

CYTOFOTOMETRYCZNA ANALIZA TROFOZOITÓW I CYST
BALANTIDIUM COLI

BOGUMIŁA SKOTARCZAK

Katedra Genetyki Uniwersytetu Szczecińskiego
71-216 Szczecin, ul. Łukasiewskiego 43

CYTOPHOTOMETRIC ANALYSIS OF TROPHOZOITES AND CYSTS
OF *BALANTIDIUM COLI*

Abstract. In trophozoites and cysts of *Balantidium coli* the contents of nucleic acids were compared, with the use of cytochemical methods. There is more RNA (nuclear and cytoplasmatic) in trophozoites, but the content of DNA is the same in both trophozoites and cysts. Some morphometric parameters, allowing to compare trophozoites and cysts of *B. coli*, were obtained on the basis of cytophotometric determination of the cytochemical reactions' intensity and its computer analysis. These studies showed greater compactness of nuclear chromatin, higher homogeneity of chromatin's structures in cysts in comparison with trophozoites, and finally, decrease in the circumference and area of cysts of *B. coli*.

WSTĘP

Cytologiczne zmiany zachodzące w czasie encystacji u pasożytniczego orzęska *Balantidium coli* opisano wcześniej (SKOTARCZAK 1984). Jednakże procesy te nie ograniczają się tylko do przemian morfologicznych, gdyż transformacja pierwotniaka z postaci wegetatywnej w przetrwalnikową wiąże się niewątpliwie z przebudową metabolizmu komórkowego. Jest bardzo prawdopodobne, że tym procesom towarzyszą zmiany zawartości kwasów nukleinowych, w szczególności RNA (SCHUSTER i SVIHLA 1968, PIGON i EDSTROM 1969, STEVENS i PACHLER 1973, OLINS i wsp. 1988).

Orzęski są tą szczególną grupą spośród Protozoa, u których aparat jądrowy składa się z dwu jąder; poliploidalnego makronukleusa i diploidalnego mikronukleusa. Ponieważ makronukleus kieruje metabolizmem i morfogenezą komórki (PRESCOTT 1994), dlatego w czasie encystacji należy się spodziewać w tym jądrze zmian cytochemicznych.

W obecnej pracy badano ilościowe zmiany w zawartości DNA makronukleusa oraz w łącznej (jądrowej i cytoplazmatycznej) ilości RNA u postaci wegetatywnej – trofozoitu w stosunku do postaci przetrwalnikowej – cysty *Balantidium coli*.

Celem badań było również określenie parametrów morfologicznych i morfometrycznych cyst i trofozoitów tego orzęska na podstawie pomiarów natężenia reakcji cytochemicznych przetwarzanych w programie komputerowym.

Material i metody

Trofozoity *B. coli* pobierano z treści jelita ślepego, cysty zaś z odbytnicy świń w Zakładach Mięsnych w Szczecinie.

Z wyizolowanych z treści jelitowej cyst i trofozoitów (poprzez wielokrotne płukanie w roztworze soli fizjologicznej) wykonywano rozmazy, które suszono w temp. pokojowej.

Do badań cytofotometrycznych pierwotniaki były utrwalane w roztworze alkoholu i kwasu octowego 3:1, następnie hydrolizowane w HCl w temp. 59 – 69°C.

W celu uwidocznienia DNA w reakcji FEULGENA użyto zieleni metylowej (Merck, Darmstedt), dla wykazania RNA stosowano pyroninę y (Gurr C-I-45005).

Dla określenia zmian w ilości kwasów nukleinowych wykonano pomiary cytofotometryczne 50 cyst i 50 trofozoitów za pomocą urządzenia Morphoquant Carl Zeiss Jena. Długość fali świetlnej do pomiarów ilości RNA (związanego z pyroniną) wynosiła 520 nm i 630 nm dla oceny ilości DNA (związanego z zielenią metylową)*. Pomiary wykonywano przy zastosowaniu „scanningu” z użyciem okularu projekcyjnego. Wyniki pomiarów były przetwarzane przez komputer Morphoquant wg programów pozwalających na analizę:

- cytofotometrycznej ilości DNA w trofozoitach (E1) i w cystach (E2);
- cytofotometrycznej ilości RNA w trofozoitach (Ex1) i w cystach (Ex2);
- zawartości chromatyny jądrowej w trofozoitach (K1) i w cystach (K2);
- jednorodności struktur chromatyny jądrowej w trofozoitach (Z1) i w cystach (Z2);
- powierzchni komórki (na podstawie ilości RNA) trofozoitów (Fk1) i cyst (Fk2);
- powierzchni jądra (na podstawie ilości DNA) trofozoitów (F1) i cyst (F2);
- obwodu komórki trofozoitu (N1) i cysty (N2);
- obwodu jąder (na podstawie ilości jądrowego DNA) w trofozoitach (Nu1) i w cystach (Nu2).

Wyniki

Obserwacje morfologiczne trofozoitów *B. coli* wykazały obecność licznych ziarnistości pyrofilnych leżących w części obwodowej makronukleusa i w cyto-

* Pomiary cytofotometryczne wykonano w Zakładzie Patologii Komórki Pomorskiej Akademii Medycznej. Bardzo dziękuję za pomoc panu mgrowi ZDZISŁAWOWI GAPSKIEMU.

plazmie. Makronukleus cyst *B. coli* również wykazywał obecność ziarnistości pyrofilnych, jednakże rozmieszczonych równomiernie w całej karioplazmie i w ilości znacznie mniejszej niż u postaci wegetatywnej.

Chromatyna jądrowa cyst wykazywała większą gęstość optyczną od chromatyny makronukleusa trofozoitów.

Trofozoity były kształtu typowego dla swojego gatunku, tj. owalnego, natomiast cysty przybierały kształt zbliżony do kulistego. Podobne różnice w kształcie dotyczą makronukleusa obu tych postaci; mikronukleus nie był rozróżnialny.

