

# Entamoeba histolitika'nın invazifliği

Dr. Vedat GÖRAL

Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bilim Dalı Başkanı, Diyarbakır



Dr. Vedat GÖRAL

**1** 875 yılında Lösch, Rusyanın St.Petersburg kentindeki kendi kliniğine başvuran genç bir çiftçide, kronik, kanlı-mukuslu diare nedeniyle yaptığı tetkik sonucu, hastanın feçesinde çok sayıda amoeba buldu ve bunun hastalıktan sorumlu olabileceğini düşündü. Bu hastalığa Amoeba coli adını verdi ve köpeklerde kolonik ülserasyon ve dizanteri oluşturduğunu gösterdi (1). Amabiasisten öldüğü bildirilen ilk hasta budur. Daha sonraları birçok araştırmacı tarafından yapılan çalışmalarda, bu organizmanın; motil olduğu, trofozoit ve kist formlarına sahip, dört nükleusu bulunan, basit bir yaşam siklusu olan ve kolon dışında, KC ve diğer organlarda da yerleşip hastalık yapabilen bir organizma olduğu bulunmuş ve buna Entamoeba histolitika adı verilmiştir. Fekal-oral yolla bulaşan parazit, kalın barsak duvarını delebilmekte, bu benzersiz invazivitesi nedeniyle de, KC ve diğer organlarda hastalık yapabilmektedir. Her yıl yaklaşık 500 milyon

insan E. histolitika ile enfekte olabilmektedir. Bunlardan en fazla % 10'u klinik olarak hastalıktan muzdarip olacaktır.Yani 50 milyon insanda invazif amebiasis gelişmektedir. Yaklaşık yılda 40-100 bin insanın ölümüne neden olmaktadır ve bunların çoğunluğunu geliştirmekte olan ülkeler oluşturmaktadır. Geri kalan 450 milyon kişi ise asemptomatik kist taşıyıcısı (seronegatif) olarak değerlendirilmektedir (2). Ancak, son yıllarda özellikle E. histolitika'ya bağlı karaciğer abselerinde azalmanın olduğu görülmektedir. Bunda, çevre şartlarının düzeltilmesi, uygun tedavilerin yapılması ve belki de amipin yapısındaki bazı değişiklikler rol oynayabilir.

Uzun yıllardır infeksiyonun gidişatının konakçıdaki farklılığa mı, yoksa parazitteki farklılığa mı bağlı olduğu konusu açık olmaktan uzaktı. Fakat, Martinez-Palomo ve arkadaşlarının önderliğindeki çalışmalardan bu yana şu husus daha da netleşmiştir ki invazif hastalığa yol açan organizmalarla, asemptomatik kist taşıyıcılığı şeklinde kendini gösteren organizmalar arasında temel biyokimyasal, immunolojik ve genetik farklılıklar vardır (3). Amipin, invazif ve noninvazif formlarının farklı türler olduğu gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, klinik olarak hastalığa yol açana E. histolitika, açmayanlara ve asemptomatik kist taşıyıcılığı yapanlara E.dispar adı verildi (4). En önemli özellik ise bu 2 formun morfolojik olarak birbirinden ayıramamasıdır. Ancak PCR aracılığı ile ayırım yapılabilmektedir.

**Patojenite ve virulans;** Patojen, hastalığa sebep olan ajan olup, virulans ise hastalığa

## **E.** histolitika trofozoitlerinin eritrositlere bağlanmasını sağlayan en önemli molekül, GİL'dir.

sebeplere bir patojenin nisbi bir kapasitesidir ve oluşan hastalığın şiddetine bağlı olarak düşükten yükseğe kadar farklılık gösterebilir. Virulans konaktan konağa farklılıklar gösterebilir. Semptomatik E. histolitika taşıyıcılarında, bariz hastalık tablosu gösteren forma geçiş olabileceği gibi, spontan olarak vücuttan elemine edilebilirler. E. histolitika'ya bağlı hastalıkta seropozitiflik saptanırken, E. dispar taşıyıcılığında serokonversiyon olmaz.

