



บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

อภิปรายผลการวิจัย

1. ผลการศึกษาจำนวนตัวพยาธิ *O. viverrini* ก่อนและหลังให้ยา praziquantel 200 mg/kg body weight

จากผลการศึกษาจำนวนตัวพยาธิ *O. viverrini* ที่ได้จาก hamster โดยการ infect ด้วย metacercariae 50 cysts ต่อ hamster 1 ตัว feed ผ่าน stomach tube พบจำนวนพยาธิโดยเฉลี่ย 19.0 ± 1.46 ตัว คิดเป็น 38% ของอัตราการติดเชื้อ ซึ่งอัตราการติดเชื้อของ *O. viverrini* ใน hamster ในการทดลองครั้งนี้ได้ผลน้อยกว่า Nongporn Hutadilok (1983) ซึ่งสามารถติดเชื้อได้ถึง 25.0 ± 2.2 ตัว หรือคิดเป็น 50% ของอัตราการติดเชื้อจาก metacercariae 50 cysts ต่อ hamster 1 ตัว ข้อแตกต่างอาจเกิดจากแหล่งที่มาของ metacercaria ได้มาจากเนื้อปลาในแหล่งน้ำธรรมชาติ และแยก metacercaria จากเนื้อปลาโดยวิธีย่อยด้วย pepsin ซึ่งง่ายต่อการคัดเลือก metacercaria จากสาเหตุนี้ทำให้อัตราการติดเชื้อ *O. viverrini* ใน hamster จึงมากกว่า และอาจจะเป็นไปได้ metacercaria จากแหล่งธรรมชาติมีความแข็งแรงกว่าจากการเลี้ยงในห้องทดลอง ทำให้สามารถต่อต้าน immune ของ hamsters ได้ดีกว่า จึงมีชีวิตรอดอยู่ใน biliary system ของตับได้มากกว่า metacercaria ที่ได้จากห้องทดลอง และจากการศึกษาพบจำนวนตัวพยาธิในตับของ hamsters โดยเฉลี่ย 13.17 ± 0.91 ตัว ในถุงน้ำดี 5.83 ± 1.25 ตัว จะเห็นว่าทั้งที่ขนาดของตับมีขนาดใหญ่กว่าถุงน้ำดีหลายเท่า แต่พบจำนวนตัวพยาธิในตับมากกว่าในถุงน้ำดีแค่เพียง 2 เท่าเศษเท่านั้น จากการ autopsy hamster พบพยาธิอยู่กันอย่างหนาแน่นในถุงน้ำดีเล็ก ๆ นี้ แสดงว่าพยาธิ *O. viverrini* ชอบอาศัยอยู่ในถุงน้ำดีมากกว่า ทั้งนี้อาจเป็นเพราะถุงน้ำดีเป็นแหล่งอาหารที่ดีกว่าในตับ จากสาเหตุนี้จึงทำให้คนไทยในภาคอีสานมีอุบัติการณ์เป็นโรคเกี่ยวกับการอักเสบของถุงน้ำดีสูง โดยเฉพาะโรคนี้ในถุงน้ำดี ทั้งยังพบว่าไข่และตัวพยาธิ *O. viverrini* เป็นแกนกลางหรือ

องค์ประกอบที่สำคัญของนิว (วิรัตน์ วงศ์แสงนาค, 2530)

หลังจากให้ยา praziquantel ไปแล้ว 4 ชั่วโมง พบตัวพยาธิจาก hamster ทั้งหมด 16 ตัว พยาธิมีลำตัวแข็งและหดเกร็ง (paralyzed and constriction) ไม่มีการเคลื่อนไหว แต่ยังมีชีวิตอยู่ มีลักษณะเช่นเดียวกับที่ Sirisinha et al. (1984) ได้ทำการศึกษาไว้ และหลังจากให้ยา 1 วัน พบจำนวนตัวพยาธิที่ยังมีชีวิตอยู่ และสามารถเคลื่อนไหวได้ โดยเฉลี่ย 3.5 ± 0.51 ตัว และไม่พบซากพยาธิที่ตายหลุดออกมากับอุจจาระของ hamsters เลย แต่จากการศึกษาของ Denai Bunnag and Tranekchit Harinasuta, 1981, Sirisinha et al. 1984, เมธี กลุ่กัมธธร และคณะ, 2529 พบตัวพยาธิในอุจจาระของคนหลังจากให้ยา praziquantel ไปแล้วทั้งชิ้นส่วนของพยาธิและพยาธิทั้งตัวจึงทำให้บอกได้ว่ามีตัวพยาธิหลุดปนออกมากับอุจจาระแต่ซากพยาธิที่ตายจากผลของยา praziquantel ออกมากับอุจจาระ hamsters มีขนาดเล็กมาก จนไม่สามารถบอกได้ว่าซากที่หลุดมาเป็นของพยาธิ *O. viverrini* หรือไม่ ดังนั้นการศึกษาค้างนี้จึงเป็นการศึกษาตัวพยาธิที่มีชีวิตอยู่รอดภายใน biliary system ของ hamster ไม่ใช่เป็นการศึกษาจำนวนตัวพยาธิที่ตายหลุดออกมากับอุจจาระของ hamsters และหลังจากให้ยา praziquantel ไปแล้ว 4 ชั่วโมง และ 1 วัน จะพบว่าจำนวนตัวพยาธิที่พบใน hamsters ต่างกันมาก แสดงว่าหลังจากที่พยาธิ *O. viverrini* ถูกทำลายด้วยผลของยา praziquantel แล้ว จะถูกขับออกผ่านทางลำไส้และปนออกมากับอุจจาระเลยภายใน 1 วัน ส่วนตัวพยาธิที่รอดชีวิตหลังจากให้ยา praziquantel 200 mg/kg body weight กับ hamsters ไม่เพียงพอที่จะทำลายตัวพยาธิใน hamsters ได้หมด

