

BADANIA NAD PATOGENEZĄ ZMIAN W ZAKRESIE WZROSTU
SOMATYCZNEGO *LYMNAEA STAGNALIS*
(GASTROPODA: PULMONATA) DOŚWIADCZALNIE ZARAŻONYCH
PARTENITAMI PRZYWRY *OPISTHIOGLYPHE RANAE*
(DIGENEA: PLAGIORCHIIDA). II. KARIOMETRIA I METABOLIZM
TLENOWY KOMÓREK NEUROSEKRECYJNYCH*

ZBIGNIEW POKORA

Katedra Biologii i Parazytologii Śl. AM
40-752 Katowice, ul. Medyków 18

INVESTIGATIONS ON PATHOGENESIS OF CHANGES IN SOMATIC GROWTH
OF *LYMNAEA STAGNALIS* (GASTROPODA: PULMONATA) EXPERIMENTALLY
INFECTED WITH PARTHENITES OF THE TREMATODE *OPISTHIOGLYPHE RANAE*
(DIGENEA: PLAGIORCHIIDA). II. KARYOMETRY AND AEROBIC METABOLISM
OF THE NEUROSECRETORY CELLS

Abstract. Enlargement of nuclear volume of the neurosecretory cells producing growth hormone (light green cells of cerebral ganglia) was observed in experimentally infected snails. In addition to noted earlier increase in the amounts of: neurosecretory material, RNA and the loose fraction of nuclear chromatin in the perikarya, it can be the next argument for the influence of the parasite on the activity of the hormonal system cells of its intermediate host. Found in infected individuals, the increase in the succinate dehydrogenase activity in these perikarya, in the absence of changes in their morphology (which are an indications of the release of the adaptative type of cellular response), indicates that examined cells supply their energetic need in the way of aerobic metabolism reactions. This increase in their activity is in the range of physiological standard.

WSTĘP

U młodocianych osobników *Lymnaea stagnalis* doświadczalnie zarażonych partenitami przywry *Opisthioglyphe ranae* obserwowano, oprócz zmniejszenia względnej masy mokrej dużych gruczołów gonoduktu, zwiększenie ilości neurosekretu w położonych w zwojach mózgowych komórkach neurosekrecyjnych (nazwanych ze względu na powinowactwo do barwników ftalocyjaninowych jasnozielonymi, *light green cells* = LGC), a także ilości RNA w cytoplazmie oraz udziału chromatyny luźnej w jądrach tych perykarionów (POKORA

* Referowano na VII Konferencji Naukowo-Szkoleniowej Sekcji Parazytologii Ogólnej PTP; Karpacz, 15–18 czerwca 1994.

1995). Pozwala to sądzić, że nasilenie wzrostu somatycznego tych ślimaków (POKORA 1994) ma złożoną patogenezę, obejmującą ograniczający wpływ pasożyta na czynność (rozwój) układu rozrodczego (hipoteza naruszenia budżetu energetycznego żywiciela) oraz nasilenie aktywności LGC.

Partenity przywr mogą potencjalnie określać metabolizm tych komórek zmieniając chemiczny skład hemolimfy. W takim przypadku zmiana aktywności LGC może być spowodowana ich ostrym lub postępującym uszkodzeniem (w następstwie hipoksji, niedoboru związków odżywczych, wysokiego stężenia katabolitów w hemolimfie, w tym także związków produkowanych przez pasożyta). Zmiany w zakresie morfologii tych komórek (autofagia, w skrajnych przypadkach prowadząca do apoptozy) mogą być również następstwem ich przeciążenia czynnościowego (tab.). Podjęto próbę udokumentowania tych

TABELA

Formy odpowiedzi komórkowej *L. stagnalis* na bodziec patogeny (zestawiono na podstawie GRONIEWSKIEGO 1984)

TABLE

Manners of the cellular response *L. stagnalis* to a pathological stimulus (compiled according to GRONIEWSKI 1984)

	Adaptacja Adaptation	Uszkodzenie komórki Injure of a cell	
		postępujące chronic	ostre acute
Obraz w mikroskopie światłym Picture in the light microscope	obrzemie komórki cellular swelling <i>offuscatio parenchymatosa</i> <i>degeneratio vacuolaris</i> (= <i>degeneratio hydropica</i>)	stłuszczenie komórki ¹ , retencja produktu autofagia ² fatty degeneration ¹ , retention of a product autophagy ²	wakuole hipoksyjne hypoxic vacuoles
Patogeneza zmian Pathogenesis of changes	adaptacja do wzrastającego zapotrze- bowania energetycznego komórki adaptation to increasing energetic request of a cell	przeciążenie robocze poszczególnych układów czynnościowych komórki working overload of particular functional structures of a cell	lokalne zmiany błony komórkowej local changes in the cellular membrane

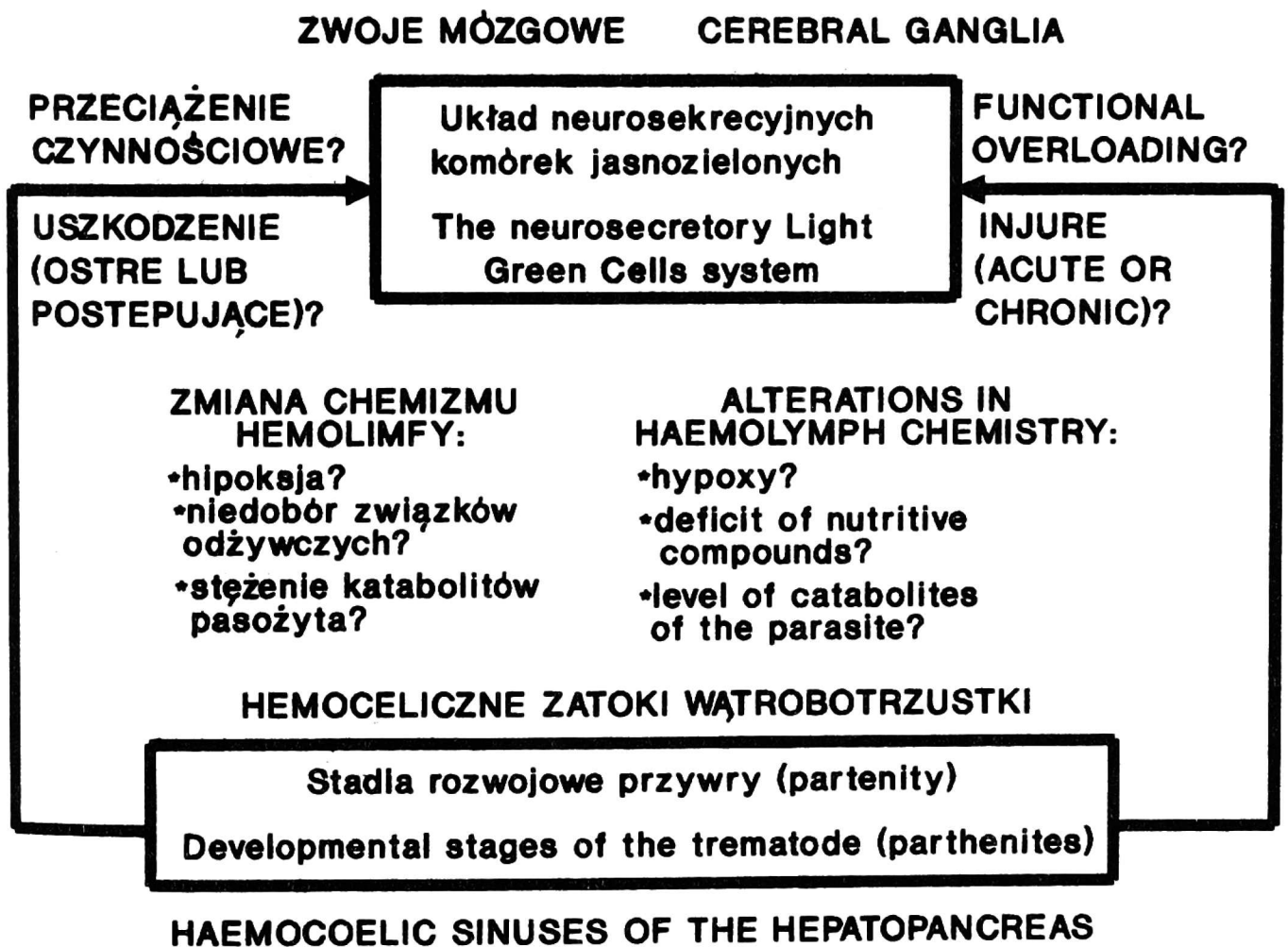
¹ W mikroskopie świetlnym widoczne są zmiany silnie zaznaczone

In the light microscope strongly advanced changes are seen

² Zużycie tego układu strukturalnego, który podlegał największemu obciążeniu

Consuming of this functional structure which underwent the greatest overload

hipotez (ryc. 1). Jako wyznacznik intensywności przemian tlenowych w LGC zarażonych ślimaków przyjęto odczyn dla dehydrogenazy bursztynianowej. W celu określenia ewentualnych zaburzeń w zakresie struktury tych komórek poddano analizie mikroskopowej ich obrazy mikroskopowe.



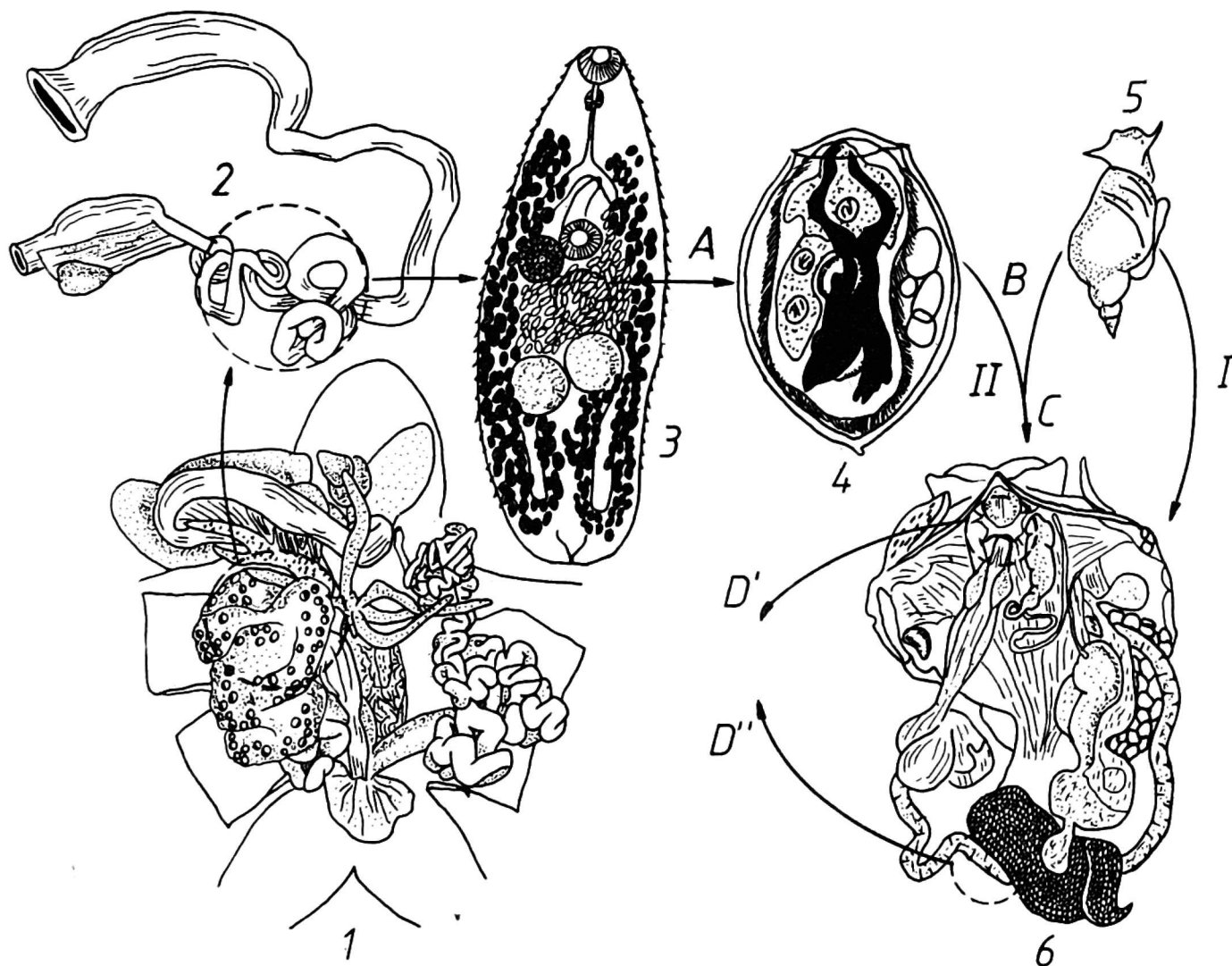
Ryc. 1. Schemat potencjalnego wpływu partenit *Opisthioglyphe ranae* na aktywność komórek układu neurohormonalnego zarażonego ślimaka

Fig. 1. Diagram of potential effect of the *Opisthioglyphe ranae* parthenites on the activity of the neurohormonal system cells of infected snail

Wielu autorów (za PIETRZAKIEM i KOZIKIEM 1983) zakładając, że zawartość neurosekretu w cytoplazmie perykarionów i wypustek aksonalnych komórek układu podwzgórzowo-przysadkowego kręgowców nie określa w sposób jednoznaczny stanu czynnościowego tego układu, podkreślało dodatkowe znaczenie dla jego oceny takich parametrów jak: zmiany wielkości jądra komórkowego i całej komórki, liczby, wielkości i lokalizacji jąder i substancji przyjąderkowych. Dla szerszego udokumentowania hipotezy wiążącej nasilenie wzrostu somatycznego zarażonych ślimaków z wpływem partenit na czynność neurosekrecyjną ośrodków kontrolujących ogół procesów wzrostowych poddano analizie morfologicznej jasnozielone komórki neurosekrecyjne tych zwierząt.

Material i metody

Obiektem badań było 20 młodocianych, pochodzących z hodowli osobników *Lymnaea stagnalis*, z których połowa została zarazona larwami *Opist-*



Ryc. 2. Schemat postępowania: 1 – sekcja naturalnie zarazonych *Rana esculenta*, 2 – izolacja jelita cienkiego, 3 – wypreparowane dojrzałe płciowo osobniki *Opisthioglyphe ranae*, 4 – inwazyjne jaja *O. ranae*, 5 – młodociane (ok. 30 dniowe) *Lymnaea stagnalis*, 6 – sekcja ślimaków w 70 dniu po zarazeniu; A – inkubacja pozyskanych z macicy jaj pasożyta w wodzie wodociągowej, B – ekspozycja poszczególnych ślimaków na 20 inwazyjnych jaj pasożyta, C – hodowla ślimaków w wodzie wodociągowej: naturalny fotoperiod, temperatura pokojowa, karmienie sałatą *ad libitum*, D' – izolacja zwojów ośrodkowego układu nerwowego (mózgowych) przeznaczonych do badań histochemicznych, D'' – analiza skuteczności zarażenia; I – grupa doświadczalna (ślimaki zarazone), II – grupa kontrolna (ślimaki nie zarazone)

Fig. 2. Diagram of the procedure: 1 – dissection of naturally infected *Rana esculenta*, 2 – isolation of the small intestine, 3 – obtained adult individuals of *Opisthioglyphe ranae*, 4 – invasive eggs of *O. ranae*, 5 – juvenile (about 30 days old) individuals of *Lymnaea stagnalis*, 6 – dissection of the snails on 70th day after infection; A – incubation of parasite eggs obtained from the uterus in tap water of 26°C for 10 days, B – exposition of particular snails to 20 invasive parasite eggs, C – breeding of snails in tap water: natural photoperiod, room temperature, feeding with lettuce *ad libitum*, D' – isolation of the central nervous system ganglia (the cerebral ganglia) assigned for histochemical examinations, D'' – analysis of the infection efficiency; I – experimental group (infected snails), II – control group (uninfected snails)

hioglyphe ranae (grupa doświadczalna). Grupę kontrolną stanowiły pozostałe ślimaki, wolne od zarażenia. Sposób pozyskiwania inwazyjnych jaj pasożyta oraz zarażania i hodowli ślimaków opisano wcześniej (POKORA 1994) (ryc. 2).

Zwoje mózgowe połowy osobników każdej z grup (pobrane po 10 tygodniach od zarażenia) utrwalano przez 48 godzin w płynie BOUINA i po odwodnieniu zatapiano w parafinie. Skrawki mikrotomowe, grubości 7 μm , cięte przy zachowaniu seryjności w płaszczyznach czołowej i strzałkowej, nalepiano na białkowane szkiełka podstawowe i po uwodnieniu barwiono paraldehydową fuksyną wg CAMERONA i STEELE'a, z podbarwieniem tła mieszaniną HALMIEGO. W badanych komórkach neurosekrecyjnych mierzono za pomocą mikrometru okularowego najdłuższe średnice jąder komórkowych i perykarionów oraz maksymalną długość średnic do nich prostopadłych (wielka i mała oś elipsy). Do pomiarów wybierano ten przekrój komórki, w którym dłuższa oś jej jądra osiągnęła swój maksymalny wymiar. Ogółem u ślimaków obu grup zmierzono po 50 jąder i perykarionów LGC. Na podstawie otrzymanych parametrów obliczano powierzchnię przekroju perykarionu oraz objętość jądra komórkowego. W pierwszym przypadku wykorzystano wzór na pole elipsy (za PIETRZAKIEM i KOZIKIEM 1983), w drugim – wzór PALKOVITSA (za SREBRO i wsp. 1988). Istotność różnic między średnimi powierzchni przekroju perykarionów oraz średnimi objętości jąder LGC ślimaków obu grup analizowano za pomocą testu *t* STUDENTA.

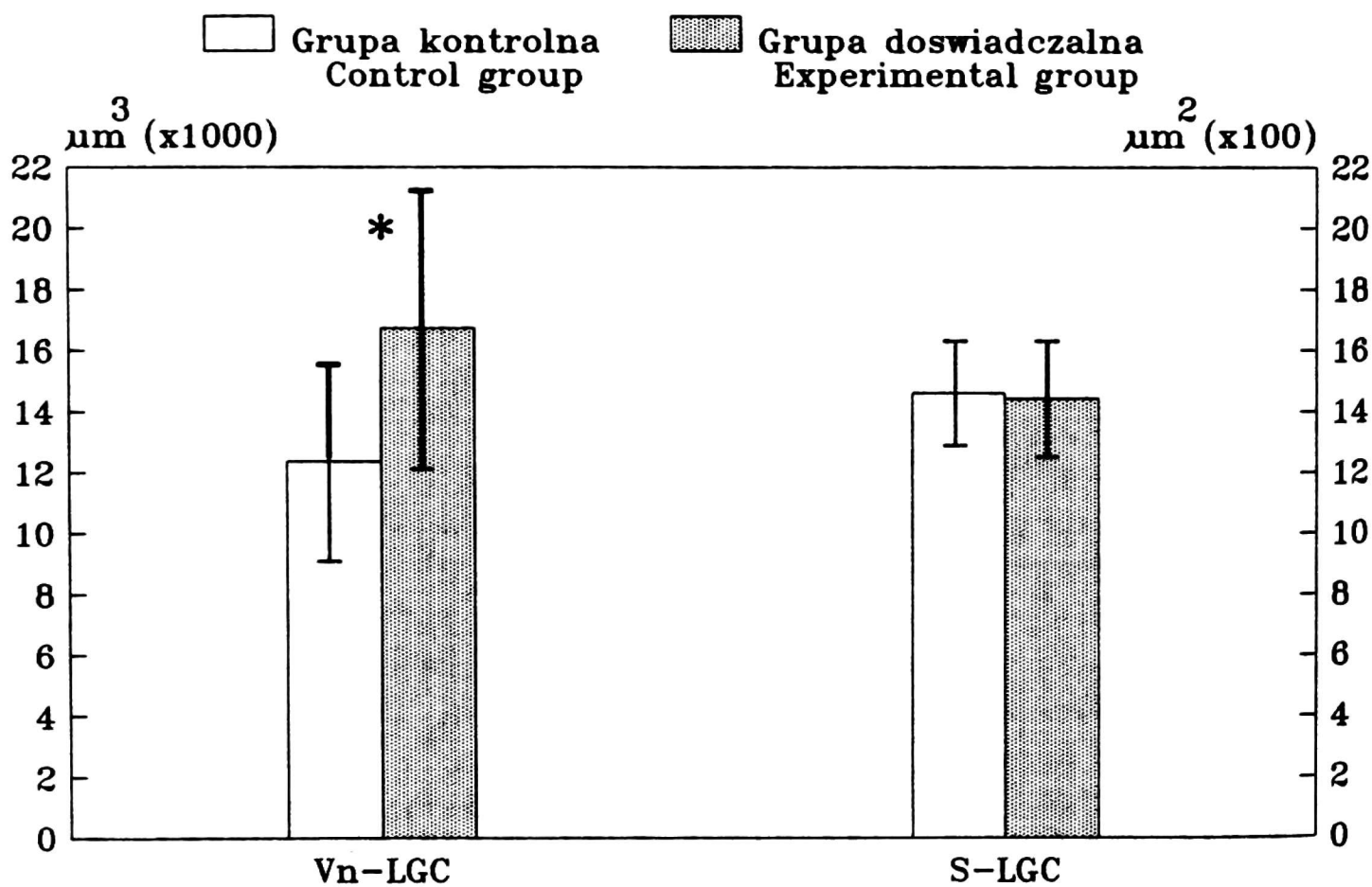
Dla oceny aktywności dehydrogenazy bursztynianowej (SDH; EC. 1.3.95.1) w badanych komórkach neurosekrecyjnych zwoje mózgowe pozostałych ślimaków obu grup zamrażano, bez wstępnego utrwalania, w temperaturze -20°C i krajano w kriostacie na skrawki grubości 10 μm . Reakcję barwną wykonywano w ciągu 6 minut przy użyciu Nitro-BT (Sigma Chemical Co.) z menadionem (naftochinonem) w środowisku inkubacyjnym (KAŁUŻA 1982).

Wyniki

W obrazach mikroskopowych komórek neurosekrecyjnych ślimaków z grupy doświadczalnej nie stwierdzono nasilenia wakuolizacji cytoplazmy, fałdowania nukleolemy, czy zmian w zakresie kształtu perykarionów i jąder komórkowych, w porównaniu z grupą kontrolną.

U ślimaków poddanych doświadczalnemu zarażeniu stwierdzono istotny wzrost objętości jąder jasnozielonych komórek zwojów mózgowych (35,25%) w stosunku do osobników grupy kontrolnej. Nie wykazano istotnej różnicy między średnimi arytmetycznymi pola powierzchni przekrojów LGC u ślimaków obu grup (ryc. 3).

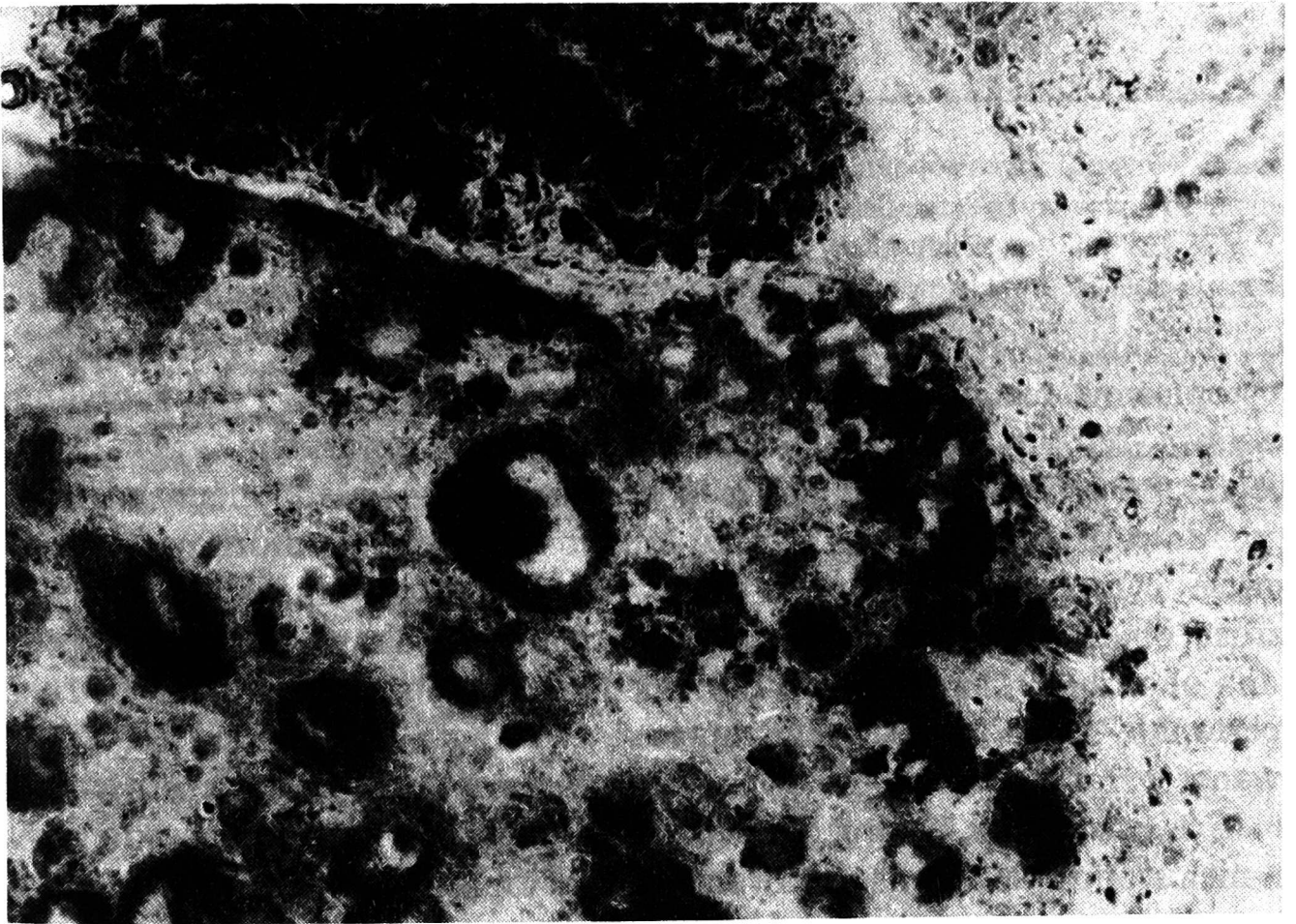
Pozytywną reakcję dla czynności dehydrogenazy bursztynianowej obserwowano w perykarionach LGC oraz w neuropilium zwoju mózgowego. Ziarnisty produkt reakcji rozmieszczony był w perykarionach badanych



Ryc. 3. Średnie arytmetyczne objętości jąder (Vn-LGC) oraz powierzchni perykarionów (S-LGC) jasnozielonych komórek zwojów mózgowych ślimaków grupy kontrolnej i zarażonych partenitami *Opisthioglyphe ranae* (gwiazdką oznaczono różnicę statystycznie znamiennej, $p < 0,05$)

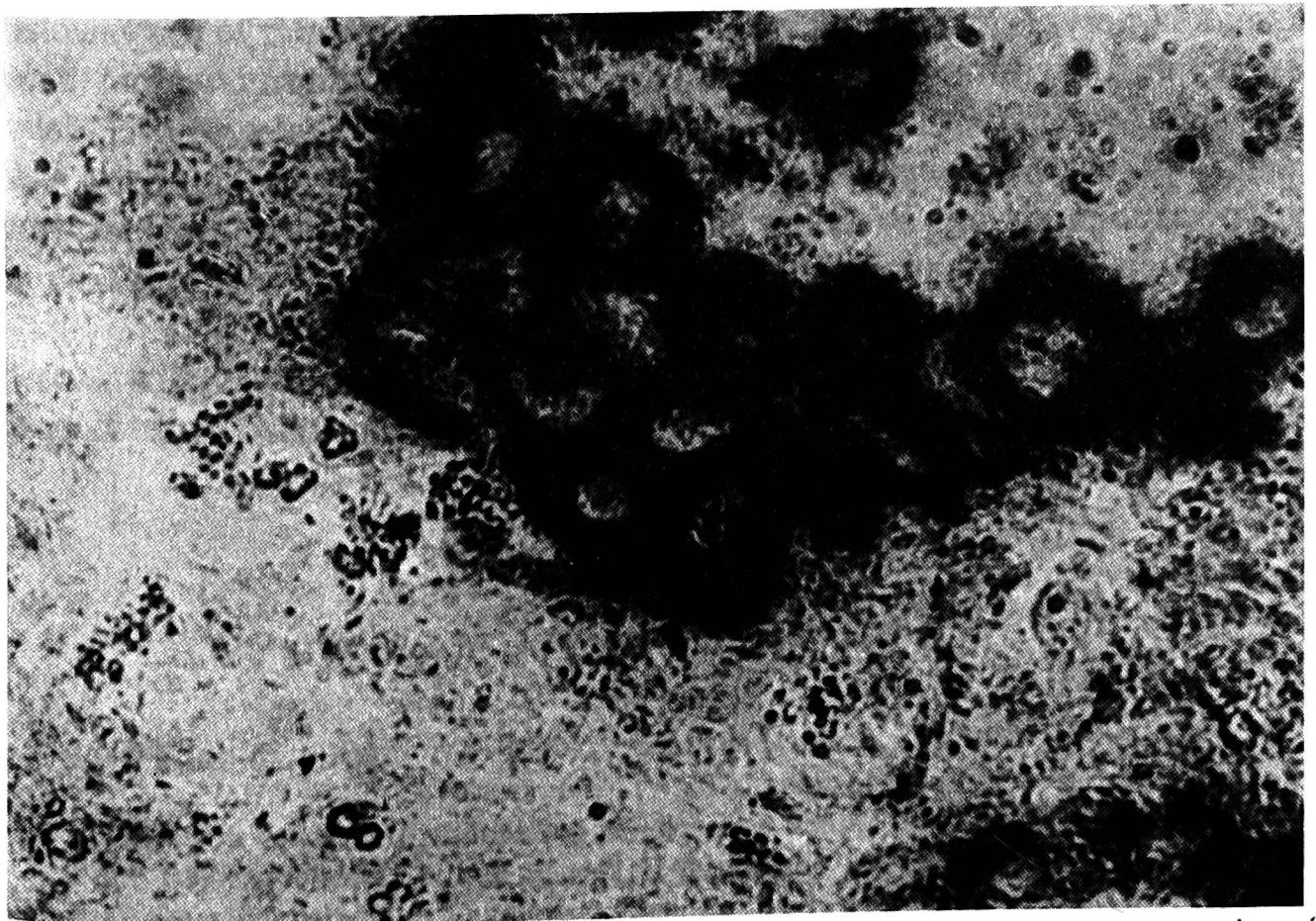
Fig. 3. Arithmetical means of nuclear volumes (Vn-LGC) and areas of perikarya (S-LGC) of the light green cells of cerebral ganglia of snails from control group and infected with parthenites of *Opisthioglyphe ranae* (statistical significant difference is marked with an asterisk, $p < 0.05$)

komórek, regularnie dookoła niewybarwionych jąder. W perykarionach LGC ślimaków poddanych zarażeniu odnotowano silniejszy odczyn dla badanego enzymu w porównaniu ze ślimakami grupy kontrolnej (w pierwszym przypadku odczyn oceniono jako bardzo silny, w drugim – jako umiarkowanie silny) (ryc. 4, 5).



Ryc. 4. Perykariony komórek jasnozielonych grupy środkowo-grzbietowej lewego zwoju mózgowego ślimaka grupy kontrolnej. Odczyn dla czynności dehydrogenazy bursztynianowej (przekrój w płaszczyźnie czołowej, pow. ok. 320 ×)

Fig. 4. The light green cell perikarya of medio-dorsal group of the left cerebral ganglion of a snail from control group. Reaction for succinate dehydrogenase activity (cross-section in the frontal plane, magn. about 320 ×)



Ryc. 5. Perykariony komórek jasnozielonych grupy środkowo-grzbietowej lewego zwoju mózgowego ślimaka grupy doświadczalnej. Odczyn dla dehydrogenazy bursztynianowej (przekrój w płaszczyźnie czołowej, pow. ok. 320 ×)

Fig. 5. The light green cell perikarya of medio-dorsal group of the left cerebral ganglion of a snail from experimental group. Reaction for succinate dehydrogenase activity (cross-section in the frontal plane, magn. about 320 ×)

Dyskusja

Zmiany w zakresie objętości jąder komórkowych, badane w warunkach fizjologicznych, mogą być uważane za wyznacznik przebiegających w cytoplazmie reakcji syntezy związków o budowie oligo- i polipeptydowej. Podstawą tej koncepcji stały się badania nad komórkami gruczołowymi zwierząt kręgowych, w tym także nad komórkami układu neurohormonalnego, dowodzące korelacji między objętością jądra komórkowego a poziomem cytoplazmatycznego i jądrowego RNA (za HILDEBRANTEM 1980). Wzrost objętości jądra w tego typu komórkach (kariokineza pozytywna, zwana obocznie przerostem lub obrzmieniem czynnościowym; niem. „Arbeitshypertrophie”, ang. „functional nuclear swelling”) być może jest spowodowany wzrostem ciśnienia osmotycznego kariolimfy w następstwie wzrostu w niej stężenia, biorących udział w regulacji czynności genów, białek niehistonowych transportowanych z cytoplazmy, gdzie są one produkowane.

Hipoteza tłumacząca zmiany w zakresie objętości jąder LGC ślimaków poddanych zarażeniu, jako następstwo bezpośredniej odpowiedzi komórkowej na bodziec patogeny, nie znajduje potwierdzenia w wynikach analizy morfologicznej. Aktywność syntetyczna LGC zarażonych ślimaków mieściła się w granicach normy fizjologicznej. Nie stwierdzono bowiem wakuolizacji, czy obrzmienia perykarionów tych komórek, co mogłoby świadczyć o wyzwoleniu adaptacyjnego typu odpowiedzi komórkowej na nadmierny wzrost zapotrzebowania energetycznego (GRONIEWSKI 1984). Wzrost aktywności dehydrogenazy bursztynianowej w perykarionach LGC zarażonych ślimaków wskazuje, że zaspokajały one swoje zwiększone, w związku z odnotowaną wcześniej intensyfikacją przemian metabolicznych, zapotrzebowanie energetyczne poprzez reakcje metabolizmu tlenowego.

Uzyskane wyniki stanowią zatem podstawę do wnioskowania o niepatogennym wpływie partenit *Opisthioglyphe ranae* na analizowane komórki neurosekrecyjne zarażonych ślimaków.

LITERATURA

- GRONIEWSKI J. 1984. Ultrastrukturalne podstawy zjawiska chorobowego. In: J. Groniowski i S. Kruś [red.]. Podstawy patomorfologii. PZWL, Warszawa: 32-73.
- HILDEBRANT R. 1980. Nuclear volume and cellular metabolism (Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology, Vol. 60). Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- KALUŻA J. 1982. Oksydo-reduktazy. In: A. Krygier-Stojałowska i H. Godlewski [red.]. Topochemiczne metody badań komórek i tkanek. PWN, Warszawa: 763-799.
- PIETRZAK M., KOZIK M. B. 1983. Czynność neurosekrecyjna podwzgórza po zatruciu cynkotoksem. *Endokr. Pol.* 34: 275-287.

- POKORA Z. 1994. Badania nad dynamiką somatycznego wzrostu młodocianych ślimaków *Lymnaea stagnalis* (Pulmonata: Basommatophora) w warunkach doświadczalnego zarażenia partenitami przywry *Opisthioglyphe ranae* (Digenea: Plagiorchiida). *Wiad. Parazytol.* 40: 253-263.
- 1996. Badania nad patogenезą zmian w zakresie wzrostu somatycznego *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda: Pulmonata) doświadczalnie zarażonych partenitami przywry *Opisthioglyphe ranae* (Digenea: Plagiorchiida). I. Względna masa płciowych narządów dodatkowych i syntetyczna aktywność komórek neurosekrecyjnych. *Ibid.* 42: 71-80.
- SREBRO Z., LACH H., PLACKOWSKA M. 1988. A karyometric study of the supraoptic and paraventricular nuclei of the hypothalamus of kainic acid-treated mice. *Folia Biol.* 36: 53-58.

Otrzymano 9 IX 1994, zaakceptowano 1 III 1996