

Wpływ produktów ekskrecyjno-sekrecyjnych *Fasciola hepatica* na funkcjonowanie hepatocytów szczurzych*)

AGNIESZKA GAJEWSKA, KATARZYNA SMAGA-KOZŁOWSKA, GRZEGORZ KOTOMSKI

Zakład Parazytologii i Inwazjologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Gajewska A., Smaga-Kozłowska K., Kotomski G.

Effect of excretory-secretory products of *Fasciola hepatica* on the functioning of rat hepatocytes

Summary

Fasciolosis, caused by *Fasciola hepatica* is a hepatic parasitic infection that affects numerous mammal species – mainly ruminants, and is still a major veterinary problem in Poland causing huge economic losses in the cattle industry. The economic significance of fasciolosis is mainly due to direct losses caused by decrease in weight gain, milking capacity and the confiscation of altered livers in slaughterhouse. The molecular mechanisms of host-parasite interactions are still little known.

The aim of the study was to investigate changes in the metabolic activity of freshly isolated rat hepatocytes exposed to excretory-secretor products (ESP) of *Fasciola hepatica*. The metabolic activity of isolated hepatocytes was determined with MTT and enzyme leakage tests. Hepatocytes were incubated with 0-1 mg/ml ES proteins from 2 to 72 hours. It was found that both the concentration and longevity of ESP action may hamper the metabolic activity of hepatocytes. Decrease in the metabolic activity of the cells correlated with an increase in enzyme leakage (ALT, ASPAT and LDH). Moreover, it was found that the level of albumin in the medium gradually decreased after 24 hrs of incubation with EPS, which may have resulted from an alternation of protein synthesis in the cells treated with the liver fluke metabolites.

In conclusion, the results of the study indicate that ESP of *Fasciola hepatica* plays an important role in damaging liver cells of the host during invasions.

Keywords: *Fasciola hepatica*, hepatocytes, excretory-secretory products

Fascjoloza, czyli choroba wywołana przez należącą do przywr motylicę wątrobową *Fasciola hepatica* stanowi poważny problem epizyotologiczny i ekonomiczny w hodowli przeżuwaczy w Polsce i na świecie. Straty ekonomiczne w stadzie zarażonym *F. hepatica* są znaczne i wynikają przede wszystkim ze zmniejszonych przyrostów masy ciała (20), spadku mleczności oraz konieczności konfiskaty wątrób w rzeźni (17). Największe zniszczenia wątroby w czasie inwazji *F. hepatica*, powstają na skutek mechanicznych uszkodzeń, będących wynikiem otarć kolczastego tegumentu oraz przysawek przemieszczających się przywr oraz występowania komórkowej reakcji zapalnej rozwijającej się w organizmie żywiciela (8). Przypuszcza się, że także chemiczne substancje wydzielane lub aktywowane przez przemieszczające się przywry w znacznym stopniu przyczyniają się do uszkodzania wątroby żywiciela ostatecznego. Jednakże dokładne mechanizmy uszkodzeń tkanki wątrobowej żywiciela ostatecznego przez motylicę wątrobową nadal są mało poznane, a większość wiedzy na ten temat bazuje na histopatologii

przywr *in situ* i analizie produktów ekskrecyjno-sekrecyjnych (ESP).

Miedzy gryzoniami – laboratoryjnymi żywicielami motylicy wątrobowej – występują podobne różnice jak między przeżuwaczami. Szczury, podobnie jak bydło, nabywają odporności na powtórna inwazję (14). Ponieważ choroba motylicza u bydła, z racji rozpowszechnienia hodowli, jest w Polsce poważniejszym problemem niż u innych zwierząt, logiczne i uzasadnione wydawało się wybranie szczura jako modelu laboratoryjnego do badania interakcji białka pasożytnicze – hepatocyt żywiciela. Na szczurach prowadzono wiele badań nad przebiegiem inwazji *Fasciola hepatica* w różnych ośrodkach naukowych, ale głównie w aspekcie immunologicznym (3, 19, 24). Poznanie mechanizmów uszkodzeń wątroby, a tym samym czynników, które je indukują, pomocne byłoby w znalezieniu skutecznego sposobu unieszkodliwiania pasożyta, zapobiegania niszczenia tkanek żywiciela, co w konsekwencji prowadziłoby do ograniczania strat ekonomicznych w hodowlach zwierząt gospodarskich.

