

AKTYWNOŚĆ PROTEOLITYCZNA ONKOSFER *TAENIA SAGINATA* BADANA METODĄ IZOTOPOWĄ

BOGUMIŁ HALAWA i BARBARA JAKACKA

Klinika Kardiologiczna Instytutu Chorób Wewnętrznych AM, Wrocław
Zakład Biologii Ogólnej Instytutu Biostruktury AM, Wrocław

Badania dotyczące mechanizmu penetracji jelita przez onkosfery ograniczają się właściwie do tasiemców mających stawonogi jako żywicieli pośrednich [10]. Metodami histologicznymi i histochemicznymi zbadano budowę haczyków i gruczołów penetracyjnych onkosfer, co pozwoliło przypisać im dużą rolę w inwazji do tkanek żywiciela [7, 8, 11]. Niniejsze badania podjęto dla stwierdzenia lub braku obecności enzymów proteolitycznych aktywnych w środowisku zasadowym lub słabo zasadowym [2].

Material i metoda

Dojrzałe, maciczne człony *Taenia saginata* przechowywano w lodówce w temperaturze około $+2^{\circ}\text{C}$ w płynie fizjologicznym, jaja uzyskiwano przez mechaniczne uszkodzenie macicy tasiemca igłami preparacyjnymi. Przepłukiwano płynem fizjologicznym i zagęszczano metodą sedymentacji (pięciokrotnej), a następnie wirowano przez 1 min przy 1500 obr./min [4]. Liczono je metodą rozcieńczenia [1]. Do 20 probówek wlewano po 1 ml zawiesiny jaj w płynie fizjologicznym. 10 probówek stanowiło grupę kontrolną, 10 następnych trawiono według Silvermana [8]. Kontrolę trawienia prowadzono pod mikroskopem. Po przerwaniu inkubacji odwirowywano osad przez 1 min przy 1000 obr./min i przemywano go płynem fizjologicznym. Płyn znad osadu po trawieniu i po płukaniu wlewano po 1 ml do 10 probówek.

Oznaczenia probówek: grupa kontrolna (nietrawiona) — I,
grupa trawiona płynem Silvermana — II,
grupa z supernatantem — III.

Wszystkie probówki przechowywano około 12 godzin w temperaturze -2°C , po czym je homogenizowano. Do 0,2 ml homogenatu dodawano 1,4 ml buforu Tris 0,2 M o pH 8,2 oraz 0,4 ml kazeiny znakowanej

jodem promieniotwórczym (^{131}J). Równocześnie przygotowano ślepią próbę wlewając do osobnych probówek znakowaną kazeinę i 0,2 ml homogenatu w buforze Tris. Inkubację przeprowadzono w łaźni wodnej w temperaturze $+37^{\circ}\text{C}$ przez 2 godziny. Reakcję przerwano przez dodanie 2 ml 6% kwasu trójchlorooctowego do inkubowanej próby, a do próby ślepej natychmiast po wlaniu homogenatu w buforze Tris do znakowanej kazeiny. Po godzinie przesączono obie próby przez bibułę Whatman I, a z przesączu pobierano 1 ml do oznaczenia radioaktywności. Pomiaru radioaktywności dokonywano w liczniku studzienkowym typu USB-2 z przelicznikiem PEL-5a i zasilaczem PZWL-5a. Aktywność proteolityczną uzyskiwano z obliczeń według wzoru:

$$\text{aktywność proteolit.} = \frac{\text{akt. próby} - \text{akt. ślepej próby}}{\text{ilość strawionej kazeiny w 1 ml}}$$

Otrzymaną wartość przeliczano na 1 mg homogenatu. Do matematycznej oceny wyników przedstawiono dane uzyskane z trzech grup. W ten sposób przeprowadzono trzykrotne badania, które oznaczono jako A, B, C. Badanie A było wykonane na jajach uzyskanych z innego tasiemca niż badanie B i C. W doświadczeniu B pobierano jaja z członów macicznych znajdujących się w roztworze fizjologicznym z Mertiolanem w rozcieńczeniu 1 : 10 000.

Matematyczna ocena wyników

Oprócz średnich arytmetycznych i ich odchyłeń standardowych, dla każdej grupy badań obliczano różnicę między ilością strawionej kazeiny przed wytrawianiem płynem Silvermana (I) i po trawieniu (II i III). Średnie porównywano testem t-Studenta lub zmodyfikowanym testem t, w zależności od tego, czy można było założyć równość wariancji. Różność wariancji testowano testami F-Snedecora.

Wyniki wartości średnich aktywności proteolitycznych onkosfer w mg strawionej kazeiny przedstawiono w tabeli.

B a d a n i e A: stwierdzono statystycznie istotny wzrost aktywności proteolitycznej grupy II w stosunku do I ($p < 0,01$). Grupa III wykazuje także statystycznie istotny wzrost aktywności proteolitycznej w stosunku do grup I i II ($p < 0,001$).

B a d a n i e B: nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w aktywności proteolitycznej między grupami I, II i III.

B a d a n i e C: nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w aktywności proteolitycznej między grupami I, II i III.

TABELA

Wartości średnie aktywności proteolitycznej onkosfer w mg strawionej kazeiny

TABLE

Mean values oncosfere proteolytic activity in mg of digested casein

Badanie Sample	Grupa Group	\bar{x}	<i>s</i>	<i>v</i>	<i>n</i>
A	I	0.0045	0.0010	23	15100
	II	0.0057	0.0007	13	
	III	0.0094	0.0020	22	
B	I	0.0065	0.0008	12	15100
	II	0.0058	0.0006	10	
	III	0.0060	0.0009	14	
C	I	0.0058	0.0006	11	9560
	II	0.0058	0.0014	23	
	III	0.0059	0.0007	12	

\bar{x} – średnie wartości badanych cech – mean values of studied features.

s – standardowe odchylenie – standart deviation.

v – współczynniki zmienności wyrażone w % – variability factors as percent.

