

Proteolitička aktivnost oralnoga protozoona *Trichomonas tenax* iz zubnoga plaka i sadržaja korijenskih kanala

Sanja Šegović¹
Dunja Buntak-Kobler¹
Albert Marinculić²
Jasminka Granić³
Dora Najžar-Fleger¹
Emir Duraković²

¹Zavod za bolesti zubi
Stomatološki fakultet
Gundulićeva 5, 10000 Zagreb

²Odjel za parazitologiju
Veterinarski fakultet,
Heinzelova 55, 10000 Zagreb

³Laboratorij za kliničku
parazitologiju Klinička bolnica
za infektivne bolesti "Dr. Fran
Mihaljević", Rockefellerova 3,
10000 Zagreb

Sažetak

Ispitivala se je proteolitička aktivnost oralnoga protozoona *Trichomonas tenax* kultiviranog izravno iz zubnoga plaka i sadržaja korijenskih kanala zuba s upalno promijenjenom ili gangrenoznom pulpom, ili periapeksnim procesom. Nakon pripreme lizata, utvrđivala se je proteolitička aktivnost oralnoga trihomonasa elektroforezom na poliakrilamidnom gelu i elektroforezom na poliakrilamidnom gelu s dodatkom želatine.

Najbrža i najizrazitija aktivnost obiju vrsta izolata oralnoga trihomonasa opažena je pri inkubiranju gela u pH 4,6; zatim u pH 5,6. Aktivnost je bila još očita kod pH 2,8, a kod pH 7,2 izrazito slaba. Proteolitička aktivnost bila je najizraženija u području proteina molekulske težine 36 kDa. Rezultati ovisni o pH inkubirajućih medija pokazuju postojanje različitih endopeptidaza u lizatima stanica protozoona *Trichomonas tenax* iz zubnoga plaka i korijenskih kanala.

Ključne riječi: *Trichomonas tenax*, proteolitička aktivnost, dentobakterijski plak, korijenski kanal

Acta Stomatol Croat
1998; 567—571

IZVORNI ZNANSTVENI
RAD
Primitljeno: 4. studenoga 1998.

Adresa za dopisivanje:

Sanja Šegović
Zavod za bolesti zubi
Stomatološki fakultet
Gundulićeva 5
10000 Zagreb

Uvod

Trichomonas tenax je parazit, bičlaš koji obitava u usnoj šupljini ljudi. Njegova prevalencija je 4-53% (1, 2). Osim čovjeka, njegovi su prirodni domaćini i psi, majmuni i mačići (3).

Čestoća oralnoga protozoona *Trichomonas tenax* veća u ispitanika starije dobi te u onih koji pate od

parodontnih bolesti i imaju nizak stupanj oralne higijene (3, 4). Nalazi ga se tri puta češće u prljavim ustima nego u čistim (5).

Trichomonas tenax je opisan kao komenzalni organizam u ljudskoj usnoj šupljini (1). Premda nije patogen, sposoban je invadirati usnu šupljinu kada uvjeti postanu povoljni za njegov rast i razmnožavanje. U fiziološkim uvjetima u usnoj šupljini mje-

sto njegova življenja je zubni plak, a u patološkim uvjetima ga nalazimo i u parodontnim džepovima (6, 7, 8) i u endodontskom prostoru zuba s gangrenoznom pulpom (1, 10).

Svrha rada bila je istražiti proteolitičku aktivnost oralnoga protozoona *Trichomonas tenax* uzgojenog iz materijala uzetog izravno od pacijenata sa zubnih struktura (zubni plak i sadržaj korijenskih kanala zuba s gangrenoznom pulpom ili periapexnim procesom).

Materijal i postupak rada

Kulture oralnoga protozoona *Trichomonas tenax* uzgojene su iz uzoraka zubnoga plaka i sadržaja korijenskih kanala zuba s upalno promijenjenom ili gangrenoznom pulpom, ili periapexnim procesom.

Uzorci su skupljeni (9, 10) i nasadeni na modificiranu hranjivu tekuću podlogu po Diamondu (9, 10, 11, 12), te su nalazi očitavani mikroskopijom svježeg preparata nakon 24, 48, 72, 96 i 120 sati (9, 10).

