

LOKALIZACJA I AKTYWNOŚĆ NIEKTÓRYCH HYDROLAZ
W POSTACIACH LARWALNYCH TASIEMCÓW
NEOGRYPORHYNCHUS CHEILANCRISTROTUS ORAZ
TRIAENOPHORUS NODULOSUS PASOŻYTUJĄCYCH U RYB

WIKTOR NIEMCZUK¹ I PAWEŁ CHORBIŃSKI²

¹ Zakład Higieny Weterynaryjnej
50-966 Wrocław, ul. Rodakowskiego 6

² Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych AR
50-366 Wrocław, pl. Grunwaldzki 45

LOCALIZATION AND ACTIVITY OF SOME HYDROLASES IN THE LARVAE
OF TAPEWORMS *NEOGRYPORHYNCHUS CHEILANCRISTROTUS*
AND *TRIAENOPHORUS NODULOSUS* PARASITIZING IN FISH

Abstract. In the study, an attempt was undertaken to compare the most common species of tapeworms' larvae in fish: *N. cheilancristrotus* and *T. nodulosus* on the basis of histoenzymatic examination of 3 enzymes: alkaline phosphatase (AP), acid phosphatase (APh) and nonspecific esterase (EN-alpha). The high activity of AP and APh in the cuticle and subcuticular cells, and the lack of EN-alpha activity in these structures was stated. Besides, an intensive AP and EN-alpha activity took place in the *N. cheilancristrotus* scolex, compared to the appropriate *T. nodulosus* segment in which the reaction was slight.

WSTĘP

Tasiemce *Neogryporhynchus cheilancristrotus* (WEDL, 1855) i *Triaenophorus nodulosus* (PALLAS, 1781) posiadają w swoim cyklu rozwojowym dwóch żywicieli pośrednich. Pierwszym z nich są planktonowe skorupiaki widłonogie, drugim zaś ryby. W organizmie ryb plerocerk *N. cheilancristrotus* umiejscawia się w błonie śluzowej woreczka żółciowego i przedniego odcinka jelita, a plerocerkoid *T. nodulosus* w wątrobie (POJMAŃSKA 1991).

Obecność larw *N. cheilancristrotus* w błonie śluzowej jelita ryby, najczęściej karpia, prowadzi do jej przerostu i tworzenia się 1–2 mm guzków pasożyt niczych. Larwy *T. nodulosus* znajdują się natomiast w kilku, kilkunastomili metrowych cystach wątroby rybiej (bardzo często u okonia osiągają wielkość nawet kilku centymetrów) (PROST 1994). O intensywności przemiany materii tasiemców można wnioskować na podstawie lokalizacji i aktywności enzymów w ich tkankach (DAVYDOV i wsp. 1973, NIEMCZUK 1993, NIEMCZUK i wsp. 1996).

W tym celu zajęto się fosfatazami – kwaśną i zasadową oraz niespecyficz-

ną esterazą EN-alfa, określając ich lokalizację i poziom aktywności w larwach wspomnianych tasiemców.

Enzymom z grupy fosfataz oraz esterazom przypisuje się dużą rolę w regulacji procesów metabolicznych w żywym organizmie, co pozwala na prześledzenie zmian trudno uchwytnych za pomocą innych metod. Fosfataza zasadowa występuje głównie w błonach komórkowych, stąd przypisuje się temu enzymowi udział w aktywnym transporcie, regulowaniu procesów wchłaniania i przechodzenia metabolitów przez te błony. Fosfataza kwaśna i esterza niespecyficzna alfa są natomiast markerami lizosomów, dlatego też ich rozmieszczenie dostarcza w sposób pośredni informacji o stanie układu wewnątrzkomórkowego trawienia. Fagolizosomy biorą udział w metabolizmie, transporcie i wydalaniu.

Material i metody

Plerocerki *N. cheilancristrotus* pochodziły z jelit narybku karpia (*Cyprinus carpio* L.) odłowionego w stawie jednego z gospodarstw milickich, natomiast plerocerkoidy *T. nodulosus* z wątrób jednorocznych okoni (*Perca fluviatilis* L.) odłowionych w zbiorniku zaporowym w woj. wałbrzyskim.