หลังจากให้ยา praziquantel ในวันที่ 2-4 จำนวนตัวพยาธิที่พบใน hamsters จะมีมากกว่าจำนวนพยาธิหลังให้ยา praziquantel ในวันที่ 5-30 แสดงว่าหลังจากให้ยา praziquantel ในวันที่ 2 ยังมีพยาธิบางตัวที่ยังมีชีวิตรอดหลังจากได้รับยาไปแล้ว แต่เมื่อไม่สามารถที่จะ repair ส่วนที่ถูกทำลายให้กลับฟื้นมาได้ก็จะตายแล้วถูกขับออกมาจาก biliary system ของ hamsters และพยาธิที่สามารถ repair ส่วนที่ถูกทำลายและสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ หลังจากได้รับยาไปแล้ว 5 วัน หลังจากให้ยา praziquantel ไปแล้ว 30 วัน ก็ยังพบตัวพยาธิที่มีชีวิตอยู่รอด 1.67 ± 1.19 ตัว คิดเป็นอัตราการตายจากผลของยา praziquantel 200 mg/kg

body weight 91.2% ซึ่งมากกว่าการศึกษาของ Nongporn Hutadilok et al. (1983) ซึ่งพบ 85.6% แต่ผลการศึกษาครั้งนี้ใกล้เคียงกับปริมาณยา praziquantel ขนาด 40 mg/kg body weight ที่ใช้รักษาคนที่เป็โรคพยาธิใบไม้ตับ (Opisthorchiasis) จะมี cure rate ประมาณ 91% (Danai Bunnag and Tranakchit Harinasuta, 1981)

2. ผลการศึกษาจำนวนไข่ของพยาธิใบไม้ตับก่อนและหลังให้ยา praziquantel 200 mg/kg body weight ไปจนถึง 30 วัน

ผลการศึกษาจำนวนไข่พยาธิในอุจจาระของ hamsters ที่ตรวจพบก่อนให้ยา praziquantel โดยเฉลี่ย 1283.33 ± 297.61 NEPG หลังจากให้ยาไปแล้วในวันที่ 1 พบจำนวนไข่พยาธิเพิ่มมากที่สุดถึง 5216.67 ± 2568.43 NEPG ทั้งนี้เพราะจากผลของยา praziquantel ไปทำลายตัวพยาธิจนตัวพยาธิเกิดการฉีกขาดผ่านอวัยวะต่าง ๆ โดยเฉพาะ uterus ทำให้ไข่จำนวนมากมายที่อยู่เต็ม uterus ของพยาธิก็หลุดออกมาและขับออกมาทางอุจจาระ จากไข่พยาธิและตัวพยาธิที่ยังมีชีวิตรอดอยู่หลังจากสัมผัสพยาธิ praziquantel ไข่ที่ตรวจพบในอุจจาระจะมีลักษณะที่เป็นทั้ง mature eggs และ immature eggs ไข่พยาธิจะถูกขับออกมาเรื่อย ๆ และมีจำนวนไข่พยาธิมากกว่าก่อนให้ยาในวันที่ 2, 3 และหลังให้ยาวันที่ 4, 5 และ 7 จำนวนไข่ที่ตรวจพบจะลดจำนวนลงเรื่อย ๆ ตามลำดับซึ่งไข่ที่ตรวจพบมีจำนวนน้อยกว่าก่อนให้ยา เพราะเป็นไข่ที่มาจากตัวพยาธิที่ยังมีชีวิตอยู่และไข่พยาธิที่มาจากการคั่งค้างอยู่ในท่อน้ำดีของการฉีกขาด uterus ของตัวพยาธิ และหลังจากให้ยาในวันที่ 10 ไม่สามารถตรวจพบไข่พยาธิในอุจจาระ

3. ผลการศึกษารูปร่างลักษณะของตัวพยาธิ ก่อนและหลังให้ยา praziquantel 200 mg/kg body weight ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง

ก่อนให้ยา praziquantel รูปร่างลักษณะของตัวพยาธิ

0. viverrini ใน hamster มีขนาดเฉลี่ย 5.20 x 0.94 มม. เล็กกว่าพยาธิ

0. viverrini ที่ตรวจพบในคน มีขนาดประมาณ 7.4 x 1.4 มม. ทั้งนี้เพราะขนาดของ biliary system ของ hamster มีขนาดเล็กกว่าของคนมาก จึงทำให้ตัวพยาธิที่พบในคนมีขนาดใหญ่กว่าใน hamster ส่วนอวัยวะอื่น ๆ ที่ตรวจพบจากตัวพยาธิใน hamster ก็มีครบเหมือนพยาธิในคนแต่มีขนาดเล็กกว่า