Dla wykazania różnic istotnych statystycznie pomiędzy wartościami mierzonych w cytofotometri parametrów trofozoitów i cyst *B. coli* zastosowano test parametryczny dla dwóch średnich z dużych prób:

$$\mu = \frac{\frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}$$

dla poziomu istotności $\alpha = 1,64$, gdzie:

x_1 = średnia arytmetyczna wartości DNA lub RNA trofozoitów

x_2 = średnia arytmetyczna wartości DNA lub RNA cyst

S^2 = wariancja

n_1 = liczebność trofozoitów

n_2 = liczebność cyst

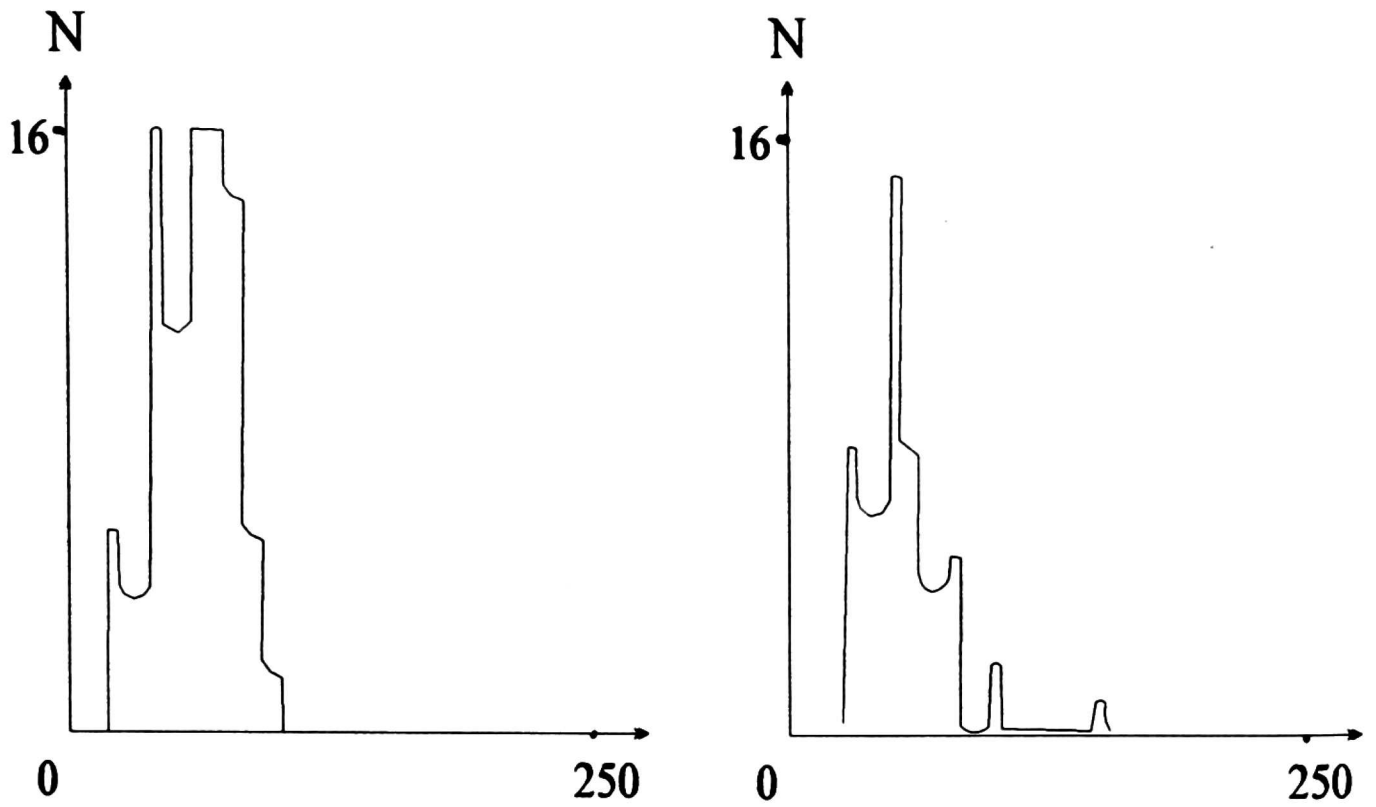
Odkładając na osi rzędnych (N) średnie arytmetyczne średnich wartości DNA i RNA otrzymanych z pomiarów cytofotometrycznych, a na osi odciętych wartości DNA i RNA otrzymano krzywe wyrażające stosunek średnich ilości DNA i RNA w danej grupie komórek (ryc. 1–8).

Cytofotometryczne pomiary ilości DNA (E) w trofozoitach (E1) i cystach (E2) *B. coli* wykazały różnicę (wyższe wartości uzyskano z pomiarów trofozoitów), ale nie była ona istotna statystycznie ($\mu \alpha > \mu$, $\mu = 1,27$, tab., ryc. 1a i 1b).