Wycinki jelit oraz wątrób wraz z pasożytami, umieszczano w 5% formalinie lub zamrażano w ciekłym azocie. Z pierwszych wykonywano 5 μ m grubości skrawki parafinowe, które barwiono hematoksyliną i eozyną (HE) albo azanem Novum, z drugich uzyskiwano skrawki kriostatowe (253°K), w których wykrywano fosfatazę zasadową (FZ-EC.3.1.3.1.) metodą wg PEARSE'a (ZAWISTOWSKI 1986), fosfatazę kwaśną (FK-EC.3.1.3.2.) według PEARSE'a i GOMORIEGO (GOMORI 1953, ZAWISTOWSKI 1986) oraz esterazę niespecyficzną alfa (EN-EC.3.1.1.1.) według PEARSE'a. Obie fosfatazy FZ i FK inkubowano w temperaturze 293°K przez 30 minut, a esterazę EN-alfa tylko przez 15 min. Kontrolę ujemną stanowiły skrawki inkubowane bez użycia substratów.

Wyniki

Badania histopatologiczne

W plerocerkach *N. cheilancristrotus* obserwowano najczęściej wciągnięte do wnętrza ryjki zaopatrzone w haki oraz, w zależności od miejsca przekroju, jedną lub dwie przyssawki. Oskórek pasożytów wybarwiał się delikatnie eozyną, natomiast komórki podoskórkowe intensywnie hematoksyliną. W przekrojach części szyjnej występowały niewychytujące barwników liczne ciała wapienne, między którymi znajdowano pojedyncze włókna tkanki łącznej barwiące się azanem. Plerocerki tego tasiemca składają się jedynie ze skoleksa i części szyjnej, stąd brak w nich narządów rozrodczych.

W plerocerkoidach *T. nodulosus* obraz histologiczny uzależniony był od miejsca uzyskanego przekroju. Pomimo, iż w cyście wątrobowej bywało po kilka pasożytów, bardzo rzadko trafiały się skrawki zawierające charakterystyczne „kotwicowate” haki w całości; znacznie częściej uzyskiwano tylko ich przekroje (ryc. 5). Oskórek i komórki podoskórkowe wybarwiały się (podobnie jak w plerocerkach *N. cheilancristrotus*) na całej długości pasożyta. W miarę oddalania się miejsca przekroju od skoleksa obserwowano coraz liczniejsze żółtniki umieszczone nieprzerwanie pod komórkami podoskórkowymi, barwiące się intensywnie hematoksyliną. W parenchymie występowały nieliczne włókna łącznotkankowe. Najbardziej oddalone od skoleksa przekroje były bogatsze w pęcherzyki jądrowe mniej intensywnie zabarwione HE.

Badania histoenzymatyczne

Fosfataza zasadowa (FZ). W plerocerkach *N. cheilancristrotus* występuje bardzo silny odczyn dodatni w oskórku i komórkach podoskórkowych (ryc. 2.) oraz w okolicy haków i przyssawek (ryc. 1, tab.).

W plerocerkoidach *T. nodulosus* stwierdzono silny odczyn dodatni na FZ w oskórku i komórkach podoskórkowych. Nasilenie reakcji obniżało się natomiast w przekrojach pasożyta położonych za skoleksem. Odcinki najbardziej odległe wykazywały wyraźnie słabszy odczyn w porównaniu do występującego w przednich partiach larwy. Nie obserwowano wyraźnej reakcji enzymatycznej wewnątrz plerocerkoidów (ryc. 5).

Fosfataza kwaśna (FK). W plerocerku *N. cheilancristrotus* odczyn dodatni stwierdzono w skoleksie i komórkach podoskórkowych części szyjnej. W porównaniu z FZ charakteryzował się większą ziarnistością, szczególnie w komórkach podoskórkowych. W przyssawkach reakcji nie stwierdzono (tab.).

Plerocerkoid *T. nodulosus* w oskórku i komórkach podoskórkowych wykazywał silny odczyn, również w postaci ziarnistej (ryc. 4, tab.).

Esteraza niespecyficzna alfa (EN-alfa). Plerocerk *N. cheilancristrotus* wykazywał reakcję pozytywną w okolicach przyssawek skoleksa oraz słabszą (nikłą) w części szyjnej, w wewnętrznych rejonach parenchymy. Brak było reakcji w oskórku i komórkach podoskórkowych (tab.).