ผลของยา praziquantel จะออกฤทธิ์ภายใน 4 ชั่วโมงหลังจากให้ยา (Mehlhorn et al., 1983) จากการศึกษาพบว่าหลังจากให้ยาไปแล้ว 4 ชั่วโมง ตัวพยาธิมีลำตัวแข็งและหดเกร็ง (Paralyzed and constriction) และไม่สามารถเคลื่อนไหวได้ ซากพยาธิตัวที่ตายก็จะถูกขับออกมาจาก biliary system ผ่านทางลำไส้และออกมาปนกับอุจจาระ ส่วนตัวพยาธิที่มีชีวิตอยู่รอดจะอาศัยอยู่ใน biliary system ของ hamster ต่อไปและทำการซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอจากผลของยา praziquantel เพื่อให้ดำรงชีวิตอยู่รอด จากการนำตัวพยาธิที่มีชีวิตรอดมาศึกษา ลักษณะภายนอกของตัวพยาธิจะพบว่าในช่วงวันแรก ๆ ของการให้ยา praziquantel ลักษณะผิวหนังภายนอกไม่สามารถบอกความแตกต่างได้จากการดูด้วยตาเปล่า เมื่อนำตัวพยาธิมาย้อมด้วย Semichon's acetic Carmine stain แล้วมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะภายในตัวพยาธิโดยผลของยา praziquantel จะมีผลต่อการสร้างไข่ของพยาธิ ปริมาณไข่ของพยาธิใน uterus มีจำนวนลดน้อยลงเริ่มเห็นได้ชัดในวันที่ 3 และจะลดลงเรื่อย ๆ จนถึงวันที่ 7 หลังจากให้ยาพยาธิจะสามารถเริ่มสร้างไข่ได้อีกหลังจากให้ยาไปแล้ว 10 วัน และจะสร้างไข่ขึ้นไปเรื่อย ๆ จนไข่เต็ม uterus อีกครั้งหลังจากให้ยาไปแล้ว 30 วัน (ภาพที่ 4) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากผลของยา praziquantel อาจจะมีผลต่อการทำงานของ ovary ทำให้การสร้างไข่หยุดชะงักลง ทำให้ปริมาณไข่ใน uterus พบน้อยลงแต่การเปลี่ยนแปลงของ ovary ไม่สามารถเห็นได้จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง จากสาเหตุนี้จึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบไข่พยาธิหลังจากให้ยาไปแล้ว 7 วัน และไม่น่าจะพบไข่พยาธิในอุจจาระอีกเมื่อดูจากการเปลี่ยนแปลงของผลการสร้างไข่ แต่สามารถตรวจพบไข่อีกในวันที่ 7 หลังให้ยาเป็นเพราะมีไข่ที่ค้างค้ำงอยู่ตามท่อน้ำดีภายในตับ (Riganti et al., 1988, Sawangjai Pungpak et al., 1990) และการสร้างไข่จะมีสภาพสมบูรณ์เต็มที่พร้อมที่จะขับออกมาได้ในวันที่ 30 หลังจากให้ยา (ภาพที่ 4) แต่ยังไม่สามารถตรวจพบไข่พยาธิในระยะนี้ได้ ทั้งนี้เป็นเพราะจำนวนตัวพยาธิที่ยังมีชีวิตอยู่รอดอยู่ใน hamsters มีจำนวนน้อยเกินไป การตรวจหาไข่พยาธิในระยะนี้จึงไม่พบ แต่ถ้ามีจำนวนตัวพยาธิที่รอดชีวิตมากกว่านี้ผู้วิจัยเชื่อว่าน่าจะตรวจพบไข่พยาธิแล้วหลังจากให้ยาไปแล้ว 30 วัน การเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะและอวัยวะอื่น ๆ ยังไม่สามารถบอกได้แน่ชัดว่าเกิดจากการเปลี่ยนแปลงจากผลของยา

praziquantel ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงซึ่งต้องศึกษารายละเอียดมากกว่านี้ต่อไปในระดับ transmission electron microscope

4. ผลการศึกษารูปร่างลักษณะของไข่พยาธิใบไม้ตับก่อนและหลังให้ยา

praziquantel 200 mg/kg body weight ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง

ก่อนให้ยา praziquantel รูปร่างลักษณะของไข่พยาธิเหมือนกับไข่พยาธิที่ตรวจพบในคน ขนาดประมาณ $24.8 \times 13 \mu$ ซึ่งเล็กกว่าไข่พยาธิที่ตรวจพบในคน $27 \times 15 \mu$

หลังให้ยา praziquantel การเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของไข่คือพบไข่ที่ฝาเปิดประมาณ 15% ไข่ที่มีโครงสร้างภายนอกบวมเข้าไปประมาณ 10% และไข่ที่ไม่มี miracidium อยู่ภายใน 5% ไข่ที่บวมขึ้นน่าจะเป็นไข่จากถุงไข่ที่เกิดจากการฉีกขาดของตัวพยาธิจึงทำให้ไข่ที่ตรวจพบมีสภาพไม่สมบูรณ์เต็มที่ ดูจากความแข็งแรงของเปลือกไข่ miracidium ที่อยู่ภายในไข่ และการเปิดของฝาไข่ได้ง่ายกว่าไข่ปกติ

5. ผลการศึกษารูปร่างลักษณะของตัวพยาธิใบไม้ตับก่อนและหลังให้ยา

praziquantel 200 mg/kg body weight ไปจนถึง 30 วัน ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน

ลักษณะทั่วไปของ *O. viverrini* ปกติ เมื่อดูด้วย SEM มีลักษณะ surface tegument คล้ายกับพยาธิตัวอื่น เช่น *Fasciola hepatica*, *Chonorchis sinensis* และ *Opisthorchis felinus* (Preset Sobhorn quoted in Bennett 1975, Fujino et al., 1979) ลักษณะเด่นของ surface tegument จะไม่เรียบมี stubby microvilli ปกคลุม microvilli เรียงตัวเป็นระเบียบ และระหว่าง microvilli จะมี sensory papillae กระจายอยู่ทั่วไปบน tegument ของพยาธิ และ tegument นี้จะทำหน้าที่ช่วยในการดูดซึมอาหารจำพวกแป้งและน้ำตาลของเล็บบางส่วนออกจากร่างกาย ส่วน sensory papillae เป็นอวัยวะรับความรู้สึก ดังนั้น microvilli และ sensory papillae จึงเป็นด่านแรกในการสัมผัสยา praziquantel จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ผิวของ microvilli และ sensory papillae (Preset Sobhorn et al. 1986)