Uzorci s oralnim trihomonasom su nakon očitavanja zamrznuti na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po redoslijedu postupka, zamrznute kulture oralnoga trihomonasa otopljene su uranjanjem epruveta u vodu temperature $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Priprema lizata

Oralni trihomonasi za utvrđivanje proteolitičke aktivnosti u kasnoj logaritmičkoj fazi rasta (gustoća stanica $3 \times 10^6 / \text{ml}$) skupljeni su centrifugiranjem ($800\text{ g} / 5\text{ min}$) na sobnoj temperaturi. Lizati ispranih stanica pripremljeni su dodavanjem $0,25\%$ (v/v) TRITON X - 100 suspenziji parazita u $0,25\text{ M}$ sukrozi (13, 14). Lizati su odmah upotrijebljeni ili pohranjivani na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; pohranjivanje nije imalo vidljiva učinka na aktivnost enzima (13, 14).

Utvrđivanje proteolitičke aktivnosti na poliakrilamidnom gelu

Proteolitička aktivnost je vizualizirana elektroforezom na poliakrilamidnom gelu (15, 16).

U radu su upotrijebljene elektroforeza na poliakrilamidnom gelu i elektroforeza na poliakrilamidnom gelu s dodatkom želatine, za dokazivanje proteolitičke aktivnosti.

Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu

Proteini su razdvajani metodom opisanom u radu Lockwooda i sur. (14). Uporabljena je aparatura za okomitu elektroforezu (Midget LKB, Švedska).

Gel je bojen preko noći u otopini za bojenje ($0,25\%$ Commassie Brilliant Blue R-250 u otopini za odbojavanje koja se sastoji od 46% metanola i 4% octene kiseline) ili je bojen srebrnim nitratom (16).

Molekulska težina proteina određena je uporabom standardne krivulje. Kao standard uporabljeni su markeri poznatih molekulskih masa: 205; 116; 97,4; 66; 45 i 29 kDa.

Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu s dodatkom želatine

Za vizualizaciju proteolitičkog djelovanja uporabljen je gel istoga sastava (samo $7,5\%$ -tni) debljine $1,5\text{ mm}$ uz dodatak $0,2\%$ -tne želatine. Elektroforeza je provedena u denaturirajućim uvjetima s dodatkom natrijeva dodecil sulfata (SDS). Gel je zatim ispran dva puta po 30 min u $2,5\%$ -tnom TRITON X-100 kako bi se odstranio SDS. Nakon ispiranja gel je inkubiran u stabilnim puferima (limunska kiselina Na_2HPO_4 pH 2,8; 4,6; 5,6 i fosfatna pufera otopina PBS 7,2) na sobnoj temperaturi tijekom $12 - 20\text{ sati}$. Zatim je obojen Commassie Brilliant Blue R-250 preko noći i sutradan odbojavan.

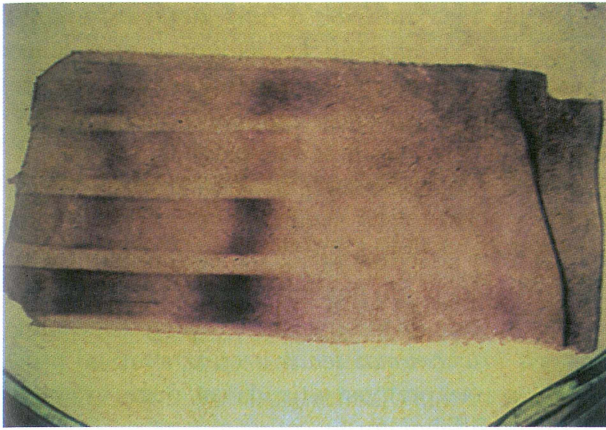
Materijal rabljen u ovome radu nabavljen je od Sigma Chemic GmbH (Diesenhofen).