Celem badań było określenie wpływu sekrecji i ekskrecji *F. hepatica* (ESP) na funkcjonowanie komórek

*) Praca wykonana w ramach projektu badawczego nr 3PO6K 01724 finansowanego przez KBN.

wątroby szczura poprzez ocenę przeżywalności hepatocytów ekspozowanych na różne stężenia tych białek (przy różnych czasach inkubacji z białkami pasożytniczymi), oznaczenie aktywności enzymów indykatorów wątroby i określenie poziomu albuminy (białka syntetyzowanego przez hepatocyty) po ekspozycji na białko pasożytnicze.

Materiał i metody

Uzyskiwanie białek ES *F. hepatica*. Produkty ES otrzymywano podczas inkubacji dorosłych, żywych przywr w 0,9% NaCl lub w PBS pH 7,4 z dodatkiem 300 j.m. penicyliny i 100 µg streptomycyny w temp. 37°C przez 4-6 godzin. Uzyskany materiał zagęszczano, używając woreczków dializacyjnych. Stężenia produktów ES określano metodą Lowry'ego.

Zwierzęta. Do doświadczenia użyto 20 sztuk szczurów szczepu Wistar o masie 250-300 g. Dwa tygodnie przed rozpoczęciem eksperymentu, zwierzęta przechodziły okres kwarantanny. Przez cały okres kwarantanny oraz bezpośrednio przed dniem eksperymentu zwierzęta miały stały dostęp do paszy (pasza LSK) oraz wody.

W celu otrzymania wątroby, z której izolowano hepatocyty wykonywano na szczurach zabiegi chirurgiczne w pełnej narkozie. Procedura izolowania wątroby i hepatocytów została przeprowadzana według zalecanego przez ECVAM protokołu INVITTOX (protokół No. 20, 1999). Świeżo izolowane hepatocyty hodowano w medium Williamsa z dodatkiem bydlęcej surowicy płodowej, antybiotyków w sterylnych warunkach w temperaturze 37°C, 100% wilgotności i 5% stężeniu CO₂. Przed doświadczeniem określano żywotność wyizolowanych hepatocytów przy zastosowaniu błękitu trypanu (TB). Do badań wykorzystywano hepatocyty o żywotności powyżej 75%.

Ocena przeżywalności hepatocytów ekspozowanych na różne stężenia ESP testem MTT. Przeżywalność hepatocytów inkubowanych w medium zawierającej różne stężenia badanych antygenów i przy zmiennym czasie ekspozycji na antygen określano standardowym testem MTT. Wyizolowane hepatocyty nanoszono na płytki 96-dółkowe w końcowym stężeniu 50 tys. komórek/dółek i umieszczano w inkubatorze w 37°C, 5% CO₂ i 100% wilgotności powietrza. W celu adhezji komórek do podłoża dółków pozostawiano komórki w tych warunkach przez okres około 12 godzin. Po stwierdzeniu, że komórki przykleiły się do podłoża dodawano do każdego dółka wcześniej przygotowane w medium antygeny *F. hepatica*. Zakres stosowanych stężeń ESP to: 0-1 mg/ml. Hepatocyty inkubowano z określonymi stężeniami białek *F. hepatica* przez okres 2, 6, 12, 24, 48 i 72 godzin. Procent komórek przeżywających określano na podstawie stosunku absorbancji dla komórek traktowanych ESP do absorbancji próby kontrolnej, dla której przeżywalność przyjęto za 100% (komórki nie traktowane ESP).