E. histolitika'nın intestinden KC'ye ulaşması 6 aşamadan geçer. Adherens, sitotoksiste (hedef hücre ölümü), bazal membranın dissolüsyonu, hücre fragmanları ve eritrositlerin sindirimi (fagozitozu), sirkülasyona geçiş ve KC'de enfeksiyon odağının teşekkülüdür (3).

**Adezyon;** E.histolitika trofozoitlerinin, eritrositlere adezyonunu (yapışmasını) sağlayan birkaç molekül vardır. Bu ana kadar ilk çalışılan, GİL (galactose/N-acetyl galaktozaminin inhibe eden lektin)dir (5). Bu adheransın, invazyon için basit bir prekürsör mü, yoksa parazitin barsak içeriği ile birlikte sürüklenmesine engel olmak için mi gerekli olduğu bilinmiyor. Fakat E. dispar'da da GİL geninin bir homologunun mevcudiyeti ikinci şıkkın doğruluğunu göstermektedir. GİL, ağır (170 kDa) ve hafif (35 kDa) subünitlerinden oluşmuş heterodinamik bir moleküldür. En az 5 ağır ve muhtemelen 6 hafif zincir genleri bilinmektedir. Fakat şu ana kadar bilinen tüm biyolojik fraksiyonların, ağır subünitte lokalize oldukları görülmektedir. Bu fonksiyonlar olağanüstü çeşitlilik göstermektedir. Bu fonksiyonlar; adherans, temasa bağlı toksiste ve kompleman lizisine rezistans şeklindedir. Bu durumda GİL, anahtar bir virulans faktörü haline gelmektedir. Tanımlanan karbonhidrat, yüzey epitel hücrelerinin yanı sıra, kolonik musinde de bulunur ve musin invitro ortamda E.histolitika'nın target hücrelerine bağlanmasını çok efektif bir şekilde önler. Bir Gerbil (bir tür hayvan) modelinde, mukus azalması epitelyal erozyonu artırmıştır ve ısıya dayanıklı bir salgı E. histolitikanın axenik kültürlerinde tespit

edilmiştir (6). Akla yakın olan şudur; en son ifade edilen aktivite trofozoitlerin mukozaya yapışmasını kolaylaştırarak invazyon işlemine görev alır. Tam olarak karakterize edilemeyen molekülün E.dispar tarafından üretildiği karanlıktır. Görünüşe göre, hedef hücrelere lektin sayesinde adheransı güçleştiren iki anti-GİL monoklonal antikoru, E.dispar'da bulunan epitoplara tanıyınca, E.disparın GİL homologu epitele adheransı sağlayabilir. E.dispardan lektin ve sekretogog maddenin klonlanması, patogenezin erken safhalarına ışık tutacaktır.

Adheransı sağlayan başka moleküller de tanımlanmıştır (7, 8, 9, 10). Bunlar, GİL kadar önemli olan ancak üzerlerinde daha az çalışılmış moleküllerdir. Yüzey glikokonjugata karşı gelişen monoklonal antikor, bağlanma ve sitotoksiteyi önlemiştir. 112 kDa'lık bir adezin de proteinaz aktivitesine sahiptir. E.dispar'da, buna karşılık gelen fonksiyonel fraksiyon bulunmaz. Son olarak 220 kDa'lık bir lektin de bulunmuştur. Bunun bağlanması N-asetil glukozamin polimerleri tarafından inhibe edilir. Bu son iki molekül ve GİL, E. histolitika'nın eritrositlere bağlanmasını ve eritrofagozitozu sağlar. Invitro şartlarda, hem E.dispar, hem de non patojenik E.coli, eritrositleri fagosite ederken, invivo şartlarda sadece E. histolitika'nın yol açtığı invazif hastalıkta feçeste hematofagoz trofozoitler vardır. Bu türün, mukozayı penetre edebilme kabiliyetinden elde ettiği avantajlar hala belirsizdir. Fakat kırmızı hücrelerin fagozitozu ile, E. histolitika için mutlaka gereksinim olan demirin (Fe++) sağlanıyor olması mümkündür.

**Sitotoksiste (hedef hücre ölümü);** E.histolitikanın çok çalışılan özelliklerinden bir tanesi (ki bu ona adını verir) doku tahribini yapabilme özelliğidir. Bu olayda yine GİL önemli rol oynamaktadır (11). Saf lektin affinitesi, intrasellüler Ca++ konsantrasyonunda artışa sebep olmasına rağmen tek başına target hücrelerini öldüremez. Target hücrelerinde bu iyonun irreversible intrasellüler artışı (yaklaşık 20 kat), canlı trofozoitle temastan saniyeler sonra durur.



Öldürücü mekanizmalardan en çok çalışılanı, genelde amoebaporlar olarak bilinen por yapıcı peptidler (pore forming peptides) familyasıdır

Ancak hücre ölümü 5-15 dak. sonra başlar. Target hücrelerinin EDTA veya verapamil ile muamelesinde, bu etki önlenir. Galaktozla da bu etki önlenmektedir. Bu arada oluşan lektin-target hücre teması da IL-8 (sitokin) üretiminde bir artışa neden olur. Muhtemelen bu olay intrasellüler  $Ca^{++}$  konsantrasyonu ile ilişkilidir. Bu olaylardan, GİL'in direkt olmasından ziyade sinyal rolünü üstlendiği anlaşılmaktadır. Sitotoksik işlemde, parazitin protein kinaz C'sinin de rolü vardır. Galaktoz ve N-asetilgalaktozamin ile sonlanan (termini) glikanları taşıyan glikosfingolipidlerin bir çeşidini içeren lipozom adheransı (muhtemelen GİL'e bağlanmayla ilişkili), E.histolitika aktininin hızlı polimerizasyonunu stimüle eder. Temas sonucu oluşan mesaj, amipin spesifik öldürme mekanizmasının aktive olmasına sebep olduğu sanılmaktadır. E.histolitika apoptozisi indükler ve adheransı takiben GİL, target hücrelere transfer edilir ve toksik etki başlar. Öldürücü mekanizmalardan en çok çalışılanı, genelde amoebaporlar olarak bilinen por yapıcı peptidler (pore forming peptides) familyasıdır (12, 13). Bu peptidler, 30, 13-15, 8 kDa'luk moleküler ağırlığa sahiptirler. Amoebaporlar sitoplazmik granüllerde depo edilirler. Bu granüller hedef hücre ile temas sonrası serbestleşip, öldürücü düzeyde yüksek bir konsantrasyon oluşturmaktadırlar. Amoebaporlar, NK ve T hücrelerince oluşturulan sitotoksitelye katkıda bulunduğu var sayılan NK lizin'e yapısal olarak benzerlerdir. Yüksek konsantrasyonlarda (özellikle minör C izoformdaki), tümör hücre dizilerini bile öldürmektedir. Diğer sitotoksik efektörlerden biri de, fosfolipaz A'dır ve tüm amoeba lizatlarındaki hemolitik aktivite olarak kabul edilmektedir (14). Bu enzim  $Ca^{++}$ 'a bağımlı ve membrana bağlıdır. Ayrıca,  $Ca^{++}$ 'a bağımlı olmayan ikinci bir fosfolipaz A enziminin solubl olmayan fraksiyonu da tespit edilmiştir. Sitotoksitelye, Rosenthal'in inhibitör ve fosfatidilkolin (fosfolipaz A2 inhibitörü) ile bloke edilebilir. Bu enzim etkisi ile lisofosfolipidler ile serbest yağ asitleri açığa çıkmakta ve bu ise hedef hücre membranının hara-

biyetine neden olur.

**Proteolitik aktivite:** Uzun bir süre, extrasellüler matrix komponentlerinin bazal membran proteinlerinin ve konnektif dokunun enzimatik degradesyonunun, E.histolitika tarafından oluşturulan doku invazyonunda anahtar rolü oynadığı düşünülmüştür. İn vitro çalışmalarla rapor edilen bu aktiviteler kollajenaz ve sistein proteinleri ile ilişkilidir ve ekspresyon seviyeleri büyük oranda virulansla korele bulunmuştur. 1982 yılında Münöz ve ark.ları, insan kollajen yapılarının E. histolitika trofozoitleri tarafından yıkıldığını ve Tip 3'e göre Tip 1 kollajene daha fazla spesifite gösterdiğini saptadılar (15). İkinci kollajenolitik aktivite de mevcuttur. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, kollajenazın dens granüllere lokalize olduğu ve kollajenazın subsitratı ile teması halinde aktif bir şekilde salgılandığı gösterilmiştir. Böylece dikkatler, tekrar invazyonda, kontakt ile yürütülen sinyal transdüksiyonun üzerine fokuslanmıştır.

Axenik E. histolitika'nın bütün hücre katlarında bulunan tüm proteolitik aktivitelerin önemli bir kısmını oluşturan sistein proteinazlar yoğun şekilde araştırılmıştır. Bir asid proteinazın parsiyel pürifikasyonu rapor edilmiştir, fakat subsellüler lokalizasyonundaki substrat spesifikliğı veya doku tahribindeki rolü tam bilinmemektedir. Daha iyi tanınan katepsin-B benzeri nötral sistein proteinazın, trofozoitlere aktif bir şekilde sekrete edildiğı söylenmektedir. Sistein proteinaz'ın ekspresyon ve sekresyon seviyeleri, geniş bir kesim tarafından anahtar virulans determinantı olarak kabul edilmektedir. 3 tane sistein proteinaz geni detaylı olarak tanımlanmıştır. Son zamanlarda bunların sayısı artmaktadır. Özellikle son bulunan ACP1 ve CP3'ün, sadece E.histolitika'da bulunduğu iddia edilmektedir (16).

**İnvazyonun son aşamaları;** Amoeboid hareket (barsak lümeninden dolaşımına geçiş) tamamen vital bir olaydır. Fagositoz (eritrosit ve epitel hücrelerin öldürülmesi) fonksiyonel

**S**onuç olarak, E.histolitika'nın invazifliğinin nasıl olduğu tam olarak bilinmemektedir. Bu olayda GIL, Lektin, IL-8, fosfolipaz A ve diğer bazı moleküller büyük rol oynamaktadır. Yakın gelecekte yapılacak yeni çalışmalar bu olaya ışık tutabilecektir.

sitoskeleton sistemin bir göstergesi olmasının yanı sıra bizzat kendisine ait virulansın determinantı olarak kabul edilmektedir. Eritrofagositoz, patojeniteyle paralellik göstermektedir ve fagositozdan fakir mutantların hayvan modellerinde avirulan oldukları görülmektedir. Bununla birlikte bu durum, yakın zamanda alınan sonuçlarca doğrulanmamıştır. E. histolitikanın aktin, miyosin II ve profilin genlerinin sekansları kodlanmıştır. Trofozoitlerin herhangi bir yere tutunmaksızın portal sirkülasyon yoluyla barsaktan KC'e ulaşmaları, portal yol boyunca öldürülmediklerini ortaya çıkarmaktadır. Ancak, E. histolitika trofozoitlerinin KC'e ulaştıklarında olan olaylar hakkında hemen hemen hiçbirşey bilinmemektedir. Çünkü, barsaktan böyle bir organa spesi-

fik yayılımı gösteren hayvan modeli yoktur. Ayrıca, invitro olarak oksijeni metabolize eden amoebanın invivo olarak da oksijeni kullanıp kullanmadığı, hastalığın erkeklerde kadınlara nazaran neden sık görüldüğü, hepatik apsenin kaçta kaçının spontan olarak iyileştiği bilinmemektedir. KC tutulumunun oluşmasında, E. histolitika'nın, spesifik, hepatotropik suşlarının rol oynadığı sanılmaktadır (17). Belki de, KC tutulumunun olmasında bazı genetik predispozisyonlar rol oynamaktadır.

Sonuç olarak, E. histolitika'nın invazifliğinin nasıl olduğu tam olarak bilinmemektedir. Bu olayda GIL, Lektin, IL-8, fosfolipaz A ve diğer bazı moleküller büyük rol oynamaktadır. Yakın gelecekte yapılacak yeni çalışmalar bu olaya ışık tutabilecektir.

#### KAYNAKLAR

1. Kean BH. A history of amebiasis. In: RavdinJI, ed. Amebiasis: Human infection by Entamoeba histolytica. New York: John Wiley, 1988: 1-10.
2. Walsh JA. Problems in recognition and diagnosis of amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev Infect Dis. 1986, 8: 228-38.
3. Clark CG, Diamond LS. Pathogenicity, virulence and Entamoeba histolytica. Parasitol Today. 1994, 10, 46-7.
4. Ackers JP. The invasiveness of Entamoeba histolytica-a continuing enigma. J Clin Pathol: Mol Pathol. 1996. 49, M192-M198.
5. Ramakrishnan G, Ragland BD, Purdy JE, Mann BJ. Physical mapping and expression of gene families encoding the N-acetyl D-galactosamine adherence lectin of Entamoeba histolytica. Mol Microbiol. 1996, 19, 91-100.
6. Chadee K, Meerovitch E. Entamoeba histolytica; early progressive pathology in the cecum of the gerbil (Meriones unguiculatus). Am J Trop Med Hyg. 1985, 34, 283-91.
7. Stanley SL Jr, Huizenga H, Li E. Isolation and partial characterisation of a surface glycoconjugate of Entamoeba histolytica. Mol Biochem Parasitol. 1992, 50, 127-38.
8. Arroyo R, Orozco E. Localisation and identification of an Entamoeba histolytica adhesin. Mol Biochem Parasitol. 1987, 23.151-8.
9. Rigotherier MC, Garcia-Rivera G, Guadderama M, Orozco E. Purification and functional characterisation of the 112 kDa adhesin of Entamoeba histolytica. Arch Med Res. 1992, 23; 239-41.
10. Meza I, Cazares F, Rossales-Encina JL, Talamas-Rohana P, Rojkind M. Use of antibodies to characterize a 220 kDa surface protein from Entamoeba histolytica. J Infect Dis. 1987, 156, 798-805.
11. Ravdin JI, Croft BY, Guerrant RL. Cytopathogenic mechanism of Entamoeba histolytica. J Esp Med. 1980, 152; 377-90.
12. Young JD, Cohn ZA. Molecular mechanisms of cytotoxicity mediated by Entamoeba histolytica: characterisation of a pore-forming protein (PFP). J Cell Biochem. 1985. 29, 299-308.
13. Lynch EC, Rosenberg I, Gitler C. An ion channel forming protein produced by Entamoeba histolytica. EMBO J. 1982, 1, 801-4.
14. Said-Fernandez S, Lopez Revilla R. Subcellular distribution and stability of the major hemolytic activity of Entamoeba histolytica trophozoites. Z Parasitenkd. 1982, 67; 249-54.
15. Serrano JJ, de la Garza M, Moreno MA, Tovar R, Leon G, Tsutsumi V. et al. Entamoeba histolytica: electron dense granule secretion, collagenase activity and virulence are altered in the cytoskeleton mutany BG-3. Mol Microbiol 1994, 11, 787-92.
16. Reed S, Bouvier J, Pollack AS, Engel JC, Brown M, Hirata K. Cloning of a virulence factor of Entamoeba histolytica. Pathogenetic strains possess a unique cysteine proteinase gene. J Clin Invest. 1993, 91, 1532-40.
17. Charmot G. Do hepatotrophic strains of Entamoeba histolytica exist? Bull Soc Pathol Exot Filiales. 1980, 73, 405-410.

*Küçük beyinler insanları, orta beyinler olayları,  
büyük beyinler fikirleri tartışırken;  
akıllılar; sesiz sedasız "yaparlar".*