oral sucker อยู่ด้าน anterior ของพยาธิ มีลักษณะคล้ายจานดูดไว้สำหรับยึดเกาะ host และดูดอาหารจาก host บริเวณรอบ ๆ sucker จะเห็น striation ชัดเจนแสดงถึง elasticity ของ sucker ในการเกาะดูด

ventral sucker อยู่บริเวณ $1/3$ ของลำตัวด้าน anterior มีลักษณะคล้ายกับ oral sucker ใช้สำหรับดูดเกาะติดกับ host และบริเวณรอบ ventral sucker จะพบ sensory papillae จำนวนมากกว่าบริเวณอื่น common genital opening อยู่ด้านบนของ ventral sucker (Craig and Faust, 1953, David, 1965, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, คณะแพทยศาสตร์, ภาควิชาปรสิตวิทยา, 1991) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง พบว่า common genital opening น่าจะอยู่เหนือ ventral sucker เช่นกัน แต่การศึกษาด้วย SEM พบว่ามีไข่มยาคี 2 ฟองกำลังจะหลุดออกมาจากตัวมยาคีในบริเวณ ventral sucker (ภาพที่ 7 B) โดยฟองหนึ่งเกือบจะหลุดออกไปนอกตัวมยาคีแล้ว เห็น knob ที่อยู่ด้านตรงข้าม operculum และ fibrous matrix ชัดเจน ส่วนไข่อีกฟองหนึ่งกำลังทยอยตามกันออกมาจากผลของการพบนี้จึงคาดว่า common genital opening น่าจะมีรูเปิดอยู่ที่ผิวด้านในของ ventral sucker และที่นักวิทยาศาสตร์ก่อน ๆ ได้รายงาน genital opening ไว้ว่ามีรูเปิดอยู่บน tegument เหนือ ventral sucker นั้น อาจจะเป็นเพราะว่า จากการดูตัวมยาคีที่เป็น permanent preparation และย้อมสี โดยผ่านขั้นตอนในการทำให้แห้ง (dehydration) และทำให้ใส (clearing) แล้วจะเห็น genital opening ชัดเจนเหมือนว่ามันเป็นรูเปิดบน surface tegument ของตัวมยาคี นั้นเพราะความใสและความแบนจนแสงผ่านทะลุตัวมยาคีมีส่วนทำให้ไม่สามารถแยกแหว่งรูเปิดบน surface tegument และ รูเปิดใน ventral sucker ได้นั่นเอง (ภาพที่ 7 B)

เนื่องจากมีผู้ศึกษาพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นบน surface tegument ของ *O. viverrini* จากผลของยา praziquantel ใน dose ต่าง ๆ กัน ทั้งใน in vitro และ in vivo หลายคนมาแล้ว (Mehlhorn et al., 1983, Sirisinha et al., 1984) การศึกษาใน in vivo ที่ทำการศึกษากันจะใช้ปริมาณยา praziquantel 350 mg/kg body weight ให้ hamster ที่เป็น Opisthorchiasis หลังจากนั้นเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ก็นำตัวมยาคีมาศึกษาด้วย SEM และ TEM จากการศึกษาของ Nongporn Hutadilok et al. (1983) ปริมาณยา praziquantel 300 mg/kg body weight ให้ hamster ที่เป็น Opisthorchiasis สามารถทำลายพยาธิ *O. viverrini* ใน hamster ได้หมด ส่วนปริมาณยา praziquantel 200 mg/kg body weight ซึ่งเป็น dose ที่ต่ำไม่

สามารถทำลายตัวพยาธิได้หมด พบว่ามีอัตราการตายของพยาธิ 85.6% แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าอัตราการตายของพยาธิ 91.2% เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับปริมาณยาที่ใช้รักษาคนที่ เป็นโรคพยาธิใบไม้ตับ จะใช้ยา praziquantel 40 mg/kg body weight cure rate ประมาณ 91% (Danai Bunnag and Tranakchit Harinasuta 1981) จะเห็นได้ว่า cure rate ในคนกับใน hamster ใกล้เคียงกัน ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้ปริมาณยา praziquantel ใน does ต่ำ เพื่อการเปลี่ยนแปลงของ surface tegument และ regeneration of surface tegument หลังจากให้ยาไปจนถึง 30 วัน ซึ่งการศึกษาของผู้วิจัยท่านอื่นก็ไม่ได้ทำการศึกษาจนถึง regeneration of surface tegument แต่การศึกษาครั้งนี้ให้ผลในแนวเดียวกับผู้วิจัยท่านอื่น และมีรายละเอียดเพิ่มเติมที่เกิดขึ้นกับพยาธิสภาพบน surface tegument ของตัวพยาธิดังนี้

