

AKTYWNOŚĆ PROTEOLITYCZNA *CYSTICERCUS BOVIS*

BOGUMIŁ HALAWA I BARBARA JAKACKA

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

Enzymy proteolityczne należą do najważniejszych enzymów występujących w komórkach, płynach ustrojowych i wydzielinach gruczołowych. Katalizują one hydrolizę białek, a także peptydów, amidów i niektórych estrów [1]. Badanie aktywności poszczególnych enzymów proteolitycznych napotyka trudności ze względu na zbliżoną swoistość oraz to, że pasożyty znajdują się w specyficznym układzie żywiciel—pasożyt, gdzie trudno odgraniczyć reakcję enzymatyczną żywiciela od reakcji pasożyta. Badania zmierzają w dwu kierunkach: badanie aktywności proteolitycznej tkanek zaatakowanego przez pasożyta żywiciela [7, 9, 14] i badanie aktywności enzymów proteolitycznych pasożyta [3, 4, 10, 13]. W badaniach tych dominują metody histochemiczne i biochemiczne [7, 10, 13, 14, 15]. W niniejszej pracy przedstawiono metodę izotopową badania aktywności proteolitycznej larw *C. bovis*.

Material i metoda

Larwy *C. bovis* uzyskano z uboju cieląt zarażonych podskórną aktywowanymi onkosferami przez doc. dr hab. Barbarę Machnicką z Instytutu Parazytologii PAN w Warszawie. Materiał pobierano trzykrotnie: w 30, 44 i 58 dniu od zarażenia.

Sposób pobierania materiału: z dużego ogniska łącznotkankowego powstałego pod skórą cielaka w miejscu zarażenia, po uprzednim przecięciu, wybierano pensetą oczną pojedyncze luźno ułożone larwy i umieszczano je na moment w roztworze fizjologicznym celem wypłukania. Aby nie uszkodzić larw, nie płukano ich roztworem fizjologicznym z tryskawki.

Przygotowano 10 próbek i umieszczono po 10 larw w każdej. Probówki przewożono w temperaturze suchego lodu. Po około 12 godzi-

nach przenoszono je do lodówki, gdzie przebywały do 24 godzin w temperaturze -2°C . Czynności te powtarzano trzykrotnie (kolejno z larwami 30-, 44- i 58-dniowymi). Celem oznaczenia aktywności proteolitycznej, larwy 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 ślepą próbę, wlewając do osobnych probówek znakowaną kazeinę i 0,2 ml zhomogenizowanych larw w buforze Tris. Inkubację przeprowadzono w łaźni wodnej w temperaturze $+37^{\circ}\text{C}$ przez 2 godziny. Reakcję przerywano 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 przesączano 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

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

Otrzymane wartości przeliczano na 1 mg homogenatu. Do matematycznej analizy wyników przedstawiono jedynie wyniki uzyskane z badania aktywności proteolitycznej larw 30- i 58-dniowych, gdyż część probówek z larwami 44-dniowymi uległa zniszczeniu. Badając tylko trzy probówki po 10 larw każda nie można było poddać analizie matematycznej otrzymanych wyników.

Matematyczna ocena wyników

Obliczono średnie arytmetyczne i odchylenie standardowe. Średnie porównywano testem t-Studenta, co pozwoliło stwierdzić, czy średnie tych różnic są istotnie różne od zera.

Średnie arytmetyczne w mg strawionej kazeiny: larwy 30-dniowe — 0,1089, larwy 44-dniowe — 0,0793, larwy 58-dniowe — 0,0129.

Larwy 30-dniowe wykazały statystycznie istotnie większą aktywność proteolityczną w porównaniu z larwami 58-dniowymi ($p < 0,0001$).