Wyniki porównań średnich między badaniami A, B i C

Grupa I: statystycznie istotny wzrost aktywności proteolitycznej zaznaczył się między badaniami: B i A ($p < 0,001$), C i A ($p < 0,01$) oraz B i C ($p < 0,05$).

Grupa II: nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w aktywności proteolitycznej między trzema badaniami.

Grupa III: statystycznie istotny wzrost aktywności proteolitycznej wystąpił tylko w badaniu A w stosunku do badań B i C ($p < 0,001$).

Omówienie

W pierwszym badaniu zaznacza się wzrost aktywności enzymów proteolitycznych w wyklutych onkosferach. Jednak największą aktywność wykazuje płyn znad osadu. Płyn ten zawiera belecзки embrioforu, które rozpadają się w trakcie trawienia 1% pepsyną i płynem Silvermana [7, 9]. Na podstawie tego badania można by sugerować, iż w trakcie uwalniania onkosfery aktywizują się enzymy proteolityczne. Potwierdzałoby to doniesienie Silvermana i Maneely [9], którzy zauważyli pewne właściwości cytolityczne i proteolityczne u onkosfer. Sugestii tej przeczą dwa następne doświadczenia, w których nie wykazano żadnych istotnych różnic w aktywności enzymów proteolitycznych pomiędzy jajami inwa-

zyjnymi, wyklutymi onkosferami i beleczkami embrioforu. Nie zauważono także różnic statystycznie istotnych w aktywności proteolitycznej pomiędzy wyklutymi onkosferami w badaniu A, B, C. Wydaje się, że różnice wynikłe w aktywności proteolitycznej pierwszego badania w stosunku do pozostałych są wynikiem zbyt długiego przetrzymywania taśmca *T. saginata*. Silverman [8] zauważył fakt nierównomiernego dojrzewania jaj wewnątrz członów macicznych przechowywanych w lodówce i dlatego wydaje się, że mniej istotny dla doświadczenia jest procent zdolnych do zarażenia onkosfer [1] niż długość przetrzymywania materiału biologicznego. W pierwszym doświadczeniu to długie przetrzymywanie strobili mogło spowodować uwolnienie z lizosomów onkosfer enzymów proteolitycznych, które po odwirowaniu dostały się do supernatantu [5]. Fakt ten tłumaczyłby także większą aktywność onkosfer w stosunku do aktywności proteolitycznej jaj inwazyjnych.

Wnioski

1. Wyklute in vitro onkosfery nie wykazują zwiększonej aktywności enzymów proteolitycznych w porównaniu do jaj inwazyjnych.

2. Wydaje się, że wykluwające się onkosfery nie wydzielają enzymów proteolitycznych aktywnych w środowisku słabo zasadowym lub zasadowym.

3. Do doświadczeń takiego typu konieczny jest świeży materiał biologiczny.

Otrzymano: 21 X 1975

Adres autora:

50-367 Wrocław, Pasteura 4

LITERATURA

1. Dewhirst, L. W., Cramer, J. D., Pistor, W. J.: Bovine cysticercosis. I. Longevity of cysticerci of *Taenia saginata*. — *J. Parasit.*, 49, 297-300, 1963.
2. Halawa, B., Frydecka, I.: Aktywność proteolityczna limfocytów krwi ludzkiej oznaczana za pomocą kazeiny znakowanej jodem promieniotwórczym [^{131}J]. — *Acta Haemat. Pol.*, 2, 219-222, 1971.
3. Harper, H. A.: Zarys chemii fizjologicznej. — *PZWL*, Warszawa, 1972.
4. Kozar, Z., Kozar, M.: Diagnostyka chorób pasożytniczych człowieka. — *PZWL*, Warszawa 1972.
5. Robertis, E. D. P., Novinski, W. W., Saez, F. A.: Biologia komórki. — *PZWL*, Warszawa 1974.

6. Sawada, J.: Penetration glands in the oncospheres of *Reillietina cestici-
lus*. — *Expl. Parasit.*, 11, 141-146, 1961.
7. Rybicka, K.: Embryogenesis in Cestodes. — *Adv. Parasit.*, [Ed. Ben Dawes],
4, 107-186, 1966.
8. Silverman, P. H.: Studies on the biology of some tapeworms of the genus
Taenia. I. Factors affecting hatching and activation of taeniid ova, and some
criteria of their viability. — *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 48, 207-215, 1954.
9. Silverman, P. H., Maneely, R. B.: Studies on the biology of some
tapeworms of the genus *Taenia*. III. The role of the secreting gland of the
hexacynth embryo in the penetration of the intestinal mucosa of the inter-
mediate host and some of its histochemical reactions. — *Ann. Trop. Med.
Parasit.*, 49, 326-330, 1950.
10. Smyth, J. D.: The biology of *Cestoda* life-cycles. — *Techn. Commun.
Commonw. Bur. Helminth.*, 34, 1-34, 1963.
11. Smyth, J. D.: The physiology of *Cestodes*. — *Oliver & Boyd*, Edinburg 1969.

PROTEOLYTIC ACTIVENESS OF *TAENIA SAGINATA* ONCOSPHERES
EXAMINED WITH THE ISOTOPIC METHOD

by

B. HAŁAWA AND B. JAKACKA

The proteolytic activeness of oncospheres digested in vitro according to Silverman was determined using casein labelled with radioactive iodine (¹³¹J). Triplicate determinations were performed on two tapeworms. The oncospheres did not show any statistically significant differences in their proteolytic activeness.

The proteolytic activeness of the post-digestion supernatant was questionable.