Rezultati

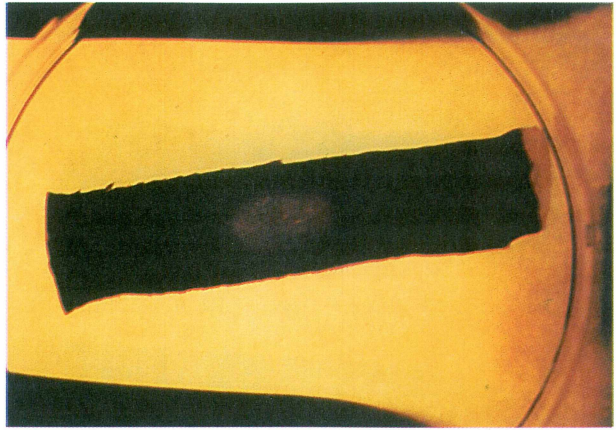
Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu

Bojenje sa Commassie Brilliant Blue R-250. Nakon bojenja ovom bojom vidljive su samo dvije, dobro izražene, proteinske trake (Slika 1). Uzorci označeni brojevima 1 i 2 su lizati stanica oralnoga trihomonasa iz sadržaja korijenskoga kanala, a 3 i 4 iz zubnoga plaka.

Bojenje srebrnim nitratom. Osim već opisanih dviju traka koje su vidljive i bojenjem Commassie Brilliant Blue R-250, vide se još i manje intenzivne proteinske trake na gornjem rubu poliakrilamidnoga gela (Slika 2). Na slici su brojevima od 1 do 4 označeni uzorci korijenskih kanala, a od 5 do 8 uzorci zubnoga plaka.

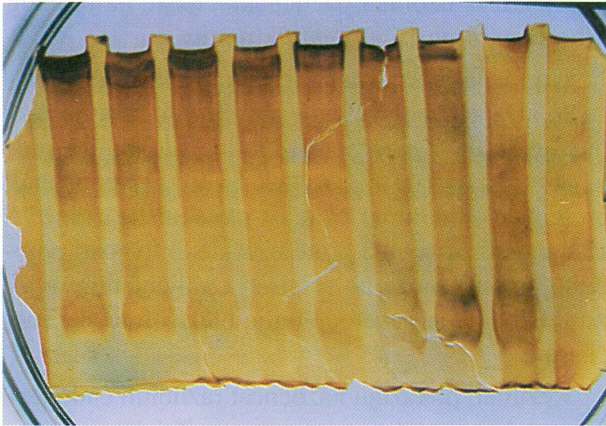


Slika 1. Bojenje s *Commassie Brilliant Blue R-250*
Figure 1. *Commassie Brilliant Blue R-250* stain



Slika 4. Lizati stanica protozoona *Trichomonas tenax* iz zubnoga plaka - elektroforeza s dodatkom želatine na pH 4,6

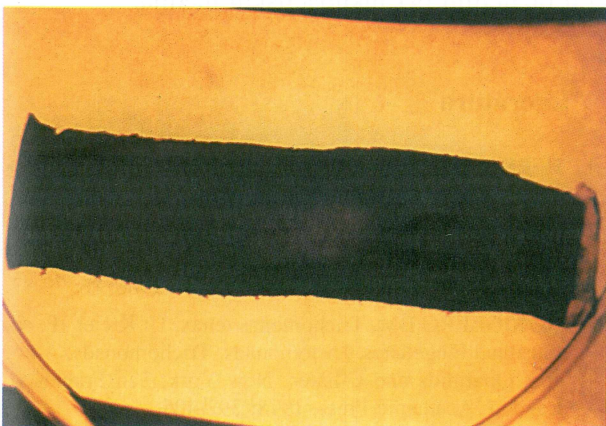
Figure 4. Cell lysates of *Trichomonas tenax* from dentobacterial plaque - electrophoretic method involving gelatin - containing polyacrylamide gels at pH 4.6