Ocena systemów enzymatycznych i poziomu albuminy hepatocytów szczurzych po ekspozycji na ESP *Fasciola hepatica*. W celu wykonania testów określających aktywność poszczególnych enzymów (aminotransferaza asparaginianowa (AST), aminotransferaza alaninowa (ALT), dehydrogenaza mleczanowa (LDH)) i poziomu albuminy prowadzono hodowlę hepatocytów w 6-dółkowych płytkach w medium Williamsa (2 × 10⁶ żywych komórek/dółek). Zastosowano czasy inkubacji 2-72 godzin i 0,1-1 mg/ml zakres stężeń antygenów ESP. Aktywność enzymów oznaczono w środowisku

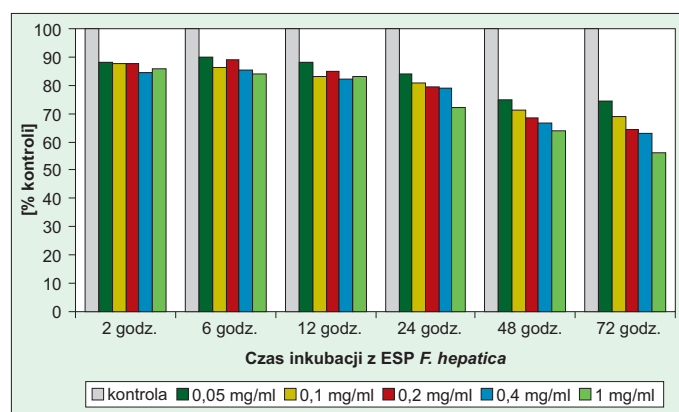
zewnątrzkomórkowym (medium znad komórek) oraz w zawiesinie hepatocytów po rozbiciu komórek ultradźwiękami. Wyniki doświadczenia przedstawiono, podając aktywność enzymów stwierdzoną w medium jako procent całkowitej aktywności enzymu w zawiesinie komórkowej. Do pomiaru aktywności enzymów i poziomu albuminy użyto odczynników firmy Pointe Scientific. Odczynniki i pomiary zostały wykonane według procedur zalecanych przez producenta.

Obliczenia statystyczne. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie uzyskane w 8-11 niezależnych doświadczeniach ± SD ($p < 0,05$ w odniesieniu do układu kontrolnego). Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy pomocy niesparowanego testu t-Studenta.

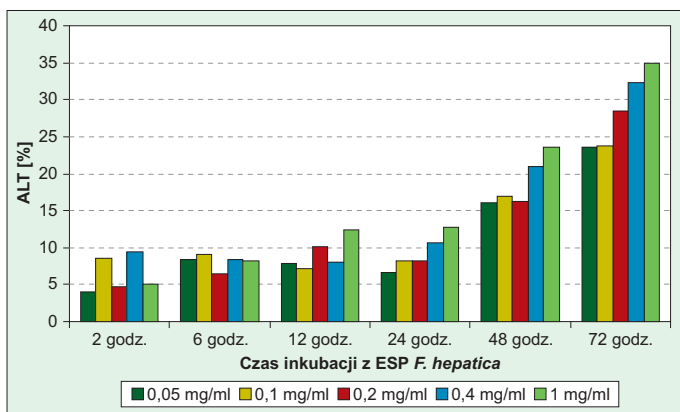
Wyniki i omówienie

Wieloletnie badania zawartości materiału ekskrecyjno-sekrecyjnego motylicy wątrobowej potwierdzają, że większość substancji wchodzących w skład ESP bierze udział w interakcji pasożyt-żywiciel (7), jednakże nie została określona ich rola w uszkodzaniu wątroby żywiciela ostatecznego.

