

CYTOCHEMICZNE BADANIA AKTYWNOŚCI ENZYMÓW W TROFOZOITACH *ENTAMOEBEA HISTOLYTICA* POCHODZĄCYCH Z JELITA ŚLEPEGO ŚWINEK MORSKICH Z INWAZYJNĄ I NIEINWAZYJNĄ AMEBOZĄ

WANDA KUŻNA-GRYGIEL

Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Medycznej Pomorskiej AM
70-111 Szczecin, al. Powstańców Wlkp. 72

CYTOCHEMICAL STUDY ON THE ACTIVITY OF ENZYMES IN THE TROPHOZOITES OF *ENTAMOEBEA HISTOLYTICA* FROM THE CAECUM OF GUINEA PIGS WITH INVASIVE AND NON-INVASIVE AMOEBOSIS

Abstract. Experimental amoebosis was inflicted on guinea pigs using the PS-2 strain of *Entamoeba histolytica*. Cytoenzymatic studies were conducted on the trophozoites sampled from the caecum of hosts with non-invasive and invasive amoebosis. The results show higher intensity of the processes of intracellular digestion, transportation, and anaerobic respiration in the amoebae originating from intestine of the host with infective amoebosis.

WSTĘP

Badania biochemiczne pasożytów i zarażonych żywicieli wykazały współzależność m.in. ich procesów metabolicznych. Z uwagi na obecność flory bakteryjnej w jelicie grubym, metody biochemiczne nie pozwalają na zbadanie metabolizmu *E. histolytica* w warunkach *in vivo*, a metabolizm aksenicznie hodowanych ameb nie odzwierciedla przemian zachodzących u tego pierwotniaka w naturalnym biotopie. Natomiast metody cytochemiczne nie wymagają aksenicznego materiału i pozwalają na badania metabolizmu pasożytniczych pierwotniaków pobranych bezpośrednio z jelita grubego.

Celem obecnej pracy było zbadanie związku aktywności enzymatycznej *E. histolytica* z wywołanymi zmianami w jelicie ślepy morynki morskiej.

Material i metody

Doświadczalną amebozę wywołano u świnek morskich za pomocą izolatu PS-2 *Entamoeba histolytica* wyizolowanego od pacjenta z objawową amebozą. Pierwotniaki hodowano *in vitro* na podłożu MSF z mieszaną florą bakteryjną wg REEVESA i wsp. (1957). Opierając się na doświadczeniach innych autorów

(SINGH 1959, BIAGI i wsp. 1962, DAS i GHOSHAL 1976, VINAYAK i wsp. 1978), miesiąc przed zarażeniem zwierząt pasażowano pełzaki (hodowane *in vitro* ok. 2 lat) z cholesterolem w stężeniu 0,1 mmol/l pożywki w celu nasilenia ich wirulencji.

60 świnek morskich o masie 250–300 g zarażano operacyjnie w narkozie eterowej, poprzez dojelitową inokulację 1 ml zawiesiny zawierającej co najmniej 2×10^5 trofozoitów. 20 świnek, stanowiących grupę kontrolną, otrzymało w ten sam sposób 1 ml zawiesiny bakterii współwystępujących z pełzakami z wspomnianego izolatu. Zwierzęta sekcjonowano po upływie 14 dni od inokulacji. Po makroskopowej ocenie jelita ślepego, jego zawartość wielokrotnie dekantowano płynem RINGERA w temp. 37°C. Osad z licznymi pełzakami stanowił materiał do badań.

Pełzaki uzyskane z treści jelita ślepego zarażonych świnek morskich, w którym nie stwierdzono zmian patomorfologicznych oraz pełzaki z jelita ślepego, w którym występowały liczne owrzodzenia, poddano reakcjom cytochemicznym na wybrane enzymy:

- trawienia wewnątrzkomórkowego: fosfatazę kwaśną (AcP) metodą sprzęgania z solą dwuazową Fast Garnet GBC (PEARSE 1968), pirofosfatazę tiaminową (TPPazę) metodą NOVIKOFFA i GOLDFISCHERA (1961), 1-leucyloaminopeptydazę (LAP) metodą NANO i wsp. (1987);
- związane z transportem przez błony: fosfatazę zasadową (AlP) metodą sprzęgania z solą dwuazową Fast Blue RR wg PEARSE (1968), 5'nukleotydzę oraz fosfohydrolazę ATP (ATPazę) wg WACHSTEINA i MEISELA (1957);
- oddychania beztlenowego: dehydrogenazę α -glicerofosforanową (α -GIDH), dehydrogenazę mleczanową NAD-zależną (LDH) i dehydrogenazę alkoholową (AIDH), wszystkie wg PEARSE (1972);
- oddychania tlenowego; dehydrogenazę bursztynianową (SDH) wg NACHLASA i wsp. (1957) i dehydrogenazę izocytrynianową (IcDH) wg PEARSE (1972).