Slika 2. Bojenje srebrnim nitratom
Figure 2. Silver stain

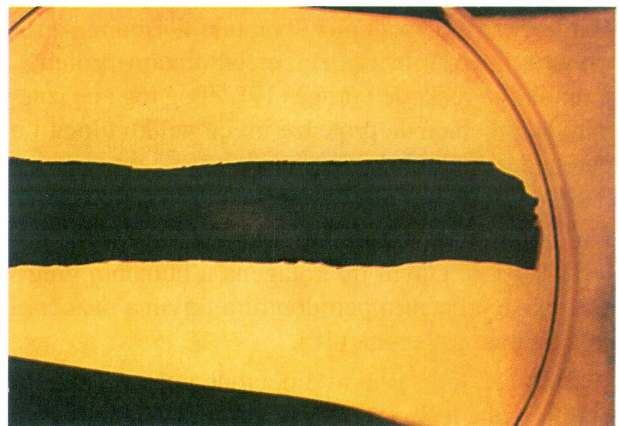
Elektroforeza na poliakrilamidnom gelu s dodatkom želatine za određivanje proteolitičke aktivnosti

Nakon inkubiranja gelova u sva je četiri pufera opažena proteolitička aktivnost, čija je veličina ovisna o pH pufera, a nešto slabija za lizate trihomonasa iz zubnoga plaka (Slike 3, 4, 5 i 6). Najbrža i najizrazitija aktivnost kod obiju vrsta lizata oralnoga trihomonasa dobivena je kod inkubiranja gela u pH 4,6 (Slike 3 i 4), zatim u pH 5,6 (Slike 5 i 6).



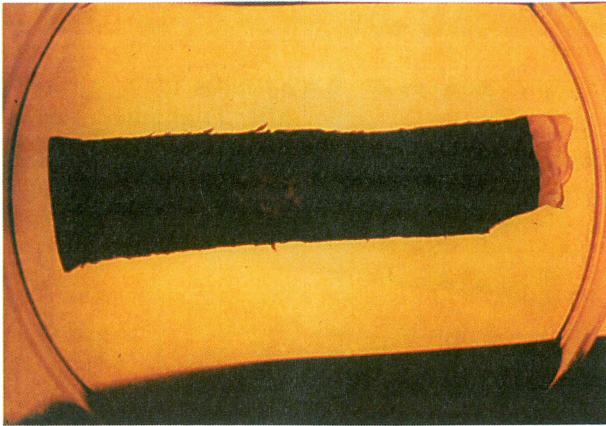
Slika 3. Lizati stanica protozoona *Trichomonas tenax* iz sadržaja korijenskih kanala - elektroforeza s dodatkom želatine na pH 4,6

Figure 3. Cell lysates of *Trichomonas tenax* from root canal contents - electrophoretic method involving gelatin - containing polyacrylamide gels at pH 4.6



Slika 5. Lizati stanica protozoona *Trichomonas tenax* iz sadržaja korijenskih kanala - elektroforeza s dodatkom želatine na pH 5,6

Figure 5. Cell lysates of *Trichomonas tenax* from root canal contents - electrophoretic method involving gelatin - containing polyacrylamide gels at pH 5.6



Slika 6. Lizati stanica protozoona *Trichomonas tenax* iz zubnoga plaka - elektroforeza s dodatkom želatine na pH 5,6

Figure 6. Cell lysates of *Trichomonas tenax* from dentobacterial plaque - electrophoretic method involving gelatin - containing gels at pH 5.6

Na pH 2,8 proteolitička je aktivnost još dobro vidljiva, a kod pH 7,2 izrazito je slaba. Iako je proteolitička aktivnost najviše izražena u području proteina molekulske težine 36 kDa, zbog veličine obezbojenoga polja možemo zaključiti da su u razgradnji želatine sudjelovali i proteini u području proteina molekulskih težina 45 i 56 kDa.

Rasprava

Proteaze kataliziraju širok spektar važnih bioloških reakcija, uključujući stvaranje hormona, zgrušavanje krvi i fibrinolizu, metabolizam proteina, imunološke reakcije i druge (17). Zbog toga ne iznenađuje činjenica da proteaze imaju veliku ulogu i u patogenezi parazitskih bolesti.

Kolagen je sastavni dio ekstracelularnog matriksa koji je podložan razgradnji tijekom parodontne bolesti. Tip I je glavni tip kolagena u humanoj gingivi, dok su u ostalim parodontnim tkivima nazočni i ostali tipovi kolagena (18).

