างกันคือ 1, 2, 4 และ 6 เดือน หลังจากสัตว์ทดลองได้รับพยาธิใบไม้ตับ ซึ่งสามารถติดตามผลการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นได้ทั้งในระยะเวลาสั้นและระยะเวลานานขึ้น ดังนั้นการทดลองครั้งนี้จึงแบ่งหนูแฮมสเตอร์ออกเป็น 3 กลุ่ม (ตามตารางที่ 1) กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม (control group) ซึ่งไม่ได้รับการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและตัวอ่อนพยาธิใบไม้ตับ กลุ่มที่ 2 กลุ่ม immunized เป็นกลุ่มที่ต้องกระตุ้นภูมิคุ้มกันหนูแฮมสเตอร์ด้วยแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ 100 µg/ml./ตัว หลังจากนั้น 1 เดือนก็ให้ตัวอ่อนพยาธิใบไม้ตับอีกจำนวน 50 metacercaria ต่อหนูแฮมสเตอร์ 1 ตัว และกลุ่มที่ 3 กลุ่ม naive เป็นกลุ่มซึ่งให้ตัวอ่อนพยาธิใบไม้ตับจำนวน 50 metacercaria เพียงอย่างเดียว



ห้ามยืมออก

ตารางที่ 1 แผนการทดลองแสดงกลุ่มการทดลองจำนวนพยาธิที่ป้อนแก่สัตว์ทดลอง และจำนวนสัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่ม รวมหนูแฮมสเตอร์ทั้งหมด 120 ตัว

Experimental group	Dose of infection (metacercaria)	Time after infection (month)			
		1	2	4	6
		Number of experimental animal			
Control	0	10	10	10	10
Immunized	50	10	10	10	10
Naive	50	10	10	10	10

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

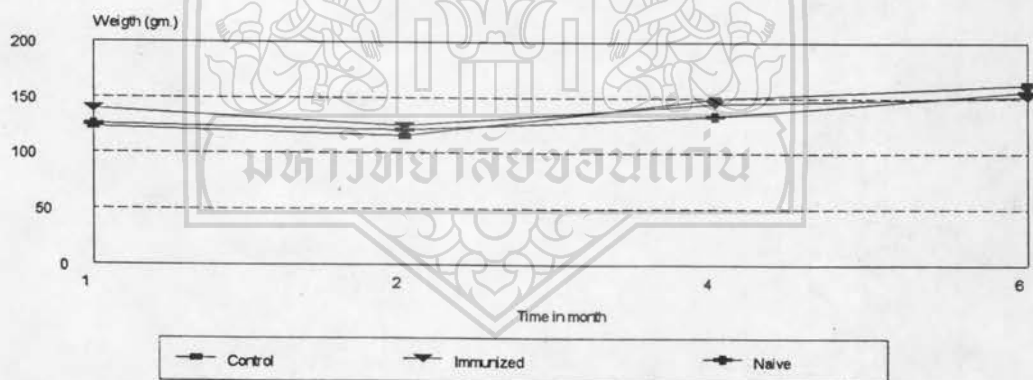
บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผลทดลอง (Results and discussion)

4.1 ผลการวิจัย

4.1.1 น้ำหนักสัตว์ทดลอง

ผลการชั่งน้ำหนักหนูแฮมสเตอร์ภายหลังการติดเชื้อเป็นเวลา 6 เดือน พบว่าการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับและการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนก่อนการติดเชื้อพยาธิไม่มีผลต่อการเติบโตของสัตว์ทดลอง โดยเมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักสัตว์ทดลองของแต่ละกลุ่มคือ กลุ่ม control, immunized และ naïve ทุกช่วงเวลาของการทดลองไม่พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ANOVA และ T-test, $p > 0.05$) (รูปที่ 1) หนูแฮมสเตอร์ในกลุ่ม control, immunized และ naïve มีน้ำหนักโดยเฉลี่ยตลอดการทดลองคือ 137.58 ± 4.41 , 140.45 ± 2.69 และ 133.18 ± 3.07 กรัม ตามลำดับ



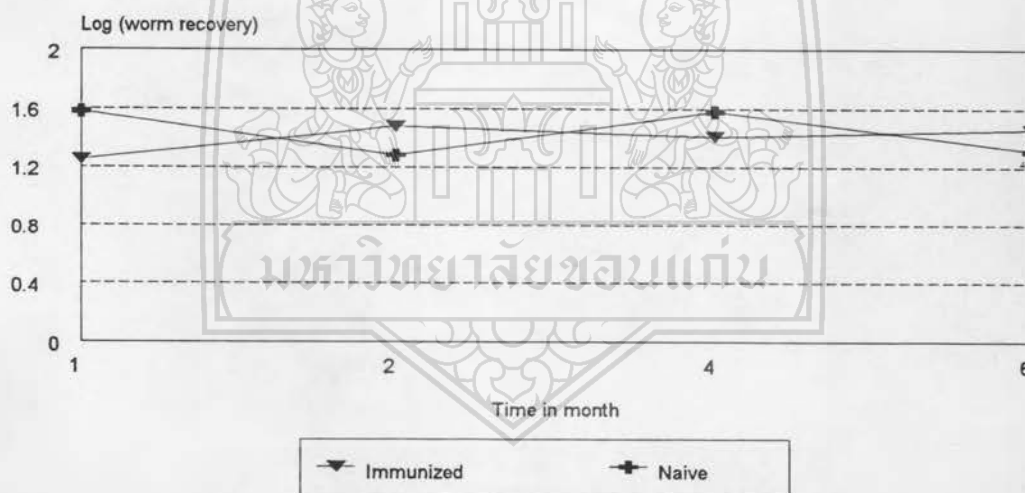
รูปที่ 1

เปรียบเทียบน้ำหนักเฉลี่ยของสัตว์ทดลองระหว่างกลุ่ม control, immunized และ naïve ในช่วงเวลา 1, 2, 4 และ 6 เดือน หลังจากติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ

4.1.2 จำนวนพยาธิตัวแก่

ผลการตรวจนับจำนวนพยาธิตัวแก่ในท่อน้ำดีและถุงน้ำดีของแฮมสเตอร์ พบว่าภายในกลุ่ม immunized และ naive มีจำนวนพยาธิตัวเต็มวัย (log worm recovery) ตลอดการทดลองในแต่ละช่วงเวลาต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ANOVA, $F=15.36$, $F=59.8$ ตามลำดับ และ $p < 0.05$) โดยกลุ่ม immunized ในช่วงเดือนแรกพบมีจำนวนพยาธิน้อยกว่าช่วงอื่น เพิ่มขึ้นในเดือนที่ 2 แล้วคงที่ในเดือนที่ 4 และ 6 ส่วนในกลุ่ม naive นั้นพบว่ามีจำนวนพยาธิมากที่สุดในเดือนแรกแล้วลดลงในเดือนที่ 2 เพิ่มขึ้นอีกในเดือนที่ 4 แล้วกลับลดลงในเดือนที่ 6 (รูปที่ 2)

เปรียบเทียบจำนวนพยาธิระหว่างกลุ่ม immunized และ naive พบว่ากลุ่ม naive มีพยาธิในช่วงเดือนแรกและเดือนที่ 4 มากกว่ากลุ่ม immunized อย่างมีนัยสำคัญ (T-test, $t = 13.36$, $t = 3.07$ ตามลำดับ และ $p < 0.05$) ในขณะที่ช่วงเดือนที่ 2 และ เดือนที่ 6 หลังการติดเชื้อพยาธิกลุ่ม immunized พบมากกว่ากลุ่ม naive มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (T-test, $t=6.10$, $t=4.50$ ตามลำดับและ $p < 0.05$)



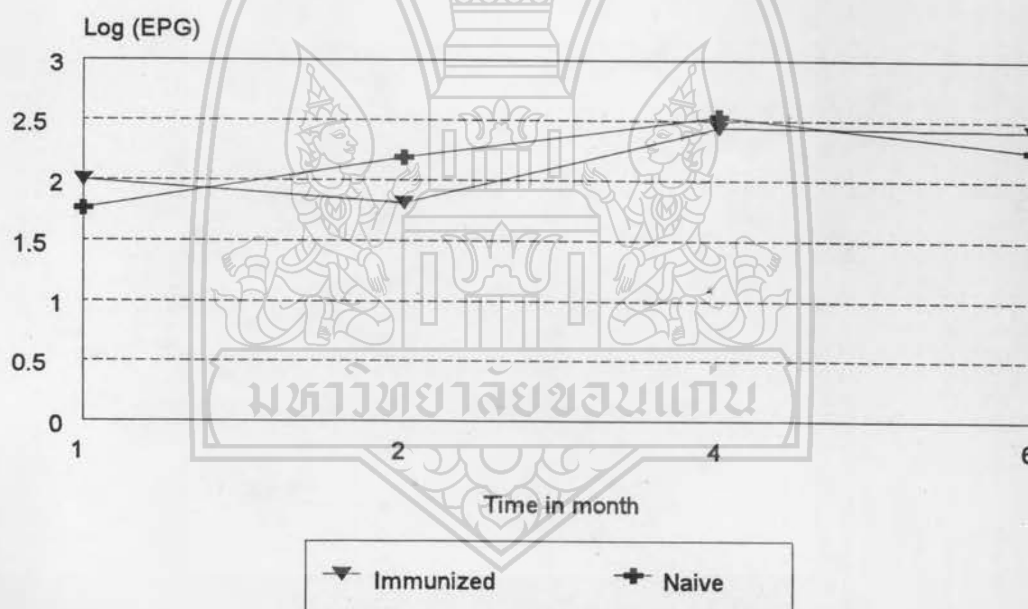
รูปที่ 2

จำนวนเฉลี่ยพยาธิใบไม้ตับ (log worm recovery) ที่ตรวจพบในแต่ละช่วงเวลาภายหลังการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ 50 metacercaria/hamster ของกลุ่ม immunized และ naive

4.1.3 จำนวนไข่พยาธิในมูลสัตว์ทดลอง

จำนวนไข่พยาธิในกลุ่ม immunized และ naive ในแต่ละช่วงเวลามีจำนวนใกล้เคียงกันและมีรูปแบบการออกไข่ของพยาธิตัวแก่คล้ายคลึงกัน โดยจำนวนไข่พยาธิจะเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงเดือนที่ 4 และลดลงเล็กน้อยในเดือนที่ 6 (รูปที่ 3)

การออกไข่ของพยาธิตัวแก่ภายในกลุ่ม immunized เมื่อเปรียบเทียบกับทุกช่วงเวลาพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ANOVA, $F = 11.81$, $p < 0.05$) และภายในกลุ่ม naive ก็มีการออกไข่ของพยาธิตัวแก่ในแต่ละช่วงเวลาต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน (ANOVA, $F = 20.35$, $p < 0.05$) แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทั้งสองนี้ในช่วงเวลาเดียวกัน คือ 1, 2, 4 และ 6 เดือน จำนวนไข่พยาธิที่ตรวจพบ ได้ค่าที่ใกล้เคียงกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (T-test, $t = 0.01, 0.85, 0.83$ และ 1.41 ตามลำดับ, $p > 0.05$)

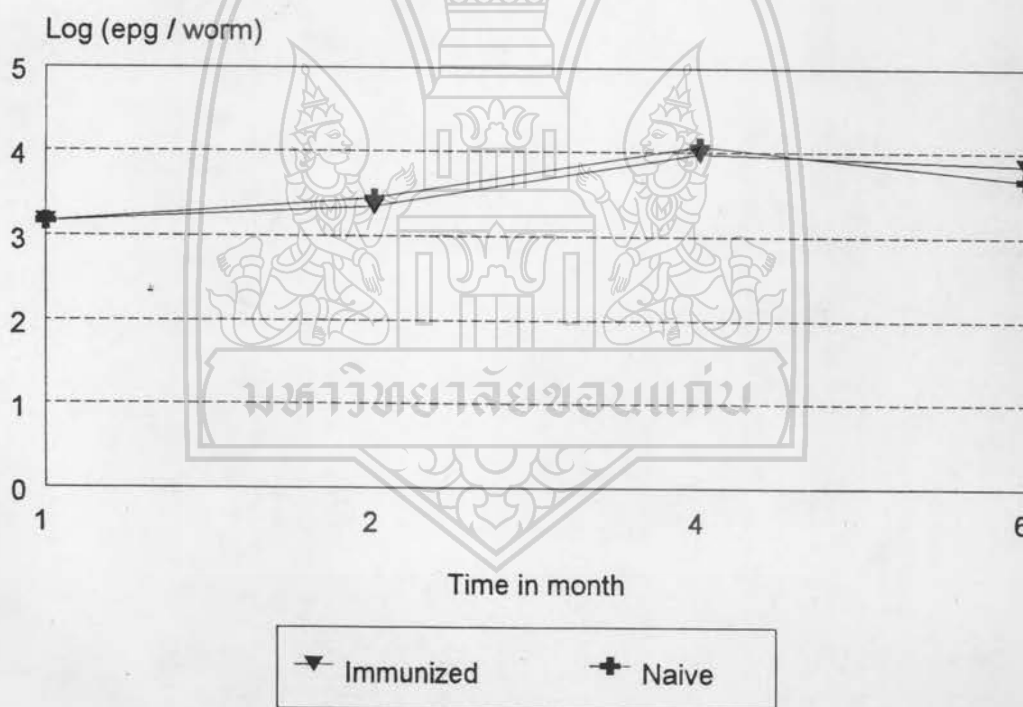


รูปที่ 3

แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนไข่ของพยาธิใบไม้ตับ (log epg) ที่ตรวจพบในมูลแฮมสเตอร์เปรียบเทียบกับในแต่ละช่วงเวลาระหว่างกลุ่ม immunized และ naive

4.1.4 การออกไข่ของพยาธิใบไม้ตับ (Log epg/worm)

เมื่อนำผล epg มาคำนวณต่อจำนวนตัวแก่ของพยาธิ (epg/worm) จะเห็นว่าโดยรวมแล้วมีรูปแบบคล้ายคลึงกันและในกลุ่ม naive การออกไข่ของพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ตั้งแต่เริ่มการทดลองมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ แล้วลดลงเล็กน้อยในช่วงเดือนที่ 6 ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ANOVA, $F = 13.78$, $p < 0.05$) (รูปที่ 4) ส่วนในกลุ่ม immunized ในช่วงเดือนแรกพบการออกไข่ของพยาธิมากกว่ากลุ่ม naive เล็กน้อยแล้วลดต่ำลงในเดือนที่ 2 และเดือนที่ 4 ซึ่งต่ำกว่ากลุ่ม naive แล้วลดลงเล็กน้อยในเดือนที่ 6 (ANOVA, $F=2.66$, $p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบการออกไข่ของพยาธิระหว่างกลุ่ม immunized และ naive ในทุกช่วงเวลาทั้งที่ 1, 2, 4 และ 6 เดือนหลังการติดเชื้อพยาธิ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (T-test, $t = 1.03$, $t = 2.18$, $t = 0.50$, $t = 0.85$ ตามลำดับ และ $p > 0.05$)

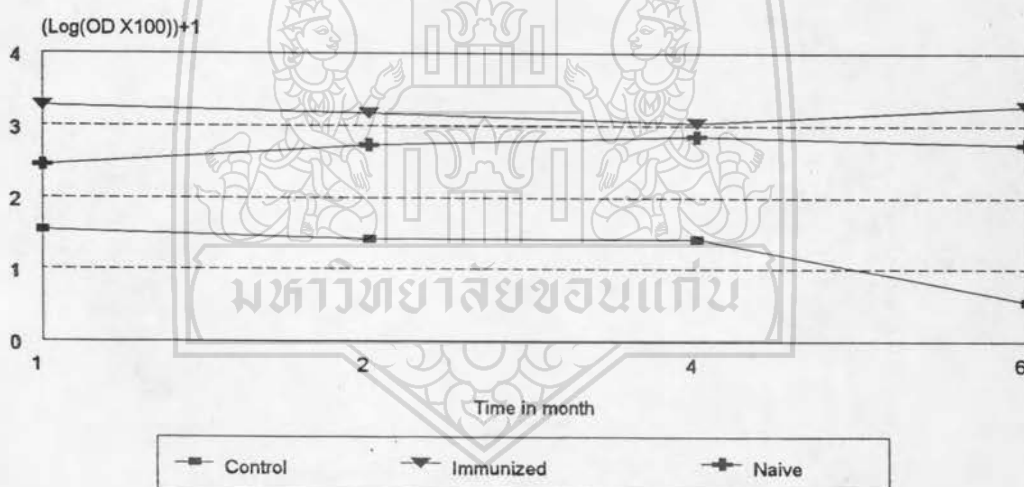


รูปที่ 4

แสดงค่าเฉลี่ยการออกไข่ของพยาธิใบไม้ตับ (epg/worm) เปรียบเทียบกันในแต่ละช่วงเวลาระหว่างกลุ่ม immunized และ naive

4.1.5 ระดับแอนติบอดีจำเพาะต่อพยาธิใบไม้ตับ

การตรวจวัดระดับ IgG ที่จำเพาะต่อพยาธิใบไม้ตับ ในซีรัมแอมสเตอร์ ของกลุ่ม control, immunized และ naive ในทุกช่วงเวลา พบว่ากลุ่ม immunized มีระดับ IgG ต่อพยาธิสูงกว่ากลุ่ม control และ naive (รูปที่ 5) อย่างมีนัยสำคัญ (T-test, $p < 0.05$) ยกเว้นในช่วงเดือนที่ 4 ต่างจากกลุ่ม naive เพียงเล็กน้อย (T-test, $t=1.33$, $p>0.05$) โดยจะมีค่าสูงสุดในช่วงเดือนแรกแล้วจะลดลงและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอีกครั้งหนึ่งในเดือนที่ 6 ส่วนในกลุ่ม naive ระดับ IgG นั้น ต่ำกว่ากลุ่ม immunized โดยจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อเริ่มต้นการทดลอง และลดต่ำลงเล็กน้อยในช่วงเดือนที่ 6 และระดับ IgG ในกลุ่ม naive สูงกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ (T - test, $p < 0.05$) ตลอดการทดลอง จะเห็นว่าหนูในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนของพยาธิจะมีการสร้างแอนติบอดีจำเพาะ IgG ต่อพยาธิสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจนของพยาธิ

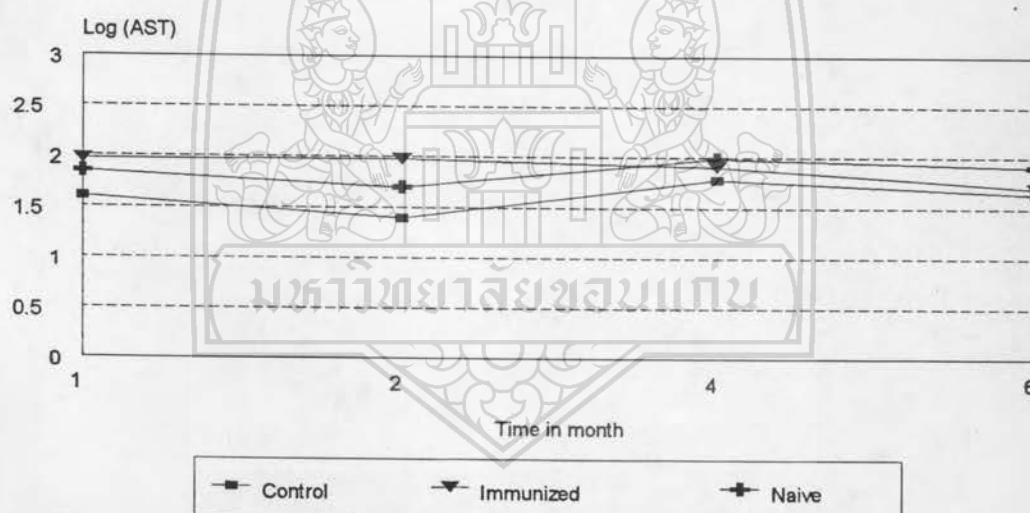


รูปที่ 5

เปรียบเทียบระดับแอนติบอดีจำเพาะ IgG ต่อแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับในแต่ละช่วงเวลาระหว่างกลุ่ม control, immunized และ naive หลังการติดเชื้อพยาธิ

4.1.6 ระดับเอนไซม์ในซีรัม

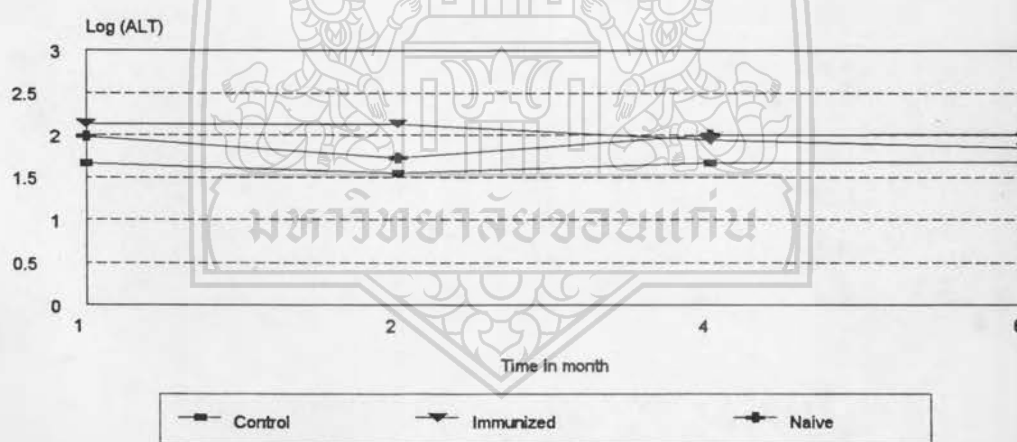
ผลการตรวจวัดระดับ Aspartate amino transferase (AST) ในซีรัมแฮมสเตอร์ในกลุ่ม immunized ในช่วงสองเดือนแรก หลังจากสัตว์ทดลองติดเชื้อพยาธิ ระดับเอนไซม์ AST พบสูงกว่ากลุ่มอื่น ๆ โดยเฉพาะในช่วงเดือนที่สอง ซึ่งพบมากกว่ากลุ่ม naive อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (T - test, $t = 2.70$ และ $p < 0.05$) (รูปที่ 6) และมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อยในช่วงเดือนที่ 4 และ 6 ซึ่งต่ำกว่ากลุ่ม naive โดยเฉพาะในช่วงเดือนที่ 6 พบระดับเอนไซม์ AST ต่ำกว่ากลุ่ม naive อย่างมีนัยสำคัญ (T - test, $t = 2.47$ และ $p < 0.05$) และมีระดับเอนไซม์ใกล้เคียงกับกลุ่ม control ส่วนในกลุ่ม naive ในช่วงเดือนแรก พบระดับเอนไซม์ AST ในซีรัมต่ำกว่ากลุ่ม immunized ลดลงเล็กน้อยในช่วงเดือนที่ 2 และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในเดือนที่ 4 และ 6 โดยเฉพาะเดือนที่ 6 มีระดับเอนไซม์สูงกว่ากลุ่ม immunized อย่างมีนัยสำคัญ (T - test, $t = 2.47$ และ $p < 0.05$) กลุ่ม control ซึ่งไม่ได้รับพยาธิและแอนติเจนพบมีระดับเอนไซม์ต่ำกว่ากลุ่มอื่นและระดับเอนไซม์ของกลุ่มนี้ตลอดการทดลองเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย (ANOVA, $F = 1.88$, $p > 0.05$)



รูปที่ 6

เปรียบเทียบระดับ Aspartate amino transferase (AST) (IU/L) ในแต่ละช่วงเวลาของกลุ่ม control, immunized และ naive

ผลการตรวจวัดระดับ Alanine amino transferase (ALT) ในซีรัมแฮมสเตอร์ พบการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ ALT ในกลุ่ม immunized มีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (ANOVA, $F=4.51$, $p<0.05$) (รูปที่ 7) โดยในช่วงเดือนที่ 1 และ 2 ระดับเอนไซม์ ALT ในซีรัมสูงกว่ากลุ่มอื่น ๆ ซึ่งในเดือนที่สองของกลุ่มนี้พบระดับเอนไซม์ ALT มากกว่ากลุ่ม control และ naive อย่างมีนัยสำคัญ (T-test, $t = 4.86$, $t = 3.52$ ตามลำดับ และ $p < 0.05$) ส่วนในเดือนที่ 4 และ 6 ระดับเอนไซม์มีแนวโน้มลดลงต่ำกว่ากลุ่ม naive เล็กน้อย (T-test, $t = 0.68$, $p > 0.05$ และ $t = 1.90$, $p > 0.05$ ตามลำดับ) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์นี้ในกลุ่ม control และ naive (ANOVA, $p > 0.05$) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม naive กับ control พบต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในช่วงเดือนที่ 1, 4 และ 6 เท่านั้น (T-test, $t = 2.64$, 3.49 , 3.84 ตามลำดับ, $p < 0.05$) เอนไซม์ ALT พบเฉพาะในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับเท่านั้น การตรวจพบเอนไซม์ ALT ในซีรัมแฮมสเตอร์ แสดงว่าเซลล์ตับนั้นถูกทำลาย ในกลุ่ม immunized พบระดับเอนไซม์นี้สูงในช่วงสองเดือนแรก และลดลงเรื่อย ๆ ในเดือนที่ 4 และ 6 ซึ่งมีระดับเอนไซม์นี้ใกล้เคียงกัน (T-test, $t = 1.49$, $p > 0.05$)

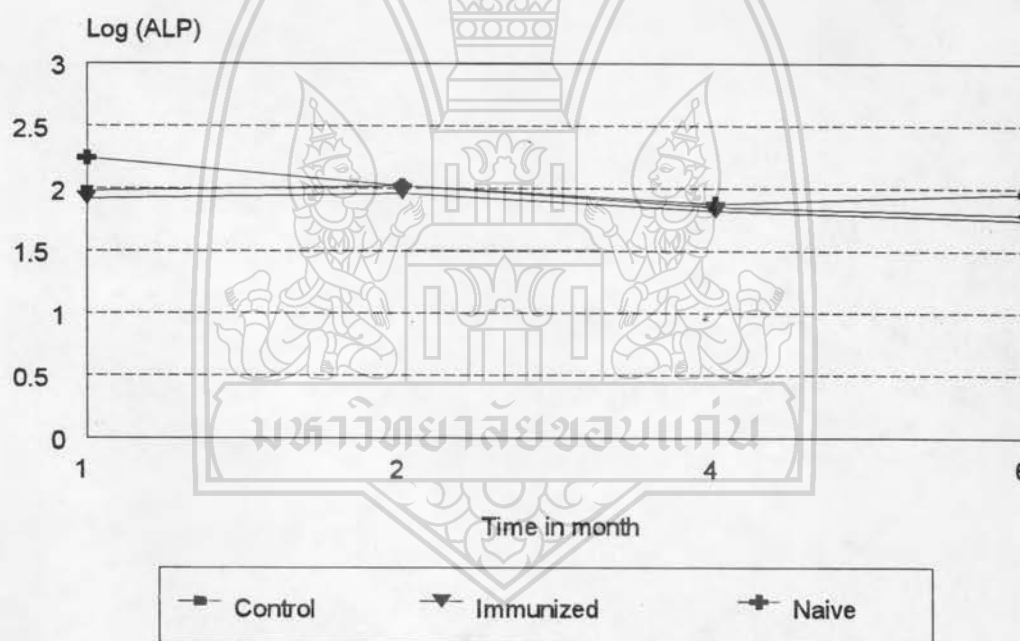


รูปที่ 7

เปรียบเทียบระดับ Alanine amino transferase (ALT) (IU/L) ในแต่ละช่วงเวลาของกลุ่ม control, immunized และ naive

ผลการตรวจวัดระดับ Alkaline Phosphatase (ALP) ในซีรัมแฮมสเตอร์กลุ่ม control, immunized และ naive พบว่า ในทุกกลุ่มระดับเอนไซม์ ALP มีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (ANOVA, $F=15.06$, $F=9.41$, $F=7.07$ ตามลำดับและ $p < 0.05$) (รูปที่ 8)

เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่ม พบว่า ในช่วงเดือนแรกของกลุ่ม naive ระดับเอนไซม์ในซีรัมแฮมสเตอร์สูงกว่ากลุ่ม control และ immunized ($t = 3.78$, $t=4.40$ ตามลำดับและ $p < 0.05$) ในช่วงเดือนที่ 2 ถึงเดือนที่ 4 ในทุกกลุ่มการทดลอง ระดับ ALP ในซีรัมลดต่ำลงในระดับที่ใกล้เคียงกันยกเว้นในเดือนที่ 6 กลุ่ม naive มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นต่างจากช่วงเดือนที่ 4 เพียงเล็กน้อยแต่ก็มีระดับที่สูงกว่ากลุ่ม control และ immunized อย่างมีนัยสำคัญ (T-test, $t=2.38$, $t=2.48$ ตามลำดับและ $p<0.05$) จากข้อมูลนี้จะเห็นว่า กลุ่ม naive ในช่วงเดือนแรกและเดือนที่ 6 ระดับเอนไซม์ ALP สูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ (T-test, $p<0.05$)



รูปที่ 8 เปรียบเทียบระดับ Alkaline phosphatase (ALP) (IU/L) ในแต่ละช่วงเวลาของกลุ่ม control, immunized และ naive ในช่วงเวลาต่าง ๆ

ผลการตรวจระดับเอนไซม์หน้าที่ตับในซีรัมแอสเตอร์ สรุปได้ว่า ในช่วงสองเดือนแรกของการทดลองกลุ่ม immunized และ naive เซลล์ตับถูกทำลายเป็นจำนวนมาก สามารถตรวจพบระดับของเอนไซม์ AST และ ALT ในซีรัมแอสเตอร์ มีระดับค่อนข้างสูง แต่เมื่อเวลานานขึ้น ระดับของเอนไซม์นี้ใกล้เคียงกัน โดยกลุ่ม naive และสูงกว่ากลุ่ม immunized เล็กน้อย ส่วนระดับเอนไซม์ ALP ไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างกลุ่มการทดลอง

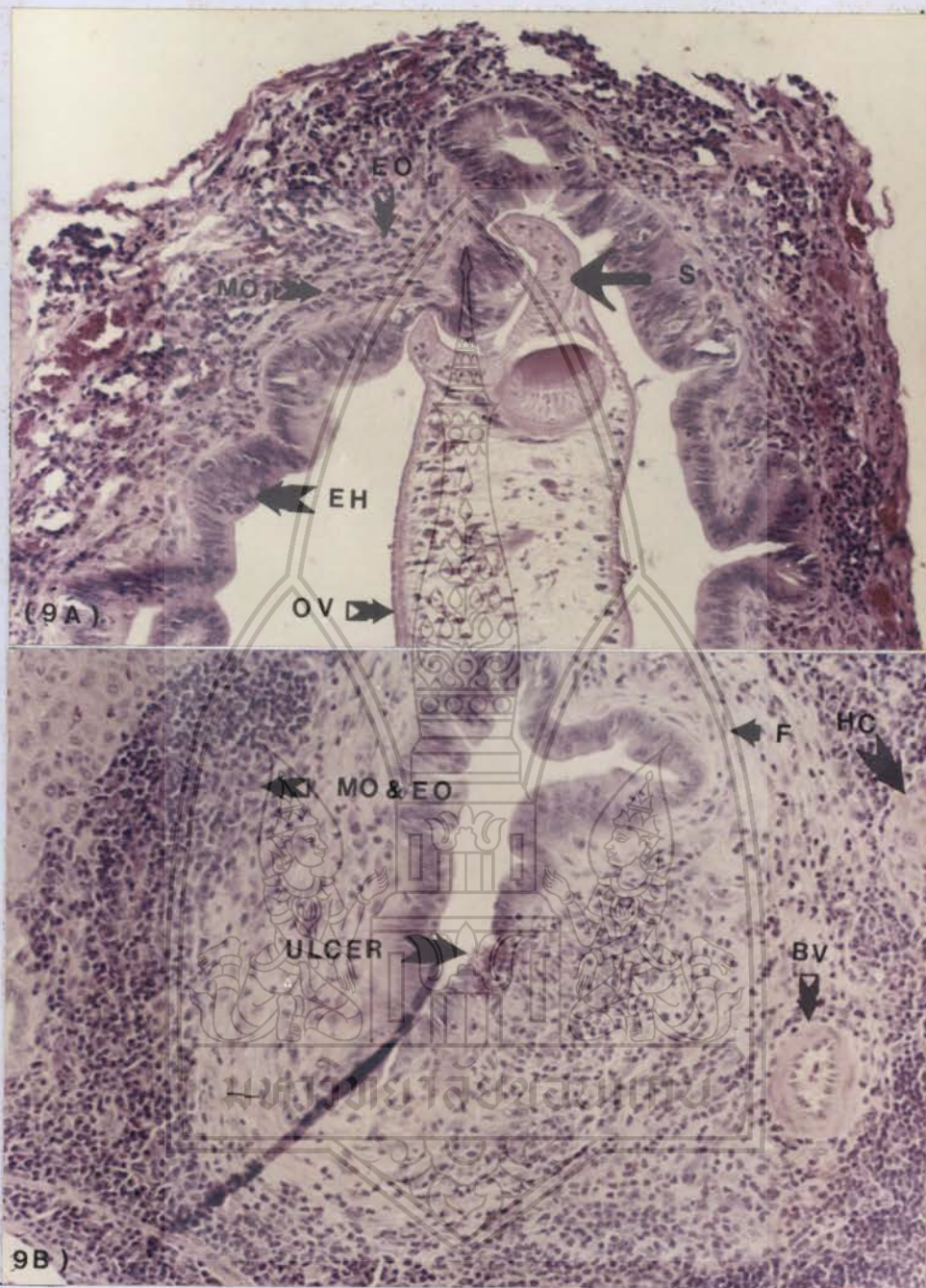
4.1.7 พยาธิสภาพของท่อน้ำดี

การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของระบบท่อน้ำดีและเนื้อเยื่อตับในกลุ่ม control ไม่พบการเปลี่ยนแปลงน้อยอย่างมีนัยสำคัญ แต่ในกลุ่ม immunized และ naive พบการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาที่สำคัญคือ ในเนื้อเยื่อตับแอสเตอร์ทุกตัวจะพบการอักเสบเกิดขึ้นบริเวณ second order duct และ second order main duct มีเซลล์เยื่อบุผนังท่อน้ำดีเพิ่มจำนวนมากขึ้น หนาขึ้น (reactive epithelial hyperplasia) มีเซลล์ประเภท mononuclear cell และ eosinophil แทรกตัวเข้ามามีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์เยื่อบุผนังท่อน้ำดีเป็น goblet cell metaplasia เยื่อบุผนังท่อน้ำดีมีทั้งหลุดลอก (desquamation) ตลอดจนมีการแบ่งตัวของเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้น จนกระทั่งมีลักษณะเหมือนนิ้วมือยื่นเข้าไปในรูท่อน้ำดี ผนังท่อน้ำดีในชั้น submucosa หนาขึ้น เนื่องจากมี fibrous tissue แทรกตัวเข้ามา พบ egg and parasite granuloma ที่เยื่อบุผนังท่อน้ำดีและที่เนื้อเยื่อตับ นอกจากนี้ยังตรวจพบ lymphoid follicle ซึ่งเป็นการรวมกลุ่มกันของ lymphocyte ในบริเวณที่มีการอักเสบของท่อน้ำดี

รูปที่ 9

แสดง sucker ของพยาธิยัดเกาะที่เยื่อผนังท่อน้ำดีทำให้เซลล์ของเยื่อท่อน้ำดีเพิ่มจำนวนมากขึ้นและมี inflammatory cell แทรกตัวเข้ามา (9 A; H&E, 3.3 x 4 X naive group at 2nd month) มีการหลุดลอก (desquamation) ของเยื่อผนังท่อน้ำดี (9 B; H&E, 3.3x4X; naive group at 1st month) fibrous tissue แทรกตัวเข้ามาในชั้น submucosa ของท่อน้ำดีบางบริเวณพบการตายของเซลล์ตับ

สัญลักษณ์ : BV = blood vessels EH = epithelial hyperplasia
 EO = eosinophils F = Fibroblast cell
 HC = hepatocyte MO = mononuclear cell
 S = sucker OV = *Opisthorchis viverrini*