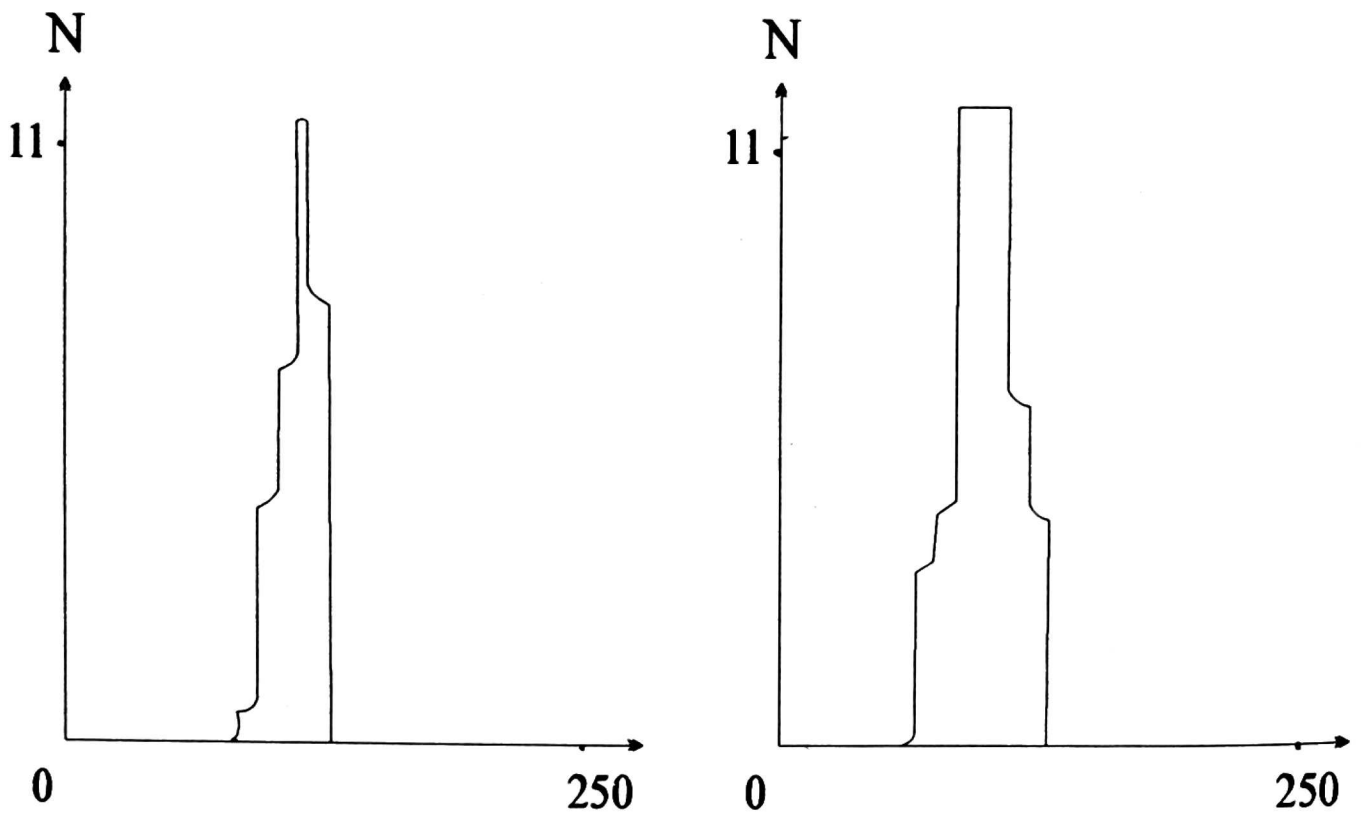
Wartości z pomiarów powierzchni jąder (F) oraz obwodu jąder (Nu), obliczone na podstawie ilości DNA w obu typach komórek, były zbliżone (ryc. 2a i 2b, 3a i 3b, tab., dla F $\mu = 1,228$, $\mu \alpha > \mu$, dla Nu $\mu = 1,41$, $\mu \alpha > \mu$).

Wartości otrzymane z pomiarów ilości RNA (Ex) w trofozoitach i cystach *B. coli* były wyższe w trofozoitach, i różnica okazała się istotna statystycznie ($\mu = 1,73$, $\mu \alpha < \mu$), ryc. 6a i 6b oraz tab.

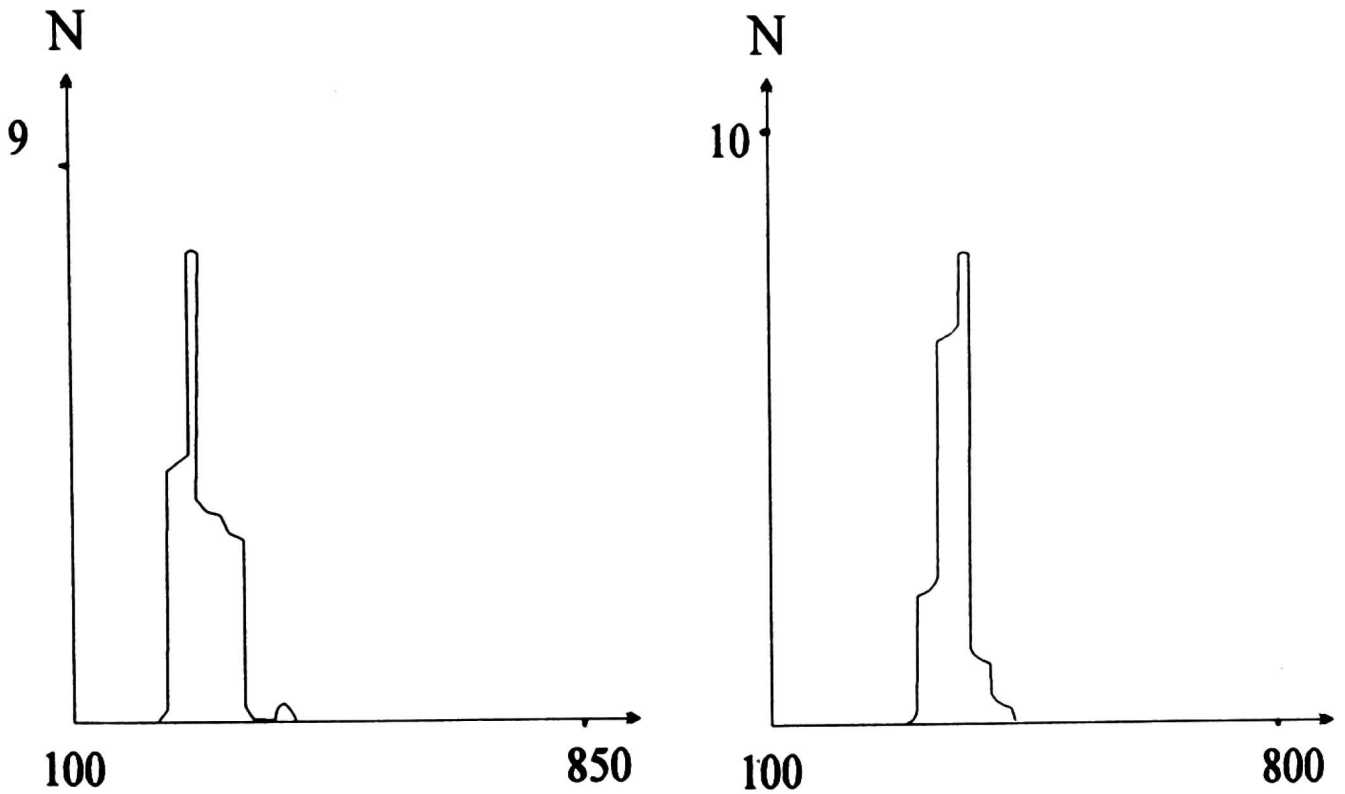
Wartości uzyskane z morfometrycznych pomiarów powierzchni komórek (Fk) oraz obwodu komórek (N) trofozoitów barwionych zielenią metylową były wyższe w porównaniu z analogicznymi wartościami cyst, a różnice były istotne statystycznie (ryc. 7a i 7b, 8a i 8b, tab; dla Fk $\mu = 1,73$, $\mu \alpha < \mu$, dla N $\mu = 1,69$, $\mu \alpha < \mu$).