Aktywność testowanych enzymów w komórkach *E. histolytica* oceniano w mikroskopie świetlnym i wyrażano za pomocą wskaźników aktywności całkowitej, które obliczano zmodyfikowaną metodą KAPŁOWA (1955), stosowaną w cytoenzymatycznych badaniach leukocytów. Za wskaźnik aktywności całkowitej przyjęto sumę ilorazów procentu komórek i stopnia nasilenia odczynu enzymatycznego (0, I, II, III lub IV). Średnie wartości wskaźników (z 10 preparatów dla każdego enzymu) poddano analizie statystycznej wg testu *t* STUDENTA.

Wyniki

W treści jelita ślepego wszystkich świnek morskich inokulowanych *E. histolytica* PS-2 pasażowanym z cholesterolem stwierdzono obecność trofozoitów tego izolatu. U 36 zwierząt (I grupa) nie obserwowano makroskopowych zmian w ścianie jelita, a w rozmazie bezpośrednim zawartości jelita notowano do

20 ameb w polu widzenia małego powiększenia ($100\times$). U pozostałych 24 (II grupa) jelito grube było wyraźnie obkurczone z owrzodzeniami charakterystycznymi dla inwazyjnej amebozy, a w rozmazach bezpośrednich pełzaki były znacznie liczniejsze.

TABELA
Wskaźniki aktywności całkowitej enzymów *Entamoeba histolytica*
TABLE
Indices of total activity of the enzymes of *Entamoeba histolytica*

Enzym Enzyme	Żywiciel z amebozą Host with amoebosis	
	nieinwazyjną non-invasive	inwazyjną invasive
	\bar{X}	
a. trawienia wewnątrzkomórkowego (of intracellular digestion)		
AcP	$345 \pm 4,3$	$380 \pm 4,0^*$
TPP-aza		
TPP-ase	$260 \pm 2,4$	$280 \pm 1,0^*$
LAP	$190 \pm 2,2$	$243 \pm 1,1^*$
b. związanych z transportem przez błony (associated with membrane transport)		
AIP	$320 \pm 2,6$	$338 \pm 1,7^*$
5'N	$190 \pm 6,4$	$207 \pm 3,4^*$
ATP-aza		
ATP-ase	$291 \pm 9,6$	$292 \pm 9,0$
c. oddychania beztlenowego (of the anaerobic respiration)		
α -GIPDH	$232 \pm 4,7$	$258 \pm 2,9^*$
LDH	$232 \pm 3,2$	$250 \pm 2,0^*$
AIDH	$203 \pm 6,5$	$220 \pm 3,2^*$
d. oddychania tlenowego (of the aerobic respiration)		
SDH	$64 \pm 4,8$	$64 \pm 4,2$
IcDH	$74 \pm 7,9$	$73 \pm 7,0$

Objaśnienia: \bar{X} – średnia arytmetyczna ($n=10$); n – liczba preparatów, * gwiazdką oznaczono różnicę statystycznie istotną ($p<0,01$)

Explanations: \bar{X} – arithmetic mean ($n=10$); n – number of preparations, * asterics mark statistically significant difference ($p<0.01$)

Wartości wskaźników aktywności całkowitej testowanych enzymów (tab.): trawienia wewnątrzkomórkowego, związanych z transportem przez błony AIP i 5'N oraz enzymów oddychania beztlenowego są wyższe u ameb pochodzą-

cych z jelita owrzodzonego niż u ameb pobranych z jelita morfologicznie nie zmienionego. Różnice te są statystycznie istotne ($p < 0,001$). Natomiast różnice nie były statystycznie istotne w nasileniu reakcji na ATP-azę ($p > 0,05$) oraz enzymy oddychania tlenowego ($p > 0,05$). Wyniki badań zestawione w ostatnim członie tabeli świadczą o braku różnic w nasileniu reakcji histochemicznych na enzymy oddychania tlenowego: SDH i ICDH w pełzakach pobranych od obu grup zwierząt.