รูปที่ 10

แสดงการเปลี่ยนแปลง เพิ่มจำนวนเซลล์เยื่อผนังท่อน้ำดี (cell proliferation) และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เป็นชนิด goblet cell metaplasia ที่เยื่อผนังท่อน้ำดีชั้น submucosa ของท่อน้ำดีพบ fibrous tissue หนาตัวมากขึ้น เป็นวงรอบท่อน้ำดีและพบ bile ductule proliferation และพบการชุมนุมกันของเซลล์จำพวก mononuclear cell (10 A; H&E, 3.3x4X, naive group at 2nd month) บริเวณที่อยู่ห่างจาก second order duct ออกไป จะพบท่อน้ำดีขนาดเล็ก (bile ductule) ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาที่พบคือ เกิดการอักเสบของท่อน้ำดีขนาดเล็ก มี inflammatory cell มาชุมนุมรอบท่อน้ำดี และพบท่อน้ำดีเพิ่มจำนวนมากขึ้น (bile ductule proliferation) (10 B; H&E, 3.3x4, naive group at 1st month)

สัญลักษณ์ : EH = epithelial hyperplasia

LF = lymphoid follicle

F = fibroblast

GC = goblet cell

MO = mononuclear cell

BD = bile ductule

OV = *Opisthorchis viverrini*



รูปที่ 11

แสดงการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อบริเวณรอบ ๆ hepatocyte lobule พบ fibrous tissueแทรกตัวเข้ามาเกิดลักษณะ second biliary cirrhosis (11 A; H&E, 3.3x4X, immunized group at 4th month) ในรายที่มีลักษณะพยาธิสภาพรุนแรงพบ fibrous tissue, mononuclear cell infiltration, regeneration nodule และ ductule proliferation เกิดขึ้นทั่วไปของเนื้อเยื่อตับ (11 B; H&E, 3.3x4X, immunized group 4th month)

สัญลักษณ์ : BD = bile ductule

MO = mononuclear cell

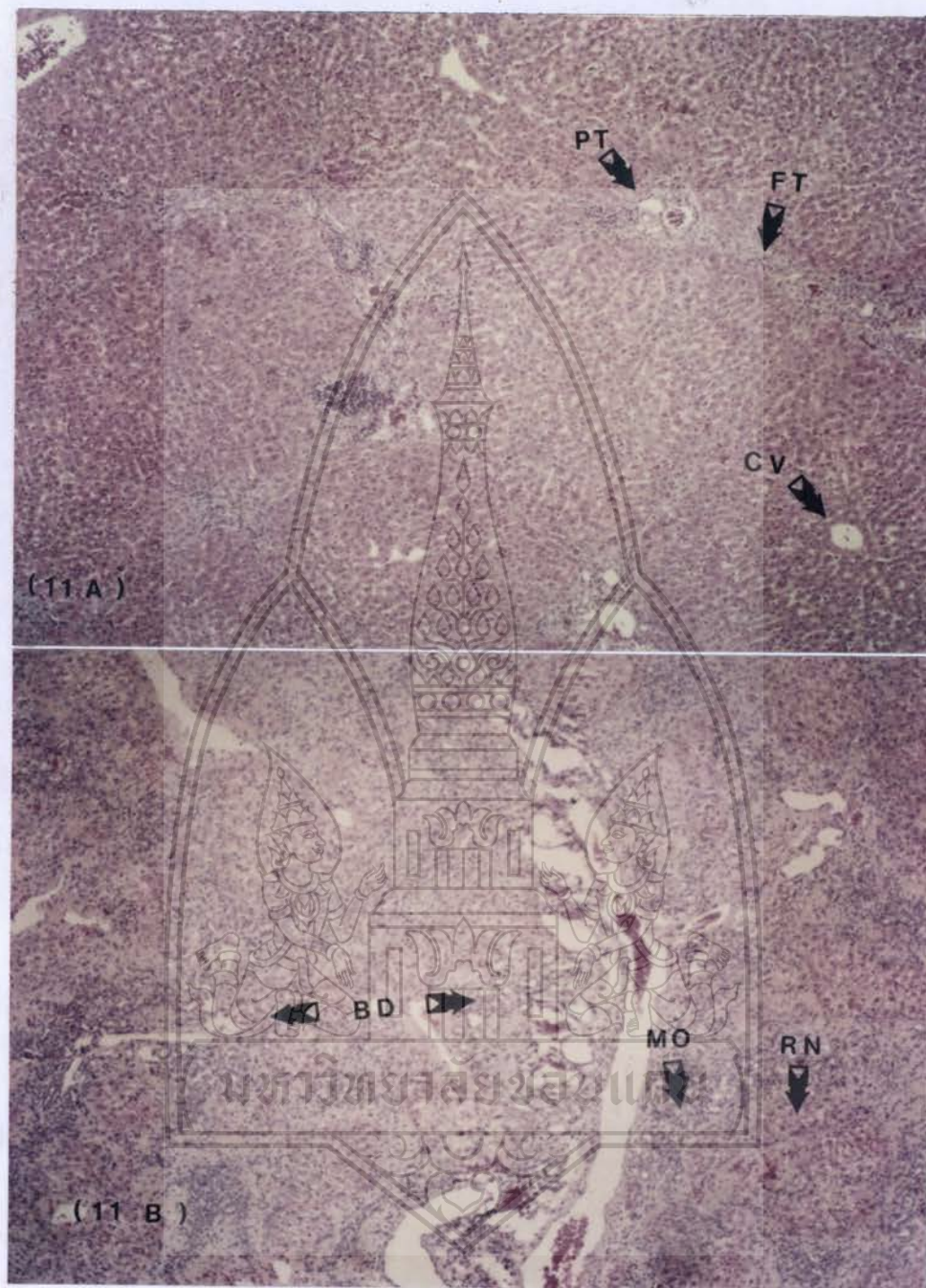
CV = central vein

FT = fibrous tissue

RN = regeneration nodule

LF = lymphoid follicle

PT = portal triad

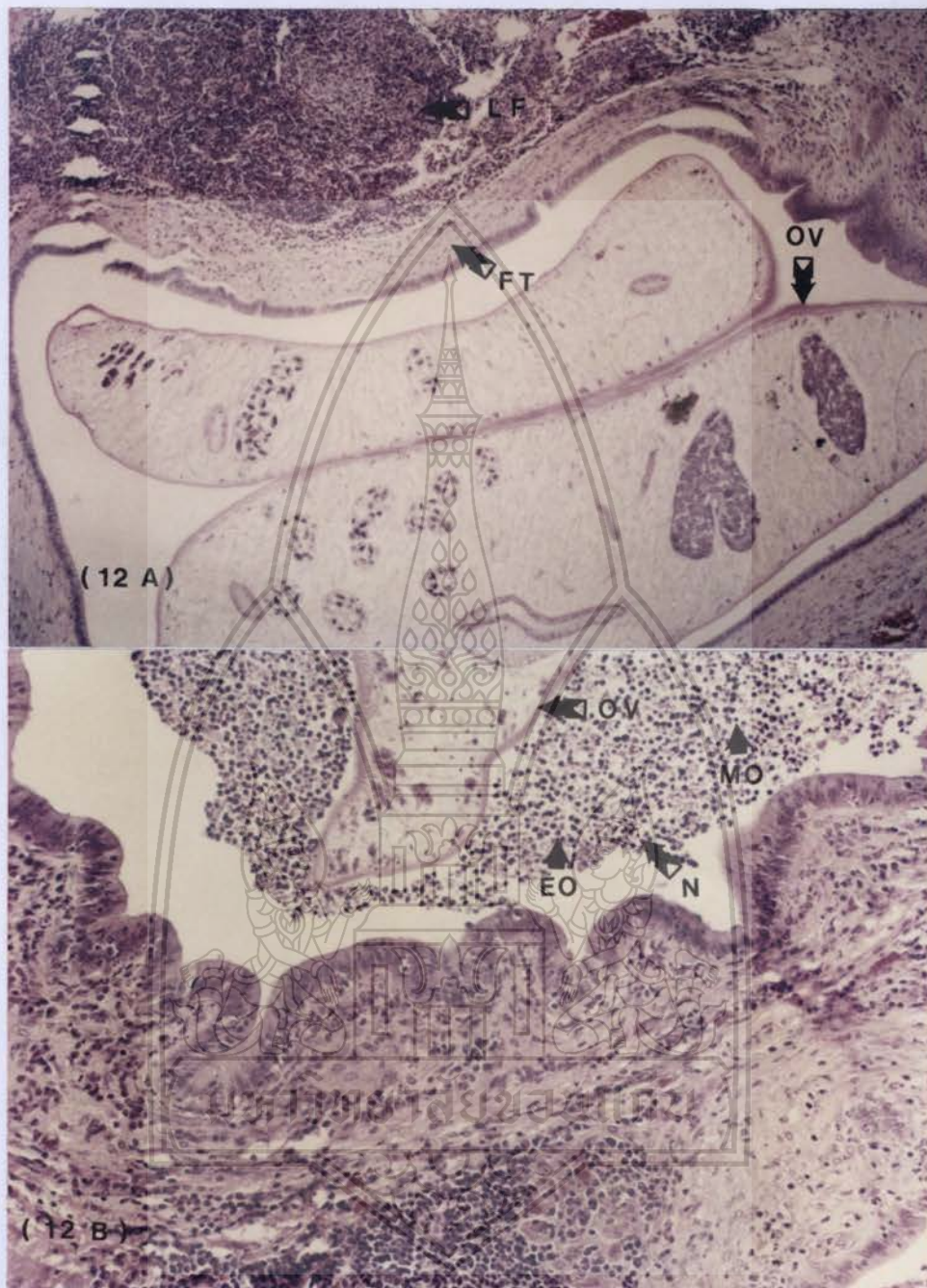


รูปที่ 12

แสดงการรวมกลุ่มของ mononuclear cell ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็น
เซลล์จำพวก lymphocyte รวมกลุ่มกันเป็น lymphoid follicle
(12 A; H&E 3.3x4X; immunized group at 4th month) พบ
mononuclear cell และซากเซลล์ที่ตายรอบ ๆ ตัวพยาธิในท่อน้ำดี
(12 B; H&E 3.3x4X; naive group at 4th month)

สัญลักษณ์ : EO = eosinophils FT = fibrous tissue
 LF = lymphoid follicle N = neutrophils
 MO = mononuclear cell
 OV = *Opisthorchis viverrini*

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

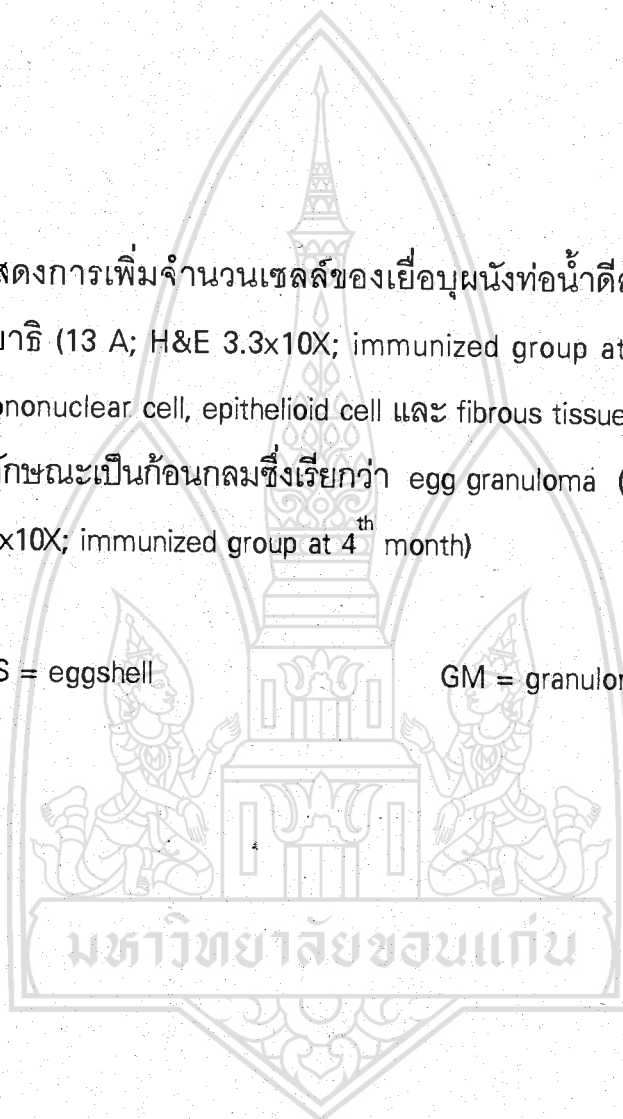


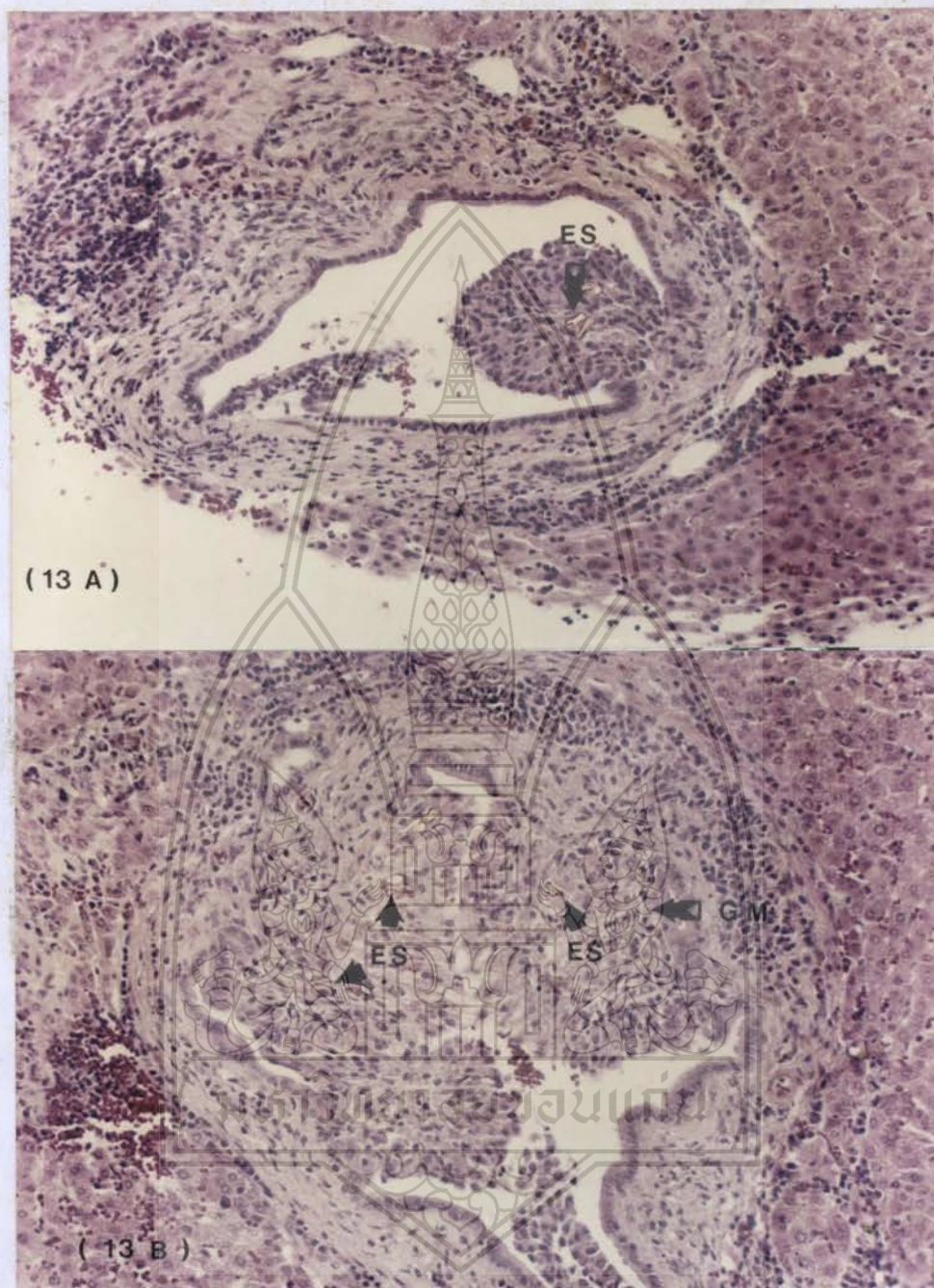
รูปที่ 13

แสดงการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเยื่อผนังท่อน้ำดีล้อมรอบไข่
พยาธิ (13 A; H&E 3.3x10X; immunized group at 4th month)
mononuclear cell, epithelioid cell และ fibrous tissue ล้อมรอบไว้
มีลักษณะเป็นก้อนกลมซึ่งเรียกว่า egg granuloma (13 B; H&E
3.3x10X; immunized group at 4th month)