พยาธิสภาพที่เกิดขึ้น surface tegument ของพยาธิที่มีชีวิตรอดอยู่ใน biliary system ของ hamster เริ่มตั้งแต่หลังจากได้รับยา praziquantel 4 ชั่วโมง จะพบ bubble เล็ก ๆ มากมาย บางบริเวณบน tegument และจะมีความรุนแรงมากตามลำดับจะพบ bubble มีขนาดใหญ่ขึ้น และ bubble บางอันมีการบวมพองเต็มที่แล้วก็จะแตกมีลักษณะเป็น crater-like pits และ bubble หลาย ๆ อันที่อยู่ใกล้กันเกิดการแตก และมีการเชื่อมตัวกันเป็น microridge ทำให้เกิด lesion ใหญ่ขึ้น (ภาพที่ 13A,B) ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับ Sirisinha et al., (1986) ที่ได้ศึกษาไว้ แต่ bubble ในวันที่ 4-5 ยังพบ bubble มีขนาดใหญ่ขึ้นมากซึ่ง ถ้าพยาธิไม่ตายหลังจากนี้ พยาธิจะมีการฟื้นตัวเองโดยการลอกหลุดของ tegument จนถึงชั้น basal lamina layer (Sirisinha et al., 1986) และมีการ repair ส่วนที่ถูกทำลายไปเรื่อย ๆ ตั้งแต่วันที่ 5 และการลอกหลุดของ microvilli และจะพบการลอกหลุดออกมามากในวันที่ 20 (ภาพที่ 16A-D) จะเห็นการลอกหลุดของ microvilli ที่เสื่อมสภาพจะรวมกองกัน และมีการสร้าง microvilli ขึ้นมาใหม่แทน tegument (regeneration of surface tegument) ที่ถูกทำลายไป microvilli ที่เกิดขึ้นมาใหม่นี้จะมีการเรียงตัวที่ไม่เป็นระเบียบ จนกระทั่งในวันที่ 30 regeneration of surface tegument มีลักษณะสมบูรณ์ขึ้นจะพบ microvilli ที่เรียงตัวเป็นระเบียบเหมือนปกติดั้งเดิม

การเปลี่ยนแปลงของ oral sucker และ ventral sucker ที่เกิดขึ้นหลังจากให้ยา praziquantel ไปจนถึง 30 วัน การเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นพบรอยย่น (striation) ที่เลื่อมสภาพ ด้านในของ sucker ตกเป็นริ้ว และมีการลอกหลุดของ fibril รอบ ๆ sucker ทำให้ความสามารถของ elasticity ที่ใช้ในการเกาะคูดอาหารและยึดเกาะติดกับ host ลดน้อยลง การเปลี่ยนแปลงจะเกิดขึ้นตั้งแต่หลังให้ยาวันที่ 1 และจะรุนแรงขึ้นเรื่อย ๆ และพบสภาพของ sucker ทั้งสองดีขึ้นหลังจากให้ยาไปแล้ว 20 วัน แต่ยังคงมีการลอกหลุดของ fibril รอบ ๆ อยู่ และสภาพดีขึ้นจนเหมือนสภาพปกติหลังจากให้ยาไปแล้ว 30 วัน และพบว่า sensory papillae บริเวณรอบ ๆ ventral sucker จะหมดไปจากผลของยา

จะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของสภาพภายนอกของพยาธิจะกลับฟื้นคืนสู่สภาพเดิมหลังจากให้ยาไปแล้ว 30 วัน

จากผลการศึกษาทำให้เห็นว่าในกรณีที่ใช้ยา praziquantel ใน dose ต่ำ รักษาคนที่ เป็นพยาธิใบไม้ตับ อาจทำให้เข้าใจผิดได้ว่า ผู้ป่วยหายแล้วด้วยการรักษา ทั้ง ๆ ที่จริง ๆ แล้วยังไม่หาย ยังมีพยาธิในร่างกาย จึงควรให้ยาใน dose ที่สองหลังจากให้ยาครั้งแรกไปแล้ว 4 วัน เพื่อทำลายพยาธิให้หมดในระหว่างที่พยาธิกำลัง repair ส่วนที่ถูกทำลาย

6. รูปร่างลักษณะของไข่ของพยาธิใบไม้ตับ ก่อนและหลังให้ยา praziquantel 200 mg/kg body weight ด้วย SEM

รูปร่างลักษณะของไข่พยาธิ *O. viverrini* เมื่อคุณลักษณะภายนอกของไข่ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงพบว่าไข่มีลักษณะรูปร่างยาวรีคล้ายหลอดไฟฟ้า ด้านบนมี operculum ระหว่าง operculum กับตัวไข่จะมี shoulder ด้านล่างจะมี knob เปลือกของไข่ผิวเรียบมี 2 ชั้น แต่เมื่อนำมาศึกษาด้วย SEM แล้ว พบว่าเปลือกไข่มีความหนา 0.4 μ ผิวด้านในเรียบผิวด้านนอกปกคลุมด้วย fibrous matrix ลานไปมาอย่างเป็นรูปแบบ (pattern) การเรียงตัวของ fibrous matrix บริเวณใกล้ operculum จะมีความหนาแน่น fibrous strips เป็นเส้นโค้งมน ส่วนด้านล่างจะมีความหนาแน่นของ fibrous matrix น้อยกว่า fibrous strips จะมีลักษณะวางตัวเป็นมุมแหลม ช่องว่างระหว่าง fibrous strips มีมากกว่าการเรียงตัวของ fibrous strips บริเวณ shoulder ต่างไปจากบริเวณอื่นมี fibrous strips 2 เส้น เรียงตัวขนานกันและชิดกันเส้นหนึ่งอยู่รอบตัวไข่ (egg body) และอีก