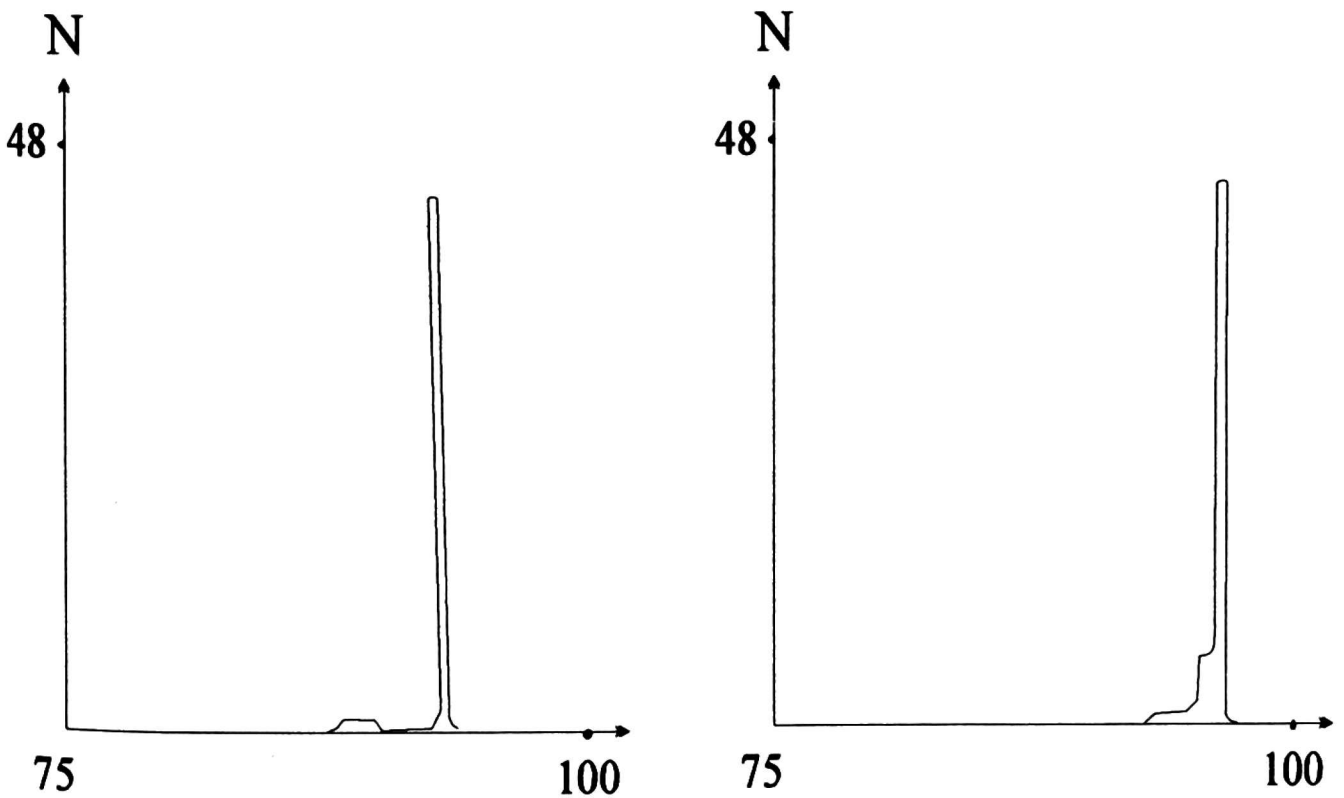
Ryc. 1. Zawartość jądrowego DNA (E): a – w trofozoitach, b – w cystach *B. coli*
 Fig. 1. Nuclear DNA content (E): a – in trophozoites, b – in cysts of *B. coli*



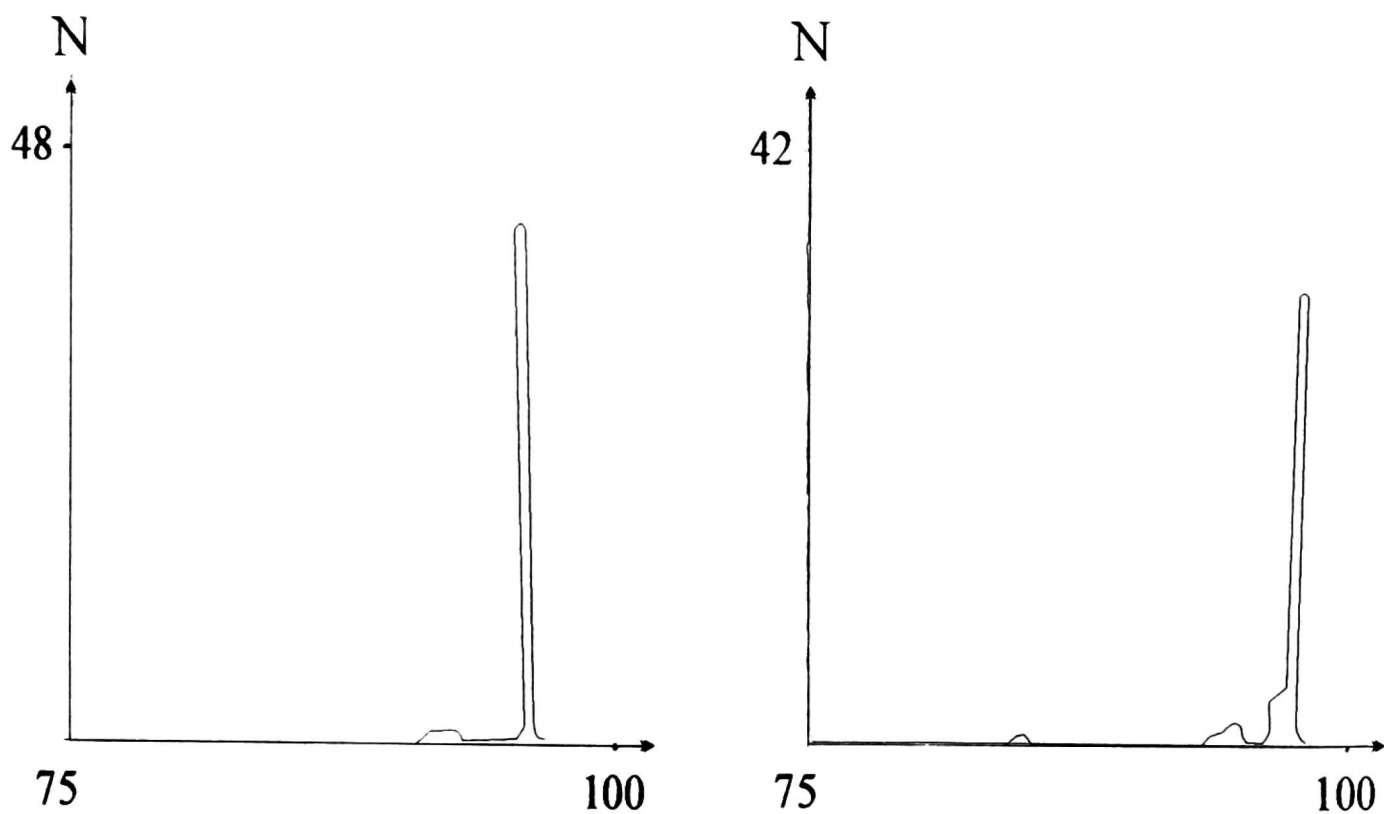
Ryc. 2. Powierzchnia jąder (F): a – w trofozoitach, b – w cystach *B. coli*
 Fig. 2. Nucleus area (F): a – in trophozoites, b – in cysts of *B. coli*