สัญลักษณ์ : ES = eggshell

GM = granuloma



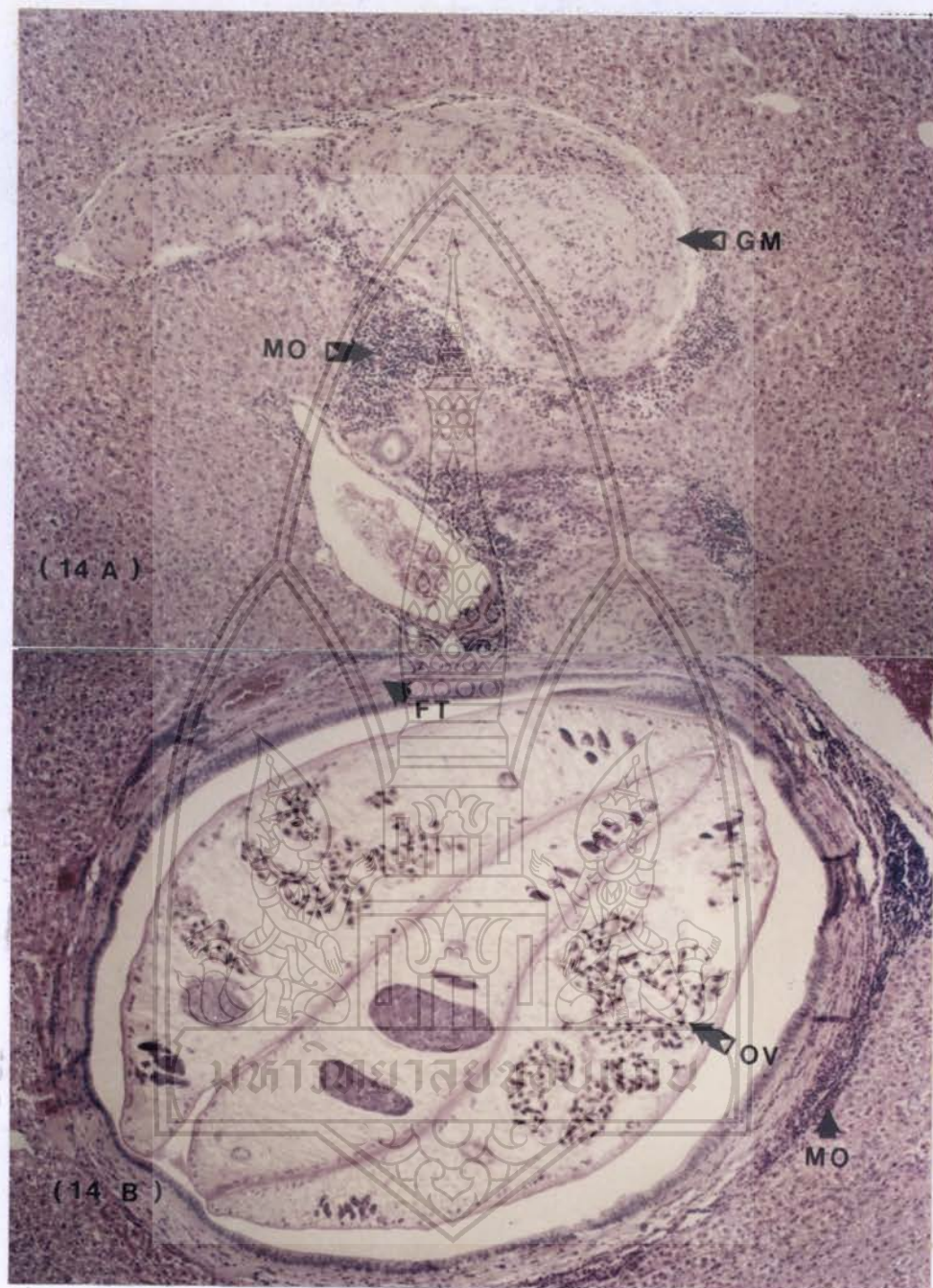


รูปที่ 14

การติดเชื้อพยาธิที่เกิดขึ้นเป็นระยะเวลานาน grannuloma ก็ยังคงปรากฏอยู่ (14 A; H&E 3.3x4X; immunized group at 6th month) การชุมนุมของ mononuclear cell พบได้น้อยที่บริเวณรอบท่อน้ำดี second order main duct ที่มีตัวพยาธิอาศัยอยู่ ส่วนชั้น submucosa ของท่อน้ำดีพบ fibrous tissue มีความหนาลดน้อยลง (14 B; H&E 3.3x4X; immunized group at 6th month)

สัญลักษณ์ : FT = fibrous tissue GM = granuloma
MO = mononuclear cell
OV = *Opisthorchis viverrini*

มหาวิทยาลัยขอนแก่น



4.1.8 Mononuclear cell infiltration

แฮมสเตอร์ที่มีติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ (*O. viverrini*) จะมีลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับเป็นการอักเสบแบบเรื้อรัง (chronic inflammation) ซึ่งพบได้ตั้งแต่เดือนแรกของการทดลองโดยพบ mononuclear cells, macrophage, และ lymphocyte มาชุมนุมอยู่ในบริเวณที่มีการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบ ๆ ท่อน้ำดี second order duct และ second order main duct (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนความถี่ของ mononuclear cell infiltration บริเวณที่มีการอักเสบของเนื้อเยื่อตับรอบท่อน้ำดี second order duct และ second order main duct ในตับหนูแฮมสเตอร์ในแต่ละช่วงเวลาระหว่างกลุ่ม immunized และ naive

Time (month)	Immunized group							Naive group						
	n	grading score					Mean $\pm$ SD	n	grading score					Mean $\pm$ SD
		1	2	3	4	5			1	2	3	4	5	
1	20	0	3	8	2	7	3.65 ± 1.13	21	0	1	5	3	12	4.23 ± 0.99
2	15	0	9	4	0	2	2.66 ± 1.04	15	0	3	4	5	3	$3.53 \pm 1.06^*$
4	25	0	18	3	3	1	2.48 ± 0.87	20	0	6	7	4	3	$3.20 \pm 1.05^*$
6	20	0	15	0	2	3	2.81 ± 1.27	21	0	4	5	6	6	$3.66 \pm 1.11^*$

หมายเหตุ

n = จำนวนท่อน้ำดีที่ศึกษา

grading score 1 = not present, 2 = mild, 3 = moderate, 4 = severe, 5 = very severe

* = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ในทั้งสองกลุ่มการทดลองนี้ พบรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของ mononuclear cell infiltration มีลักษณะที่คล้ายกันโดยในช่วงแรกพบได้จำนวนมาก และค่อย ๆ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญและจะกลับเพิ่มขึ้นอีกในเดือนที่ 6 (ANOVA, $F = 5.24$, $F = 3.42$ ของกลุ่ม immunized และ naive ตามลำดับ $p < 0.05$) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม naive และ

immunized พบว่า กลุ่ม naive มีจำนวน mononuclear cell มากกว่ากลุ่ม immunized โดยเฉพาะในช่วงเดือนที่ 2, 4 และ 6 ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (T-test, $t = 2.25$, $t = 2.50$, $t = 2.83$ ตามลำดับ และ $p < 0.05$) ส่วนในเดือนที่ 1 นั้นไม่มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญ (T-test, $t = 1.76$ และ $p = 0.08$)

4.1.9 Eosinophil infiltration

การอักเสบเนื่องจากการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับที่ยังคงมีอยู่เป็นเวลานาน (chronic inflammation) สามารถพบเซลล์ชนิด eosinophils ร่วมกับ mononuclear ได้ ด้วยแต่มีสัดส่วนของ eosinophils ที่พบได้น้อยกว่า ในบางตำแหน่งเซลล์ eosinophils จะหายไป แต่บางแห่งก็ยังคงเหลืออยู่ แต่โดยส่วนใหญ่จะมีปรากฏอยู่น้อยทั้งในกลุ่ม immunized และ naive ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (T-test, $p > 0.05$) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนความถี่ของเซลล์ eosinophils บริเวณที่มีการอักเสบของ เนื้อเยื่อตับรอบท่อน้ำดี second order duct และ second order main duct ในตับหนูแฮมสเตอร์ในแต่ละช่วงเวลาระหว่างกลุ่ม immunized และ naive

Time	Immunized group							Naive group						
(month)	n	grading score					Mean $\pm$ SD	n	grading score					Mean $\pm$ SD
		1	2	3	4	5			1	2	3	4	5	
1	15	0	15	0	0	0	2.00 $\pm$ 0	16	0	15	1	0	0	2.06 $\pm$ 0.06
2	15	0	15	0	0	0	2.00 $\pm$ 0	11	0	11	0	0	0	2.00 $\pm$ 0
4	22	0	22	0	0	0	2.00 $\pm$ 0	19	0	18	1	0	0	2.05 $\pm$ 0.05
6	15	0	14	1	0	0	2.06 $\pm$ 0.06	14	0	14	0	0	0	2.00 $\pm$ 0

หมายเหตุ

n = จำนวนท่อน้ำดีที่ศึกษา

grading score 1 = not present, 2 = mild, 3 = moderate, 4 = severe, 5 = very severe

4.1.10 Lymphoid follicle

บริเวณห่อการอักเสบของเนื้อเยื่อตับรอบท่อน้ำดี second order duct และ second order main duct พบการชุมนุมกันของ plasma cell และ lymphocyte เรียกลักษณะนี้ว่า lymphoid follicle (รูปที่ 12 A) ซึ่งมีขนาดแตกต่างกัน จำนวนที่พบโดยเฉลี่ยของ lymphoid follicle ในกลุ่ม immunized ทุกช่วงเวลาตลอดการทดลองไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ANOVA, $F = 0.74$, $p = 0.52$) และกลุ่ม naive ตลอดการทดลองมีจำนวนเฉลี่ยทุกช่วงเวลาตลอดการทดลองต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ANOVA, $F = 4.27$, $p < 0.05$) (ตารางที่ 4) เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มในช่วงเดือนแรก กลุ่ม naive พบจำนวนเฉลี่ย lymphoid follicle มีมากกว่ากลุ่ม immunized ซึ่งต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (T-test, $t = 3.72$ และ $p < 0.05$)

ตารางที่ 4 แสดงจำนวนความถี่ของ lymphoid follicle บริเวณที่มีการอักเสบของเนื้อเยื่อตับรอบท่อน้ำดี second order duct และ second order main duct ในตับหนูแฮมสเตอร์ในแต่ละช่วงเวลาระหว่างกลุ่ม immunized และ naive

Time (month)	Immunized group							Naive group						
	n	grading score					Mean $\pm$ SD	n	grading score					Mean $\pm$ SD
		1	2	3	4	5			1	2	3	4	5	
1	17	1	11	5	0	0	2.23 ± 0.56	19	0	5	6	5	3	$3.31 \pm 1.05^*$
2	15	5	7	3	0	0	1.86 ± 0.74	13	2	5	5	1	0	2.38 ± 0.86
4	24	6	8	9	1	0	2.20 ± 0.88	20	1	11	7	1	0	2.40 ± 0.68
6	15	5	2	8	0	0	2.20 ± 0.94	17	0	5	8	2	1	2.82 ± 0.95

หมายเหตุ

n = จำนวนท่อน้ำดีที่ศึกษา

grading score 1 = not present, 2 = mild, 3 = moderate, 4 = severe, 5 = very severe

* = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

4.1.11 การเปลี่ยนแปลงเพิ่มจำนวนเซลล์เยื่อบุผิวท่อน้ำดี

1. การเปลี่ยนแปลงเพิ่มจำนวนเซลล์เยื่อบุผิวท่อน้ำดี second order main duct ของแฮมสเตอร์ พบบีพยาธิใบไม้ตับ (*O. viverrini*) จำนวนตั้งแต่ 1 ถึง 3 ตัวที่อยู่ในบริเวณเดียวกัน(รูปที่ 14 B) เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงนี้ระหว่างกลุ่ม immunized และ naive พบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (T -test, $p > 0.05$) (ตารางที่ 5) ในทั้งสองกลุ่มนี้ตลอดการทดลองพบการเปลี่ยนแปลงน้อยมากไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ANOVA, กลุ่ม immunized, $F=1.23$, $p=0.31$; กลุ่ม naive, $F=0.66$, $p=0.57$)

ตารางที่ 5 แสดงความถี่ในการเพิ่มของเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial hyperplasia) ที่ท่อน้ำดี second order main duct ในแต่ละช่วงเวลาของกลุ่ม immunized และ naive

Time (month)	Immunized group							Naive group						
	n	severity score					Mean $\pm$ SD	n	severity score					Mean $\pm$ SD
		1	2	3	4	5			1	2	3	4	5	
1	10	0	10	0	0	0	2.0 ± 0.00	10	0	9	1	0	0	2.1 ± 0.09
2	10	0	7	2	0	1	2.5 ± 0.30	10	0	9	1	0	0	2.1 ± 0.09
4	10	0	7	3	0	0	2.5 ± 0.16	10	0	10	0	0	0	2.0 ± 0
6	10	1	5	3	0	1	2.6 ± 0.33	10	0	10	0	0	0	2.0 ± 0

หมายเหตุ

n = จำนวนสไลด์ของเนื้อเยื่อตับที่ใช้ในการศึกษา

severity score 1 = not present, 2 = mild, 3 = moderate, 4 = severe, 5 = very severe

2. การเปลี่ยนแปลงเพิ่มจำนวนเซลล์เยื่อบุผิวท่อน้ำดี second order duct ของตับหนูแฮมสเตอร์กลุ่ม immunized และ naive ในแต่ละช่วงเวลา พบการเปลี่ยนแปลงที่ไม่ค่อยแตกต่างกันมากนัก (ANOVA, $F=0.95$, $p=0.42$ และ $F=1.31$, $p=0.28$ ตามลำดับ) (ตารางที่ 6) เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงนี้ของกลุ่ม immunized และ naive ในช่วงเวลาเดียวกัน พบว่า ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (T - test, $p > 0.05$)

ตารางที่ 6 แสดงความถี่ในการเพิ่มของเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial hyperplasia) ที่ท่อน้ำดี second order duct ในแต่ละช่วงเวลาของกลุ่ม immunized และ naive

Time (month)	Immunized group							Naive group						
	n	severity score					Mean $\pm$ SD	n	severity score					Mean $\pm$ SD
		1	2	3	4	5			1	2	3	4	5	
1	10	0	10	0	0	0	2.0 ± 0.00	10	0	8	2	0	0	2.2 ± 0.13
2	10	0	7	2	0	1	2.5 ± 0.30	10	0	9	1	0	0	2.1 ± 0.09
4	10	0	7	3	0	0	2.5 ± 0.15	10	0	10	0	0	0	2.0 ± 0
6	10	1	5	3	0	1	2.5 ± 0.34	10	0	10	0	0	0	2.0 ± 0

หมายเหตุ

n = จำนวนสไลด์เนื้อเยื่อที่ใช้ศึกษา

severity score 1 = not present, 2 = mild, 3 = moderate, 4 = severe, 5 = very severe

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

4.1.12 การเปลี่ยนแปลง periductal fibrosis ที่ท่อน้ำดี

1. การเกิด periductal fibrosis บริเวณรอบท่อน้ำดี second order main duct มีลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา พบ fibroblast cell แทรกเข้ามาอยู่ในชั้น submucosa เรียงกันอยู่อย่างหนาแน่นล้อมรอบเยื่อบุผิวท่อน้ำดี (รูป 10 A) การเปลี่ยนแปลงนี้พบได้ตั้งแต่เดือนแรกของการติดเชื้อพยาธิ พบได้ทั้งในกลุ่ม immunized และ naive ความหนาของ periductal fibrosis นี้ในแต่ละช่วงเวลาตลอดการทดลองของกลุ่ม immunized มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (T - test, $t=3.96$, $t=2.49$ และ $p>0.05$) (ตารางที่ 7) เปรียบเทียบความหนาเฉลี่ยของ periductal fibrosis ระหว่างกลุ่ม immunized และ naive พบว่า ในช่วงระยะเวลาเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (T-test, $p > 0.05$) แต่จะเห็นว่าที่ 1 เดือนจะมีความแตกต่างกันค่อนข้างมาก ($t= 1.99$, $p=0.052$)

ตารางที่ 7 แสดงความถี่ของการเปลี่ยนแปลง periductal fibrosis รอบท่อน้ำดี second order main duct ในแต่ละช่วงเวลาของกลุ่ม immunized และ naive

Time (month)	Immunized group							Naive group						
	n	grading score					Mean $\pm$ SD	n	grading score					Mean $\pm$ SD
		1	2	3	4	5			1	2	3	4	5	
1	13	0	5	8	0	0	1.61 ± 0.14	33	0	23	10	0	0	1.3 ± 0.08
2	13	0	6	7	0	0	1.53 ± 0.14	18	0	11	7	0	0	1.38 ± 0.11
4	17	0	3	14	0	0	1.82 ± 0.09	18	0	5	10	2	1	1.94 ± 0.18
6	14	0	2	10	2	3	2.0 ± 0.14	19	0	7	11	1	0	1.68 ± 0.13

หมายเหตุ

n = จำนวนท่อน้ำดีที่ศึกษา

grading score 1 = not present, 2 = mild, 3 = moderate, 4 = severe, 5 = very severe

2. การเกิด periductal fibrosis บริเวณรอบท่อน้ำดี second order duct กลุ่ม immunized พบการเปลี่ยนแปลง periductal fibrosis ของท่อน้ำดีได้มากกว่ากลุ่ม naive ในช่วงเดือนแรกเท่านั้น (T-test, $t=4.37$ และ $p < 0.05$) (ตารางที่ 8) สำหรับในช่วงเวลาอื่น ถึงแม้กลุ่ม immunized จะมีความรุนแรงมากกว่าเล็กน้อย แต่ก็ไม่มี ความแตกต่าง กันทางสถิติ การเปลี่ยนแปลงนี้ในทั้งสองกลุ่มพบว่ามีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ ถ้า การติดเชื้อพยาธินั้นยังคงมีอยู่เป็นระยะเวลานาน (ANOVA, $F=6.89$, $F=19.67$ ตามลำดับ และ $p<0.05$)

ตารางที่ 8 แสดงความถี่ของการเปลี่ยนแปลง periductal fibrosis รอบท่อน้ำดี second order duct ในแต่ละช่วงเวลาของกลุ่ม immunized และ naive

Time (month)	Immunized group							Naive group						
	n	grading score					Mean $\pm$ SD	n	grading score					Mean $\pm$ SD
		1	2	3	4	5			1	2	3	4	5	
1	39	0	13	24	2	0	$1.71 \pm 0.08^*$	48	0	36	12	0	0	1.25 ± 0.09
2	35	0	15	16	4	0	1.68 ± 0.11	29	0	18	11	0	0	1.37 ± 0.09
4	41	0	8	30	3	0	1.87 ± 0.07	35	0	9	20	6	0	1.91 ± 0.11
6	36	0	3	23	7	3	2.27 ± 0.12	36	0	6	21	7	2	2.13 ± 0.12

หมายเหตุ

n = จำนวนท่อน้ำดีที่ศึกษา

grading score 1 = not present, 2 = mild, 3 = moderate, 4 = severe, 5 = very severe

* = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของ periductal fibrosis ที่ท่อน้ำดี second order main duct กับ second order duct ของกลุ่ม immunized พบว่าในช่วงระยะเวลาเดียวกัน เกิดการเปลี่ยนแปลงนี้ได้ใกล้เคียงกัน (ไม่ต่างกันทางสถิติ (T-test, $p>0.05$) สำหรับกลุ่ม naive จะแตกต่างกันเฉพาะในช่วงเดือนที่ 6 เท่านั้นที่พบการเปลี่ยนแปลง periductal

fibrosis ของ second order duct มากกว่า second order main duct (T-test, $t=2.27$ และ $p<0.05$)

4.1.13 การเปลี่ยนแปลงเพิ่มจำนวนท่อน้ำดีเล็ก (ductular proliferation)

ในกลุ่ม immunized พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มจำนวน ductular proliferation เมื่อติดเชื้อพยาธิานขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ANOVA, $p<0.05$) (ตารางที่ 9) ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับกลุ่ม naive พบเฉพาะในช่วงเดือนที่ 1 กับ 6 และเดือนที่ 2 กับ 6 เท่านั้นที่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (T-test, $t=8.19$, $t=5.87$ และ $p<0.05$) เปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่ม immunized และ naive ในช่วงเวลาเดียวกัน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (T-test, $p>0.05$)

ตารางที่ 9 แสดงผลของการเปลี่ยนแปลงการเพิ่มจำนวนท่อน้ำดีเล็ก (ductular proliferation) ในกลุ่ม immunized และ naive ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ กัน

Time (month)	Immunized group						Naive group					
	n	severity score					n	severity score				
		1	2	3	4	5		1	2	3	4	5
1	10	0	9	1	0	0	10	0	10	0	0	0
2	10	0	9	1	0	0	10	0	9	1	0	0
4	10	0	3	4	3	0	10	0	7	2	1	0
6	10	0	3	2	3	2	10	0	4	4	1	1

หมายเหตุ

n = จำนวนสไลด์เนื้อเยื่อตับที่ใช้ศึกษา

severity score 1 = not present, 2 = mild, 3 = moderate, 4 = severe, 5 = very severe

4.1.14 การเปลี่ยนแปลงของ Secondary biliary cirrhosis

ในกลุ่ม immunized พบ secondary biliary cirrhosis ตลอดการทดลอง และการเปลี่ยนแปลงนี้เกิดขึ้นได้ใกล้เคียงกัน (ANOVA, $F=2.79$, $p=0.053$) (ตารางที่ 10) สำหรับกลุ่ม naive ตลอดการทดลอง 6 เดือนพบว่าการเปลี่ยนแปลงน้อยไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญ (ANOVA, $F=2.25$, $p=0.09$) เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงนี้ระหว่าง กลุ่มทั้งสองในระยะเวลาเดียวกันพบว่า secondary biliary cirrhosis ในกลุ่ม immunized พบได้มากกว่ากลุ่ม naive อย่างมีนัยสำคัญในทุก ๆ ระยะเวลา (T-test, $p<0.05$)

ตารางที่ 10 แสดงความถี่ของการเปลี่ยนแปลง secondary biliary cirrhosis ในตัวหนูแฮมสเตอร์ในกลุ่ม immunized และ naive ในช่วงเวลาต่าง ๆ

Time		Immunized group						Naive group						
(month)	n	severity score					Mean $\pm$ SD	n	severity score					Mean $\pm$ SD
		1	2	3	4	5			1	2	3	4	5	
1	10	0	9	1	0	0	$2.10 \pm 0.09^*$	10	10	0	0	0	0	1.00 ± 0.00
2	10	0	6	2	2	0	$2.60 \pm 0.26^*$	10	10	0	0	0	0	1.00 ± 0.00
4	10	0	8	4	0	0	$2.2 \pm 0.13^*$	10	10	0	0	0	0	1.00 ± 0.00
6	10	0	10	0	0	0	$2.0 \pm 0.00^*$	10	8	2	0	0	0	1.20 ± 0.13

หมายเหตุ

n = จำนวนสไลด์เนื้อเยื่อตับที่ใช้ศึกษา

severity score 1 = not present, 2 = mild, 3 = moderate, 4 = severe, 5 = very severe

* = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

4.1.15 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาอื่นที่ตรวจพบ

จากการทดลองพบว่าแฮมสเตอร์กลุ่ม immunized พบการเกิด portal fibrosis ในทุกช่วงเวลาได้มากถึง 100 % ตั้งแต่เดือนแรกจนกระทั่งถึงเดือนที่ 6 (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 แสดงเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับและท่อน้ำดีของแฮมสเตอร์กลุ่ม immunized และ naive ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน

Histopathological studies	n	Immunized group				Naive group			
		Time (month)				Time (month)			
		1	2	4	6	1	2	4	6
		Histological findings (%)				Histological findings (%)			
Portal fibrosis	10	100	100	100	100	0	0	0	30
Periductal cholangitis of second order main duct	10	100	100	100	100	90	100	100	100
Ulceration of second order main duct with granuloma	10	10	0	10	10	0	0	0	0
Ulceration of second order duct with granuloma	10	0	0	10	0	10	10	0	0
Egg granuloma with giant cell	10	20	0	0	0	10	10	20	0
Egg granuloma without giant cell	10	10	20	20	0	10	30	10	10
Parasite granuloma	10	10	0	0	0	0	0	0	0

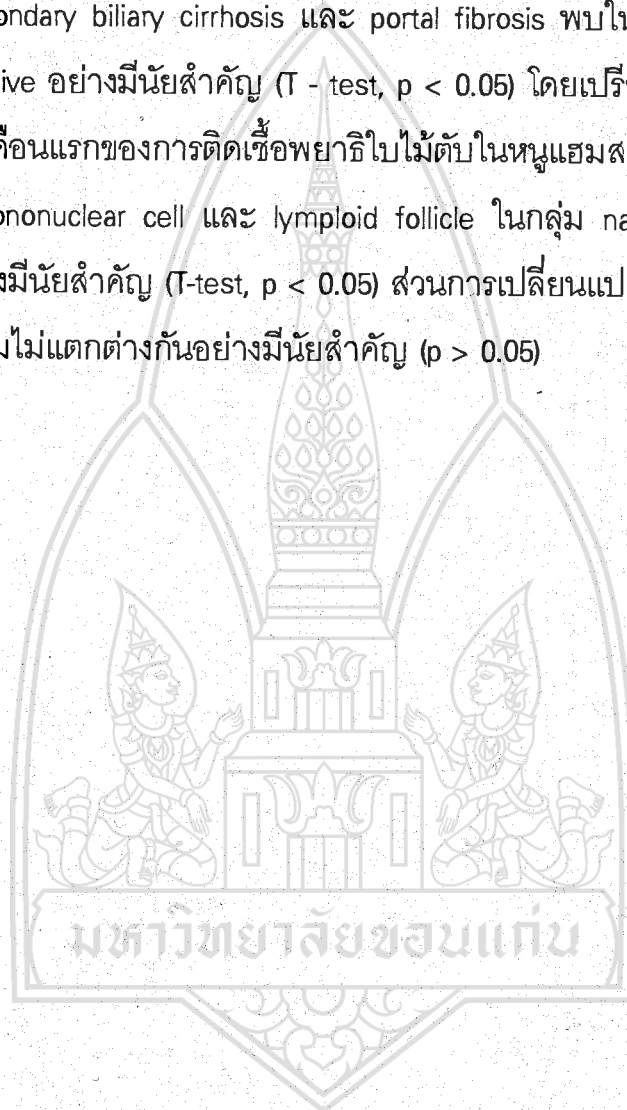
หมายเหตุ

n = จำนวนสไลด์เนื้อเยื่อตับที่ใช้ศึกษา

สำหรับกลุ่ม naive พบการเกิด portal fibrosis ได้ในช่วงเดือนที่ 6 เท่านั้น ซึ่งพบเพียง 30 % การเปลี่ยนแปลงของ periductal cholangitis ที่ท่อน้ำดี second order main duct ของกลุ่ม immunized พบการเปลี่ยนแปลงนี้ 100 % ทุกช่วงเวลา แต่กลุ่ม naive ในช่วงเดือนแรก พบ 90 % ส่วนในเดือนที่ 2,4 และ 6 พบได้ 100 % เช่นเดียวกัน การเกิด ulceration of second order main duct with granuloma และ ulceration of secondary order duct with granuloma ในทั้งสองกลุ่มนี้พบได้น้อยมาก เช่นเดียวกันกับการเกิด egg granuloma with giant cell และ without giant cell ก็พบได้น้อย สำหรับ parasite

granuloma ตรวจพบได้เฉพาะในกลุ่ม immunized ในเดือนแรกเท่านั้น (10 %) ในกลุ่มอื่น และช่วงเวลาอื่น ไม่พบ parasite granuloma เลย

ข้อมูลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาทั้งหมดที่กล่าวแล้วนั้นสังเกตได้ว่าการเปลี่ยนแปลงที่เห็นแตกต่างกันได้ชัดเจนคือ การเกิด periductal fibrosis ที่ secondary order duct, secondary biliary cirrhosis และ portal fibrosis พบในกลุ่ม immunized ได้มากกว่ากลุ่ม naive อย่างมีนัยสำคัญ (T - test, $p < 0.05$) โดยเปรียบเทียบกันในทุกช่วงเวลา ในช่วงเดือนแรกของการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับในหนูแฮมสเตอร์พบว่าการชุมนุมกันของเซลล์ mononuclear cell และ lymphoid follicle ในกลุ่ม naive พบมากกว่ากลุ่ม Immunized อย่างมีนัยสำคัญ (T-test, $p < 0.05$) ส่วนการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาอื่นในทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)



4.2 อภิปรายผล (Discussion)

4.2.1 การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของโฮสต์ต่อพยาธิใบไม้ตับ

ผลการฉีดแอนติเจนของพยาธิตัวแก่ 100 $\mu\text{g/ml}$ ให้กับสัตว์ทดลอง แล้วป้อนตัวอ่อนพยาธิใบไม้ตับ 50 metacercaria แก่สัตว์ทดลองกลุ่ม immunized พบว่าระดับแอนติบอดีจำเพาะ IgG ต่อพยาธิใบไม้ตับในซีรัมสูงกว่ากลุ่ม naive ซึ่งได้รับตัวอ่อนพยาธิเพียงอย่างเดียว ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทุกช่วงเวลาตลอดการทดลองนาน 6 เดือนหลังการติดเชื้อพยาธิ แสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยฉีดแอนติเจนเพียงครั้งเดียวทำให้มี humoral immune response ในระดับหนึ่ง แม้ว่าจะไม่มีข้อมูลยืนยันผลการกระตุ้นด้าน cell mediated immune response ก็ตามการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับที่แสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับสามารถกระตุ้นให้เกิด cell mediated immune response ได้ คือการเกิด egg granuloma และ worm granuloma (สุทธิพันธุ์ สารสมบัติ, 2537) เมื่อแอนติเจนสัมผัสกับเซลล์ของร่างกายเป็นครั้งที่ 2 หรือครั้งต่อ ๆ ไป เซลล์มาโครฟาจ (macrophage cell หรือ antigen presenting cell, APC) จะจับแอนติเจนไว้แล้วส่ง epitope ของแอนติเจนนั้นไปให้ memory CD^+_4 T lymphocyte โดยจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและหลั่งสารลิมโฟไคน์ออกมาหลายชนิด ซึ่งบางครั้งสามารถเรียกเซลล์มาโครฟาจจากที่อื่นให้มาชุมนุม และกระตุ้นให้สามารถทำลายแอนติเจนได้ดียิ่งขึ้น เซลล์มาโครฟาจที่ชุมนุมนั้นอาจเปลี่ยนรูปเป็นเซลล์อีพิทลิออยด์ (epithelioid cell) และ/หรือรวมตัวกันเป็นเซลล์ยักษ์ (giant cell) ซึ่งเซลล์เหล่านี้มีความสามารถทำลายแอนติเจนได้ดีมาก บางครั้งบริเวณที่มีการชุมนุมกันของเซลล์มาโครฟาจและลิมโฟไซต์นี้จะมี fibrosis ล้อมรอบและมีเนื้อเยื่อที่ตายแล้ว ตลอดจนเซลล์ที่กล้วมาข้างต้นบรรจุอยู่ภายใน

จากการศึกษา kinetic ของ humoral immune response ในหนูที่ติดเชื้อพยาธิ 100 และ 25 metacercaria (Sirisinha et al., 1982; Wongratanacheewin et al., 1987) พบว่าในช่วงหลัง ๆ ของการติดเชื้อพยาธิประมาณสัปดาห์ที่ 8 และ 16 เป็นต้นไปแอนติบอดี

จำเพาะต่อ *O. viverrini* antigen ลดลง ซึ่งอาจจะเป็นได้ว่าเกิด immunosuppression เกิดขึ้น (Sirisinha et al., 1982)

4.2.2 การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อตับ

ความรุนแรงของ periductal fibrosis ทั้งใน second order duct, main duct และ secondary biliary cirrhosis ที่พบในกลุ่ม immunized มากกว่ากลุ่ม naive นั้น ซึ่งให้เห็นว่าขบวนการตอบสนองของภูมิคุ้มกันต่อพยาธิใบไม้ตับมีผลต่อความรุนแรงและเร่งขบวนการ inflammation ให้เกิดขึ้นรวดเร็วกว่าการไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยแอนติเจน โดยที่การเกิด fibrosis เป็นส่วนหนึ่งของขบวนการ healing ซึ่งเกิดต่อจาก immune response ของเนื้อเยื่อ การศึกษาของ Flavell และ Flavell (1986) ในหนูที่ทำให้พว่อง T - cell จะพบว่าพยาธิวิทยาของท่อน้ำดีต่อการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับรุนแรงน้อยกว่าหนูปกติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้

ในทางตรงข้ามพยาธิจุลชีววิทยาอื่น ๆ ที่ตรวจพบ ได้แก่ mononuclear cell infiltration และความถี่ของ lymphoid follicle ซึ่งมีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม immunized เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม naive ซึ่งแสดงถึงภาวะ immunosuppression ซึ่งน่าจะเกิดจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนของพยาธิใบไม้ตับ ผลการศึกษาประเด็นนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาในแฮมสเตอร์ ซึ่งพบว่า T - cell มีความสามารถในการตอบสนองต่อ mitogen ลดลงเมื่อติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับ (Wongratanacheewin et al., 1987)

นอกจากนี้แล้วยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงเพิ่มจำนวนเซลล์เยื่อผนังท่อน้ำดี, การเปลี่ยนแปลงของ periductal fibrosis second order duct และ second order main duct, การเพิ่มจำนวนท่อน้ำดีเล็กในเนื้อเยื่อตับ, periductul cholangitis ของ second order main duct, ulceration และ granuloma ภายในเยื่อท่อน้ำดี second order duct และ second order main duct, egg granuloma with giant cell และ without giant cell, parasite granuloma เปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่ม immunized และ naive ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

4.2.3 ระดับเอนไซม์ในซีรัมและการถูกทำลายของเซลล์ตับ

ระดับเอนไซม์ AST ในซีรัมของกลุ่ม immunized ช่วงเดือนที่ 1 และ 2 พบว่าสูงกว่ากลุ่ม naive และ control โดยเฉพาะในช่วงเดือนที่ 2 พบระดับเอนไซม์ AST ในซีรัมสูงกว่ากลุ่ม naive ส่วนเดือนที่ 4 และ 6 ระดับเอนไซม์ในซีรัมจะต่ำกว่า naive โดยเฉพาะช่วงเดือนที่ 6 ซึ่งต่ำกว่ากลุ่ม naive อย่างมีนัยสำคัญ และมีระดับที่ใกล้เคียงกันกับกลุ่ม control

ส่วนระดับเอนไซม์ ALT ในซีรัมพบมีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงคล้ายกับเอนไซม์ AST คือกลุ่ม immunized ระดับเอนไซม์นี้ตรวจพบได้มากใน 2 เดือนแรกหลังการติดเชื้อพยาธิ โดยเฉพาะเดือนที่ 2 ระดับเอนไซม์ ALT สูงกว่ากลุ่ม naive อย่างมีนัยสำคัญแล้วลดลงมาอยู่ในระดับใกล้เคียงกับกลุ่ม naive

เอนไซม์ AST พบได้มากใน cytoplasm ของ mitochondria ของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจและเซลล์ตับ ส่วนเอนไซม์ ALT พบเฉพาะ cytoplasm และพบมากที่สุด ในเซลล์ตับ ในกรณีมีเซลล์ตับถูกทำลายจะทำให้ระดับเอนไซม์ AST และ ALT ในซีรัมสูงได้ ถ้าเป็นการอักเสบแบบเฉียบพลันของเซลล์ตับ เอนไซม์ AST และ ALT มีระดับสูงที่พอ ๆ กัน ในการอักเสบแบบเรื้อรังเอนไซม์ AST จะถูกปล่อยออกมามากกว่า ALT ที่เป็นเช่นนั้นเพราะใน cytosol ของเซลล์ตับปริมาณ ALT กับ AST นั้นมีพอ ๆ กัน แต่ใน mitochondria ของเซลล์ตับไม่พบ ALT isoform ดังนั้นเมื่อเกิดการอักเสบแบบเฉียบพลัน เซลล์ตับจะปล่อยเอนไซม์ออกจาก cytosol เท่านั้น และเซลล์ตับก็สามารถที่จะกลับคืนสู่สภาพเดิมได้ แต่ในการอักเสบแบบเรื้อรังจะมีการตายของเซลล์ตับมากกว่า และจะมีการปล่อยเอนไซม์ AST จาก mitochondria ออกมา (Brown, 1988) จากการทดลองนี้กลุ่ม immunized พบระดับเอนไซม์ AST และ ALT สูงในช่วงเดือนแรก โดยเฉพาะช่วงเดือนที่ 2 ซึ่งมีระดับสูงกว่ากลุ่ม naive และ control อย่างมีนัยสำคัญ (T-test, $p < 0.05$) แสดงว่าในกลุ่มนี้เซลล์ตับถูกทำลายมากในเดือนที่ 1 - 2 สอดคล้องกับผลของจุลพยาธิวิทยาที่พบว่ามี fibrosis เพิ่มมากขึ้นแทรกเข้ามาแทนที่ในบริเวณเซลล์ตับที่ถูกทำลาย ในขณะที่กลุ่ม naive ในช่วง 2 เดือนแรกเซลล์ตับถูกทำลายน้อยกว่ากลุ่ม immunized แล้วจะเพิ่มมากขึ้นในช่วงเดือนที่ 4 และ 6

เอนไซม์ ALP เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม phosphomonoesterase ที่สามารถ hydrolyze phosphate ester ที่ optimum pH 10 Activity ของเอนไซม์ตัวนี้พบมากในตับ กระดูก และ reticulo endothelial tissue ดังนั้นระดับเอนไซม์ ALP จะสูงได้ในกรณีที่มีการเจริญเติบโตของกระดูก เช่น ในเด็กและคนกระดูกหัก ในหญิงตั้งครรภ์ที่มีอายุครรภ์ในช่วง 3-9 เดือน ในกรณีที่ตับมีพยาธิสภาพจากการที่ท่อน้ำดีอุดตัน ไม่ว่าจะเป็นสาเหตุภายนอกหรือภายในเซลล์ตับ เอนไซม์ ALP จะบอกถึงการอุดตันท่อน้ำดีได้เร็วกว่าระดับของ bilirubin เพราะกว่า bilirubin จะสูง ก็ต้องมีการอุดตันทางเดินน้ำดีมาก ๆ (Brown, 1988) ผลการตรวจวัดระดับเอนไซม์ในซีรัมสัตว์ทดลองพบว่า กลุ่ม immunized, naive และ control ระดับเอนไซม์ ALP ในซีรัมมีแนวโน้มในภาพรวมลดลงเล็กน้อยจนกระทั่งถึงเดือนที่ 6 ไม่พบความแตกต่างของเอนไซม์ ALP ในกลุ่ม immunized ให้เห็นเหมือนเอนไซม์ AST และ ALT

จากการศึกษาของ Flavell and Flavell (1986) พบว่าแฮมสเตอร์กลุ่ม ที่มีภาวะภูมิคุ้มกันปกติเมื่อได้รับพยาธิ 50 metacercaria มีระดับเอนไซม์ในซีรัมสูงที่สุดในวันที่ 25 หลังการติดเชื้อพยาธิ ต่อจากนั้นจึงลดลงและเมื่อ เปรียบเทียบกับกลุ่ม T-cell deprived animal ซึ่งได้รับเชื้อพยาธิ 50 metacercaria เหมือนกัน พบระดับเอนไซม์ AST และ ALT ต่ำกว่ากลุ่ม immunological intact อย่างมีนัยสำคัญ (T-test, $p < 0.001$) เปรียบเทียบผลการทดลองในครั้งนี้นี้กับการทดลองของ Favell and Favell (1986) จะเห็นว่า การเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ในซีรัมมีลักษณะที่คล้ายกัน คือจะสูงในช่วงประมาณ 1 เดือนแรกหลังการติดเชื้อ หลังจากนั้นจะมีแนวโน้มลดลง

4.2.4 การเปลี่ยนแปลงด้านปรีสตีวิทยา

จำนวนพยาธิในท่อน้ำดีของตับและถุงน้ำดี ระหว่างกลุ่ม immunized และ naive แม้จะพบว่ามี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละช่วงเวลา ซึ่งมีทั้ง การเพิ่มขึ้นและลดลงอย่างคงที่ ที่เป็นเช่นนี้อาจจะเนื่องมาจากสัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาไม่เป็นสายพันธุ์เดียวกัน (outbred strain) ความสามารถในการติดเชื้อพยาธิของสัตว์ทดลองแต่ละตัวจึงไม่เท่ากัน

สำหรับผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม immunized และ naive ได้แก่น้ำหนักสัตว์ทดลอง, จำนวนไขพยาธิในมูลสัตว์ทดลองของกลุ่ม immunized ไม่พบข้อมูลที่ยืนยันได้อย่างชัดเจนว่า การฉีดแอนติเจนพยาธิตัวแก่ให้กับสัตว์ทดลอง จะสามารถป้องกันการติดเชื้อพยาธิซ้ำได้ เพราะจำนวนพยาธิในตับและความสามารถในการออกไขพยาธิไม่มีแนวโน้มลดลงตลอดการทดลอง 6 เดือนหลังติดเชื้อพยาธิ การศึกษาของ Flavell and Pattanapanyasat (1980); Bunnag and Harinasuta (1981); Sirisinha et al. (1983b); Sirisinha et al. (1986); Sirisinha and Wongratanacheewin (1986) ก็มีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ยืนยันว่าการติดเชื้อพยาธิครั้งแรกไม่ทำให้มีภูมิคุ้มกันที่สามารถป้องกันหรือยับยั้งการติดเชื้อครั้งที่สองให้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ



บทที่ 5

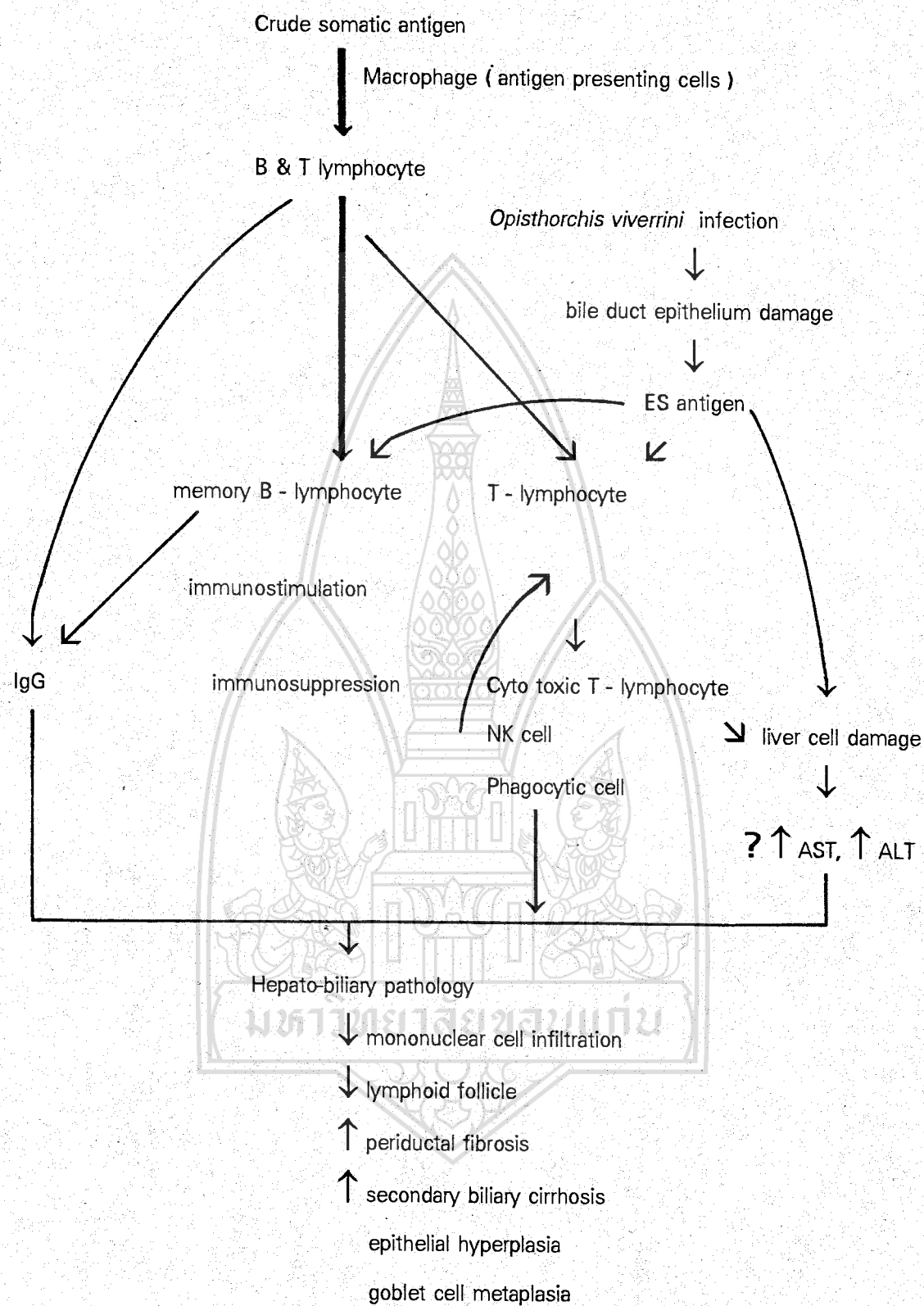
สรุปและข้อเสนอแนะ (Conclusion and suggestions)

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่าระดับแอนติบอดีจำเพาะ IgG ต่อแอนติเจนพยาธิใบไม้ตับ *O. viverrini* ในซีรัม การชุมนุมกันของ mononuclear cell การเปลี่ยนแปลงของเซลล์พบลักษณะ lymphoid follicle, parasite or egg granuloma ที่เนื้อเยื่อตับ เป็นหลักฐานที่สนับสนุนว่าแอนติเจนของพยาธิสามารถกระตุ้นให้เกิด host immune response ซึ่งมีผลในการเพิ่มพยาธิสภาพของท่อน้ำดีในตับในสัตว์ทดลอง

ในทางตรงกันข้ามการฉีดแอนติเจนพยาธิตัวแก่ให้กับสัตว์ทดลอง อาจจะทำให้เกิด immunosuppression ในโฮสต์เพราะจากข้อมูลทางจุลพยาธิวิทยาของ mononuclear cell infiltration, lymphoid follicle ในกลุ่ม immunized ส่วนใหญ่พบน้อยกว่ากลุ่ม naive แต่อย่างไรก็ตามจะต้องมีการศึกษาอีกว่าการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนจะนำไปสู่การเกิด immunosuppression ขึ้นจริงหรือไม่และการกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้วยแอนติเจนพยาธิตัวแก่จะไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของโฮสต์ จำนวนพยาธิหลังการติดเชื้อพยาธิรวมทั้ง egg/worm ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม naive ในช่วงเวลาเดียวกัน

จากข้อมูลผลการทดลองครั้งนี้ที่สนับสนุนสมมุติฐาน (Hou, 1955) ประการแรก คือ พบการใช้ sucker ของพยาธิยึดเกาะที่เยื่อผนังท่อน้ำดี (รูปที่ 9 A.) และการหลุดลอกของเยื่อผิว (9 B.) ซึ่งอาจเกิดจากการใช้ sucker ยึดเกาะหรือการระคายเคืองเนื่องจากการเคลื่อนไหวของตัวพยาธิภายในท่อน้ำดี และหลักฐานที่สนับสนุนสมมุติฐานสอง ประการหลังคือ พบการตายของเซลล์ตับในส่วนที่อยู่ห่างไกลจากตัวพยาธิ เอนไซม์ AST และ ALT ในซีรัมมีระดับสูงในช่วง 2 เดือนแรกหลังการติดเชื้อพยาธิซึ่งพบได้ทั้งในกลุ่ม immunized และ naive แสดงว่าในช่วงเวลาดังกล่าวมีเซลล์ตับจำนวนมากถูกทำลาย นอกจากนี้ยังตรวจพบระดับแอนติบอดีที่จำเพาะ IgG ต่อแอนติเจนพยาธิ, การ



ภาพที่ 15 แผนภาพแสดงสมมุติฐานพยาธิกำเนิดของโรคพยาธิใบไม้ตับในสัตว์ทดลอง

ชุมชนุมักของ mononuclear cell, การเกิด lymphoid follicle, parasite or egg granuloma ซึ่งล้วนเกี่ยวข้องกับการตอบสนองของโฮสต์ได้ทั้งระบบ HIR และ CMIR ต่อแอนติเจนพยาธิใบไม้ตับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

การวัดความรุนแรงทางจุลพยาธิวิทยาที่ใช้โดยทั่วไปเป็นแบบ qualitative แต่การทดลองนี้ได้พยายามใช้วิธี semi-quantitative grading ซึ่งคงจะมีข้อบกพร่องอยู่ น่าจะมีการใช้วิธี quantitative อย่างแท้จริงโดยการวัดพื้นที่ของจุลพยาธิวิทยาต่าง ๆ ด้วย image analyzer ซึ่งจะทำได้ค่าตัววัดต่าง ๆ ถูกต้องมากขึ้นและสามารถนำไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วยความมั่นใจมากขึ้น

ในส่วนการกระตุ้นให้หนูเกิดภูมิคุ้มกันก่อนการติดเชื้อพยาธิใบไม้ตับหากสามารถปรับปรุงการกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้สามารถวัดผลยืนยันได้ทั้ง HIR และ CMIR ไปพร้อม ๆ กันจะทำให้แน่ใจมากขึ้นอีกว่าภาวะภูมิคุ้มกันของแฮมสเตอร์เป็นอย่างไร และรวมไปถึงบทบาทของ immune response ต่อขบวนการการเกิดมะเร็งท่อน้ำดีว่าจะเป็นอย่างไร ซึ่งจะนำไปสู่ความเข้าใจพยาธิกำเนิดของโรคพยาธิใบไม้ตับได้มากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแง่ที่เกี่ยวกับส่วนใดของ host immune response ทำให้เกิดพยาธิสภาพรุนแรงขึ้นและส่วนใดหรือแอนติเจนส่วนใดที่นำไปสู่การเกิด immunosuppression ซึ่งน่าจะมีการศึกษาในรายละเอียดต่อไป

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

(Reference)

- ตระหนักจิต หะริณสูตร. 2536. โรคพยาธิใบไม้ตับทั่วไป. ใน : โรคพยาธิใบไม้ตับ, หน้า 14. สว่างใจ พึ่งพิภตร. (บรรณาธิการ) พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ ฯ : สำนักพิมพ์ฟรีแมกกรุ๊ป.
- ไพโรจน์ ปาริชาติกานนท์ และอำนาจ สารสาส. 2527. พยาธิใบไม้ตับฟาสซิโอลาใน ท่อน้ำดีคน รายงานผู้ป่วยรายแรกของประเทศไทย. **สารศิริราช**. 36 : 131-138.
- วีระยุทธ แคนสีแก้ว, ศศิธร แก้วเกษ และจำรัส พุ่มพวง. 2533. รายงานการพบพยาธิ ใบไม้ตับ (*Fasciola sp.*) ใน Omentum ของผู้ป่วยจากจังหวัดอุบลราชธานี. **สรรพสิทธิเวชสาร**. 11 : 111 - 114.
- สุชาติ ปริยานนท์ และสมาน เทศนา. 2529, โรค Fascioliasis ในท่อน้ำดีของคนป่วย จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. **รายงานการเฝ้าระวัง โรคประจำสัปดาห์**. 18 : 337 - 348.
- สุทธิพันธ์ สารสมบัติ. 2537. กลไกของระบบภูมิคุ้มกันในการทำลายเนื้อเยื่อ. ใน **อิมมูโนวิทยา**. หน้า 203 - 204 สุทธิพันธ์ สารสมบัติ (บรรณาธิการ). พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ ฯ : สำนักพิมพ์ บริษัท เค.พี.พรินติ้ง จำกัด.
- สุวัชร วัชรเสถียร และวิเชียร สุนทรศิริ. 2522. อาการทางผิวหนังของโรคพยาธิ ใบไม้ตับ. **เวชสารแพทย์ตำรวจ**. 5 : 48 - 53.
- อรทัย พาชีรัตน์, ศิริ เชื้ออินทร์ และเยาวลักษณ์ เชื้ออนันต์. 2532. โรคพยาธิใบไม้ ฟัสซิโอลิซิสในตับ : รายงานผู้ป่วย 1 ราย. **วารสารกรมการแพทย์**. 14 : 793 - 796.

- อรุณ เผ่าสวัสดิ์. 2529. โรคพยาธิใบไม้ตับ. ใน. **ศัลยกรรมทางเดินน้ำดี**. หน้า 417-418. อรุณ เผ่าสวัสดิ์ (บรรณาธิการ) พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์กรุงเทพเวชสาร : 417 - 418.
- Beaver, P.C., R.C. Jung and E.W. Cupp. 1984. *Clinical Parasitology*, 9th edition. Philadelphia ; Lea and Febiger.
- Bhamarapravati, N., W. Thamavit and S. Vajarasthira. 1978. Liver Changes in hamsters infected with a liver fluke of man, *Opisthorchis viverrini*. **American Journal of tropical Medicine and Hygiene**. 27: 787 - 794.
- Boonpucknavig, S, S. Kurathong and W. Thamavit. 1986. Detection of antibodies in sera from patients with opisthorchiasis. **Journal of Clinical Laboratory Immunology**. 19 : 135 - 137.
- Brown, BR Jr. 1988. **Anesthesia in hepatic and biliary tract disease**. F.A. Davis Company. Philadelphia. USA. pp. 38 - 45.
- Bunnag, D. and T. Harinasuta. 1989. Liver fluke disease. In : R. Gold-smith, D. Heyneman. eds. **Tropical Medicine and Parasitology**. Appleton and lange, Norwalk. p. 464.
- Chawengkirttikul, R. and S. Sirisinha. 1988. Antibodies in serum and bile of hamster experimentally infected with *Opisthorchis viverrini*. **International Journal of Parasitology**. 18 : 721 - 727.
- Choi, DW. 1984. *Clonorchis sinensis* : life cycle, intermediate hosts, transmission to man and geographical distribution in Korea. **Drug Research**. 34 : 1145.
- Elkins, D.B., M.R. Haswell - Elkins, E. Mairiang, P. Mairiang, P. Sithithaworn, S. Kaewkes, V. Bhudhisawasdi and T. Uttaravichien. 1990. A high frequency of hepatobiliary disease and suspected cholangiocarcinoma associated with heavy *Opisthorchis viverrini* infection in a small

community in Northeast Thailand. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.** 84 : 715 - 719.

Elkins, D.B., P. Sithithaworn, M.R. Haswell - Elkins, S. Kaewkes, P. Awacharagan and S. Wongratanacheewin. 1991. *Opisthorchis viverrini* : Relationships between egg counts, worms recovered and antibody levels within an endemic community in Northeast Thailand. **Parasitology.** 102 : 283 - 288.

el - Shiek Mohamad, A.R. and V. Mummery. 1990. Human dicrocoeliasis. Report on 208 cases from Saudi Arabia. **Journal of Tropical Geographic Medicine.** 42 : 1.

Facey, R.V. and P.D. Marsden. 1960. Fascioliasis in man : an outbreak in Hamshire. **British Medical Journal.** 2 : 619.

Flavell, D.J. and S.U. Flavell. 1986. *Opisthorchis viverrini*. Pathogenesis of infection in immunodeprived hamsters. **Parasite Immunology.** 8 : 455 - 466.

Flavell, D.J., K. Pattanapanyasat and S.U. Flavell. 1980. *Opisthorchis viverrini* ; Partial success in adoptively transferring immunity with spleen cell and serum in the hamster. **Journal of Helminthology.** 54 : 191 - 197.

Harinasuta, C. and T. Harinasuta. 1984. *Opisthorchis viverini* : Life cycle, intermediate hosts, transmission to man and geographical distribution in Thailand. **Drug Research.** 34 : 1164 - 1167.

Harinasuta, C., S. Vajrasthira, and S. Jetanasen. 1961. Metacercaria of *Opisthorchis viverrini* in fishes. **Journal of the Medical Association of Thailand.** 44 : 612.