เส้นหนึ่งอยู่รอบขอบ operculum จากการขีดตัวของ fibrous strips ทั้งสองเส้นนี้และยังมี fibrous strip อีกเส้นหนึ่งตัดขวาง (cross strip) อาจเป็นเหมือนบานพับประตู เมื่อตัวอ่อนที่อยู่ภายในไข่พร้อมที่จะออกจากไข่แล้ว fibrous strips ที่อยู่รอบฝาไข่นี้อาจจะหลุดออกจากไข่ทำให้ฝาเปิด และฝานี้ก็จะเปิดในลักษณะแฉกขึ้นโดยเส้น fibrous strip ที่ตัดขวางจะเป็นตัวเชื่อม ทำให้เห็นไข่ที่ตัวอ่อนออกไปจากไข่แล้วมีลักษณะฝาแฉกขึ้นโดยที่ฝายังไม่หลุดออกไปจากตัวไข่พยาธิในกล้องจุลทรรศน์แสง แต่ถ้การเตรียมตัวอย่างที่มีการเขย่าแรง ๆ อาจทำให้ฝาหายไปเลยก็ได้ เพราะเส้น cross strips ขาด หรือผลจากสารเคมีก็อาจจะทำให้ cross strip นี้เสื่อมสภาพและหลุดขาดได้ง่าย และจากการศึกษา immature eggs จาก uterus ของพยาธิพบว่ายังไม่เห็น shoulder ชัดเจน คือจะไม่พบการสร้างเส้นขนานของ fibrous strips เมื่อเป็น mature eggs แล้วจึงเห็น shoulder นี้ชัดเจนขึ้น ส่วนบริเวณที่เป็น knob จะพบว่า pattern ของ fibrous matrix จะเป็นอีกแบบหนึ่งคือ จะเป็นลักษณะของ fibrous strip หักมุมแหลมหลายๆ อันมารวมกลุ่มกันที่บริเวณรูปกลมเล็ก ๆ ของ egg shell ทำให้เห็นเป็น knob ขึ้นขึ้น จะเห็นได้ว่า fibrous matrix มี pattern ที่เป็นลักษณะเฉพาะของมัน เราไม่สามารถแยกไข่ของพยาธิ *O. viverrini* *C. sinensis* และ *O. felinus* ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงได้ แต่เราสามารถแยกลักษณะของไข่พยาธิทั้ง 3 ชนิดนี้ได้โดยดู pattern ของ fibrous matrix ซึ่งจะแตกต่างกันไปเฉพาะตัว (Suzuki, 1977) fibrous matrix เกิดจากอะไรยังไม่เป็นที่ทราบแน่นอน แต่มันทำให้ egg shell มีความแข็งแรงคงทนขึ้น อาจเป็นไปได้ว่า immature eggs ต้องพึ่ง fibrous matrix ในการสร้างความคงทนให้เปลือกไข่ดังนั้น fibrous matrix จึงหนาแน่นมากในช่วงนี้ เมื่อเป็น mature eggs แล้ว fibrous matrix จึงบางลง

การศึกษาพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นบนไข่พยาธิหลังจากให้ยา praziquantel นั้น ยังไม่มีผู้ใดรายงานมาก่อนว่ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างไร จากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง แทบจะไม่พบความแตกต่าง แม้จะพบ abnormal eggs ว่ามีไข่ฝาเปิดประมาณ 15% ก็ยังไม่สามารถตัดสินได้แน่ชัดว่าเป็นเพราะผลจากการทำ Stoll's dilution egg count technique โดยการเขย่าไข่ให้อูจจาระแตกหรือไม่ ไข่ที่มีลักษณะบิดเบี้ยวผิดปกติรูปร่าง พบประมาณ 10% (ภาพที่ 5C) และไข่ไม่มี miracidium อยู่

ภายใน (unembryonated egg) พบประมาณ 5% (ภาพที่ 5D) ก็ตามแต่ไม่อาจจะยืนยันได้ว่าลักษณะของไข่ที่ผิดปกตินี้จะเป็นผลของยา praziquantel หรือไม่ แต่จากการศึกษาด้วย SEM จึงสามารถบอกได้ว่าการเปลี่ยนแปลงนี้เกิดจากผลของยาโดยพบลักษณะของไข่ที่ฝาดหายนี้เป็นผลของยามีผลต่อ fibrous matrix โดยที่ยานี้จะทำให้เส้น fibrous strips บริเวณ shoulder เสื่อมสภาพจึงทำให้ฝาของไข่เปิดได้ง่ายลักษณะฝาที่เปิดอาจเป็นแบบฝาแฉก หรือฝาหลุดหายไปเลย นอกจากนี้ยาจะไปทำลาย fibrous matrix ที่ตัวไข่ด้วยจะเห็นได้ว่า pattern ของ fibrous matrix เลี้ยวไปโดยสิ้นเชิง ไม่เห็นความเด่นนูนของ fibrous strips กลายเป็น fibrous plate ขนาดต่าง ๆ ซึ่งจะหลุดลอกออกจากเปลือกไข่ต่อไป (ภาพที่ 38B) จากลักษณะไข่ที่พบมีลักษณะบิดเบี้ยว เลี้ยวรูปร่าง และ unembryonated egg ที่หลุดออกมาจะเป็น immature egg ที่หลุดมาจากไข่เนื่องจากการฉีกขาดของลำตัวพยาธิผ่าน uterus ทำให้ไข่พยาธิถูกขับออกมาทางอุจจาระ และพบลักษณะไข่ที่เปลือกไม่แข็งแรงมีรูปร่างบิดเบี้ยว ไม่มี miracidium จากผลของยา praziquantel จึงทำให้ fibrous strips ที่ shoulder เสื่อมสภาพทำให้ฝาเปิด miracidium หลุดออกมาจากไข่ในระยะที่ยังไม่เจริญเต็มที่จะสามารถแพร่ขยายพันธุ์ได้ หรือทำให้ไข่ฝ่อ (uninfected egg) นอกจากนี้ยังพบ pattern ของ fibrous matrix ที่ปกคลุมไข่จะเบาบางลง บางบริเวณปราศจาก fibrous matrix ซึ่งเกิดจากผลของยาทำให้ fibrous matrix หลุดหลุดไป ทำให้เปลือกไข่พยาธิไม่แข็งแรงไข่จึงเสื่อมสภาพ แตกทำลายได้โดยง่าย ช่วยลดอัตราการติดโรคพยาธิใบไม้ตับได้ส่วนหนึ่งด้วยการตัดวงจรชีวิตในช่วงที่เป็นไข่