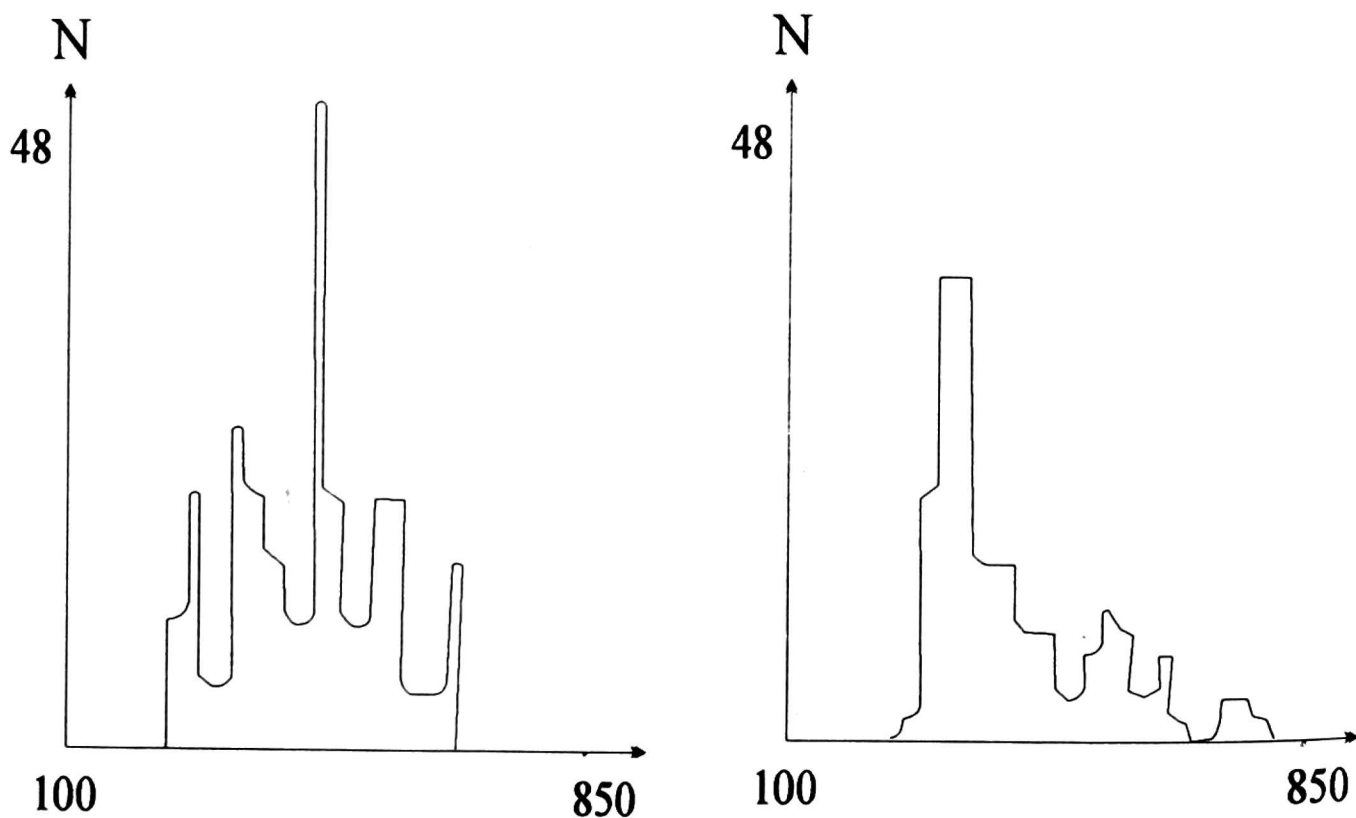
Ryc. 3. Obwód jąder (Nu): a – w trofozoitach, b – w cystach *B. coli*
 Fig. 3. Nucleus circumference (Nu): a – in trophozoites, b – in cysts of *B. coli*



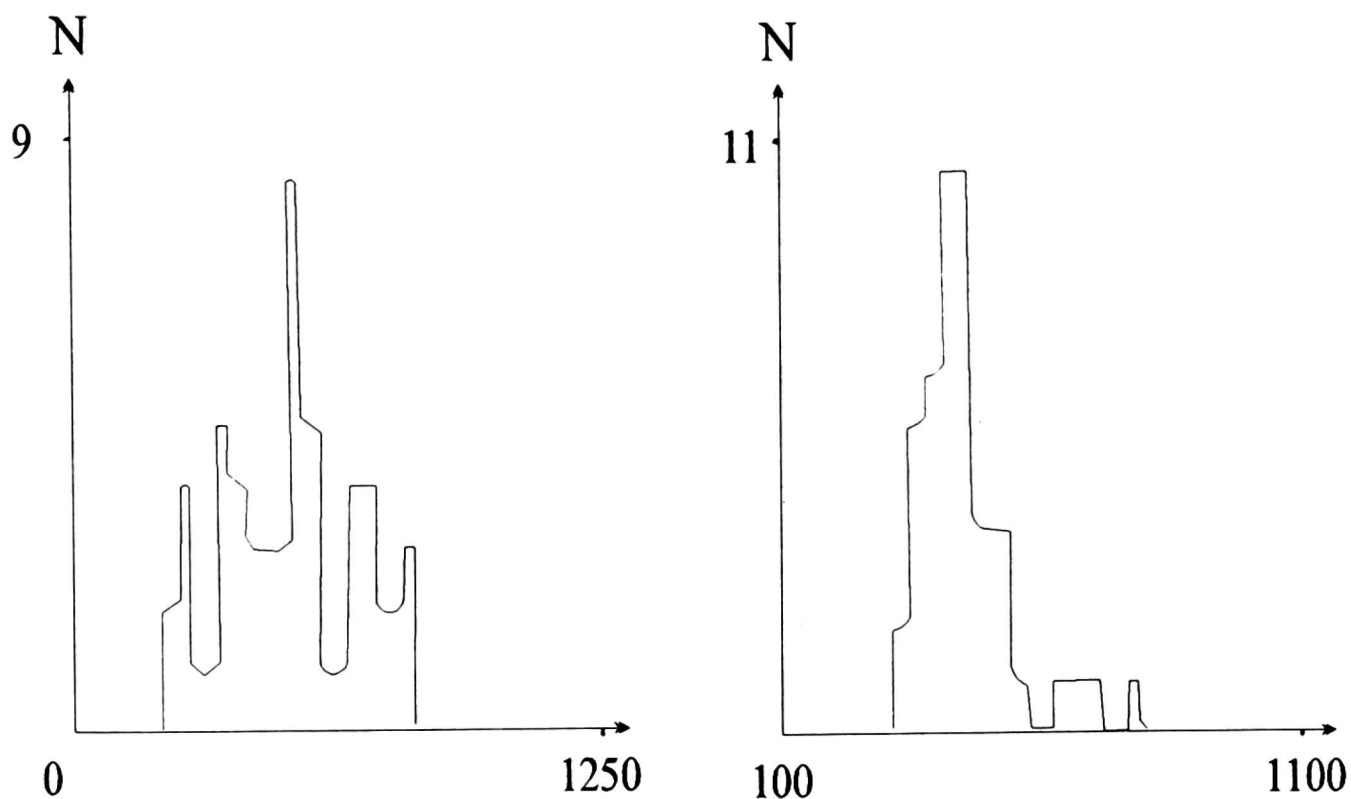
Ryc. 4. Zwartość chromatyny jądrowej (K): a – w trofozoitach, b – w cystach *B. coli*
 Fig. 4. Compactness of nuclear chromatin (K): a – in trophozoites, b – in cysts of *B. coli*



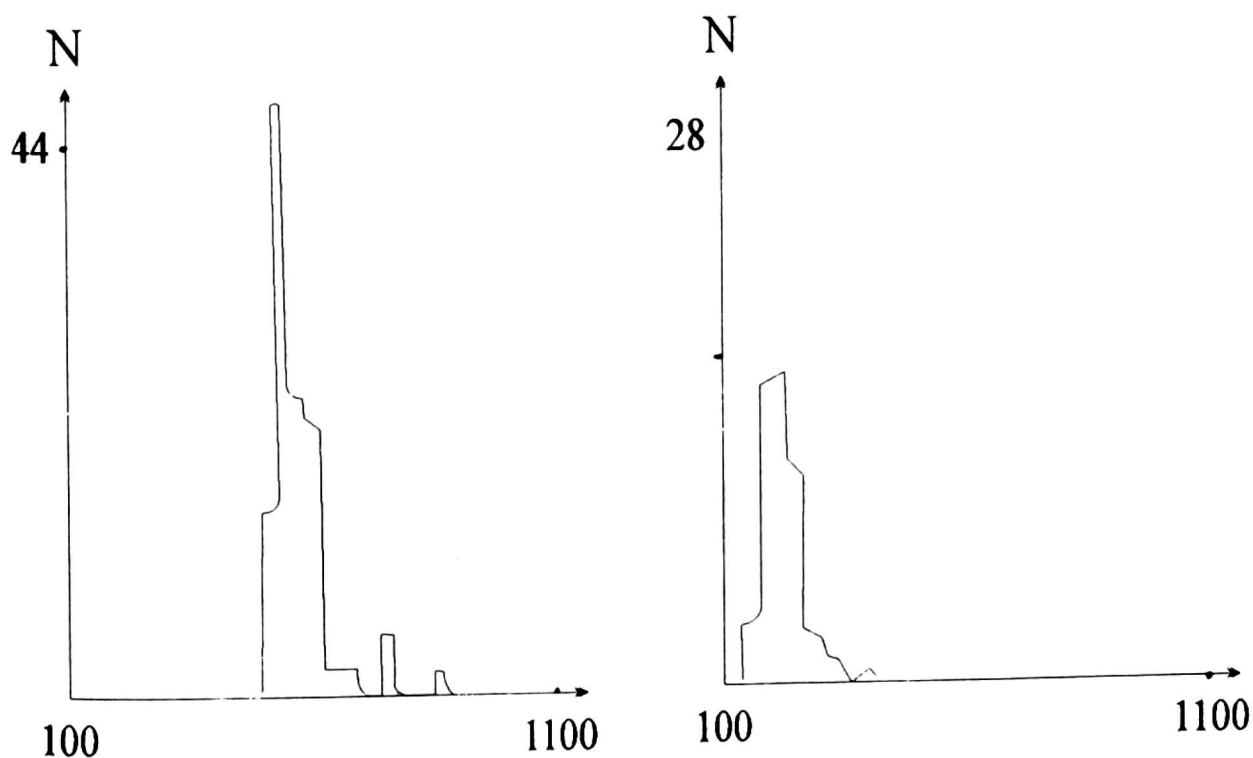
Ryc. 5. Jednorodność struktur chromatyny jądrowej (Z): a – w trofozoitach, b – w cystach *B. coli*
 Fig. 5. Homogeneity of nuclear chromatin (Z): a – in trophozoites, b – in cysts of *B. coli*



Ryc. 6. Zawartość RNA (Ex): a – w trofozoitach, b – w cystach *B. coli*
 Fig. 6. RNA content (Ex): a – in trophozoites, b – in cysts of *B. coli*



Ryc. 7. Powierzchnia komórek (Fk): a — trofozoitów, b — cyst *B. coli*
 Fig. 7. Area of the cells (Fk): a — trophozoites, b — cysts of *B. coli*



Ryc. 8. Obwód komórek (N): a — trofozoitów, b — cyst *B. coli*
 Fig. 8. Circumference of the cells (N): a — trophozoites, b — cysts of *B. coli*

TABELA
Wyniki pomiarów trofozoitów i cyst *B. coli*
TABLE
Result of measurements in trophozoites and cysts *B. coli*

Cecha Feature	Trofozoity Trophozoites $\bar{X} \pm S$	Cysty Cysts $\bar{X} \pm S$
a. jądro – nucleus		
E	$44 \pm 2,5$	$38 \pm 3,6$
F	$73 \pm 1,9$	$60 \pm 2,4$
Nu	$65 \pm 3,1$	$60 \pm 1,9$
K	$99 \pm 1,6$	$199 \pm 2,1^*$
Z	$100 \pm 2,1$	$168 \pm 3,1^*$
b. komórki – cells		
Ex	407 ± 21	$346 \pm 10,2^*$
Fk	656 ± 32	$514 \pm 16,0^*$
N	169 ± 18	$121 \pm 16,0^*$

Objaśnienia: E – zawartość DNA, F – powierzchnia jądra, Nu – obwód jądra, K – zwartość chromatyny jądrowej, Z – jednorodność struktur jądrowych, Ex – zawartość RNA, Fk – powierzchnia komórek, N – obwód komórek, * – różnica istotna statystycznie

Explanations: E – DNA content, F – nucleus area, Nu – nucleus circumference, K – compactness of nuclear chromatin, Z – homogeneity of nuclear structure, Ex – RNA content, Fk – cells area, N – circumference of cells, * – statistical significant difference

Zwartość chromatyny (K) jak i jednorodność struktur chromatyny jądrowej (Z) była wyższa w cystach; różnice były istotne statystycznie (ryc. 4a i 4b, 5a i 5b, tab.; dla K $\mu = 1,72$ i $\mu \alpha < \mu$, dla Z $\mu = 1,68$, $\mu \alpha < \mu$).

Dyskusja

Badania mikroskopowe trofozoitów i cyst *B. coli* z reakcją cytochemiczną na obecność RNA wykazały różnice w zawartości ziarnistości pyrofilnych. Liczebność ziarnistości pyrofilnych w makronukleusie postaci wegetatywnych była większa niż w jądrze cyst; były one rozmieszczone obwodowo. Wcześniej-sze badania SKOTARCZAK (1986) dotyczące trofozoitów *B. coli* z hodowli nie wykazały tych różnic.

Makronukleus jest jądrem odpowiedzialnym za transkrypcję RNA i wzrost komórek wegetatywnych orzęska (RADZIKOWSKI 1965, 1976, PRESCOTT 1994), a skupienia RNA w makronukleusie identyfikuje się z jąderkami. Jąderka są miejscem syntezy prekursorów rybosomów, bo zawierają białka prekursorowe rybosomów rDNA oraz RNA, transportowane do cytoplazmy na siateczkę śródplazmatyczną, gdzie następuje ostateczna organizacja rybosomów (KACZANOWSKA i wsp. 1975, OLINS i wsp. 1988, HIGASHINAKAGAWA i wsp. 1992).

DODD (1962) badając *Telotrochidium henneguyi* stwierdził, że w czasie encystacji makronukleus tego orzęska zachowuje struktury nienaruszone, ale wykazuje wewnętrzną reorganizację kwasów nukleinowych. W czasie encystacji pojawia się RNA w jąderkach, podczas gdy w trofozoitach nieencystujących zawierają one tylko DNA. W procesie transformacji trofozoitu w stadium cysty zwiększa się ogólna liczba jąderek, które wykazują zawartość DNA i RNA, z przewagą tego drugiego.

Jąderka u orzęsków są strukturami komórkowymi najmniej stabilnymi. Liczba jąderek u tych pierwotniaków jest różna w zależności od fazy życiowej komórki, ale liczebność ich jest cechą danego gatunku. Znane są gatunki orzęsków nie posiadające jąderek (KACZANOWSKA i wsp. 1975).

Kształt, wielkość i liczba jąderek świadczy o intensywności metabolizmu w komórce i o intensywności syntezy białek.

U *Tetrahymena pyriformis* (KACZANOWSKA i wsp. 1975) stwierdzono największą liczbę jąderek i najintensywniejszą syntezę RNA na początku interfazy oraz tuż przed podziałem. RADZIKOWSKI (1976) stosując metody cytochemiczne i autoradiograficzne z użyciem znakowanej tymidyny i urydyny wykazał, że u *Chilodonella cucullus* synteza RNA związana jest z funkcją makronukleusa, przy czym największe skupienia pyrofilne identyfikujące RNA pojawiają się w części obwodowej makronukleusa. Takie usytuowanie granul pyrofilnych, stwierdzone też obecnie w trofozoitach *B. coli*, związane jest z koniecznością transportu RNA do cytoplazmy w celu syntetyzowania białek.

Analiza wyników pomiarów ilości RNA w komórkach *B. coli* wykazała wyższą zawartość tego kwasu w trofozoitach niż w cystach (tab., różnica istotna statystycznie), co można wiązać z obniżeniem tempa metabolizmu u form przetrwalnikowych.

Wyniki badań zawarości RNA w czasie encystacji u różnych gatunków orzęsków nie są zgodne. MATSUSAKA (1989) wykrył, że procesowi encystacji *Histiculus* towarzyszy przemiana RNA oraz białek. Cytodyferencjacja związana z przekształcaniem postaci wegetatywnej w przetrwalnikową wiąże się u tego orzęska z uaktywnieniem polisomów (intensyfikacja syntezy białek) oraz ze wzrostem transkrypcji RNA.