Harinasuta, T., M. Riganti and D. Bunnag. 1984. *Opisthorchis viverrini* infection : Pathogenesis and clinical features. **Drug Research,** 34 : 1167 - 1169.

- Haswell - Elkins, M.R., S. Satarug and D.B. Elkins. 1992. *Opisthorchis viverrini*. infection in Northeast Thailand and its relationship to Cholangiocarcinoma. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. 7 : 538 - 548.
- Haswell - Elkins, M.R., P. Sithithaworn, E. Mairing, D.B. Elkins, S. Wongratanacheewin, S. Kaewkes and P. Mairiang. 1991. Immune responsiveness and parasite - specific antibody levels in people with hepatobiliary disease associated with *Opisthorchis viverrini* infection. **Clinical and Experimental Immunology**. 84 : 213 - 218.
- Hou, P.C. 1955. Pathology of *Clonorchis sinensis* infestation of liver. **Journal of Pathology and Bacteriology**. 70 : 53 - 64.
- _____. 1964. Primary carcinoma of bile duct of the liver of the cat (*Felis catus*) infested with *Clonorchis sinensis*. **Journal of Pathology and Bacteriology**. 87 : 357 - 364.
- _____. 1965 a. : Pathological changes in the intrahepatic bile ducts of cat (*Felis catus*) infested with *Clonorchis sinensis*. **Journal of Pathology and Bacteriology**. 89 : 357-364.
- _____. 1965 b. Hepatic Clonorchiasis and carcinoma of the bile duct in a dog. **Journal of Pathology and Bacteriology**. 89 : 365 - 367.
- Janechaiwat, J., S. Tharavanij, S. Vajrasthira and W. Chaicumpa. 1980. The immunological diagnosis of human opisthorchiasis and the humoral immune response to opisthorchiasis infection in the hamster. **Journal of the Medical Association of Thailand**. 63 : 439 - 447.
- Jongsuksantigul, P., W. Chaeychomsri, P. Techamontrikul, P. Jeradit and P. Suratanavinit. 1992. Study on prevalence and intensity of intestinal helminthiasis and opisthorchiasis in Thailand. **The Journal of Tropical Medicine and Parasitology**. 2 : 80 - 95. (in Thai).

- Khamboongruang, C. and K. Sakulwong. 1971. *Fasciola hepatica* from a breast abscess. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health.** 2 : 588.
- Kim, Yi. 1984. Liver carcinoma and liver fluke infection. **Drug Research.** 34 : 1121 - 1126.
- Leiper, R.T. 1911. Note on the occurrence of parasite presumably rare in man. **Journal London School Tropical Medicine.** 1 : 16 - 19.
- Pairojkul, C., P. Sitthithaworn., B. Sripa, W. Thamavit, N. Ito, T. Shirai and M. Itoh. 1991. Risk groups for opisthorchiasis-associated cholangiocarcinoma. **Kan - Tan - Sui.** 22 : 393 - 402.
- Preuksaraj, S. 1984. Public health aspects of opisthorchiasis in Thailand. **Drug Research.** 34 : 1119 - 1120.
- Prommas, C. 1927. Report of a case of *Opisthorchis felinus* in Siam. **Annual Review of Tropical Medicine and Parasite.** 21 : 9 - 10.
- Pungpak, S., D. Bunnag, T. Harinasuta and U. Vongsthongsri. 1988. Incidence of bacteraemia in patients with opisthorchiasis during recurrent cholangitis. **Southeast Asian Journal Tropical Medicine and Public Health.** 19 : 215 - 218.
- Riganti, M., S. Pungpak, B. Punpoowong, D. Bunnag and T. Harinasuta. 1989. Human pathology of *Opisthorchis viverrini* infection : A comparison of adults and children. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health.** 20 : 95 - 100.
- Sadun, E.H. 1955. Studies on *Opisthorchis viverrini* in Thailand. **American Journal of Hygiene.** 62 : 81 - 115.

- Sirisinha, S., S. Tuti, S. Vichasri and A. Tawatsin. 1983 a. Humoral immune response in hamster infected with *Opisthorchis viverrini*. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health.** 14 : 243 - 251.
- Sirisinha, S., S. Tuti, A. Tawatsin, S. Vichasri, E.S. Upatham and D. Bunnag. 1983b. Attempts to induce protective immunity in hamsters against infection by the liver fluke of man (*Opisthorchis viverrini*). **Parasitology.** 86 : 127 -136.
- Sirisinha, S., W. Ratanasiriwilai, S. Puengtomwatanakul, P. Sobhon, P. Saitongdee, and T. Kooncharmboon. 1986. Complement mediated killing of *Opisthorchis viverrini* via activation of the alternative pathway. **International Journal of Parasitology.** 16 : 341 - 346.
- Sithithaworn, P., S. Tesana, V. Pipitgool et al. 1991. Quantitative post- mortem study of *Opisthorchis viverrini* in man in northeast Thailand. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.** 85 : 765 - 768.
- Sithithaworn, P., S. Tesana, V. Pipitgool, S. Kaewkes, C. Pairojkul, A. Puapairoj and K. Thaklar. 1991. Relationship between faecal egg count and worm burden of *Opisthorchis viverrini* in humans. **Parasitology.** 102 : 277 - 281.
- Sonakul, D., C. Koompirochana, K. Chinda and T. Stitnimarnkarn. 1987. Hepatic carcinoma with opisthorchiasis. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health.** 9 : 215 - 219.
- Sornmani, S., P. Vivatanaseseth, P. Impanod, W. Phatihatakorn and P. Sitaputra. 1984. Infection and reinfection rate of opisthorchiasis in the water resource development area of Nam Pong Project, Khon Kaen Province,

Northeast Thailand. **American Journal of Tropical Medicine Parasitology.** 78 : 649 - 659.

Srivatanakul, P., V.: Viyanant, S. Kurathong and D. Tiwawech. 1985. Enzyme - linked immunosorbent assay for detection of *Opisthorchis viverrini* infection.

Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 16 : 234 - 239.

Sun, T. 1980. Clonorchiasis : A report of four cases and discussion of unusual manifestation. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** 29 : 1223 - 1227.

Sun, T. and J.B. Gibson. 1969 a. The metabolic products of adults *Clonorchis sinensis*. Their composition and antigenic potential. **Journal of Helminthology.** 103 : 395 - 402.

Sun, T. and J.B. Gibson. 1969 b. The site of antigen formation in different development stages of *Clonorchis sinensis*. **Japanese Journal of Medical Science and Biology.** 22 : 263 - 271.

Sun, T., S.T. Chou and J.B. Gibson. 1968. Route of entry of *Clonorchis sinensis* to the mammalian liver. **Experimental Parasitology.** 22 : 346 - 351.

Sun, T., S.T. Chou and J.B. Gibson. 1968. Route of entry of *Clonorchis sinensis* to the mammalian liver. **Experimental parasitology.** 22 : 346 - 351.

Tansurat, P. 1971. Opisthorchiasis. In : **Pathology of Protozoa and helminthic Diseases.** (Edited by Rojas M. and R.A. Williams) pp. 536 - 545. Williams and Wilkins. Baltimore.

Tesana, S., A. Pamarapa and O. Sae Sio. 1989. Acute cholecystitis and *Fasciola sp.* infection in Thailand : Report of two cases. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health.** 20 : 447 - 452.

- Tesjaroen, S., P. Sririsumpan and K. Sindhvananda. 1988. Three granuloma of greater omentum caused by *Fasciola gigantica* in a Thai woman a case report. **Siriraj Hospital Gazette**. 40 : 575 - 580.
- Thamavit, W., R. Hungkanunin, D. Tiwawech and M.A. Moore. 1987. Level of *Opisthorchis* infestation and carcinogen dose dependence of cholangiocarcinoma induction in Syrian golden hamsters. **Virchows. Archives of B cell Pathology**. 54 : 52 - 58.
- Upatham, E.S., V. Viyanant, S. Kurathong, J. Rojborwonwitaya, W.Y. Brockelman, S.. Ardsungnoen, P. Lee and S. Vajrasthira. 1984. Relationship between prevalence and intensity of *Opisthorchis viverrini* infection and clinical symptoms and signs in a rural community in Northeast Thailand. **Bulletin of the World Health Organization**. 62 : 451 - 461.
- Upatham, E.S., V. Viyanant, S. Kurathong, W.Y. Brockelman, A. Menaruchi, S. Saowakontha, C. Intrarakhoa, S. Vajrasthira and K.S. Warren. 1982. Morbidity in relation to intensity of infection in *Opisthorchis viverrini* study of a community in Khon Kaen. Thailand. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 31 : 1156 - 1163.
- Vajrasthira, S., C. Harinasuta and Y. Komiya. 1961. The morphology of metacercaria of *Opisthorchis viverrini* with special reference to the excretory system. **Annual Review of Tropical Medicine and Parasite**. 55 : 413 - 418.
- Wong, R.K.H., D.A. Peura, M.L. Mutter, H.A. Heit, M.K. Bims and L.F. Johnson. 1985. Hemobilia and liver flukes in a patient from Thailand. **Gastroenterology**. 88 : 1958 - 1963.
- Wongratanacheewin, S., D. Bunnag, N. Vaeusorn and S. Sirisinha. 1988 a. Characterization of humoral immune response in the serum and bile of

patients with opisthorchiasis and its application in immunodiagnosis.

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.

38 : 356 - 362.

Wongratanacheewin, S., C. Charupatana, D. Bunnag and S. Sirisinha. 1988b.

Effect of praziquantel treatment on antibody levels and lymphoproliferative

responses in patients with opisthorchiasis. **Southeast Asian Journal**

of Tropical Medicine and Public Health. 19: 109-116.

Wongratanacheewin, S. and S. Sirisinha. 1987. Analysis of *Opisthorchis viverrini*

antigens : Physicochemical characterization and antibody recognition.

Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public

Health. 18 : 511 - 520.

Wongratanacheewin, S., W. Rattanasiriwilai, R. Priwan and S. Sirisinha. 1987a.

Immunodepression in hamster experimentally infected with

Opisthorchis viverrini . **Journal of Helminthology.** 61:151-156.

Wykoff, D.E., C. Harinasuta, P. Juttijudata and M.M. Winn. 1965.

Opisthorchis viverrini in Thailand. The life cycle and comparison with

O. felineus. **Journal of Parasitology.** 51 : 207 - 214.

Wykoff, D.E., K. Chittayasothorn and M. Winn. 1966. Clinical manifestations of

Opisthorchis viverrini infections in Thailand. **American Journal of**

Tropical Medicine and Hygiene ; 15 : 914 - 918.

ภาคผนวก
(Appendix)

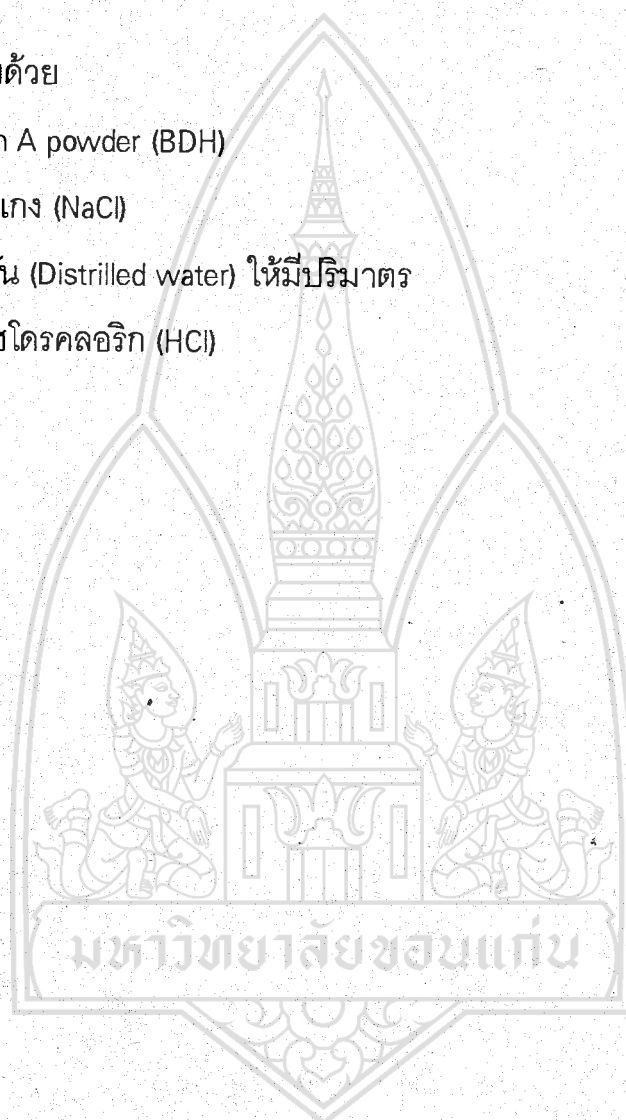
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ภาคผนวก ก

สารละลายเปปซิน A (BDH) 0.25 เปอร์เซ็นต์

ประกอบด้วย

- | | |
|--|----------------|
| 1. Pepsin A powder (BDH) | 2.5 กรัม |
| 2. เกลือแกง (NaCl) | 8.5 กรัม |
| 3. น้ำกลั่น (Distilled water) ให้มีปริมาตร | 1000 มิลลิลิตร |
| 4. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) | 15 มิลลิลิตร |



ภาคผนวก ข

การตรวจวัดโปรตีนโดยวิธี Lowry

การเตรียม Solution A

2 % Na_2CO_3 in 0.1 N NaOH	50.0 ml
1 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.5 ml
2 % Pot. Sod. Tartrate	0.5 ml

การเตรียม Solution B

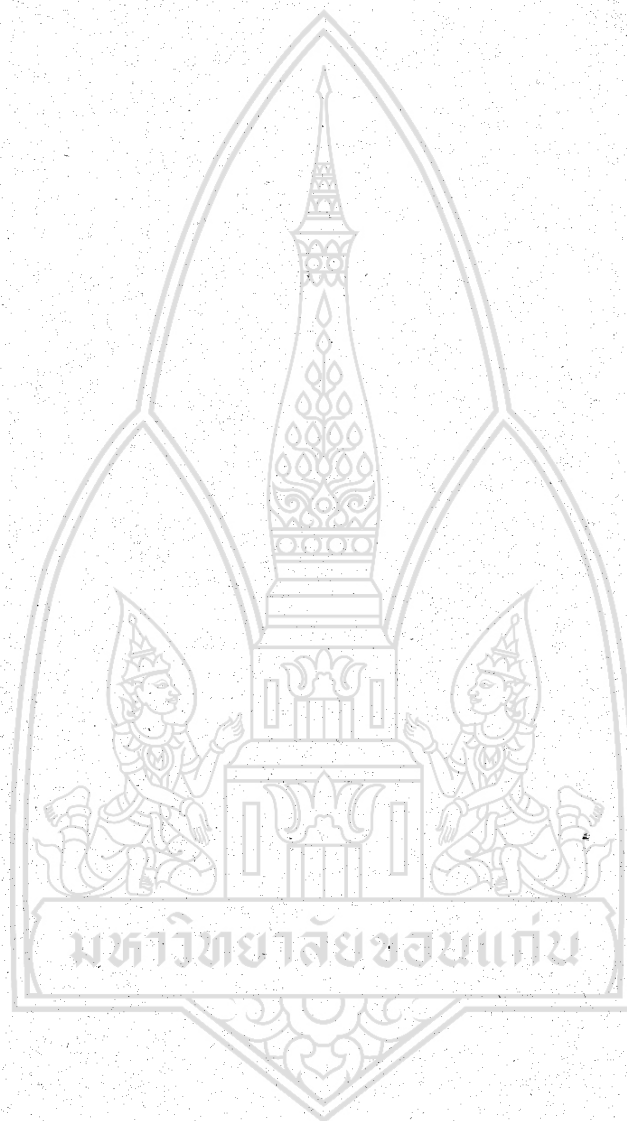
Folin-Ciocalteu	1 ml
น้ำกลั่น	1 ml
เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้	

วิธีการตรวจวัดปริมาณโปรตีน

1. เตรียม Standard BSA 1 mg/ml ที่มีปริมาณโปรตีนต่าง ๆ กัน และ Blank ในหลอดทดลองขนาด 5 ml
2. เตรียมตัวอย่าง โดยนำแอนติเจนของพยาธิตัวแก่ (adult crude extract antigen) มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1:20 และ 1:40 ในหลอดทดลองขนาด 5 ml
3. เติม Solution A ลงในทุกหลอด ๆ ละ 3.00 ml แล้วผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer
4. ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา 10 นาที

5. เติม Solution B ลงในทุกหลอด ๆ ละ 0.3 ml ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที

6. นำไปวัด OD 625 nm.