Wartości odchyłeń standardowych wskazują na większe zróżnicowanie nasilenia odczynów cytoenzymatycznych u ameb pochodzących z jelita ślepego niezmienionego inwazją pasożyta.

Dyskusja

We wcześniejszych pracach wykazano różnice w aktywności enzymów *E. histolytica* w zależności od habitatu. Istotne różnice stwierdzono w aktywności AcP, ALP, esteraz nieswoistych, TPP-azy, β -glukuronidazy (KUŻNA 1984), lipaz (KUŻNA 1987) w pełzakach pochodzących z jelita zarażonych zwierząt i z hodowli *in vitro*.

Wyniki prezentowanej pracy świadczą, że zmiany wywołane w habitacie (*in vivo*) przez *E. histolytica* wpływają na intensywność procesów metabolicznych tego pasożyta. Tak więc u ameb pochodzących z owrzodzonego jelita ślepego stwierdzono nasilone procesy trawienia, transportu i oddychania anaerobowego.

Ponieważ AcP bierze udział w trawieniu wewnątrzkomórkowym, może być markerem aktywności fagocytarnej. TRISSL i wsp. (1978), RAVDIN i wsp. (1980) oraz OROZCO i wsp. (1982) wykazali współzależność aktywności fagocytarnej i zjadliwości szczepów *E. histolytica*. Większa aktywność AcP w pełzakach pobranych z owrzodzonego jelita ma bezpośredni związek z nasiloną fagocytozą, czyli agresywnością pasożyta. AGRAWAL i wsp. (1989), którzy stwierdzili wydzielanie AcP przez *E. histolytica* do podłoża hodowlanego, sugerują udział tego enzymu w patogenezie amebozy.

Przypuszczalnie większa aktywność enzymu proteolitycznego — LAP u ameb pochodzących od świnek morskich II grupy jest także wynikiem intensywniejszej fagocytozy i procesów trawienia wewnątrzkomórkowego, a tym samym pośrednio odzwierciedla nasilenie zjadliwości pasożyta.

TPP-aza pośrednio również jest związana z aktywnością fagocytarną. U Metazoa enzym ten jest wyznacznikiem aparatu GOLGIEGO (NOVIKOFF i GOLDFISCHER 1961, CHEETHAM i wsp. 1971); występuje w jego cysternach i pęcherzykach, które z uwagi na zawartość glikoproteidów, fosfolipidów i mukopolisacharydów mogą brać udział w syntezie plazmolemy (NEUTRA i LEBLOND 1966, NORTHCOTE i PICKETT-HEAPS 1966, HODSON i BRENCHLEY 1976). U *E. histolytica* nie stwierdzono obecności typowego aparatu GOLGIEGO. Badania ultrastrukturalne (KUŻNA 1994) wykazały zgrupowanie błon i pęche-

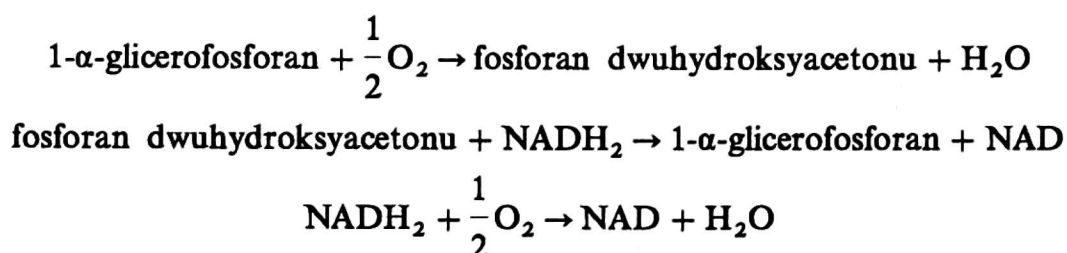
rzyków z produktem reakcji na TPP-azę, być może odpowiednikiem aparatu GOLGIEGO. Wyższa aktywność TPP-azy w amebach pochodzących od zwierząt II grupy mogła wynikać z większego zapotrzebowania komórki na błony w związku z intensywniejszymi podziałami i większą wakuolizacją, która jest następstwem wzmożonej fagocytozy.