Kolagen je i sastavni dio zubne pulpe, čini 34% ukupne suhe težine proteinskoga sadržaja pulpe. Od toga je 25 - 45% kolagen tipa III, a ostatak je kolagen tipa I (18).

Temeljem navedenog, tkivo zubne pulpe je supstrat na kojem *Trichomonas tenax* može naći dobro stanište za rast i razmnožavanje.

Ribaux i sur. su 1980. i 1981. objavili svoja istraživanja o kolagenolitičkoj aktivnosti protozoona *Trichomonas tenax* (19, 20). Bozner i Demeš su 1991. dokazali nazočnost multiplih proteinaza oralnoga trihomonsa ispitujući učinak njegovih ekstracelularnih proteinaza na razgradnju kolagena tipa I, III, IV i V (21). Iako je proteolitički učinak dokazan na svim tipovima kolagena, na bazalnoj membrani (tip IV) je bio najdjelotvorniji. U prikazanim istraživanjima nije vidljivo da su rabljeni sojevi protozoona *Trichomonas tenax* uzeti izravno od pacijenata, pa se pretpostavlja da su duže vremena održavani u laboratoriju.

U ovome radu nastojalo se je ispitati proteolitičku aktivnost oralnih protozoona *Trichomonas tenax* uzgojenih iz uzoraka pacijenata - nositelja oralnog trihomonsa na zubnim strukturama.

Utvrđena je aktivnost proteina molekulske težine 36 kDa, ali zbog veličine obezbojenoga polja zaključujemo da u razgradnji želatine sudjeluju i proteini molekulskih težina 45 i 56 kDa. Nedostatak proteolize u području proteina molekulske težine 76 kDa te nerazdvajanje proteolitičke aktivnosti pojedinih enzima možemo pripisati izmijenjenim uvjetima inkubacije i metodologije elektroforetske raščlambe.

Rezultati pokazuju nazočnost različitih endopeptidaza u lizatima stanica protozoona *Trichomonas tenax* iz zubnoga plaka i korijenskih kanala, s obzirom na to da je njihova aktivnost znakovito različita u različitim pH inkubacijskih medija.

Literatura

1. HERS SM. Pulmonary trichomoniasis and *Trichomonas tenax*. J Med Microbiol 1985; 20: 1-10.
2. VRABLIĆ J, VODRAŽKA J, ČATAR G I MASAROVA E. Concerning the isolation and occurrence of the oral flagellate *Trichomonas tenax*. Cslka Stomat 1986; 86: 79-87.
3. HONIGBERG BM. *Trichomonas tenax*. U: Kreier JP, ed. Intestinal Flagellates, Histomonads, Trichomonads, Amoeba, Opalinids and Ciliates. New York, San Francisco, London: Academic Press, 1978: 392-405.
4. VRABLIĆ J, ČATAR G, STANIĆ R i sur. K vyskytu ustneho bičikovca *Trichomonas tenax* u deti s chronickou tonzilitidou. J Bratisl Lek Listz 1987; 88: 64-70.
5. WANTLAND WW, LAUER D. Correlation of some oral hygien variables with age, sex and incidence of oral protozoa. J Dent Res 1970; 49: 293-297.