W plerocerkoidzie *T. nodulosus* wyraźna reakcja na EN-alfa miała miejsce jedynie w żółtnikach, natomiast bardzo nikła w skoleksie (tab.). Także i tu nie stwierdzono odczynu w oskórku i komórkach podoskórkowych (tab., ryc. 3).

Omówienie

Otrzymane wyniki badań stanowią poszerzenie wiadomości dotyczących lokalizacji i aktywności enzymów tasiemców o ich postaciach larwalnych. Badane larwy różnią się między sobą. *N. cheilancristrotus* składa się tylko ze skoleksa

TABELA
Odczyn histoenzymatyczne u badanych larw tasiemców
TABLE
Histoenzymatical reactions in the tapeworms' larvae

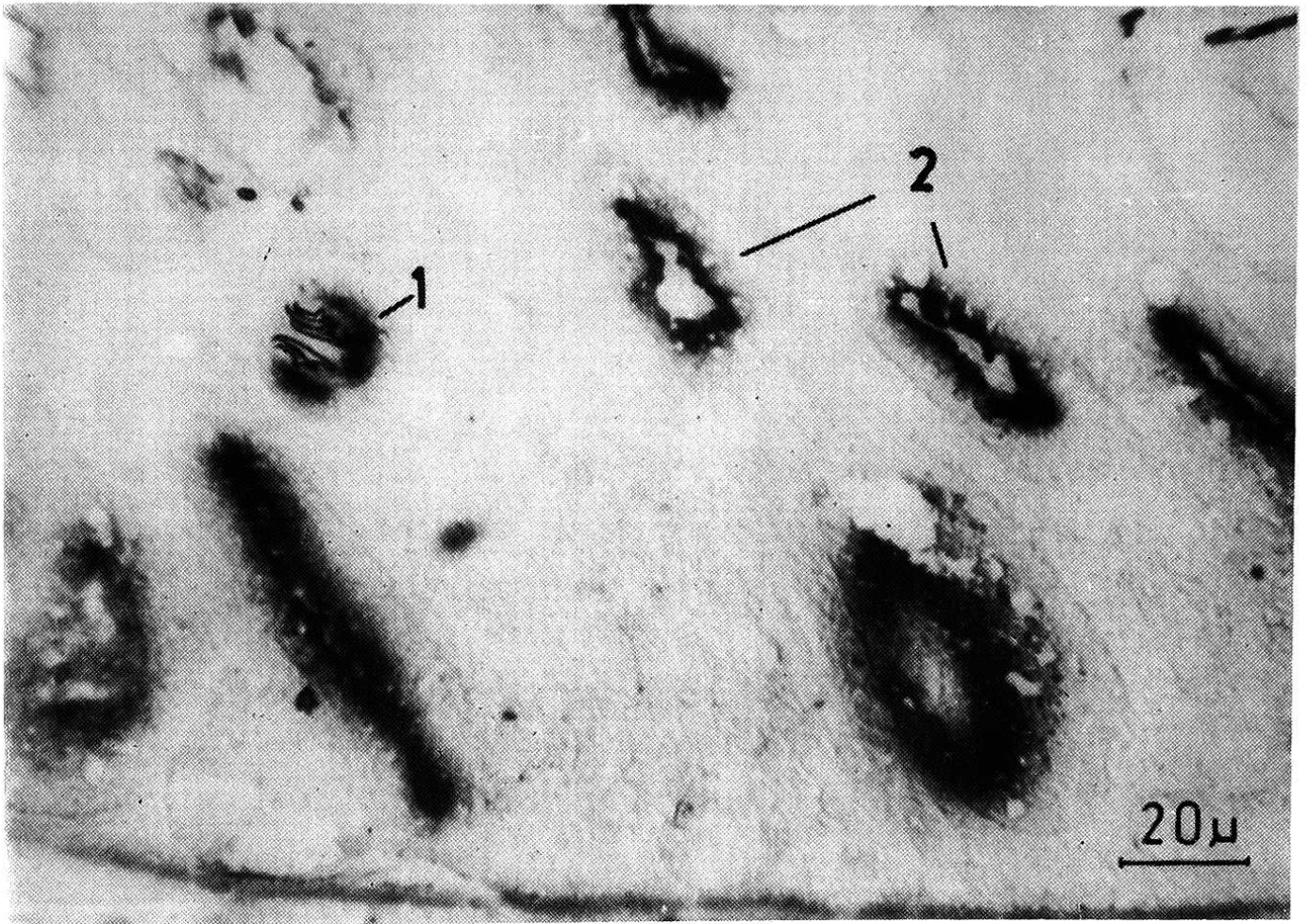
Pasożyt Parasit Enzym Enzyme	<i>N. cheilancristrotus</i>				<i>T. nodulosus</i>			
	oskórek cuticle	podoskórkowe subcuticular cells	komórki podoskórkowe subcuticular cells	parenchyma parenchyma	oskórek cuticle	podoskórkowe subcuticular cells	parenchyma parenchyma	żółtniki vitellaria scoleks scolex
FZ	+++	+++	+++	-	+++	+++	-	+/-
AP	+++	+++	+++	-	+++	+++	-	+/-
FK	++	++	++	-	++	++	-	-
APh	++	++	++	-	++	++	-	-
EN-alfa	-	-	-	+/-	-	-	-	+/-
EN-alpha	-	-	-	+/ -	-	-	-	+/-