Omówienie

Zastosowana metoda pozwala ocenić aktywność enzymów proteolitycznych, których reakcje przebiegają w środowisku słabo alkalicznym lub alkalicznym [5]. Przy doświadczalnym zarażeniu podskórnym aktywowanymi onkosferami możliwe jest pobieranie pojedynczych larw, gdyż

TABELA

Wartości średnie aktywności proteolitycznej
C. bovis w mg strawionej kazeiny

TABLE

Mean values of *C. bovis* proteolytic activity in mg
of digested casein

Oznaczenia Symbols	Wiek w dniach Age in days	
	30	58
\bar{x}	0.109	0.013
s	0.004	0.001
v	4	7
n	10	10

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

s – standardowe odchylenia – standart deviation.

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

n – ilość *bovis* – number of *bovis*.

powstałe ognisko składa się z luźno, blisko siebie leżących larw cysticerków (przypominających kolonię), które otoczone są torebką łącznotkankową. Po przecięciu tej torebki wysypują się pojedyncze larwy. Można więc mieć pewność, że badana aktywność enzymów proteolitycznych dotyczy wyłącznie aktywności larw. Larwy 30-dniowe wykazują największą aktywność enzymów proteolitycznych. Są to rosnące larwy typu *cysticercus* [8], u których bardzo intensywnie przebiegają procesy metaboliczne związane z organogenezą [6]. Badając homogenizowany materiał biologiczny nie jesteśmy w stanie stwierdzić, czy mamy do czynienia z egzo- czy endopeptydazami [2]. Dlatego nie można jednoznacznie określić, czy zwiększona aktywność enzymów proteolitycznych związana jest z wzmożonymi procesami metabolicznymi, czy z reakcjami obronnymi pasożyta. Więcej dowodów przemawia za pierwszym stwierdzeniem. Smyth [16] przeprowadzając analizę badań prowadzonych metodą znakowania pierwiastków zwraca uwagę na fakt, że nie tylko aminokwasy, lecz i peptydy mogą być aktywnie przenoszone przez powłoki ciała tasiemców. W związku z tym muszą być syntetyzowane endopeptydazy, które umożliwiają pasożytowi wbudowanie tego białka. Kwa [10] na podstawie badań biochemicznych stwierdza, że enzymy proteolityczne są syntetyzowane w powłoce ciała tasiemców. Lumsden [11, 12] uważa, że duża ilość białek strukturalnych i enzymatycznych jest syntetyzowana w cytoplazmie podpowłokowej i dopiero potem transportowana do innych tkanek. Uważa też, że pewna ilość białek enzymatycznych może być wydzielana na zewnątrz. Badania histochemiczne na *Taenia pisiformis* [15] u larw 6-, 8-, 10-, 12-, 15- i 25-dniowych sugerują, że żadna larwa

nie nagromadza materiału białkowego. Obecność u tych larw RNA w przednich komórkach podpowłokowych i w komórkach wydzielniczych związane jest prawdopodobnie z syntezą białka podporowego. Zwiększona aktywność proteolityczna w larwach *C. bovis* rosnących, bez wykształconej główki, jest wynikiem prawdopodobnie najintensywniejszego procesu odżywiania i organogenezy, których tempo maleje wraz z wzrostem i wykształceniem skoleksa [16]. Larwy 30-dniowe mają w porównaniu do larw 58-dniowych grubsze warstwy powłokową i podpowłokową, co potwierdzałyby wyżej wymieniony pogląd.

Wątpliwa zdaje się być interpretacja zwiększonej aktywności proteolitycznej młodszych larw reakcjami obronnymi pasożyta. Badania Shield i wsp. [15] wykazały wprawdzie obecność u larw *T. pisiformis* gruczołów wydzielniczych, lecz nie stwierdzono wydzielania białek. U larw *C. bovis* nie wykryto dotychczas występowania takich gruczołów [16, 17]. Podany pogląd potwierdzają także badania nad inhibitorami enzymów proteolitycznych żywicieli występującymi u innych robaków pasożytniczych, np. *Ascaris* sp. [3, 13].

Wnioski

1. Rosnące larwy typu cysticercus wykazują zdecydowanie większą statystycznie aktywność enzymów proteolitycznych niż larwy z rozwiniętym skoleksem ($p < 0,0001$).