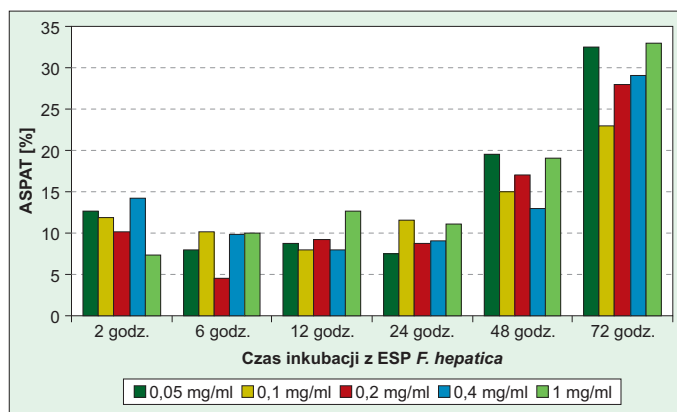
W materiale ES *F. hepatica* zidentyfikowano wiele enzymów w tym różnych proteaz, które oprócz udziału w odżywianiu się pasożyta, mogą odgrywać rolę w rozpuszczaniu tkanek żywiciela, uszkodzaniu tkanki wątroby i powodowaniu owrzodzeń przewodów żółciowych w czasie inwazji (5, 6). W obecnych badaniach zaobserwowano, że zarówno stężenie ESP, jak i czas inkubacji z białkami pasożytniczymi mają istotny wpływ na przeżywalność hepatocytów. Stosując standardowy test MTT stwierdzono, że hepatocyty traktowane ESP wykazują się niższą aktywnością metaboliczną w porównaniu do komórek nie traktowanych białkami motylicy wątrobowej. Wraz ze wzrostem stężenia produktów ekskrecyjno-sekrecyjnych, jak i wydłużaniem czasu inkubacji następuje spadek przeżywalności hepatocytów. Istotnie statystycznie zmiany stwierdzono już po 12-godzinnej inkubacji hepatocytów z ESP *F. hepatica* o stężeniu 0,1 mg/ml. Najwyższy spadek zanotowano dla najwyższych stężeń ESP po czasie 72 godzin inkubacji i wynosił on dla stężenia 0,4 mg/ml – 37 ± 5,3%, a dla stężenia 1 mg/ml – 43,9 ± 7,1%. Wpływ produktów ekskrecyjno-sekrecyjnych na przeżywalność szczurzych hepatocytów przedstawiono na ryc. 1.



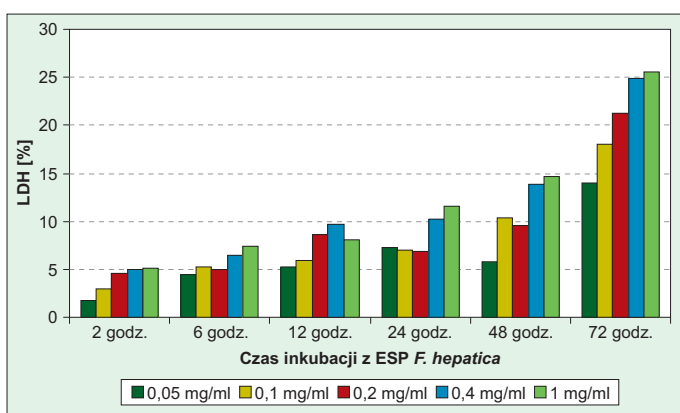
Ryc. 1. Wpływ produktów ES na przeżywalność hepatocytów szczurzych



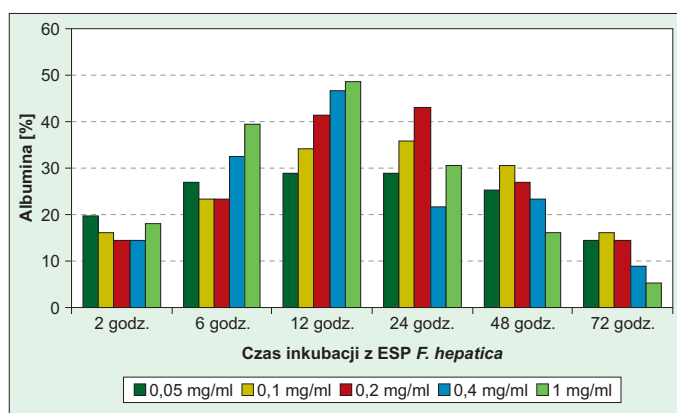
Ryc. 2. Zmiany poziomu aktywności aminotransferazy alani-
nowej w hepatocytach szczurzych traktowanych produkta-
mi ES pochodzącymi od *F. hepatica*



Ryc. 3. Zmiany poziomu aktywności aminotransferazy aspa-
raginianowej w hepatocytach szczurzych traktowanych pro-
duktami ES pochodzącymi od *F. hepatica*



Ryc. 4. Zmiany poziomu aktywności dehydrogenazy mlecz-
anowej w medium inkubacyjnym hepatocytach szczurzych
traktowanych produktami ES pochodzącymi od *F. hepatica*



Ryc. 5. Wpływ produktów ES *F. hepatica* na poziom albumi-
ny hepatocytów szczurzych