6. LANGE DE, HÖCKER K, STOCKMANN H. Vorkommen und Identifizierung von Protozoen im entzündlichen Taschenexudat der menschlichen Gingiva. Dtsch Zahnärztl Z 1984; 39: 673-676.
7. LANGE DE, STOCKMANN H, HÖCKER K. Vorkommen und Identifizierung von Protozoen in der menschlichen Mundhöhle. Dtsch Zahnärztl Z 1983; 38: 906-910.
8. HÖCKER K, STOCKMANN H, LANGE DE. Über das Vorkommen von Protozoen bei profunden Parodontopathien. Dtsch Zahnärztl Z 1983; 38: 887-890.
9. ŠEGOVIĆ S, GRANIĆ J, BUNTAK-KOBLER D i sur. *Trichomonas tenax* in human oral cavity. Acta Stomatol Croat 1993; 27: 255-261.
10. ŠEGOVIĆ S, BUNTAK-KOBLER D, ANIĆ I i sur. *Trichomonas tenax* in the root canals. Period Biol 1995; 97: 239-242.
11. KEENE WE, PETIT MG, ALLEN S, McKERROW JH. The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. J Exp Med 1986; 163: 536-549.
12. DIAMOND LS. The establishment of various *Trichomonads* of animals and man in axenic cultures. J Parasitol 1957; 43: 488-490.
13. LOCKWOOD CL, NORTH MJ, COOMBS GH. *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas foetus* and *Trichomitus batrachorum*: Comparative Proteolytic Activity. Exp Parasit 1984; 58: 245-253.
14. LOCKWOOD BC, NORTH MJ, SCOTT KI i sur. The use of highly sensitive electrophoretic method to compare the proteinases of trichomonads. Mol Biochem Parasitol 1987; 24: 89-95.
15. NORTH MJ, COOMBS GH. Proteinases of *Leishmania mexicana* amastigotes and promastigotes: Analysis by gel electrophoresis. Mol Biochem Parasitol 1981; 3: 293-300.
16. MORRISSEY JH. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. Analitic Biochem 1981; 117: 307-310.
17. McKERROW JH. Parasite Proteases. Exp Parasit 1989; 68: 111-115.
18. GAGE JP, FRANCIS MJO, TRIFFITT JT. Collagen and dental matrices. London, Boston, Singapore, Sidney, Toronto, Wellington: Butterworth and Co. Ltd, 1989; 3-105.
19. RIBAUX CL, MAGLOIRE H, JOFFRE A i sur. Collagolytic activity of oral flagellate *Trichomonas tenax*: an ultrastructural study. J Dent Res 1980; 59: 1868, Abs No 83.
20. RIBAUX CL, COUBLE ML, MAGLOIRE H i sur. Degradation of type I collagen by *Trichomonas tenax*: a biochemical study. J Dent Res 1981; 60 Special Issue: 1202, Abs No 14.
21. BOZNER P, DEMEŠ P. Degradation of collagen types I, III, IV and V by extracellular proteinases of an oral flagellate *Trichomonas tenax*. Arch Oral Biol 1991; 36: 77-83.

Proteolytic Activity of *Trichomonas tenax* from Dentobacterial Plaque and Root Canal Contents

Sanja Šegović¹
Dunja Buntak-Kobler¹
Albert Marinculić²
Jasminka Granić³
Dora Najžar-Fleger¹
Emir Duraković²

¹Zavod za bolesti zubi
Stomatološki fakultet
Gundulićeva 5, 10000 Zagreb

²Odjel za parazitologiju
Veterinarski fakultet,
Heinzelova 55, 10000 Zagreb

³Laboratorij za kliničku
parazitologiju Klinička bolnica
za infektivne bolesti "Dr. Fran
Mihaljević", Rockefellerova 3,
10000 Zagreb

Summary

The purpose of this study was to examine proteolytic activity of *Trichomonas tenax* collected directly from dentobacterial plaque and root canal contents of gangrenous teeth or teeth with periapical processes. Both electrophoretic method involving polyacrylamide gels and electrophoretic method involving gelatin - containing polyacrylamide gels, have been used to analyse *Trichomonas tenax* proteolytic activity. The most obvious and fastest activities were obtained when gels were incubated in pH 4.6, followed by the results of incubating in pH 5.6, while in pH 2.8 activity was less but still obvious. Proteolytic activities were the most effective in the area of protein MW 36 kDa. The different activity of enzymes depending on the pH of incubated media indicate the presence of different endopeptidases in cell lysates of protozoon *Trichomonas tenax* from dentobacterial plaque and root canal contents.

Key words: *Trichomonas tenax*, proteolytic activity, dentobacterial plaque, root canal

Acta Stomatol Croat
1998; 573—575

ORIGINAL SCIENTIFIC
PAPER

Received: November 4, 1998

Address for correspondence:

Sanja Šegović
Zavod za bolesti zubi
Stomatološki fakultet
Gundulićeva 5
10000 Zagreb

Introduction

Trichomonas tenax is a parasitic flagellate protozoon in the human mouth with a prevalence ranging from 4 to 53% (1, 2). Hosts can be humans, dogs, monkeys and cats (3).