STEVENS i PACHLER (1973) w badaniach *in vitro* *Acanthamoeba castellanii* wykazali, iż najintensywniejsza synteza RNA odbywa się w fazie stacjonarnej, najniższa natomiast w cystach, gromadzenie zaś RNA nie jest niezbędne do indukcji encystacji. Jednakże spadek intensywności syntezy RNA w cystach prowadzi do redukcji rozmiarów komórki. McMILLEN i wsp. (1974) stwierdzili również, że w czasie encystacji *A. castellanii* dochodzi do wzrostu koncentracji tRNA, co sugeruje, iż wzrost syntezy RNA inicjuje proces encystacji. Jednakże SCHUSTER i SVIHLA (1968) u *Naegleria gruberi* stwierdzili, że podczas encystacji Colpoda następuje drastyczny spadek zawartości jądrowego RNA; podobne wyniki uzyskali PIGON i EDSTROM (1969) u Urostyla. REPAK (1968) wykazał u *Blepharisma* uwalnianie RNA do cytoplazmy w czasie encystacji.

Proces encystacji polega m.in. na zmianie kształtu komórki, głębokiej przemianie metabolizmu (zmiany zapotrzebowania energetycznego), zmianach w aktywności struktur wydalniczych itp. Kwasy nukleinowe niewątpliwie partycypują w procesie encystacji; oczywiste jest, że są niezbędne do regulacji przemian morfogenetycznych, jednakże zawartość obu kwasów nukleinowych u *Urostyla* (PIGON i EDSTROM 1969) jest prawie taka sama.

Zawartość DNA w jądrach trofozoitów *B. coli* była nieco wyższa niż w jądrach cyst, jednakże różnica nie była istotna statystycznie (tab.). Badania morfologiczne nie wykazały mikronukleusa, ale wiadomo, że gdy makronukleus zawiera DNA i RNA, to w mikronukleusie obecny jest tylko kwas dezoksyrybonukleinowy (HALDAR i CHAKRABORTY 1976), a więc i w przedstawionych obecnie badaniach uzyskane wartości z pomiarów DNA są wskaźnikiem zawartości DNA w obu jądrach.

Brak różnicy istotnej statystycznie pomiędzy ilością DNA w jądrach trofozoitów i cyst *B. coli* jest oczywisty, gdyż powielanie DNA odbywa się tylko po koniugacji oraz przed podziałem komórki. Pewne różnice na korzyść trofozoitów w zawartości DNA wynikają prawdopodobnie z faktu, iż badane trofozoity nie pochodziły z tej samej fazy wzrostu, a więc część form troficznych mogła być po fazie S interfazy.

Silniejsza zwartość chromatyny jądrowej oraz wyższa jednorodność struktur chromatyny jądrowej w cystach niż w trofozoitach *B. coli* jest konsekwencją wszystkich wspomnianych wyżej różnic, jakie dotyczą replikacji, transkrypcji i syntezy białek u postaci przetrwalnikowej i troficznej.

Zmniejszenie obwodu i powierzchni cyst w porównaniu z tymi wartościami u trofozoitów *B. coli* jest wynikiem szeregu morfotycznych zmian, jakie zachodzą w czasie transformacji trofozoitów w stadium cysty, tj. odwodnienie, resorbcja rzęsek, wykorzystywanie materiałów zapasowych itp.

Zmniejszenie rozmiarów cyst u *Oxytricha* notował HASHIMOTO (1982). Autor zaobserwował w czasie encystacji wyrzucanie gęstych ziarnistości, m.in. wakuoli trawiennych autofagosomalnych i heterofagosomalnych, co może zachodzić również u *Balantidium coli*.

LITERATURA

- DODD E. E. 1962. A cytochemical investigation of the nuclear changes in the cyst cycle of the Ciliate *Telotrochidium henneguyi*. *J. Protozool.* 9: 93-97.
- HALDAR D., CHAKRABORTY N. 1976. Studies on the morphology and cytochemistry of Ciliate. *Acta Protozool.* 15: 23-28.
- HASHIMOTO K. 1982. Relationships between feeding organelles and encystment in *Oxytricha fallax* Stein. *J. Protozool.* 9: 161-169.
- HIGASHINAKAGAWA T., NARUSHIMA M., SAIGA H., KONDO S. 1992. Properties of isolated extrachromosomal nucleoli from *Tetrahymena pyriformis*. *Chromosoma* 101: 413-419.
- KACZANOWSKA J., KACZANOWSKI A., RADZIKOWSKI S. 1975. Aparat jądrowy u orzęsków. *Post. Biol. Kom.* 1: 25-60.

- MATSUSAKA T. 1989. Effect of cyclohexamide on the encystment and ultrastructure of the Ciliate, *Histiculus*. *J. Protozool.* 26: 619-625.
- McMILLEN J., NAZARIO M., JENSEN T. 1974. Changes in transfer ribonucleic acids accompanying encystment in *Acanthamoeba castellanii*. *J. Bacteriol.* 1: 242-252.
- OLINS A., OLINS D., DERENZINI M. 1988. Replication bands and nucleoli in the macronucleus of *Euplotes eurytomus*: an ultrastructural and cytochemical study. *Biol. Cell.* 1: 83-93.
- PIGON A., EDSTROM J. 1969. Nucleic acid changes during starvation and encystment in a Ciliate (*Urostyla*). *Exp. Cell. Res.* 16: 648-659.
- PRESCOTT D. M. 1994. The DNA of ciliated protozoa. *Microbiol. Rev.* 2: 233-267.
- RADZIKOWSKI S. 1965. Changes in the heterometric macronucleus in division of *Chilodonella cucullus*. *Acta Protozool.* 3: 233-238.
- 1976. DNA and RNA synthesis in the nuclear apparatus of *Chilodonella cucullus*. *Ibid.* 15: 47-56.
- REPAK A. J. 1968. Encystment and excystment of the *Heterotrichus* Ciliata *Blepharisma stolei* Isquith. *J. Protozool.* 15: 407-412.
- SCHUSTER F., SVIHLA G. 1968. Ribonucleoprotein-containing vesicles in cysts of *Naegleria gruberi*. *Ibid.* 15: 752-758.
- SKOTARCZAK B. 1984. Wpływ niektórych czynników zewnętrznych na encystację i ekscystację *Balantidium coli* (M). *Wiad. Parazytol.* 30: 565-574.
- 1986. Ultrastruttura di *Balantidium coli* (M). *Esper. Med. Chirug.* 6: 119-125.
- STEVENS A., PACHLER P. 1973. RNA synthesis and turnover during density-inhibited growth and encystment of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Cell. Biol.* 57: 525-537.

Otrzymano 20 IV 1995, zaakceptowano 20 I 1996