Powszechnie wiadomo, że AIP, 5'N i ATP-aza są enzymami funkcjonalnie związanymi z transportem przez błony. Biologiczna funkcja AIP jest wielostronna, ale niedokładnie poznana. Przypisuje się jej rolę w transporcie komórkowym węglowodanów, tłuszczów, nukleotydów, w regulacji poziomu NAD i NADP, w proliferacji i różnicowaniu komórek, a także w regulacji wymiarów błon komórkowych (SAWICKA 1980, KIEREK-JASZCZUK 1981). Większa aktywność AIP w amebach pochodzących od zarażonych świnek morskich II grupy jest wynikiem intensywniejszych podziałów i metabolizmu w porównaniu z amebami pochodzącymi od zwierząt z amebozą bezobjawową. Funkcja 5'N polega na hydrolizie RNA i udziale w transporcie końcowych produktów przez błony (SAWICKA 1980). Badania biochemiczne BOONLAYANGOORA i wsp. (1980) oraz HUSAINA i GRAHAMA (1986) wykazały, że *E. histolytica* nie syntetyzuje puryn. Przypuszczalnie pełzak ten wykorzystuje do syntezy kwasów nukleinowych nukleotydy bakteryjne. 5'N może brać udział w degradacji kwasów nukleinowych ze sfagocytowanych bakterii i transportować nukleotydy do odpowiednich przedziałów komórkowych. Silny odczyn na 5'N w pełzakach pochodzących z jelita z inwazyjną amebozą może się wiązać z aktywnością fagocytarną pasożyta, a także z większym zapotrzebowaniem na kwasy nukleinowe podczas intensywnych podziałów.

Wyniki badań cytochemicznych α -GIPDH, LDH i ALDH wskazują na intensywniejsze procesy oddychania beztlenowego w amebach pochodzących z jelita owrzodzonego. Oddychanie tlenowe u *E. histolytica* podczas bytowania w jelicie odgrywa znacznie mniejszą rolę i nie zależy od nasilenia amebozy. MONTALVO i wsp. (1971) wykazali, że w aksenicznych hodowlach tego pierwotniaka, zarówno w warunkach aerobowych jak i anaerobowych produktem oddychania jest etanol, octan i CO₂, z tym że w środowisku beztlenowym stosunek wydzielanego etanolu do octanu wynosi 3:1, a w tlenowym 1:3. U aksenicznie hodowanych *E. histolytica* nie wykryto metodami biochemicznymi mleczanu i dehydrogenazy mleczanowej. Wcześniej ENTNER i ANDERSON (1954) oraz ENTNER (1958) oznaczali kwas mlekowy u ameb hodowanych monoksenicznie. Ponadto ENTNER i HALL (1955) wykazali, że inny jest metabolizm u *E. histolytica* w warunkach aksenicznych, a inny w obecności mikroorganizmów. W obecnych badaniach wykrywanie LDH w pełzakach pochodzących z jelita żywiciela jest związane z obecnością w ich biotopie bakterii.

Badaniami biochemicznymi nie wykrywano u aksenicznie hodowanych *E. histolytica* produktów pośrednich cyklu KREBSA (REEVES 1984). ENTNER i ANDERSON (1954) oznaczali kwas bursztynowy w pełzakach hodowanych

monoksenicznie. Autorzy sugerują, że bursztynian może się tworzyć u tego pasożyta przez kondensację C₃-C lub pochodzi ze sfagocytowanych i strawionych bakterii. Uzyskane pozytywne odczyny reakcji na SDH i IcDH u *E. histolytica* świadczą o tym, że bursztynian i izocytrynian mogą być utleniane przez pełzaka. Brak utleniania produktów pośrednich cyklu KREBSA przez *E. histolytica* w hodowli aksenicznej, a utlenianie ich przez ameby w hodowli zawierającej bakterie oraz żyjące w jelicie grubym, wskazuje na pochodzenie substratów dla SDH i IcDH ze sfagocytowanych bakterii. Ponieważ jednak *E. histolytica* nie posiada mitochondriów, transport elektronów może się odbywać bez udziału cytochromów, podobnie jak u innych pierwotniaków bez mitochondriów (GRANT i SARGENT 1960, 1961, BAERSTEIN 1963, HILL 1976). Zgodnie z koncepcją GRANTA i SARGENTA (1960, 1961) transport H₂ na O₂ odbywa się przy udziale dehydrogenazy α-glicerofosforanowej, która utlenia substrat do dwuhydroksyacetonu. Przepuszczalny przebieg tej reakcji jest następujący:



U *E. histolytica* rola tlenu w warunkach aerobowych jest problematyczna. Może on być wykorzystywany do reoksydacji NADH₂ z powstaniem H₂O, co by przeciwdziało toksycznym jego właściwościom. Nie można wykluczyć, że u pełzaka czerwonej, podobnie jak u *Trichomonas* i *Trypanosoma*, w transporcie H₂ na O₂ bierze udział również α-GIDH.

Obecność flory bakteryjnej jest istotnym czynnikiem modyfikującym metabolizm *E. histolytica*. Przepuszczalnie produkty trawienia sfagocytowanych bakterii aktywują enzymy *E. histolytica*, a produkty intensywnego metabolizmu tego pasożyta są inhibitorami enzymów żywiciela, co niedawno wykazano (KUŻNA 1995).

LITERATURA

- AGRAWAL A., PANDEY N. C., KUMAR G. 1989. Secretion of acid phosphatase by axenic *Entamoeba histolytica* NIH 200 and properties of the extracellular enzyme. *J. Protozool.* 36: 90-92.
- BAERSTEIN H. D. 1963. A review of electron transport mechanisms in parasitic Protozoa. *J. Parasitol.* 49: 12-21.
- BIAGI F., ROBLEDO E., SERVIN H. 1962. The effect of cholesterol on the pathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 11: 333-340.
- BOONLAYANGOOR P., ALBACH R. A., BOODEN T. 1980. Purine nucleotide synthesis in *Entamoeba histolytica*: a preliminary study. *Arch. Inv. Med.* (Mexico) 11, suppl. 1: 83-88.
- CHEETHAM R., MORRE D., PANNEK C. 1971. Isolation of a Golgi apparatus — rich fraction from rat liver. — IV. Thiamine pyrophosphatase. *J. Cell. Biol.* 49: 899-905.