Spadek przeżywalności hepatocytów może być wynikiem poważnych uszkodzeń hepatocytów związanych m.in. z uszkodzeniem ich błon, a co za tym idzie – z wyciekaniem enzymów indykatorowych. Oceniając stopień integralności błon komórkowych świeżo izolowanych hepatocytów szczura testem uwalniania aminotransferazy alaninowej i asparaginianowej stwierdzono, że aktywność uwalnianych z komórek enzymów wzrasta wraz z wydłużaniem czasu inkubacji z białkami ESP. Wzrost aktywności aminotransferaz był istotny statystycznie po 48-godzinnej inkubacji w zakresie wszystkich stężeń EPS i wynosił odpowiednio 16-23,5% dla ALT i 13-17% dla ASPAT, w stosunku do całkowitej wartości aktywności tych enzymów stwierdzonej w zawiesinie komórek. Najwyższą aktywność – $35 \pm 7,5\%$ dla ALT (ryc. 2) i $33 \pm 8,5\%$ dla ASPAT (ryc. 3) odnotowano przy zastosowaniu najwyższego stężenia ESP – 1 mg/ml po czasie 72 godzin. Podobnie test uwalniania dehydrogenazy mleczanowej pokazał, że zastosowanie wyższego stężenia i wydłużanie czasu inkubacji sprzyja uszkodzeniu błon hepatocytów. Wpływ LDH z hepatocytów traktowanych produktami ekskrecyjno-sekrecyjnymi uzyskał niższe wartości w porównaniu w ww. testami. Przy najwyższym stężeniu ESP – 1 mg/ml i 72-godzinnej inkubacji aktywność LDH uwol-

nionej z komórek do medium inkubacyjnego wynosiła $23,8 \pm 6,4\%$ (ryc. 4). Badania *in vivo* prowadzone m.in. przez Jemlięgo i wsp. (15) oraz przez Ferre i wsp. (13) potwierdzają, że na skutek zniszczeń tkanki wątroby podczas inwazji u różnych gatunków zwierząt, do krwi zostają uwolnione enzymy wątrobowe. Dzięki badaniu ich aktywności we krwi możemy wnioskować o etapach inwazji *Fasciola hepatica*. Enzymami, których aktywność najczęściej oznacza się w osoczu są m.in.: dehydrogenaza glutaminianowa i aminotransferaza alaninowa, ich aktywność wzrasta w początkowej fazie inwazji, a szczyt osiąga przy końcu stadium mięszoowego (12, 13, 15). W stadium żółciowym choroby przy braku zniszczeń mięszo, poziom enzymów spada, ale pozostaje wyższy niż w przypadku nie zarażonej kontroli.

Praca Kołodziejczyka i wsp. (16) pokazała, że zmianom w zdolnościach antyoksydacyjnych wątroby szczurów zarażonych *F. hepatica* oraz zmianom w strukturze fosfolipidów błon komórkowych hepatocytów towarzyszyła wzrastająca aktywność aminotransferazy asparaginianowej i alaninowej, co potwierdzało zniszczenie komórek wątroby. Uszkodzenia wątroby, które wystąpiły w czasie inwazji motylicy wątrobowej u kóz związane były m.in. ze wzrostem aktywności dehydro-

genazy mleczanowej oraz gamma-glutamylotranspeptydazy w ich surowicy. Wyższą aktywność enzymów obserwowano u zwierząt z rozległymi zniszczeniami tkanki (18).