Objaśnienia:

+++ odczyn silnie dodatni
++ odczyn wzmożony
+ odczyn dodatni
+/- odczyn nikły
- brak odczynu

Explanations:

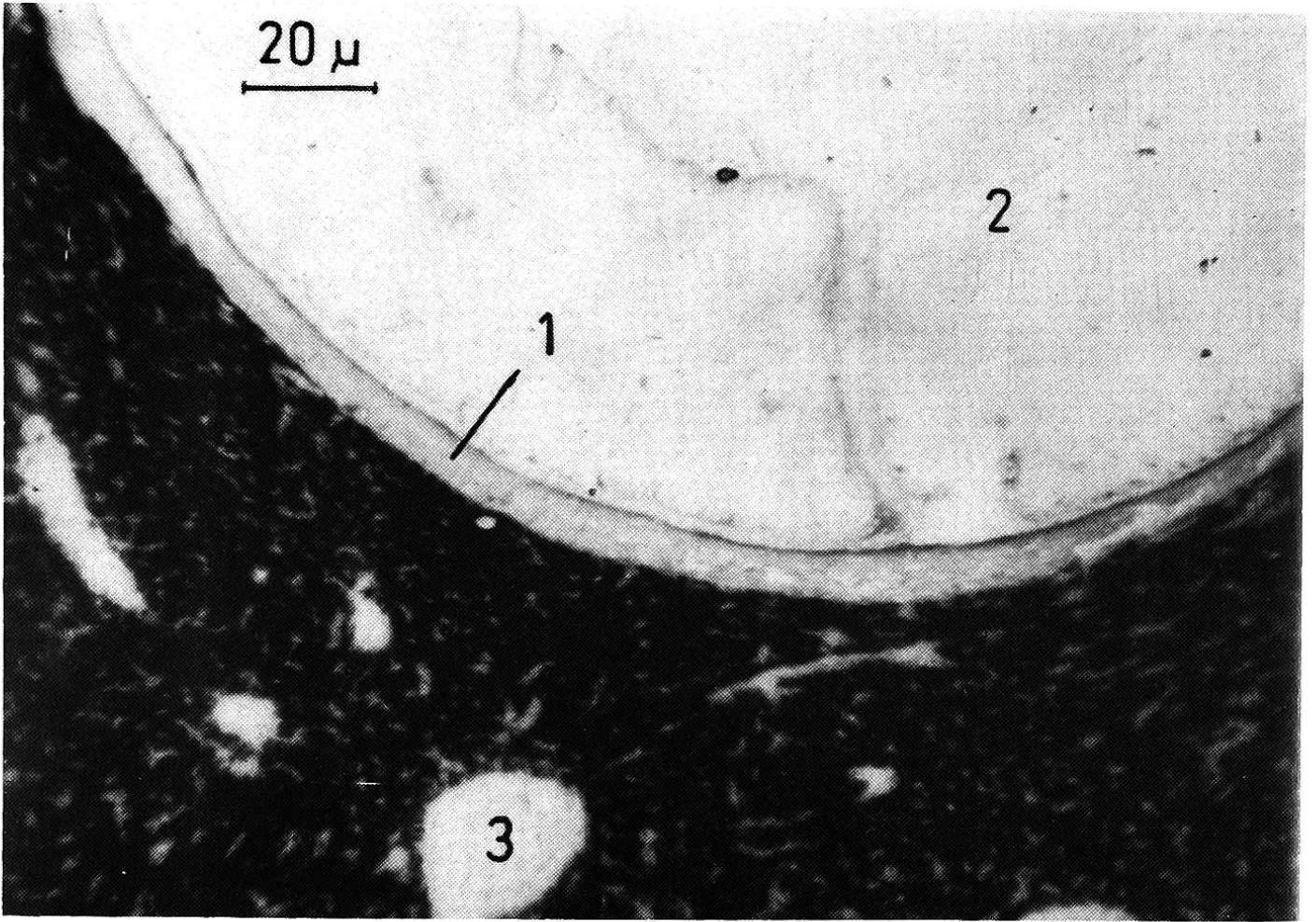
+++ strong positive reaction
++ intensified reaction
+ positiv reaction
+/- weak reaction
- negativ reaction