It is frequently found in the mouths of elderly people, persons with advanced periodontal disease, and those with poor oral hygiene (3, 4). It is found that

individuals with clean, healthy oral cavities have an infection rate only one third as great as those who have unclean mouth (5).

Trichomonas tenax is considered to be a commensal. We can find it in the mouth when the conditions in the oral cavity are favourable for its growth and survival. *Trichomonas tenax* lives in dentobacterial plaque in physiological oral conditions; in periodontal pockets (6, 7, 8) and the endodontic spa-

ce of gangrenous teeth in pathological oral states (1, 10).

The purpose of this study was to examine proteolytic activity of *Trichomonas tenax* collected directly from patients from dental structures (dentobacterial plaque and root canal contents of gangrenous teeth or teeth with periapical processes).

Material and methods

Trichomonas tenax cultures were cultured from dentobacterial plaque specimens and root canal content specimens of gangrenous teeth or teeth with periapical processes.

Specimens were collected (9, 10) and placed in modified liquid Diamond's axenic broth medium (9, 10, 11, 12). The native smears taken from the test tubes were examined by light microscopy after 24, 48, 72, 96 and 120 hours (9, 10).

Positive specimens were then frozen at -20 °C. When needed, frozen specimens were warmed in water at 20 °C.

Preparations of lysates

Flagellates in late logarithmic phase of growth (cell density about 3×10^6 / ml) were harvested by centrifugation (800 g / 5 min) at room temperature. Lysates of washed parasites were obtained by the addition of 0.25% (v / v) TRITON - X 100 to suspensions of the parasites in 0.25 M sucrose (13, 14). The lysates were used immediately or stored at -20 °C. Storage had no apparent effect on enzyme activity.

Proteolytic activity determination involving polyacrylamide gels

Proteinases were separated and visualised by electrophoresis on polyacrylamide gels (15, 16). Both, electrophoretic method involving polyacrylamide gels and electrophoretic method involving gelatin - containing polyacrylamide gels, were used to analyse *Trichomonas tenax* proteolytic activity.

Electrophoretic method involving polyacrylamide gels

Proteins were separated by Lockwood's method (14). A machine for vertical electrophoresis was used (Midget LKB, Sweden).

Gel was stained through the night in stained solution (0.25% Commassie Brilliant Blue R - 250 in destained solution composed of 46% methanol and 4% acetic acid) or it was silver stained.

Molecular weight of proteins was determined by standard curve. Markers with familiar molecular weights were used as standards: 205; 116; 97.4; 66; 45 and 29 kDa.

Electrophoretic method involving gelatin - containing polyacrylamide gels

For proteolytic activity visualisation the same gel (7.5%; thick 1.5 mm; with the addition of 0.2% gelatin) was used. Electrophoresis was performed in denaturated conditions with the addition of sodium dodecyl sulphate (SDS). Gel was then washed twice for 30 minutes in 2.5% TRITON - X 100 to remove SDS. After that, the gel was incubated in stable buffer (citric acid Na_2HPO_4 pH 2.8; 4.6; 5.6 and phosphate buffer solution 7.2) at room temperature for 12 - 20 hours. The gel was stained with Commassie Brilliant Blue R - 250 through the night and destained the following day.

All used materials were obtained from Sigma Chemie GmbH (Diesenhofen).

Results

Electrophoretic method involving polyacrylamide gels

Commassie Brilliant Blue R - 250 stain. Two distinct protein bands were obtained (Figure 1). Samples numbers 1 and 2 were cell lysates of oral trichomonas from root canal contents, and 3 and 4 from dentobacterial plaque.

Silver stain. Behind the two mentioned protein bands we were able to obtain less intensive protein bands in the upper margin of polyacrylamide gel (Figure 2). Samples 1 - 4 are samples of cell lysates of oral trichomonas from root canal contents, and 5 - 8 from dentobacterial plaque.

Electrophoretic method involving gelatin - containing polyacrylamide gels for proteolytic activity determination

Gels were incubated in four buffers and proteolytic activity were obtained. Proteolytic activity was pH dependent and less intensive in lysates of den-