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการวิจัย

1. จำนวนตัวพยาธิ *O. viverrini* ที่ได้จากการ infected metacercaria 50 cysts ใน hamsters 1 ตัว โดยเฉลี่ย = 19.10 ± 1.46 ตัว คิดเป็น 38% ของอัตราการติดเชื้อ หลังจากให้ยา praziquantel 200 mg/kg body weight ไปแล้ว 1 วัน ตัวพยาธิที่ตายจะถูกขับออกมากับอุจจาระ ส่วนตัวพยาธิที่มีชีวิตรอดจะมีการซ่อมแซม (repair) ส่วนที่ถูกทำลาย โดยสร้าง tegument ขึ้นใหม่ (regeneration) ถ้าไม่สามารถทนต่อฤทธิ์ของยาตัวพยาธิจะถูกขับออกมากับอุจจาระของ hamsters อีก ตัวพยาธิจะมีชีวิตอยู่รอดและสามารถดำรงชีวิตอย่างปกติได้หลังจากได้รับยาไปแล้ว 30 วัน จากการศึกษาครั้งนั้นพบตัวพยาธิมีชีวิตอยู่รอดใน hamsters โดยเฉลี่ย 1.67 ± 0.95 ตัว คิดเป็น cure rat 91.2% จำนวนตัวพยาธิ ก่อนและหลังให้ยา praziquantel 200 mg/kg body weight แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2. จำนวนไข่พยาธิ *O. viverrini* ก่อนให้ยา โดยเฉลี่ย 1283.33 ± 297.55 NEPG หลังจากให้ยา praziquantel 200 mg/kg body weight พบไข่พยาธิในอุจจาระของ hamster มีจำนวนมากที่สุดหลังให้ยาไปแล้ว 1 วัน และจะถูกขับออกมาเรื่อย ๆ จนถึงวันที่ 7 หลังจากให้ยา และจะไม่พบไข่พยาธิหลังจากให้ยาไปแล้ว 10 วัน

3. รูปร่างลักษณะของตัวพยาธิจาก hamster ที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ แสงมีลักษณะเหมือนกับพยาธิที่พบในคน แต่มีขนาดเล็กกว่า หลังจากให้ยา praziquantel พบการเปลี่ยนแปลงที่ปริมาณไข่ใน uterus มีจำนวนน้อยลง เริ่มเห็นได้ชัดหลังจากให้ยาไปแล้ว 3 วันและปริมาณไข่จะเริ่มเพิ่มขึ้นหลังให้ยาไปแล้ว 10 วัน ไข่จะเต็ม uterus เหมือนตัวพยาธิปกติหลังจากให้ยาไปแล้ว 30 วัน

4. รูปร่างลักษณะของไข่พยาธิที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงมีลักษณะเหมือนกับไข่พยาธิที่พบในคน แต่มีขนาดเล็กกว่า หลังจากให้ยา praziquantel ลักษณะของไข่พยาธิที่พบมีทั้ง embryonated eggs, non-embryonated eggs และไข่ที่ปราศจาก operculum

5. รูปร่างลักษณะของตัวพยาธิ *O. viverrini* ที่ศึกษาด้วย SEM พบ oral sucker และ ventral sucker surface tegument ประกอบด้วย stubby microvilli ระหว่าง microvilli จะมี sensory papillae แทรก

อยู่เป็นระยะ ๆ บริเวณรอบ ๆ ventral sucker จะพบ sensory papillae มากที่สุด หลังให้ยา praziquantel พบการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพบน surface tegument เกิด bubble ตั้งแต่ให้ยาไปแล้ว 4 ชั่วโมง หลังจากนั้น bubble จะมีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อย ๆ จน bubble แตกเป็นหลุมที่เรียกว่า crater-like pits หลาย ๆ bubble ที่แตกมาเชื่อมรวมกันเป็น microridge ทำให้เกิด lesion บนตัวพยาธิใหญ่ขึ้น หลังจากให้ยา 7 วันจะพบมีการหลุดลอกของ tegument ที่ถูกทำลาย และพบมากขึ้นหลังจากให้ยาไปแล้ว 20 วัน regeneration of surface tegument เกิดขึ้น หลังจากให้ยาไปแล้ว 30 วัน มีการเปลี่ยนแปลงที่ oral sucker และ ventral sucker พบว่ามี striation เลือ่มสภาพ และมีการหลุดลอกของ destroyed fibril หลังจากให้ยาในช่วงแรก ๆ และหลังจากนั้น จะมีสภาพดีขึ้นเรื่อย ๆ จนมีสภาพเหมือนตัวพยาธิที่ปกติหลังจากให้ยาไปแล้ว 30 วัน

6. รูปร่างลักษณะของไข่พยาธิ *O. viverrini* ที่ศึกษาด้วย SEM พบว่าไข่พยาธิปกคลุมด้วยเปลือกไข่ที่มีความหนา 0.4μ ส่วนประกอบส่วนใหญ่เป็น chitin ผิวของเปลือกไข่ด้านในเรียบแต่ด้านนอกปกคลุมด้วย fibrous matrix ที่มี pattern เฉพาะตัวของไข่ ด้านบนของไข่มี fibrous strip เป็นเส้นโค้ง ด้านล่างของไข่มี fibrous strip เป็นเส้นหักเป็นมุมแหลม ด้านที่เป็นมุมจะหันด้านมุมลงไปด้านล่างรวมตัวเป็น knob ของไข่ ส่วนที่ shoulder เป็น fibrous strip 2 เส้นเรียงตัวขนานกัน และมี cross strip ตัดขวาง แบ่งระหว่างตัวไข่กับ operculum