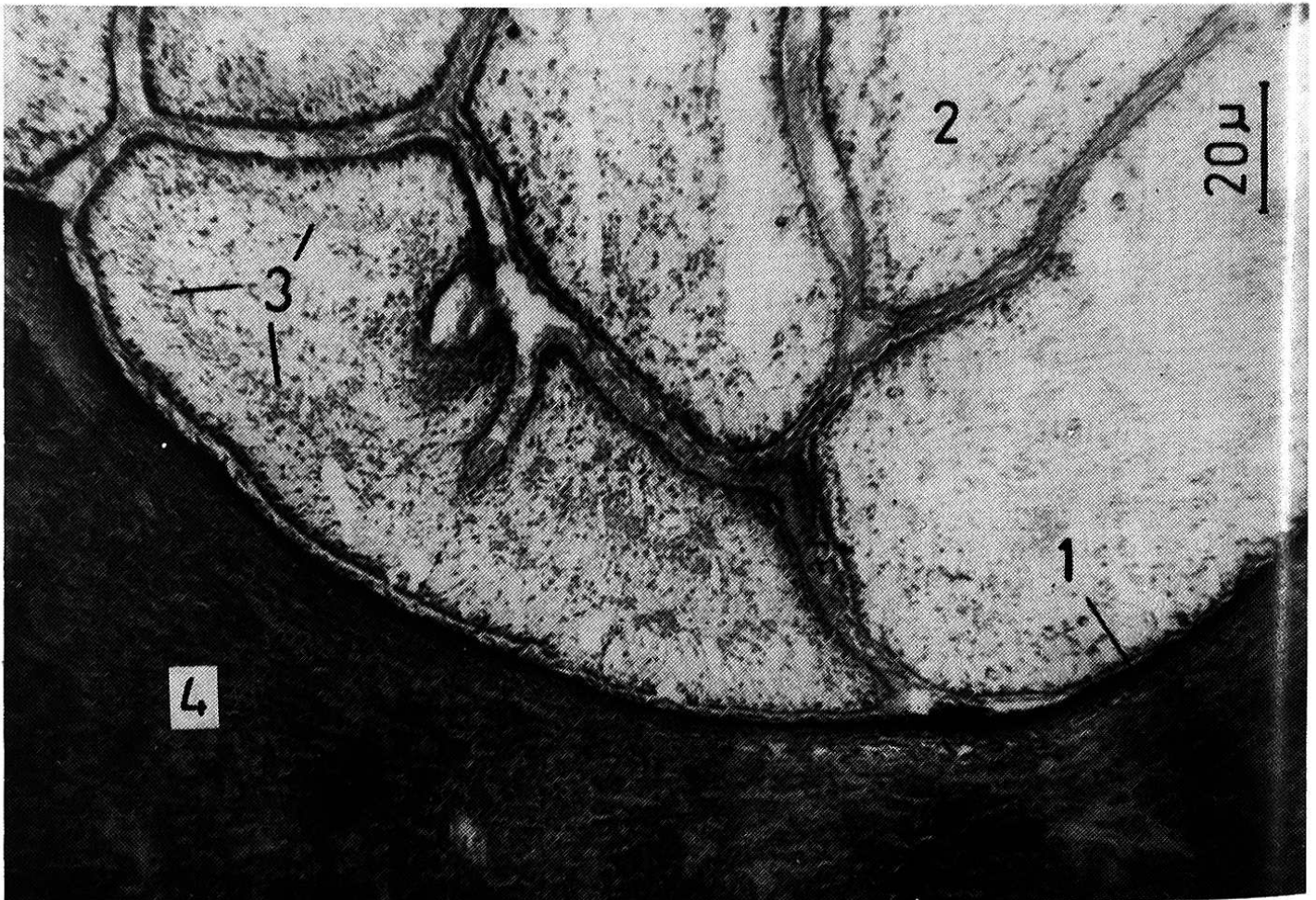
1



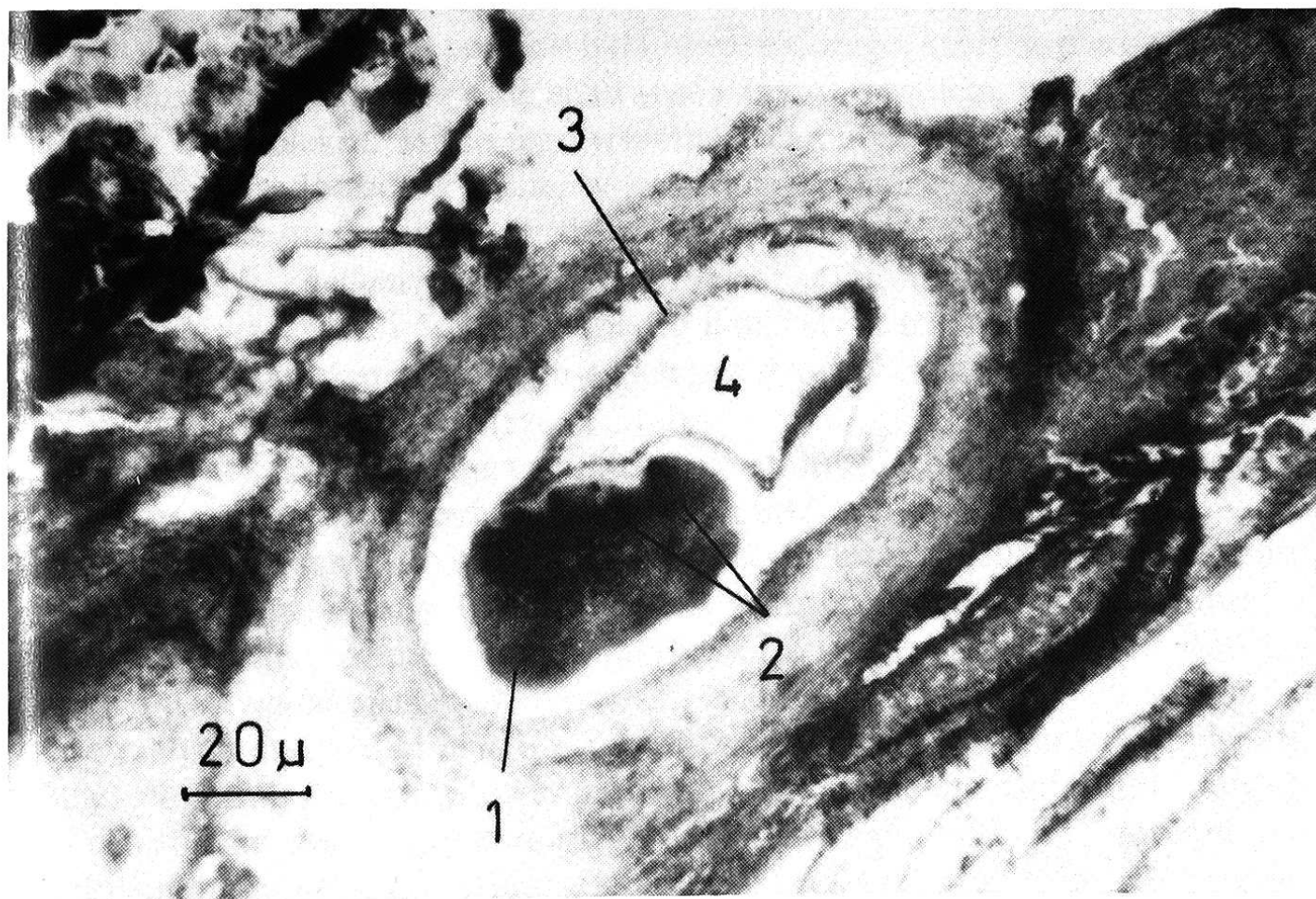
2



3



4



5

Ryc. 1. FZ: odczyn silnie dodatni w skoleksie *N. cheilancristrotus* przeciętym na wysokości przyssawek. 1 – skoleks, 2 – komórki nabłonkowe jelita

Fig. 1. AP: Strong positive reaction in the scolex of *N. cheilancristrotus* cut at the acetabuli level. 1 – scolex, 2 – epithelial cells of the midgut

Ryc. 2. FZ: odczyn silnie dodatni w oskórku i komórkach podoskórkowych *N. cheilancristrotus* przeciętego na wysokości odcinka szyjnego. 1 – larwa, 2 – komórki nabłonkowe jelita

Fig. 2. AP: strong positive reaction in the cuticle and subcuticular cells of *N. cheilancristrotus* cut at the segment of the neck. 1 – larva, 2 – epithelial cells of the midgut

Ryc. 3. EN-alfa: brak odczynu w oskórku, komórkach podoskórkowych i parenchymie *T. nodulosus*. Silna reakcja w wątrobie ryby. 1 – oskórek, 2 – parenchyma, 3 – wątroba