Na skutek uszkodzeń błon cytoplazmatycznych hepatocytów oprócz wycieku enzymów wątrobowych do krwi przy dłuższej trwających uszkodzeniach, może dochodzić do obniżenia poziomu albuminy we krwi. Na ryc. 5 pokazano zmiany w medium inkubacyjnym poziomu albuminy uwolnionej z hepatocytów inkubowanych z ESP *Fasciola hepatica*. Zaobserwowano, że do 12. godziny inkubacji poziom albuminy w medium wzrasta, co może wiązać się z wpływem albuminy z komórek posiadających uszkodzoną błonę. Stopniowy spadek stężenia albuminy w medium inkubacyjnym został stwierdzony od 24. godziny inkubacji z ESP. Przyczyn tego zjawiska można upatrywać w zaburzeniu syntezy albuminy w hepatocytach. Najwyższy spadek stężenia albuminy, który miał miejsce przy najdłuższym czasie ekspozycji na ESP i najwyższym stężeniu stosowanych białek pasożytniczych koresponduje z największym spadkiem przeżywalności hepatocytów oraz wyciekami aminotransferaz i dehydrogenazy mleczanowej, co niezbieżnie świadczy o poważnych uszkodzeniach hepatocytów. W stadium mięsowym inwazji migrujące przywry niszczą tkanki wątroby, powodują upośledzenie jej funkcji, co odzwierciedla się w obniżeniu poziomu albumin osocza u owiec i cieląt (22). U szczurów w tym stadium inwazji obniżony poziom albumin korelował z intensywnością inwazji (23). Niemniej jednak w zaawansowanym stadium inwazji, straty krwi i białek są znaczne, a uszkodzona wątroba nie jest w stanie przywrócić prawidłowego poziomu albumin. Upośledzenie wątroby jest m.in. wynikiem procesów reorganizacji jej funkcji, dlatego stopniowa utrata albumin w osoczu występuje u wszystkich gatunków żywicielskich i zaczyna się od momentu rozpoczęcia odżywiania się przywr (4).

Badania wykazały, że produkty ekskrecyjno-sekrecyjne *Fasciola hepatica* odgrywają istotną rolę w uszkodzeniu hepatocytów szczura. Elektroforeza materiału ES użytego do doświadczeń potwierdziła obecność białek o masie 26-30 kDa, które uprzednio scharakteryzowano jako proteiny cysteinowe – kathepsyny L i B (9, 21, 25) oraz białek z rodziny saponin (SAP2) o masie 46 kDa (11) (wyniki nie zostały przedstawione w pracy). Prawdopodobnie m.in. proteiny cysteinowe obecne w materiale ekskrecyjno-sekrecyjnym brały udział w procesach, prowadzących do uszkodzeń błon cytoplazmatycznych hepatocytów i tym samym przyczyniając się do wycieku enzymów indykatorowych i śmierci komórek. Potwierdzeniem litycznego działania tych enzymów na tkanki gospodarza może być fakt, iż obydwie formy kathepsyn L1 i L2 mają zdolność lizy kolagenu, laminin i fibronektyn, co wyraźnie wskazuje na udział tych proteaz w odżywianiu się pasożyta i, być może, także na udział w pozaustrojowym trawieniu tkanek gospodarza, co w ten sposób usprawniałoby pene-

trację tkanek podczas wędrówki młodocianych przywr (1, 2). Regularne uwalnianie proteinaz cysteinowych przez pasożyta oraz ich wysoka stabilność w środowisku zewnętrznym (obojętnym pH) potwierdzają realny udział tych białek w patologii wątroby, która ma miejsce w czasie fascjolozy (10).