- DAS S. R., GOSHAL S. 1976. Restoration of virulence to rat of axenically grown *Entamoeba histolytica* by cholesterol and hamster liver passage. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 70: 439-443.
- ENTNER N. 1958. On the pathway of carbohydrate metabolism in *Entamoeba histolytica*. *J. Parasitol.* 44: 638.
- ANDERSON H. 1954. Lactic and succinic acid formation by *Entamoeba histolytica* in vitro. *Exp. Parasitol.* 3: 234-239.
- HALL N. 1955. Some aspects of carbohydrate metabolism of *Entamoeba histolytica*. *Ibid.* 4: 92.
- GRANT P., SARGENT J. 1960. Properties of L- α -glycerophosphate oxidase and its role in the respiration of *Trypanosoma rhodesiense*. *Biochem. J.* 76: 229-237.
- — 1961. L- α -glycerophosphate dehydrogenase, a component of an oxidase system in *Trypanosoma rhodesiense*. *Ibid.* 81: 206-214.
- HILL G. C. 1976. Characterization of the electrontransport systems present during the life cycle of african trypanosomes. In: W. VAN DEN BOSSCHE [Ed.]. *Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationships*. Elsevier, Amsterdam: 31-50.
- HODSON S., BRENCHLEY G. 1976. Similarities of the Golgi apparatus membrane and plasma membrane in rat liver cells. *J. Cell. Sci.* 20: 167-182.
- HUSAIN H. F., GRAHAM C. H. 1986. Purine-metabolising enzymes in *Entamoeba histolytica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 19: 19-26.
- KAPLOW L. 1955. A histochemical procedure for localizing evaluating leucocyte alkaline phosphatase activity on smears of blood. *Blood* 10: 1023-1029.
- KIEREK-JASZCZUK D. 1981. Heterogenność fosfatazy alkalicznej ssaków. *Post. Biochem.* 27: 217-237.
- KUŻNA W. 1984. Cytochemiczne badania pełzaków *Entamoeba histolytica* (Schaudinn, 1903) pochodzących z jelita różnych żywicieli oraz histochemiczne i histologiczne badania jelita zarażonych zwierząt. *Wiad. Parazytol.* 30: 409-422.
- 1987. Histochemiczne badania gospodarki tłuszczowej w pełzakach *Entamoeba histolytica* (Schaudinn, 1903). *Ibid.* 33: 657-661.
- 1994. Ultrastructural localization of enzymes in *Entamoeba histolytica*. I. Acid phosphatase, alkaline phosphatase and thiamine phosphatase. *Acta Protozool.* 33: 233-238.
- 1995. Histologiczne i histochemiczne badania jelita grubego i cienkiego świnek morskich zarażonych *Entamoeba histolytica*. *Wiad. Parazytol.* 41: 155-162.
- MONTALVO F., REEVES R., WARREN L. 1971. Aerobic and anaerobic metabolism in *Entamoeba histolytica*. *Exp. Parasit.* 30: 249-256.
- NACHLAS M., TSOU K., DE SOUSA E. 1957. Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by use of a new p-nitro-phenyl substitutes ditetrazole. *J. Histochem. Cytochem.* 5: 420-436.
- NANO R., DE PICEIS POLVER P. G., GERZELI G. 1987. Leucinoaminopeptidase activity in blood and hemopoietic organs of different Vertebrates. A histochemical comparative study. *Acta Histochem.* 82: 83-88.
- NEUTRA M., LEBLOND C. P. 1966. Synthesis of the carbohydrate of mucus in the Golgi complex as shown by electron microscope radioautography of goblet cells from rats infected with glucose- H^3 . *J. Cell. Biol.* 30: 119-136.
- NORTHCOTE D. H., PICKETT-HEAPS J. D. 1966. A function of Golgi apparatus in polysaccharide synthesis and transport in the root cap cells of wheat. *Biochem. J.* 98: 159-167.
- NOVIKOFF A. B., GOLDFISCHER S. 1961. Nucleotide diphosphatase activity in the Golgi apparatus and its usefulness for cytological studies. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 47: 802-810.
- OROZCO E., GUAMEROS G., MARTINEZ-PALOMO A. 1982. Las interacciones entre lectina y receptor median la adherencia de *Entamoeba histolytica* a células epiteliales. Relacion de la adhesión con la virulencia de las cepas. *Arch. Invest. Med.* 13, Suppl. 3: 159-163.
- PEARSE E. A. G. 1968. *Histochemistry. Theoretical and Applied*. Vol. 1. Edinburgh and London—New York.

- 1972. Histochemistry. Theoretical and Applied. Vol. 2. Edinburgh and London—New York.
- RAVDIN J. I., CROFT B. Y., GUERRANT R. L. 1980. Cytopathogenic mechanism of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 152: 377-390.
- REEVES R. 1984. Metabolism of *Entamoeba histolytica* Schaudinn 1903. *Adv. Parasitol.* 23: 106-141.
- MELENEY H., FRYE W. 1957. A modified Schaffer-Frye technique for the cultivation of *Entamoeba histolytica* and some observations on the carbohydrate requirements. *Am. J. Hyg.* 66: 56-62.
- SAWICKA T. 1980. Aktywność nukleolityczna plazmalemy komórek ssaków. *Post. Biol. Kom.* 7: 1-18.
- SINGH B. N. 1959. Effect of cholesterol on the virulence of *Entamoeba histolytica* in rats. *J. Sci. Industr. Res.* 180: 165-166.
- TRISL D., MARTINEZ-PALOMO A., DE LA TORRE M. 1978. Surface properties of *Entamoeba*: Increased rates of human erythrocyte phagocytosis in pathogenic strains. *J. Exp. Med.* 148: 1137-1145.
- VINAYAK V. K., CHAKRAVARLI R. N., AGARWAL K. C. 1978. Pathogenicity of *Entamoeba histolytica* – effect of cholesterol on the virulence of strains of amoebae. *Ind. J. Med. Res.* 67: 545-552.
- WACHSTEIN M., MEISEL E. 1957. Histochemistry of hepatic phosphatases of physiologic pH with special reference to the demonstration of bile canaliculi. *Am. J. Clin. Pathol.* 27: 12-23.

Otrzymano 17 II 1996, zaakceptowano 30 VII 1996