2. Zmniejszanie się aktywności proteolitycznej wraz ze wzrostem larw jest prawdopodobnie związane ze zwolnieniem tempa procesów metabolicznych.

3. Dla określenia rodzaju enzymów proteolitycznych konieczne jest uzupełnienie badań izotopowych badaniami histochemicznymi i biochemicznymi.

Otrzymano: 21 X 1975

Adres autora:
50-367 Wrocław, Pasteura 4

LITERATURA

1. Bender, M. L., Kezdy, F. J.: Mechanizm of action of proteolytic enzymes. — *Ann. Rev. Biochem.*, 34, 49, 1965.
2. Bergmann, M.: A classification of proteolytic enzymes. — *Adv. Enzym.*, 2, 49-52, 1942.

3. Brand, T. von: Biochemistry of Parasitae., *Academic Press*, New York—London, 1966.
4. Dubrawskaja, I.: Study of the proteolytic activity in some Cestoda species. — *Parasitologia*, 7, 154-159, 1973.
5. 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.
6. Heath, D. D., Elsdon-Dew: The in vitro culture of *Taenia saginata* and *Taenia taeniaeformis* larvae from the oncosphere, with observations on the role of serum for in vitro culture of larval Cestodes. — *J. Parasit.*, 58, 119-130, 1972.
7. Januszkiewicz, J., Poznańska, H.: Aktywność niektórych enzymów w homogenatach mięśniowych w przebiegu włośnicy u ludzi i zwierząt. — *Prz. Epidem.*, 23, 1-10, 1969.
8. Jarecka, L.: Ontogeny and evolution of cestodes. — *Acta Parasit. Pol.*, 23, 93-97, 1975.
9. Kozar, Z., Seniuta, R.: Histochemical studies on some respiratory enzymes in muscular phase of trichinellosis. — *Wiad. Parazyt.*, 18, 127-136, 1968.
10. Kwa, B. H.: Studies on the sparganum of *Spirometra erinacei*. II — Proteolytic enzyme(s) in the scolex. — *J. Parasit.*, 58, 29-33, 1972.
11. Lumsden, R. D.: Cytological studies on the absorptive surfaces of cestodes. I. The fine structure of the strobilar integument. — *Z. ParasitKde.*, 27, 355-382, 1966.
12. Lumsden, R. D.: Cytological studies on the absorptive surfaces of cestodes. II. The synthesis and intracellular transport of protein in the strobilar integument of *Hymenolepis diminuta*. — *Z. ParasitKde.*, 28, 1-13, 1966.
13. Polamarczyk-Leszczynska, G.: Inhibitory enzymów proteolitycznych występujących w rodzaju *Ascaris*. — *Wiad. Parazyt.*, 14, 267-274, 1968.
14. Sale, E. A., Priest, S. C., Jursen, H.: Studies on the antiproteolytic activity of bovine blood. — *J. Biol. Chem.*, 83, 227-234, 1957.
15. Shield, J. M., Heath, D. D., Smyth, J. D.: Light microscope studies of the early development of *Taenia pisiformis* cysticerci. — *J. Parasit.*, 59, 471-479, 1973.
16. Smyth, J. D.: The physiology of Cestodes. — *Oliver & Boyd*, Edinburg, 1969.
17. Zdárská, Z.: On the histochemistry of the tegument of *Cysticercus bovis*. — *Folia Parasit. Praga*, 30, 307-318, 1973.

PROTEOLYTIC ACTIVENESS OF *CYSTICERCUS BOVIS*

by

B. HALAWA AND B. JAKACKA

Using the method of labelled casein digested with radioactive iodine (^{131}J), the activeness of proteolytic enzymes was tested in 30, 44 and 58 day-old larvae of *C. bovis*. On mathematical comparison and assessment of the results it was found that the activeness of proteolytic enzymes of growing larvae type cystericus was positively higher than that of 58 day-old larvae with formed scolex. The differences were statistically significant ($p < 0.0001$).