Piśmiennictwo

1. Berasain P., Goni F., McGonigle S., Dowd A., Dalton J. P., Frangione B., Carmona C.: Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components. *J. Parasitol.* 1997, 83, 1-5.
2. Berasain P., Carmona C., Frangione B., Dalton J. P., Goni F.: *Fasciola hepatica*: parasite-secreted proteinases degrade all human IgG subclasses: determination of the specific cleavage sites and identification of the immunoglobulin fragments produced. *Exp. Parasitol.* 2000, 94, 99-110.
3. Baeza E., Poitou I.: Influence of anti-inflammatory treatments on experimental infection of rats with *Fasciola hepatica*: changes in serum levels of inflammatory markers during the early stages of fasciolosis. *Res. Vet. Sci.* 1994, 57, 172-179.
4. Behm C. A., Sangster N. C.: Pathology, Pathophysiology and Clinical Aspects, [w:] Dalton J. P. (ed.): Fasciolosis, rozdział 6; CABI Publishing 1999, 185-224.
5. Carmona C., Dowd A. J., Smith A. M., Dalton J. P.: Cathepsin L proteinase secreted by *Fasciola hepatica* in vitro prevents antibody-mediated eosinophil attachment to newly excysted juveniles. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1993, 62, 9-17.
6. Chapman C. B., Mitchell G. F.: Proteolytic cleavage of immunoglobulin by enzymes released by *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 1982, 11, 165-178.
7. Clegg J. A., Smith M. A.: Prospects for the development of dead vaccines against helminths. *Adv. Parasitol.* 1978, 16.
8. Dow C., Ross J. G., Todd J. R.: The histopathology of *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Parasitology* 1968, 58, 129-135.
9. Dowd A. J., Smith A. M., McGonigle S., Dalton J.: Purification and characterisation of a second cathepsin L protease secreted by the parasitic trematode *Fasciola hepatica*. *Eur. J. Biochem.* 1994, 223, 91-98.
10. Dowd A. J., Dooley M., Fagain C., Dalton J.: Stability studies on the cathepsin L proteinase of the helminth parasite, *Fasciola hepatica*. *Enzyme Microb. Technol.* 2000, 27, 599-604.
11. Espino A. M., Hillyer G. V.: Molecular cloning of a member of the *Fasciola hepatica* saponin-like protein family. *J. Parasitol.* 2003, 89, 545-552.
12. Ferre I., Barrio J. P., González-Gallego J., Rojo-Vázquez F. A.: Appetite depression in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* L. *Vet. Parasitol.* 1994, 55, 71-79.
13. Ferre I., López P., Rojo-Vázquez F. A., González-Gallego J.: Experimental ovine fasciolosis – antipyrine clearance as indicator of liver damage. *Vet. Parasitol.* 1996, 62, 93-100.
14. Haroun E. T. M., Hillyer G. V.: Resistance to fascioliasis – a review. *Vet. Parasitol.* 1986, 20, 63-93.
15. Jemli M. H., Braun J. P., Dorchie P., Romdhane M. N., Kilani M.: Exploration biochimique et hématologique chez l'agneau infesté expérimentalement par *Fasciola hepatica*. *Recueil de Médecine Vétérinaire* 1993, 169, 241-249.
16. Kołodziejczyk L., Siemieniuk E., Skrzydlewska E.: Antioxidant potential of rat liver in experimental infection with *Fasciola hepatica*. *Parasitol. Res.* 96, 367-372.
17. Krupa J., Filianowicz D.: Choroba motylicza nadal groźna. *Życie Wet.* 1998, 1, 25-26.
18. Martínez-Moreno A., Jiménez-Luque V., Moreno T., Redondo E. S., de las Mulas J. M., Perez J.: Liver pathology and immune response in experimental *Fasciola hepatica* infections of goats. *Vet. Parasitol.* 1999, 22, 82, 19-33.
19. Poitou I., Baeza E., Boulard C.: Kinetic responses of parasite-specific antibody isotypes, blood leukocyte pattern and lymphocyte subsets in rats during primary infestation with *Fasciola hepatica*. *Vet. Parasitol.* 1993, 49, 179-190.
20. Ramisz G., Ramisz A., Balicka-Ramisz A.: Wpływ odrobaczania na przebieg doświadczalnej inwazji *Fasciola hepatica* oraz przyrosty masy ciała u owiec. *Wiad. Parazyt.* 1997, 43, 69-77.
21. Smith A. M., Dowd A. J., McGonigle S., Keegan P. S., Brennan G., Trudgett A., Dalton J. P.: Purification of a cathepsin L-like proteinase secreted by adult *Fasciola hepatica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1993, 62, 1-8.
22. Symons L. E. A.: Pathophysiology of Endoparasitic Infection. Academic Press, Sydney 1989, s. 331.
23. Thorpe E.: Liver damage and the host-parasite relationship in experimental fascioliasis in the albino rat. *Res. Vet. Sci.* 1965, 6, 498-509.
24. Wędrychowicz H., Turner K.: Antibody isotypes involved in local and systemic humoral responses of rats to primary infection with *Fasciola hepatica*. *Acta Parasitol. Pol.* 1987, 32, 369-382.
25. Wijffels G. L., Salvatore L., Dosen M., Waddington J., Wilson L., Thompson C., Campbell N., Sexton J., Wicker J., Bowen F., Friedel T., Spithill T. W.: Vaccination of sheep with purified cysteine proteinases of *Fasciola hepatica* decreases worm fecundity. *Exp. Parasitol.* 1994, 78, 132-148.

Adres autora: dr Agnieszka Gajewska, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: azatorska@alpha.sggw.waw.pl