ภาคผนวก ค

การเตรียมสารละลายต่าง ๆ ในการตรวจวัดระดับแอนติบอดีจำเพาะ IgG
ด้วยวิธี ELISA

Coating buffer (carbonate buffer pH 9.6)

Na_2CO_3	1.59	กรัม
NaHCO_3	2.93	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1	ลิตร

Incubation buffer (for diluting antibody and conjugate)

NaCl	8.9	กรัม
Na_2HPO_4	1.28	กรัม
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.15	กรัม
Tween 20	0.5	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1	ลิตร

Washing buffer (10X) (dilute before using 1:10)

NaCl	90	กรัม
Tween 20	5	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1	ลิตร

ภาคผนวก ค (ต่อ)

Substrate buffer (0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pH 8.9)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 35.96 กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

Substrate solution

Chemicals / Plate	1	2	3	4
0.1 M Citric acid (ml)	6.03	10.05	16.09	20.11
0.2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (ml)	6.20	10.34	16.54	20.68
1:100 H_2O_2 (ml)	0.245	0.408	0.653	0.816
OPD (tablet)	3	5	8	10

5 % skim milk in carbonate buffer

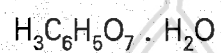
	2 plates	4 plates
Skim milk (gm)	2	4
Carbonate buffer (ml)	40	80

ภาคผนวก ค (ต่อ)

2 % skim milk in incubating buffer

	2 plates	4 plates
Skim milk (gm)	2	4
Incubating buffer (ml)	100	200

Citric acid (0.1 M, pH 2.5)



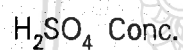
น้ำกลั่น

5.2535 กรัม

250

มิลลิลิตร

Stopping solution



น้ำกลั่น

35

มิลลิลิตร

215

มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ภาคผนวก ง

การตรวจนับไขพยาธิในอุจจาระด้วยวิธี Modified formalin ethyl acetate

1. ชั่งอุจจาระ 1 กรัม ใส่ใน centrifuge tube
2. เติม 10 % formalin 10 ml
3. กวนให้เข้ากันดี แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 2000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 - 10 นาที
4. นำตะกอนไปเติมน้ำ 5 ml เท Supernate ทิ้ง เขย่าให้เข้ากัน แล้วกรองตะกอนด้วยผ้าก๊อซ
5. นำน้ำตะกอนไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 2000 รอบ/นาที 5 นาที
6. เท Supernate ทิ้ง นำตะกอนที่ได้ เติมน้ำ 7 ml และ Ethyl acetate 3 ml เขย่าให้เข้ากันดี
7. นำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge 2000 รอบ/นาที 5 นาที
8. ใช้สำลีเช็ดเศษอุจจาระที่อยู่ส่วนบน และ Supernate ทิ้ง
9. นำตะกอนที่ได้เติม 10 % formalin 1-2 ml
10. เขย่าให้เข้ากันแล้ว ใช้ Stoll's pipette ดูดส่วนตะกอนมา 0.15 ml หยดลงบน slide ผสม NSS 1 หยด ปิด Cover glass ทำการนับจำนวนไขพยาธิภายใต้ Light microscope กำลังขยาย 10 X

คำนวณจำนวนไขพยาธิในอุจจาระ 1 กรัม

ตะกอนอุจจาระ 0.15 ml นับจำนวนไขได้ X ฟอง

ตะกอนอุจจาระ 15 ml หรืออุจจาระ 1 กรัมมีจำนวนไขพยาธิ = $X \times 15 = X \times 100$ ฟอง

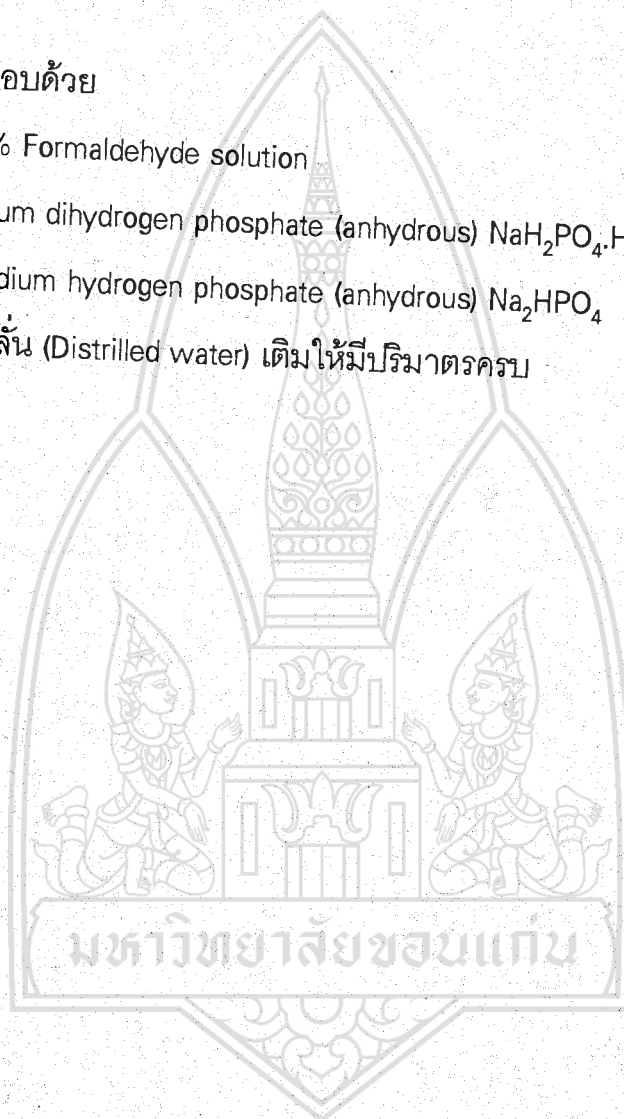
0.15

ภาคผนวก จ

10 % neutral buffered formalin fixative

ประกอบด้วย

- | | |
|--|-----------------|
| - 40 % Formaldehyde solution | 100 มิลลิลิตร |
| - Sodium dihydrogen phosphate (anhydrous) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 3.5 กรัม |
| - Disodium hydrogen phosphate (anhydrous) Na_2HPO_4 | 6.5 กรัม |
| - น้ำกลั่น (Distilled water) เติมให้มีปริมาตรครบ | 1,000 มิลลิลิตร |



ภาคผนวก จ

Haematoxylin

ประกอบด้วย

- Haematoxylin	5 กรัม.
- Absolute alcohol	50 มิลลิลิตร
- Potassium or Ammonium alum	100 กรัม
- Mercuric oxide	2.5 กรัม
- น้ำกลั่น (Distilled water)	950 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

1. ละลาย haematoxylin ใน absolute alcohol
2. ละลาย alum ใน distilled water และต้มให้เดือด
3. ผสม haematoxylin และ alum solution และต้มต่อไปจนเดือด
4. ยกลง แล้วเติม mercuric oxide
5. ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว โดยจุ่มแช่ในน้ำเย็น
6. กรองด้วยกระดาษกรอง

ภาคผนวก ช

วิธีการย้อมด้วย Haematoxylin และ Eosin (H & E)

1. Deparaffinization โดยการแช่แผ่นสไลด์ที่มี paraffin section ติดอยู่ ใน xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เพื่อล้าง paraffin ออกให้หมด

2. Hydration ตามขั้นตอนดังนี้

2.1 แช่ใน 100 % ethyl alcohol 3 นาที

2.2 แช่ใน 95 % ethyl alcohol 3 นาที

2.3 แช่ใน 80 % ethyl alcohol 3 นาที

2.4 แช่ใน 70 % ethyl alcohol 3 นาที

3. Staining

3.1 แช่ใน haematoxylin 5 นาที

3.2 Running tap water เพื่อล้างสีที่มีมากเกินไปออก

3.3 จุ่มใน acid alcohol (1% conc. hydrochloric acid ใน 70 % Alcohol) เพื่อล้างสี haematoxylin ออก (ในกรณีที่สีติดเข้มเกินไป)

3.4 Running tap water ประมาณ 5 นาที

3.5 จุ่มใน saturated lithium carbonate in water

3.6 จุ่มใน distilled water

3.7 Dehydrate ใน ethyl alcohol.

- 70 % เป็นเวลา 3-4 นาที

- 80 % เป็นเวลา 3-4 นาที

- 95 % เป็นเวลา 3-4 นาที

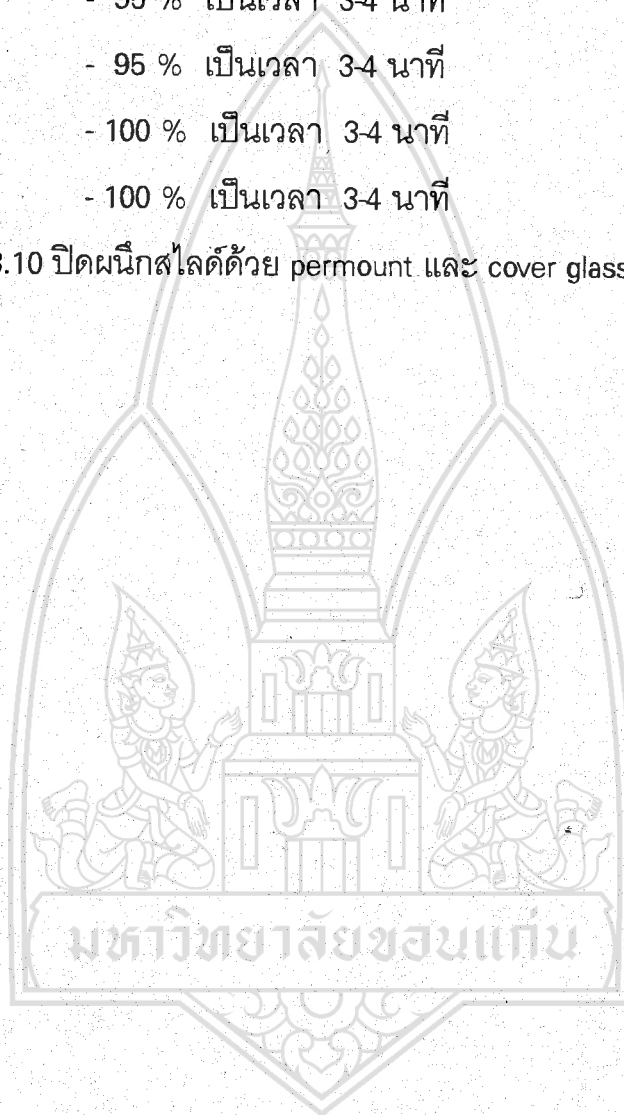
3.8 Counterstain ด้วย eosin 1-2 นาที

ภาคผนวก ช (ต่อ)

3.9 Dehydrate ใน ethyl alcohol

- 95 % เป็นเวลา 3-4 นาที
- 95 % เป็นเวลา 3-4 นาที
- 100 % เป็นเวลา 3-4 นาที
- 100 % เป็นเวลา 3-4 นาที

3.10 ปิดผนึกสไลด์ด้วย permount และ cover glass



ภาคผนวก ข

น้ำหนักแฮมสเตอร์

Animal Group																
ID/Time	Control						Immunized						Naïve			
	1	2	4	6	1	2	4	6	1	2	4	6	1	2	4	6
1	100.0	103.5	207.5	186.3	125.0	115.8	142.7	156.0	141.0	137.2	125.0	164.7				
2	120.3	115.7	131.5	150.0	135.0	124.7	151.8	102.7	125.4	118.5	157.4	158.4				
3	114.8	157.7	132.0	162.6	131.8	133.8	173.0	171.5	118.4	122.0	125.6	167.5				
4	102.5	106.9	154.5	153.8	161.5	-	156.6	146.3	123.6	100.0	127.4	-				
5	100.1	124.2	151.0	147.5	140.0	121.0	147.0	152.8	141.5	142.0	133.6	160.0				
6	110.5	114.5	154.7	169.8	142.0	128.8	130.8	145.5	119.5	114.0	-	124.6				
7	153.3	128.0	134.7	173.5	137.6	128.0	134.5	153.5	113.6	137.4	-	148.7				
8	151.5	98.0	157.6	133.3	146.5	138.0	132.0	168.8	128.6	114.0	160.3	155.0				
9	149.4	101.5	147.0	151.8	-	115.8	148.5	160.0	125.6	110.0	116.4	158.3				
10	129.2	101.5	122.5	199.0	135.5	112.7	130.5	159.5	118.0	113.5	119.4	167.0				
N	10	10	10	10	9	9	10	10	10	10	8	9				
Mean	123.16	115.15	149.27	162.75	139.40	124.30	144.74	151.66	125.50	120.86	133.12	156.02				
SD	21.5	18.03	23.72	19.71	10.30	8.73	13.64	19.60	9.41	13.72	16.70	13.21				

ภาคผนวก ฅ

จำนวนพยาธิในท่อน้ำดีและถุงน้ำดี (worm recovery)

	Animal Group							
	Immunized				Naive			
ID/Time	1	2	4	6	1	2	4	6
6	18	-	27	25	45	22	-	-
7	20	27	22	29	38	20	-	21
8	17	33	31	27	36	18	36	18
9	-	36	23	31	36	17	38	23
10	17	28	28	35	39	19	31	20
N	4	4	5	5	5	5	3	4
Mean	18.00	31.00	26.20	29.40	38.80	19.20	35.00	20.50
SD	1.22	3.67	3.31	3.44	3.31	1.72	2.94	1.80

ภาคผนวก ก

จำนวนไข่พยาธิในมูลสัตว์ทดลอง (EPG fecae)

	Animal Group							
	Immunized				Naive			
ID/Time	1	2	4	6	1	2	4	6
1	1189	4371	1491	10150	1071	2790	12139	9455
2	3752	2442	15000	22122	174	2242	17861	2070
3	224	1984	7245	9540	1870	1376	8275	3828
4	5810	990	21840	18361	1836	3672	7236	5220
5	560	3960	10965	4945	2542	3503	17108	3721
6	2800	-	4048	4292	2115	1849	-	-
7	496	3348	7009	7140	4800	4173	-	4848
8	1764	2660	17808	2430	3150	2752	9976	4880
9	-	3120	3084	2408	962	3990	14152	9234
10	445	588	12670	11142	1840	2754	11826	3870
N	9	9	10	10	10	10	8	9
Mean	2338.88	2607.00	44757.70	9248.40	2036.00	2910.10	1231.62	5236.20
SD	1868.51	1195.53	5804.43	6277.30	1216.58	876.50	3622.22	2362.40

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ภาคผนวก ก

ค่า OD ในการตรวจหา IgG ต่อแอนติเจนพยาธิใบไม้ตับที่ 490 nm.

Animal Group																
Control					Immunized					Naive						
ID/Time	1	2	4	6	1	2	4	6	1	2	4	6	1	2	4	6
1	0.044	0.015	0.029	0.0008	2.500	0.865	1.136	1.604	0.551	0.432	0.670	0.674	0.551	0.432	0.670	0.674
2	0.042	0.008	0.004	0.006	2.325	1.609	1.060	-	0.435	0.640	0.766	0.832	0.435	0.640	0.766	0.832
3	0.012	0.035	0.060	0.0008	2.365	0.910	1.250	1.600	0.576	0.542	0.543	0.315	0.576	0.542	0.543	0.315
4	0.046	0.029	0.045	0.005	2.339	1.981	1.115	2.036	0.530	0.499	1.180	0.510	0.530	0.499	1.180	0.510
5	0.119	0.123	0.033	0.002	1.710	2.266	2.507	2.500	0.043	0.326	0.833	0.568	0.043	0.326	0.833	0.568
6	0.010	0.028	0.028	0.005	1.536	-	1.396	1.781	0.265	0.698	-	-	0.265	0.698	-	-
7	0.045	0.006	0.047	0.001	1.271	2.082	2.082	2.128	0.237	0.617	-	0.446	0.237	0.617	-	0.446
8	0.020	0.047	0.017	0.048	2.069	0.893	0.944	2.212	0.404	0.556	0.673	0.765	0.404	0.556	0.673	0.765
9	0.012	0.055	0.042	0.006	-	2.110	1.096	1.631	0.196	0.713	0.547	0.590	0.196	0.713	0.547	0.590
10	0.014	0.026	0.023	0.007	1.325	1.893	2.204	1.612	0.317	0.628	0.756	0.640	0.317	0.628	0.756	0.640
N	10	10	10	10	9	9	10	9	10	10	8	9	10	10	8	9
Mean	0.0364	0.0372	0.0318	0.00806	1.9377	1.6232	1.4790	1.9007	0.3554	0.5651	0.7460	0.5933	0.3554	0.5651	0.7460	0.5933
SD	0.0313	0.0320	0.0130	0.0130	0.4540	0.5450	0.5351	0.3114	0.1661	0.1147	0.1898	0.1497	0.1661	0.1147	0.1898	0.1497

หมายเหตุ positive control = 0.997 negative control = 0.035 serum dilution = 1:1,500 conjugate dilution = 1:4,000

ภาคผนวก ฎ

ระดับแอนติบอดี AST (IU/L) ในซีรัมแอมสโตอร์

Animal Group														
Control					Immunized					Naïve				
ID/Time	1	2	4	6	1	2	4	6	1	2	4	6	1	2
1	35	66	48	48	23	84	96	47	220	81	64	94	220	81
2	50	2	75	27	53	130	114	-	77	81	69	69	77	81
3	60	48	78	53	138	155	120	132	91	68	210	74	91	68
4	29	1	52	28	160	99	71	54	76	73	67	51	76	73
5	64	54	60	53	228	107	66	34	94	49	112	93	94	49
6	96	59	60	39	414	-	73	33	60	46	-	-	60	46
7	19	29	42	72	57	119	66	48	26	11	-	83	26	11
8	30	57	62	30	63	72	54	55	90	-	93	66	90	-
9	27	60	66	38	-	77	75	-	57	38	110	193	57	38
10	36	66	78	77	72	59	108	41	40	74	136	67	40	74
N	10	10	10	10	9	9	10	8	10	9	8	9	10	9
Mean	44.600	44.200	62.100	46.500	133.110	100.222	84.300	55.500	83.100	57.770	107.625	87.770	83.100	57.770
SD	22.073	23.604	11.835	16.705	116.044	29.031	21.987	29.921	50.389	22.355	45.511	39.986	50.389	22.355

ภาคผนวก ร

ระดับเอนไซม์ ALT (IU/L)

Animal Group																
Control							Immunized							Naive		
ID/Time	1	2	4	6	1	2	4	6	1	2	4	6	1	2	4	6
1	26	39	84	51	25	132	60	50	278	69	83	217				
2	31	25	80	49	99	167	90	-	147	99	48	48				
3	72	48	60	82	192	342	96	93	95	92	156	130				
4	44	5	35	35	168	92	177	75	77	81	49	69				
5	64	55	51	41	288	142	60	119	105	49	198	132				
6	224	27	24	33	288	-	117	48	65	33	-	-				
7	26	42	30	60	154	159	89	60	59	11	-	79				
8	42	63	54	37	105	98	60	76	198	101	128	59				
9	28	60	60	38	-	121	102	71	51	32	144	294				
10	39	66	10	78	246	95	84	73	55	70	118	163				
N	10	10	10	10	9	9	10	9	10	10	8	9				
Mean	59.600	43.000	51.000	50.4000	173.888	149.777	93.500	73.888	113.000	63.700	115.500	132.333				
SD	56.7911	18.5148	19.7180	16.7821	84.6711	72.6907	33.3054	20.6798	70.5109	29.5738	49.3153	77.1693				



ประวัติผู้เขียน
(Curricula vitae)

นายสมพงษ์ สิทธิพรหม

เกิดวันที่

5 กันยายน พ.ศ. 2503 ที่จังหวัด อุตรธานี

พ.ศ. 2527

สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา)

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

พ.ศ. 2527

รับราชการตำแหน่งนักวิเคราะห์อาหาร 3

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ 4 ขอนแก่น

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

พ.ศ. 2529

รับราชการตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 3

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ปัจจุบัน

รับราชการตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 5

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น และลาศึกษาต่อระดับปริญญาโท

สาขาปรสิตวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย

มหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อปีพ.ศ. 2534