หลังให้ยา praziquantel พบการเปลี่ยนแปลงที่ fibrous pattern ที่บริเวณตัวไข่โดยมีการเรียงตัวของ fibrous strips ไม่เป็นระเบียบ บางบริเวณแน่นทึบ บางบริเวณมีการหลุดลอก มีการเปลี่ยนแปลงของ fibrous strips บริเวณ shoulder นอกจากนี้พบไข่ที่ปราศจาก operculum และไข่ที่ egg shell บบลงไปพอสมควร

ข้อเสนอแนะ

แม้จะถูกจำกัดด้วยงบประมาณ และเวลาในการศึกษารายละเอียดโครงสร้างของไข่และตัวพยาธิ O. viverrini ก็ตาม ผู้วิจัยได้พยายามที่จะให้การศึกษาครั้งนี้ตอบสนองวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ตั้งแต่แรกเริ่ม นับว่าได้บรรลุผลตามวัตถุประสงค์ตามสมควรกล่าวคือ

1. ศึกษารูปร่างลักษณะไข่และตัวแก่ของพยาธิใบไม้ตับปกติ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน
2. ศึกษารูปร่างลักษณะของไข่และตัวแก่ของพยาธิใบไม้ตับที่ถูกทำลายด้วยยา praziquantel ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน
3. ศึกษาจำนวนไข่พยาธิที่ออกมากับอุจจาระของ hamster และจำนวนพยาธิที่มีชีวิตรอดใน hamsters หลังจากให้ยา praziquantel ในแต่ละวัน
4. ศึกษา regeneration of surface tegument ของพยาธิใบไม้ตับใน hamsters หลังจากให้ยา praziquantel ไปแล้ว 30 วัน

อย่างไรก็ตามข้อมูลเหล่านี้เกิดจากการศึกษาผลของยา praziquantel ต่อไข่และตัวพยาธิใบไม้ตับใน hamsters ดูจากการเปลี่ยนแปลงของจำนวนไข่ที่ออกมากับอุจจาระของ hamsters และจำนวนตัวพยาธิที่มีชีวิตรอดจากผลของยา การเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอก และอวัยวะภายในด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง และการเปลี่ยนแปลงของลักษณะภายนอกของไข่และตัวพยาธิด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกนเท่านั้น ดังนั้นหากงบประมาณและเวลาอำนวย น่าจะมีการศึกษารายละเอียดลักษณะภายในของไข่และตัวพยาธิมีรูปร่างลักษณะของตัวพยาธิโดยละเอียดเป็นอย่างไร ทั้งก่อนและหลังให้ยา praziquantel ด้วย Transmission Electron Microscope (TEM) จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้เราทราบว่าผลของยา praziquantel มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างภายนอกที่ได้จากการศึกษาด้วย SEM พบที่ oral sucker, ventral sucker, surface tegument และ sensory papillae ส่วนการสร้างไข่ที่ขังงันในระยะหนึ่งด้วยนั้นจะเป็นผลจากความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับ ovary หรือไม่ ไม่สามารถบอกได้จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แสง แต่ผลของยานี้น่าจะมีผลต่ออวัยวะภายในอื่น ๆ ด้วย ดังนั้นจึงน่าจะทำการศึกษาในรายละเอียดอีกต่อไปและจากการศึกษารูปร่างลักษณะของไข่ ทำให้ทราบว่า O. viverrini มีลักษณะเฉพาะอย่างไรโดยดูได้จากลักษณะของ

pattern ของ fibrous matrix อย่างไรก็ดี การศึกษาวิจัยครั้งนี้ทำให้ได้ทราบลักษณะ surface ของไข่และตัวพยาธิโดย SEM เท่านั้น น่าจะมีการศึกษาต่อไปด้วย TEM เพื่อจะได้ทราบผลของยาที่อาจมีต่อตัว miracidium ที่อยู่ในไข่ด้วย ซึ่งเป็นประโยชน์ในด้านวิชาการนำไปใช้ในการรักษาโรคนี้ต่อไป จากข้อมูลในการศึกษาลักษณะของไข่และตัวพยาธิก่อนและหลังให้ยา praziquantel สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษารายละเอียดโครงสร้างของไข่และตัวพยาธิได้ต่อไป

จากผลการศึกษานี้จะเห็นได้จากยา praziquantel ใน dose ต่ำ ไม่อาจทำลายตัวพยาธิให้หมดได้ ตัวพยาธิกลับฟื้นตัวขึ้นมาสามารถดำรงชีวิตรอดใน hamsters ได้อีก เช่นเดียวกับการรักษาคนที่ เป็น Opisthorchiasis โดยเฉพาะในรายที่เป็น heavy infection หลังรักษาด้วยยา praziquantel 40 mg/kg body weight ไม่สามารถฆ่าพยาธิได้หมด พยาธิยังคงมีชีวิตรอดได้หลังจากให้ยาแล้ว ดังนั้นการรักษาครั้งต่อไปอาจจะมีผลต่อการรักษา พยาธินี้ อาจคือต่อยา praziquantel การใช้ยาในปริมาณต่ำอาจไม่สามารถทำลายตัวพยาธิได้ เรื่องนี้ก็เป็นเรื่องที่น่าที่จะทำการศึกษาต่อไป ดังนั้นการรักษาโรคพยาธิใบไม้ตับในกรณีที่เป็น heavy infection ควรจะให้ยา praziquantel ในปริมาณที่สูงพอเพื่อทำลายตัวพยาธิให้หมด หรืออาจจะให้ยาซ้ำอีกครั้งหลังจากให้ยาครั้งแรก 4 วัน เพื่อทำลายตัวพยาธิให้หมดก่อนที่พยาธิจะซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอให้ฟื้นคืนมาได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย