WIADOMOŚCI PARAZYTOLOGICZNE
T. XXXI, NR 3: 1985

METABOLIZM BIOENERGETYCZNY LARW *TRICHINELLA SPIRALIS SPIRALIS* I *TRICHINELLA SPIRALIS PSEUDOSPIRALIS* *

KRYSTYNA BOCZOŃ

Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego, Poznań

Badania metabolizmu pasożytów, oprócz oczywistego aspektu poznawczego, mają również aspekt praktyczny, ponieważ wyniki badań biochemicznych wykorzystuje się następnie zgodnie z założeniami celowanej terapii. Jak wiadomo, leki skuteczne w chemioterapii robaczyc działają głównie na metabolizm bioenergetyczny i dlatego poznawanie torów i mechanizmów jakimi robaki pasożytnicze zdobywają energię ma zasadnicze znaczenie dla poszukiwania nowych, jeszcze bardziej skutecznych leków.

Badania nad metabolizmem bioenergetycznym larw *Trichinella spiralis spiralis* i *Trichinella spiralis pseudospiralis* przedstawione w tej pracy zostały podjęte jako badania podstawowe, umożliwiające przeprowadzenie równolegle badań nad wpływem leków przeciwrobaczycowych na ten metabolizm u obu nicieni. Wyniki tych badań stanowiących próbę wyjaśnienia biochemicznych mechanizmów działania kilku stosowanych w chemioterapii leków (levamizolu, tiabendazolu i mebendazolu) zostały ostatnio opublikowane (Boczoń i wsp., 1984).

Własności bioenergetyczne mitochondriów larw *T. spiralis spiralis* zostały częściowo zbadane (Stannard i wsp., 1938; Goldberg, 1957; Ferguson i Castro, 1973; Boczoń i Michejda, 1978) ale jednoznaczna ich interpretacja jest trudna (Stewart, 1983). Metabolizm bioenergetyczny larw *T. spiralis pseudospiralis* jest w ogóle nieznany; wynikała stąd potrzeba dalszej kontynuacji badań metabolizmu bioenergetycznego z rozszerzeniem ich o badania porównawcze u obu podgatunków z rodzaju *Trichinella*.

---

* Praca częściowo subwencjonowana przez Komitet Parazytologii PAN.

Larwy *Trichinella* żyją w środowisku niewątpliwie natlenowanym (mięśnie żywiciela), ale fakt nieotarbiania larw *T. spiralis pseudospiralis* w mięśniu żywiciela może być odpowiedzialny za istnienie różnicy w natlenowaniu bezpośredniego otoczenia larwy. (U *T. spiralis spiralis* dzięki utrudnionej penetracji tlenu przez ścianę torebki natlenowanie może być niższe). Porównanie własności metabolizmu bioenergetycznego u obu tych nicieni wydawało się więc interesujące z punktu widzenia adaptacji torów oddechowych u nicieni pasożytniczych do stopnia natlenowania biotopu.

Udział obu torów oddechowych: typu klasycznego, wrażliwego na działanie cyjanku i antymycyny, występującego u ssaków oraz „alternatywnego" o małej wrażliwości na cyjanek, występującego w tkankach roślin i niektórych mikroorganizmów (Rychter, 1982) jest obiektem badań u niektórych stadiów rozwojowych nicieni żyjących w biotopach różniących się stopniem natlenowania (Fry i Jenkins, 1983). Odgałęzienie drogi alternatywnej w łańcuchu oddechowym u roślin (Storey, 1971) i u niektórych robaków pasożytniczych (Barrett, 1981) występuje w rejonie ubichinonu, który jest wspólnym przenośnikiem elektronów zarówno dla drogi alternatywnej jak i cytochromowej. Ze względu na kluczową rolę ubichinonu w rozgałęzionych torach oddechowych oraz na korelację pomiędzy typem i ilością chinonów w mitochondriach tkanek pasożytów a stopniem natlenowania biotopu, na co zwrócili uwagę Sato i Ozawa (1969) oraz Allen (1973) badania chinonów wydają się mieć istotne znaczenie dla poznawania metabolizmu bioenergetycznego. Allen (1973) zbadała jakościowo chinony u różnych robaków pasożytniczych, m.in. i u *T. spiralis spiralis* oraz ilościowo u postaci dorosłych i larw *Stephanurus dentatus*.

Założeniem badań przedstawionych w tej pracy była próba porównania metabolizmu bioenergetycznego u obu nicieni z rodzaju *Trichinella*, ze zwróceniem uwagi na wrażliwość toru transportu elektronów na cyjanek, ocena stopnia sprzężenia mitochondriów oraz jakościowa i ilościowa analiza chinonów. Zbadano również aktywność i właściwości kinetyczne mitochondrialnej, stymulowanej Mg^{++} ATP-azy u obu pasożytów. Obecność pewnej aktywności tej ATP-azy, ale niewrażliwej na oligomycynę, w surowej frakcji cytoplazmatycznej może być odpowiedzialna za trudności w uzyskiwaniu sprzężonych preparatów mitochondrialnych u obu nicieni z rodzaju *Trichinella*. Może ona również tłumaczyć częściowo zaobserwowane uprzednio zjawisko rozkojarzającego wpływu surowej frakcji cytoplazmatycznej z larw *T. spiralis spiralis* na mitochondria zdrowych tkanek szczura (Michejda i Boczoń, 1972).

Materiał i metody

Izolacja frakcji komórkowych i pomiary szybkości zużycia tlenu oraz wrażliwość na działanie inhibitorów toru transportu elektronów

Wytrawianie i oczyszczanie larw obu gatunków nicieni przeprowadzono wg schematu opisanego w poprzedniej publikacji (Boczoń i wsp., 1978).

Frakcję mitochondrialną używaną do pomiarów oksygraficznych oraz do oznaczania aktywności mitochondrialnej ATP-azy izolowano w następujący sposób: 20% homogenat larw nicieni w medium składającym się z 0,25 M sacharozy, 0,03 M buforu Tris (pH 7,2 - 7,4) oraz 0,5% BSA (białko surowicy wołowej, frakcja V, wolne od kwasów tłuszczowych) wirowano przy 1000 g przez 6 minut; osad odrzucano a uzyskany supernatant wirowano ponownie przy 12 000 g przez 12 minut. Przemywany dwukrotnie osad mitochondriów traktowano jako frakcję mitochondrialną. Supernatant po drugim wirowaniu określano jako surową frakcję cytoplazmatyczną. Izolacja frakcji komórkowych z wątroby zdrowego szczura odbywała się analogicznie, z tym jednak, że wprowadzono następujące zmiany: 10% homogenat przygotowywano w medium sacharozowym bez dodatku BSA, a pierwsze wirowanie z przyspieszeniem 600 g odbywało się przez 6 minut.

Pomiar szybkości zużycia tlenu (QO_2) oraz stopnia kontroli oddechowej (K/O) przeprowadzono metodą polarograficzną z użyciem elektrody Clarka w systemie zamkniętym (oksygraf Yellow Spring Instruments) w naczynkach o objętości 1 ml. Skład medium inkubacyjnego był następujący (w mM): bufor Tris (pH 7,2) — 20, $MgCl_2$ — 3, KCl — 125, P_i — 5, EDTA (kwas etylenodwuaminoczterooctowy) — 0,1, BSA — 0,5%, cyt. c — 30, alfa-glicerofosforan i bursztynian — 20, pirogronian i jabłczan — 10, NADH — 0,1, TMPD (czterometylenofenylenodwuamina) — 0,4 i askorbinian — 4. Zawartość białka mitochondrialinego w naczynku wynosiła 0,7 - 2,0 mg a temperatura pomiaru 28°C. Współczynnik kontroli oddechowej obliczano wg metody opisanej przez Estabrooka (1967).

Aktywność ATP-azy we frakcajch komórkowych obu nicieni

Aktywność ATP-azy w obu frakcjach mitochondrialnej i cytoplazmatycznej była mierzona jako ilość P_i uwalnianego do medium pomiarowego (wg Fiske i Subbarowa, 1925) bez użycia systemu regenerującego ATP. Skład medium inkubacyjnego był następujący (w mM): sacharoza — 50, KCl — 75, bufor Tris (pH 7,2) — 20, ATP — 8, $MgCl_2$ — 4. Aktywność ATP-azy mierzonej bez dodatków jonów Mg^{++} wynosiła

tylko około 5% aktywności stymulowanej przez dodatek jonów Mg^{++}. W doświadczeniach z zastosowaniem rozprzęgacza i inhibitora stężenie ich było następujące: rozprzęgacz — 2,4-dwunitrofenol (DNP) — 1 mM, inhibitor-oligomycyna (15% formy A i 85% formy B) — 0,7 ug/ml. W badaniach nad wpływem inhibitorów toru transportu elektronów (rotenon, antymycyna i cyjanek) oraz rozprzęgaczy (DNP i FCCP-trójfluorometoksyfenylohydrazon cyjanku karbonylu) stosowano etanolowe roztwory (stężenie etanolu nigdy nie przekraczało 0,4% w naczynku pomiarowym) antymycyny, FCCP i DNP; cyjanek rozpuszczany był w wodzie a rotenon w formamidzie.

Ilościowe i jakościowe badanie chinonów

Cienkowarstwową chromatografię chinonów przeprowadzono wg metody Allen (1973). Spektra absorpcyjne ekstraktów (w mieszaninie izopropanol:benzen:woda) mierzono w zakresie 200 - 360 nm na spektrofotometrze firmy Zeiss (Specord UV-vis). Posługując się wzorcem UQ (ubichinon-koenzym Q_{50} — firmy Sigma) wyliczono współczynnik ekstynkcji 1% roztworu (przy grubości mierzonej warstwy 1 cm) — $E^{1\%}_{1\,cm} = 107$, natomiast dla rodochinonu wobec braku wzorca posłużono się współczynnikiem podanym dla *Ascaris* przez Allen = 103.

Z powodu wrażliwości na światło rodochinonu wszystkie ekstrakcje i całość procedury chromatograficznej prowadzono w ciemni. W badaniach jakościowych jako detektora plam używano roztworu leucobłękitu metylenowego (uzyskiwanego drogą redukcji tego barwnika przy pomocy podsiarczanu sodu).

Białko oznaczano metodą Lowry'ego i wsp. (1951).

Wyniki

Szybkość utleniania w Stanie 4 (bez dodatku ADP) bursztynianu, pirogronianu i jabłczanu oraz TMPD +askorbinian nie różniła się w sposób istotny w mitochondriach obu gatunków nicieni z rodzaju *Trichinella* (tab. 1). Była ona tego samego rzędu co szybkość utleniania bursztynianu u *Ascaris*, ale znacznie niższa niż szybkość utleniania tego substratu w mitochondriach tkanek ssaków (Köhler i Bachman, 1980).

Podobnie, jak to wykazano uprzednio w badaniach u *T. spiralis spiralis* (Boczoń, 1976), szybkość utleniania w Stanie 3 (QO_2) oraz współczynnik kontroli oddechowej (K/O) z bursztynianem jako substratem — były w przypadku *T. spiralis pseudospiralis* zależne od wysokich stężeń ADP w medium inkubacyjnym. Dopiero przy stężeniu ADP około 300 μM osiągano maksymalną szybkość oddychania w Stanie 3 (ryc. 1).

Wrażliwość oddychania wobec kilku wybranych substratów odde-

TABELA 1

Szybkość zużycia tlenu w Stanie 4 (QO_2) i kontrola oddechowa (K/O) w mitochondriach larw *T. spiralis spiralis* i *T. spiralis pseudospiralis*

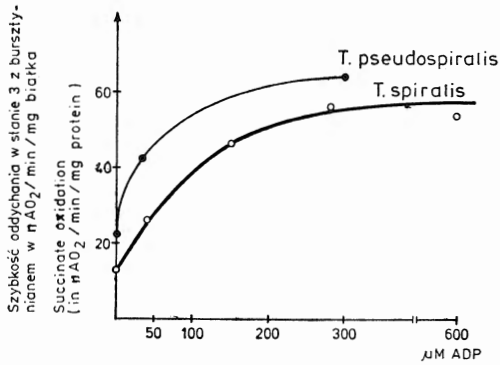
TABLE 1

Oxygen uptake in State 4 (QO_2) and respiratory control index (RCI) in mitochondria of *T. spiralis spiralis* and *T. spiralis pseudospiralis*

	T. spiralis spiralis					*T. spiralis pseudospiralis*				
	B*	Gl*	P+J*	NADH*	TMPD+a	B	Gl	P+J	NADH	TMPD+ +a
QO_2	$16{,}3_{19}$	$9{,}2_5$	$4{,}8_8$	$7{,}8_9$	248_2	$21{,}2_{11}$	$19{,}8_6$	$4{,}2_4$	$19{,}4_7$	190_4
v	50	50	33	51	—	49	84	—	26	—
K/O	$2{,}6_{19}$	$1{,}6_3$	$2{,}0_4$	—	—	$3{,}0_{11}$	$2{,}9_5$	$1{,}1_4$	—	—
RCI										
v	50	—	—	—	—	63	—	—	—	—

Warunki pomiaru — patrz Materiał i Metody. Stan 4 — oddychanie (w nA 0_2/min/mg białka) mierzone przed dodaniem ADP. Kontrolę oddechową mierzono po dodaniu 300 nmoli ADP. v — współczynnik zmienności (w %). Liczba pomiarów w prawym dolnym rogu obok każdej wartości. * — Dane opublikowane uprzednio (Boczoń, 1976). B — bursztynian (20 mM), GL — alfaglicerofosforan (20 mM), P + J — pirogronian + jabłczan (po 10 mM), TMPD + a — TMPD (0,4 mM) + askorbinian (4 mM)

Conditions of measurements — see Material and Methods. State 4 respiration (in nA 0_2/min/mg of protein) before addition of ADP. Respiratory control index (RCI) was measured after addition of 300 nmoles of ADP. v — coefficient of variation (in %). Number of experiments next to the valute on the right. * Data published previously (Boczoń, 1976). B — succinate (20 mM), Gl — alphaglicerophosphate (20 mM), P + J — pyruvate + malate (10 mM), NADH (0.10 mM), TMPD + a — TMPD (0.4 mM) + ascorbate (4.0 mM)



Ryc. 1. Zależność szybkości utleniania (QO_2) bursztynianu w stanie 3 od stężenia ADP w mitochondriach larw *T. spiralis spiralis* i *T. spiralis pseudospiralis*. Punkty krzywej reprezentują średnią z dwóch pomiarów. Ilość białka mitochondrialnego w naczynku wynosiła 0,9 mg, a stężenie bursztynianiu 20 mM.

Fig. 1. Correlation between succinate oxidation rate (QO_2) and ADP concentration in mitochondria of *T. spiralis spiralis* and *T. spiralis pseudospiralis*. Data are means from 2 experiments. Succinate concentration — 20 mM, mitochondrial protein — 0,9 mg.

TABELA 2

Wrażliwość oddychania wobec kilku substratów oddechowych na inhibitory toru transportu elektronów oraz rozprzęgacze fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach *T. spiralis spiralis* i *T. spiralis pseudospiralis*

TABLE 2

Sensitivity of mitochondrial respiration in *T. s. spiralis* and *T. s. pseudospiralis* to inhibitors of electron transport and to uncouplers

Inhibitory Inhibitors	Substraty Substrates	*T. spiralis spiralis*		*T. spiralis pseudospiralis*	
		stężenie concentration	oddychanie QO_2	stężenie concentration	oddychanie QO_1
Antymycyna (w μg/mg białka)	B	0,2	0*	0,8	50
Antimycin (in μg/mg of protein)	Gl	0,2	0*	1,4 $1,9_{1,9}$	25 2_2
Rotenone (w μM)	P+J	2,3	0*	—	—
Rotenone (in μM)	NADH	0,7 1,1	50* 0	2,0 4,0	20 0
Cyjanek (w mM)	B	—	—	1,0	2
Cyanide (in mM)	Gl	—	—	0,3	0
	TMPD+a	0,5 0,8	20 0	0,5—2,5	60
2,4-dwunitrofenol (w μM)	B	158	126 ST*	120	220 ST
2,4-dinitrophenol	Gl	—	—	100	200 ST
FCCP (w μM)	B	24,8	126 ST*	—	—
(in μM)	Gl	15,8	73	—	—

Wyniki reprezentują średnią z 2—4 pomiarów (TMPD + a i wpływ KCN u *T. spiralis pseudospiralis* — 8 pomiarów). Inhibicja lub stymulacja (ST) oddychania w Stanie 4 została wyrażona (w %) jko część oddychania zmierzona po dodaniu inhibitora lub rozprzęgacza (100% stanowiło oddychanie przed dodaniem odpowiedniego czynnika). Objaśnienia porównaj tab. 1.

Results are mean of 2-4 experiments except the TMPD + a oxidation with KCN (a mean from 8). Inhibition or stimulation (ST) was expressed of mitochondrial respiration (100% = respiration without inhibitors) before addition of inhibitor or uncoupler. Expl. of tab. 1.

chowych na działanie inhibitorów toru transportu elektronów w mitochondriach *T. spiralis spiralis* okazała się podobna do tej wrażliwości w mitochondriach normalnych tkanek ssaków. Natomiast w mitochondriach larw *T. spiralis pseudospiralis* wrażliwość oddychania z bursztynianem i alfa-glicerofosforanem na działanie antymycyny była znacznie niższa (około 10-krotnie wyższe stężenie aniżeli u *T. spiralis spiralis* hamowało to oddychanie w 100%). Również utlenianie TMPD+askorbinian wykazywało u *T. spiralis pseudospiralis* częściowy brak wrażliwości na działanie cyjanku.

Stymulacja przez rozprzęgacze fosforylacji (DNP i FCCP) oddycha-

nia w Stanie 4 świadczy u obu larw nicieni o pewnej ich zdolności do przeprowadzania procesu fosforylacji oksydacyjnej, jednak niska wartość tej stymulacji (tab. 2) może wskazywać na mały stopień sprzężenia mitochondriów uzyskiwanych w tych badaniach.

Częściowy brak wrażliwości na działanie cyjanku oksydazy cytochromowej mierzonej przy użyciu sztucznego donora elektronów — askorbinianu i TMPD u larw *T. spiralis pseudospiralis* może wskazywać na prawdopodobieństwo działania u tego pasożyta alternatywnej drogi oddechowej. Ostateczne zbadanie tej drogi z określeniem jej udziału w przenoszeniu elektronów można określić jedynie na podstawie miareczkowania przy narastającym stężeniu specyficznego inhibitora tej drogi — kwasu hydroksamowego (Rychter, 1983).

Aktywność stymulowanej Mg^{++} ATP-azy wykryta we frakcji mitochondrialnej była ściśle zależna od stężenia EDTA w medium używanym

TABELA 3

Ahkywność stymulowanej Mg^{++} ATP-azy w sprzężonych i rozprzężonych preparatach mitocotndrialnych oraz we frakcji cytoplazmatycznej izolowanej z larw *T. spiralis spiralis*, *T. spiralis pseudospiralis* oraz z wątroby zdrowego szczura

TABLE 3

Activity of Mg^{++} - stimulated ATP-ase in mitochondria and crude cytoplasmic fraction from *T. spiralis spiralis*, *T. spiralis pseudospiralis* and from normal rat liver

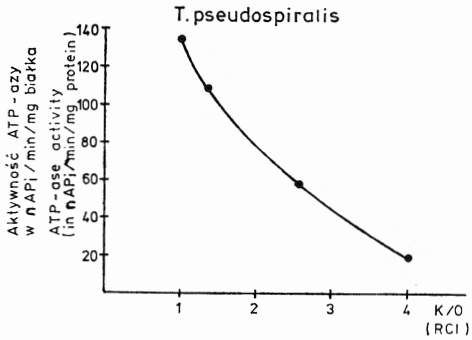
	T. spiralis spiralis		*T. spiralis pseudospiralis*			Wątroba szczura Liver		
	Mito	Cyto	Mito 1	Mito 2	Cyto	Mito 1	Mito 2	Cyto
A_s	$42{,}0_2$	$81{,}0_6$	$110{,}0_6$	$30{,}0_3$	$41{,}0_8$	$60{,}0_3$	$26{,}0_2$	$7{,}0_4$
v (w %) (in %)	—	42	33	—	18	—	—	—
A_s+DNP	—	—	—	59,0	48,0	—	—	—
A_s+oligomycyna (hamowanie w %) A_s+oligomycin (inhibition in %)	—	—	—	57	73	—	—	—

Cyto — Surowa frakcja cytoplazmatyczna (warunki izolacji — patrz Materiał i metody), Mito 1 — mitochondria rozprzężone (K/O = 1,1) Mito 2 — mitochondria sprzężone (K/O około 5), Mito u *T. spiralis spiralis* — nie oznaczono współczynnika kontroli oddechowej. Stężenie EDTA w medium izolacyjnym w przypadku uzyskiwania mitochondriów rozprzężonych wynosiło około 1 mM, a w przypadku mitochondriów sprzężonych 0,1 - 0,3 mM. A_s — aktywność specyficzna wyrażona w nA P_i/mg białka/min. Stężenie 2,4-dwunitrofenolu (DNP) — 1 mM, a oligomycyny około 1 μM

Cyto — cytoplasmic fraction (conditions of isolation of crude cytoplasmic fraction — see Material and Methods). Mito 1 — uncoupled mitochondria (RCI 1,1), Mito 2 — coupled mitochondria (RCI about 5). EDTA concentration in isolation medium for uncoupled mitochondria about 1 mM and in medium for coupled mitochondria 0,1 - 0,3 mM. In mitochondrial preparation from *T. spiralis spiralis* RCI was not estimated. A_s — specific activity in nA P_i/min/mg of protein. Concentration of 2,4-dinitrophenol — 1 mM and oligomycin about 1 μM

do izolacji frakcji mitochondrialnej. Mitochondria izolowane z *T. spiralis pseudospiralis* z użyciem niskiego stężenia EDTA (0,3 mM) wykazywały dobry stopień sprzężenia (tab. 3) i prawie 4-krotnie niższą aktywność ATP-azy mitochondrialnej aniżeli mitochondria izolowane w medium o stężeniu EDTA około 1 mM. Stężenie EDTA w medium izolacyjnym nie miało natomiast żadnego wpływu na ATP-azę zawartą w surowej frakcji cytoplazmatycznej, której aktywność u obu nicieni była kilkakrotnie wyższa aniżeli w izolowanej w podobny sposób frakcji cytoplazmatycznej z wątroby normalnego szczura (tab. 3).

W mitochondriach wykazujących rozprzężenie, izolowanych zarówno z obu nicieni, jak i z wątroby szczura — aktywność mitochondrialnej ATP-azy była wysoka (tab. 3). Na ryc. 2 przedstawiono relację pomiędzy stopniem sprzężenia mitochondriów (wartość współczynnika K/O) u larw *T. spiralis pseudospiralis* a aktywnością mitochondrialnej ATP-azy u tego nicienia.



Ryc. 2. Korelacja pomiędzy wartością współczynnika kontroli oddechowej (K/O) a aktywnością mitochondrialnej, stymulowanej Mg^{++} ATP-azy u larw *T. spiralis pseudospiralis*. Aktywność wyrażono w nA P_i/min/mg białka. Punkty krzywej reprezentują średnią z 2 - 4 pomiarów.

Fig. 2. Correlation between mitochondrial ATP-ase activity and respiratory control ratio (RCI) in *T. spiralis pseudospiralis* larvae. Activity expressed in nA of P_i/min/mg of protein. Data are means for 2 - 4 experiments.

Wrażliwość stymulowanej Mg^{++} ATP-azy we frakcji mitochondrialnej i surowej frakcji cytoplazmatycznej na działanie oligomycyny — specyficznego inhibitora ATP-azy zlokalizowanej w mitochondriach — u *T. spiralis pseudospiralis* przypominała wrażliwość mitochondrialnej ATP-azy u ssaków (70% zahamowania aktywności). Mitochondrialna ATP-aza była słabo stymulowana (około 2-krotnie w mitochondriach *T. spiralis pseudospiralis*) przez jeden z rozprzęgaczy fosforylacji — 2,4-dwunitrofenol.

TABELA 4

Porównanie własności kinetycznych mitochondrialnej ATP-azy stymulowanej Mg^{++} u obu nicieni z rodzaju *Trichinella* i w wątrobie szczura

TABLE 4

Kinetic properties of Mg^{++}-stimulated ATP-ase from mitochondria of both *Trichinella* nematodes and in normal rat liver

$K_m \times 10^{-3}$ M	*T. spiralis spiralis*	*T. spiralis pseudospiralis*	Wątroba szczura Liver
dla ATP	1,8	3,4	1,0
dla Mg^{++}	1,8	1,7	0,5

Przedstawione wartości stanowią średnią z 2 eksperymentów. Warunki izolacji frakcji mitochondrialnej patrz: Materiał i metody.

Results a mean from 2 experiments. Isolation of mitochondrial fraction — see Material and Methods.

Stosunek stężenia jonów Mg^{++} do stężenia ATP optymalny dla pomiaru aktywności ATP-azy był u nicieni podobny do tegoż stosunku dla analogicznego enzymu w mitochondriach wątroby szczura (tab. 4), ale wartość K_m z ATP jako substratem u *T. spiralis pseudospiralis* była wyższa aniżeli w przypadku mitochondrialnej ATP-azy z wątroby normalnego szczura, co świadczy o niższym powinowactwie ATP-azy w mitochondriach tego nicienia do ATP.

TABELA 5

Zawartość chinonów w ekstraktach z larw *T. spiralis spiralis* i *T. spiralis pseudospiralis*

TABLE 5

Quinone content in larvae of *T. spiralis spiralis* and *T. spiralis pseudospiralis*

	T. spiralis spiralis			*T. spiralis pseudospiralis*		
	UQ	RQ	UQ/RQ	UQ	RQ	UQ/RQ
Zawartość w μg/g świeżej masy Content in μg/g of wet weight	$15{,}2_2$	$7{,}6_2$	2	$56{,}6_2$	$28{,}6_2$	2
Zawartość w μg/mg N Content in μg/mg of N	0,72	0,36		6,94	3,50	

Dla badań ilościowych całkowite homogenaty solne z larw obu nicieni były ekstrahowane w mieszaninie izopropanol: benzen: woda (Allen, 1973). Dla wyliczenia ilości ubichinonu w maksimum absorpcji $\lambda = 273$ nm używano współczynnika ekstynkcji 1% roztworu przy grubości warstwy mierzonej w kiuwecie = 1 cm o wartości 107, a dla rodochinonu w maksimum absorpcji $\lambda = 283$ nm użyto współczynnika, którego wartość wynikająca z badań Allen u *Ascaris* wynosiła 103.

For quantitative estimation the absorption spectra of the total extracts in a mixture of isopropanol: bensene: water were measured between 200 - 360 nm. To calculate the amount of ubiquinone an $E^{1\%}_{1\,cm}$ of 107 was used at $\lambda = 273$ and of 103 at $\lambda = 283$ nm was used to caltulate the amount of rhodoquinone.

Ilościowa analiza chinonów u obu nicieni z rodzaju *Trichinella* wykazała, że występują one tutaj we wzajemnej propozycji UQ:RQ = 2:1 (tab. 5). Dla ułatwienia porównania wyników własnych z wynikami innych autorów zawartość chinonów wyrażono zarówno w przeliczeniu na g świeżej masy, jak i na mg azotu białkowego. W larwach *T. spiralis pseudospiralis* zawartość obu typów chinonów w przeliczeniu na g świeżej masy jest 3-krotnie wyższa niż u *T. spiralis spiralis*.

Dyskusja

Wobec znanego faktu nieprzepuszczalności błony mitochondrialnej dla NADH w normalnych mitochondriach tkanek ssaków (Lehninger, 1951) i niektórych tasiemców (Cheah, 1971) zmierzone w tych badaniach dość wysokie tempo utleniania NADH (tab. 1) u *T. spiralis pseudospiralis* może świadczyć o częściowym uszkodzeniu mitochondriów w czasie procedury izolacji. Takie samo tempo utleniania egzogennego NADH charakteryzowało jednak zarówno rozprzężone preparaty mitochondrialne (K/O = 1 — 2) u *T. spiralis pseudospiralis*, jak i te, które wykazywały pewien stopień rozsprzężenia (K/O około 3) (Boczoń, dane niepublikowane). Sugeruje to, że zdolność utleniania NADH może być własnością mitochondriów tego nicienia, podobnie jak to ma miejsce u wielu bezkręgowców i roślin charakteryzujących się oddychaniem niewrażliwym na cyjanek (Rychter, 1983).

Proces końcowego utleniania u *T. spiralis pseudospiralis* różni się więc od tego procesu w tkankach ssaków. Porównując metabolizm bioenergetyczny u obu nicieni z rodzaju *Trichinella*, należy zauważyć następujące różnice: 1) szybkość utleniania NADH i alfa-glicerofosforanu jest 2-krotnie wyższa u *T. spiralis pseudospiralis* niż u *T. spiralis spiralis*; 2) wrażliwość oksydaz bursztynianowej i alfa-glicerofosforanowej na działanie antymycyny jest znacznie mniejsza u *T. spiralis pseudospiralis*; 3) częściowy brak wrażliwości oksydazy cytochromowej na działanie cyjanku u *T. spiralis pseudospiralis*.

Uzyskanie sprzężonych preparatów mitochondrialnych z larw obu nicieni było trudne, o czym świadczy niska powtarzalność wyników w tab. 1 (współczynnik zmienności v dla QO_2 około 50% a dla K/O nawet 63%). Mitochondria tych nicieni, ze względu na niski stopień sprzężenia przypominają mitochondria tkanek roślinnych, których oddychanie jest niewrażliwe na cyjanek (Rychter, 1982).

Trudności w uzyskaniu sprzężonych mitochondriów z obu gatunków nicieni z rodzaju *Trichinella*, a z drugiej strony rozkojarzający wpływ surowej frakcji cytoplazmatycznej larw *T. spiralis spiralis* na mitochondria zdrowych mięśni szczura, zaobserwowany w poprzednich badaniach (Michejda, Boczoń, 1972) były powodem podjęcia badań nad aktywnością ATP-azową również we frakcji cytoplazmatycznej u obu nicieni.

Wyniki tych badań wskazują na obecność w tej frakcji pewnej aktywności stymulowanej Mg^{++} ATP-azy. Porównanie wrażliwości ATP-azy zawartej w surowej frakcji cytoplazmatycznej na oligomycynę, z jej wrażliwością we frakcji pozbawionej częściowo drogą kolejnego wirowania surowej frakcji cytoplazmatycznej (przy 16 000 g przez 40 minut) fragmentów błony mitochondrialnej wykazało, że około 40% aktywności tego enzymu zmierzonej w surowej frakcji cytoplazmatycznej, może być pochodzenia pozamitochondrialnego. Ze względu na małą liczbę tego typu eksperymentów (2) oraz zbyt niską wartość przyśpieszenia stosowanego przy powtórnym wirowaniu surowej frakcji cytoplazmatycznej — badania w tym zakresie będą kontynuowane.

Aktywność mitochondrialnej ATP-azy w sprzężonych mitochondriach u larw *T. spiralis pseudospiralis* (Mito 2 w tab. 3) była podobna do aktywności ATP-azy w mitochondriach Ascaris (van den Bossche, 1974).

Z ilościowych badań chinonów wynika, że ilość rodochinonu u obu nicieni jest podobna do jego ilości u postaci dorosłych i larw inwazyjnych *Stephanurus dentatus*, a także do jego zawartości w mięśniach czerwonych u ryb i morskich bezkręgowców (Farbu i Lambersten, 1979).

Allen (1973) zaobserwowała następującą korelację u pasożytniczych nicieni: u żyjących w dobrze natlenowanym środowisku przeważa ubichinon, natomiast u żyjących w słabo natlenowanym (np. dorosłe *Ascaris*, *Ascaridia dissimilis*, dorosłe *Stephanurus dentatus*) głównym chinonem jest rodochinon. Wyższy poziom ubichinonu u *T. spiralis pseudospiralis* niż u *T. spiralis spiralis* może być dowodem adaptacji tego nicienia do bytowania w dobrze natlenowanym mięśniu żywiciela bez żadnej otoczki (co zapewnia lepsze natlenowanie bezpośredniego otoczenia larwy niż to ma miejsce w przypadku larw *T. spiralis spiralis*). Larwy *T. spiralis pseudospiralis* poruszające się w obrębie mięśni żywiciela (Al Karmi i Faubert, 1981) wymagają więcej energii niż otorbione larwy *T. spiralis spiralis*. Podobnie jak mięśnie czerwone ryb, działające w czasie szybkiego ruchu ryb, mogłyby larwy czerpać energię przynajmniej częściowo z procesu fosforylacji oksydacyjnej. Dla udowodnienia jednak zdolności mitochondriów larw obu gatunków nicieni z rodzaju *Trichinella* do przeprowadzenia procesu fosforylacji oksydacyjnej, konieczne jest dalsze kontynuowanie tych badań.

W mięśniach czerwonych Fabru i wsp. (1979) zaobserwował aż 10-krotnie wyższą zawartość ubichinonu (w analogii do 10-krotnie wyższej aktywności oksydazy cytochromowej) niż w mięśniach białych działających w czasie wolnego ruchu ryb. Zaobserwowana w tych badaniach nad larwami z rodzaju *Trichinella* kilkakrotnie wyższa niż u *T. spiralis spiralis* zawartość obu typów chinonów u ruchliwych larw *T. spiralis*

pseudospiralis — może być wyrazem adaptacji tego pierwszego nicienia do nieco odmiennego sposobu bytowania w tkance mięśniowej żywiciela.

Wnioski

1. Metabolizm bioenergetyczny larw obu nicieni z rodzaju *Trichinella* wykazuje następujące własności: (a) szybkość utleniania podstawowych substratów tj. bursztynianu, pary substratowej — pirogronian + jabłczan oraz alfa-glicerofosforanu jest znacznie niższa niż w przypadku mitochondriów tkanek ssaków; (b) dla osiągnięcia maksymalnych wartości współczynnika kontroli oddechowej oraz maksymalnej szybkości oddychania w stanie 3 (+ADP) wymagane są wysokie stężenia ADP; (c) wysokie tempo utleniania egzogennego NADH, słaby stopień sprzężenia mitochondriów oraz częściowy brak wrażliwości oksydazy cytochromowej na działanie cyjanku i oksydazy bursztynianowej na działanie antymycyny może sugerować istnienie w mitochondriach larw *T. spiralis pseudospiralis*, toru „alternatywnego" obok klasycznego toru transportu elektronów.

2. Pomiary aktywności i próby częściowej kinetycznej charakterystyki mitochondrialnej, stymulowanej Mg^{++} ATP-azy w sprzężonych preparatach u obu nicieni wykazały, że jest ona zasadniczo podobna do mitochondrialnej ATP-azy z wątroby szczura. Obecność pewnej aktywności ATP-azy, charakteryzującej się brakiem wrażliwości na działanie oligomycyny, w surowej frakcji cytoplazmatycznej, może komplikować procedurę izolacji ściśle sprzężonych mitochondriów z larw obu nicieni.

3. Jakościowe i ilościowe badania chinonów wykazały obecność w larwach obu nicieni dwóch typów chinonów: ubichinonu i rodochinonu (we wzajemnej proporcji 2:1). Ilość ubichinonu w larwach *T. spiralis pseudospiralis* była kilkakrotnie wyższa niż u *T. spiralis spiralis*, co pozostaje w pewnej korelacji z ruchliwością tego nicienia w czasie przebywania w mięśniach żywiciela.

Podziękowania

Autorka pragnie serdecznie podziękować Prof. J. W. Michejdzie za przedyskutowanie maszynopisu pracy i cenne uwagi krytyczne. Pani Krystynie Szeląg dziękuję za ofiarną i sprawną pomoc techniczną w trakcie wykonywania eksperymentów, a Dr. med. Hugo van den Bossche za trafne uwagi w czasie przygotowywania roboczej wersji maszynopisu.

Adres autorki:
61-701 Poznań, Fredry 10

LITERATURA

1. Allen, P.: Helminths: Comparison of their rhodoquinones. — *Expl Parasitol.*, 34, 211 - 219, 1973.
2. Boczoń, K.: Bioenergetics of *Trichinella spiralis* larvae and the effect of some anthelmintics on succinate dehydrogenase of *Trichinella spiralis* mitochondria. — Biochemistry of Parasites and Host- Parasite Relationships, pod red. H. van den Bossche, Elsevier, North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 589 - 597, 1976.
3. Boczoń, K.: The role of malic enzyme in the carbohydrate metabolism of *Trichinella spiralis spiralis* and *Trichinella spiralis pseudospiralis*. — *Int. J. Parasitol.*, w druku.
4. Boczoń, K.: The Influence of Some Anthelmintics on *Trichinella spiralis spiralis* and *Trichinella spiralis pseudospiralis* Bioenergetic Metabolism. — *Biochem. Pharmacol.*, 33, 2523 - 2525, 1984.
5. Boczoń, K., Michejda J. W.: Electron transport in mitochondria of *T. spiralis* larvae. — *Int. J. Parasitol.*, 8, 507 - 513, 1978.
6. Barrett, J.: Biochemistry of Parasitic Helminths, McMillan Publishers Ltd., 1981.
7. van den Bossche, H.: Adenosine triphosphatase activity in *Ascaris* muscle mitochondria. — *Comp. Biochem. Physiol.*, 49b, 71 - 78, 1974.
8. Cheah, K. S.: Oxidative phosphorylation in *Moniezia* mitochondria. — Comparative Biochemistry of Parasites, ed. H. van den Bossche, Academic Press, N. Y. - London, 479 - 491, 1972.
9. Estrabrook, R.: Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurements of ADP:O ratios. — *Methods in Enzymology*, 10, 41 - 47, 1967.
10. Farbu, T., Lambersten, G.: Ubiquinone analysis in fish tissues and in some marine invertebrates. — *Comp. Biochem. Physiol.*, 63b, 395 - 397, 1979.
11. Fiske, C. H., Subbarow, Y.: The colorimetric determination of phosphorus. — *J. Biol. Chem.*, 66, 375 - 400, 1925.
12. Fry, M., Jenkins, D. C.: *Nippostrongylus brasiliensis* and *Ascaridia galli*: Mitochondrial Respiration in Free-living and Parasitic Stages. — *Expl. Parasitol.*, 56, 101 - 106, 1983.
13. Goldberg, E.: Studies on intermediary metabolism of *T. spiralis*. — *Expl. Parasitol.*, 6, 367 - 382, 1957.
14. Gursch, O. F.: Effect of digestion and refrigeration on the ability of *T. spiralis* to infect rats. — *J. Parasitol.*, 34, 304 - 395, 1948.
15. Al Karmi, T. O., Faubert, G. M.: Biological differences between *T. spiralis* and *T. pseudospiralis* in mice. — Trichinellosis, ed. Kim, Ch. W., Ruitenberg, E. J., Teppema, J. S., Redbook Ltd., Fox Lane North., Surrey, England, 29 - 33, 1981.
16. Köhler, P., Bachman, R.: Mechanism of respiration and phosphorylation in *Ascaris suum* mitochondria. — *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1, 75 - 90, 1980.
17. Lehninger, A. H.: Phosphorylation coupled to the oxidation of dihydrodiphosphopyridine nucleotide. — *J. Biol. Chem.*, 190, 345 - 359, 1951.
18. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: Protein measurements with the Folin-phenol reagent. — *J. Biol. Chem.*, 193, 263 - 275, 1951.
19. Michejda, J. W., Boczoń, K.: Uncoupling effect of cytoplasmic fraction of *Trichinella spiralis* larvae on bioenergetics of rat skeletal muscle mitochondria. — *Bull. Soc. Amis Sci. Lettr.* Poznań, ser. D8, 159 - 164, 1967.

20. Rychter, A. M.: Alternatywna droga oddechowa u roślin wyższych. — *Post. Bioch.*, 28, 89 - 113, 1982.
21. Sato, M., Ozawa, H.: Occurance of ubiquinone and rhodoquinone in parasitic nematodes *Metastrongylus elongatus* and *Ascaris lumbricoides var. suis.* — *J. Biochem.*, 65, 861 - 867, 1969.
22. Stannard, N. J., McCoy, O. R., Latchford, W. B.: Studies on the metabolism of *Trichinella spiralis* larvae. — *Am. J. Hyg.*, 27, 666 - 682, 1938.
23. Storey, B. T.: The respiratory chain of plant mitochondria. X. Oxidation--reduction potentials of the flavoproteins of skunk cabbage mitochondria. — *Plant Physiol.*, 48, 493 - 497, 1971.

BIOENERGETICS OF *TRICHINELLA SPIRALIS SPIRALIS* AND *TRICHINELLA SPIRALIS PSEUDOSPIRALIS*

by

K. BOCZOŃ

Both nematodes were isolated from invaded rat muscles 3 - 6 month after invasion. Total digestion (according to Gursch et al., 1948) time was not longer than 1.5 h (*T. spiralis pseudospiralis*) or 2.5 h (*T. spiralis spiralis*). For isolation of two subcellular fractions from *T. spiralis spiralis*, *T. s. pseudospiralis* and rat liver the total homogenate in 0.25 M sucrose + 0,03 M Tris buffer (pH 7.2 - 7.4) + 0.5% w/v BSA (FAF, fraction V, Sigma) was centrifuged at 1000 g for 6 minutes. The supernatant after the first centrifugation was centrifuged again at 12 000 g for 10 min. Sedimented mitochondrial pellet was washed twice in isolation medium without BSA and used for oxygraphic measurements. For ATP-ase estimation both washed and unwashed mitochondrial preparations in parallel to crude cytoplasmic fraction were used.

Respiration was measured polarographically with closed-system Clark-type electrode and YSI-53 oxygen monitor in 1 ml. ATP-ase activity was measured by the release of P_i (according to Fisske - Subbarow, 1925) without ATP regenerating system in the presence of Mg^{++}.

Thin layer chromatography and quantitative determinations of both quinones-ubiquinone (UQ) and rhodoquinone (RQ) was performed according to modified Allen technique (1973).

State 4 respiration with succinate in mitochondria from both *Trichinella* nematodes was much lower than in mammalian tissues (rat liver), but similar to *Ascaris* (Köhler and Bachman, 1980). A high concentration of ADP is required to reach a maximal State 3 respiration. Respiratory control index with all substrates was rather low (RCI = 2—3) and reproducibility of its measurements with succinate was poor (in *T. s. spiralis and T. s. pseudospiralis* v = 50 and 63%, respectively).

Main differences between bioenergetic of *T. s. pseudospiralis* and *T. s. spiralis* follow: 1. *T. s. pseudospiralis* has a higher rate of exogenous NADH oxidation than *T. s. spiralis*; 2. partial insensitivity of cytochrome oxidase (measured polorographically as the oxidation of TMPD + ascorbate) to KCN and succinate oxidase to antimycin in *T. s. pseudospiralis.*

Partial insensitivity of cytochrome oxidase to KCN, a poor coupling of mitochondria and the ability of oxidation of exogenous NADH may suggest the presence of alternative electron transport system in *T. s. pseudospiralis* larvae.

Mitochondrial Mg^{++} stimulated ATP-ase was inhibited by oligomycin (like in mammals in 70%) and stimulated (only twice) by uncoupler 2,4-dinitrophenol. Some oligomycin - insensitive — Mg^{++} stimulated ATP-ase activity was measured also in crude cytoplasmic fraction and this ATP-ase can make procedure of isolation of tightly coupled mitochondria from both nematodes difficult.

The quantitative and qualitative determinations of quinones in both *Trichinella* nematodes revealed the presence of two quinones : ubiquinone (UQ) and rhodoquinone (RQ) in proportion of UQ: RQ = 2 : 1. As it was expected, motile in host muscles (Al Karmi and Faubert, 1981), uncapsulated *T. s. pseudospiralis* larvae possess 3 - 4-times greater amount of both quinones than capsulated, motionless *T. s. spiralis* larvae.