Fig. 3. EN-alpha: no reaction in the cuticle, subcuticular cells and parenchyma of *T. nodulosus*. Strong reaction in the liver of fish. 1 – cuticle, 2 – parenchyma, 3 – liver

Ryc. 4. APH: nasilenie reakcji w oskórku i komórkach podoskórkowych *T. nodulosus*. Brak reakcji w żółtnikach i parenchymie. 1 – oskórek, 2 – parenchyma, 3 – żółtniki, 4 – wątroba

Fig. 4. APH: intensified reaction in the cuticle and subcuticular cells of *T. nodulosus*. No reaction in the vitellaria and parenchyma. 1 – cuticle, 2 – parenchyma, 3 – vitellaria, 4 – liver

Ryc. 5. Przekrój cysty wątrobowej ze skoleksem *T. nodulosus*; FZ: odczyn silnie dodatni w oskórku i komórkach podoskórkowych w skoleksie, słabszy w dalszym odcinku larwy. 1 – skoleks, 2 – haki, 3 – oskórek, 4 – parenchyma

Fig. 5. Section of the hepatic cysts with the scolex of *T. nodulosus*; AP: strong positive reaction in the cuticle and subcuticular cells of the scolex, weaker reaction in the distal segments of the larva. 1 – scolex, 2 – hamuli, 3 – cuticle, 4 – parenchyma

i części szyjnej, a więc nie posiada układu rozrodczego, który w plerocerkoidzie *T. nodulosus* charakteryzuje się zaawansowanym rozwojem, tym większym im dalej jest od skoleksa. Mimo tego wspólną cechą obu larw stanowi aktywność fosfataz – zasadowej i kwaśnej w oskórku i komórkach podoskórkowych. Nieco większą aktywnością tych enzymów charakteryzuje się szyjna część plerocerka *N. cheilancristrotus* w porównaniu z odpowiednim odcinkiem u *T. nodulosus* (ryc. 2 i 5, tab.). Ponadto intensywna reakcja na FZ w okolicy haków i przyssawek u pierwszego z nich przemawia za wzmożoną aktywnością metaboliczną tejże okolicy (ryc. 1., tab.).

Obserwacje te wskazują na stan pewnego „uśpienia” larwy *T. nodulosus* czekającej w grubościennnej cyście łącznotkankowej, wytworzonej przez gospodarza, na połknięcie przez żywiciela ostatecznego, w którego jelicie, po uwolnieniu się z osłonki, uzbrojony w haki skoleks zacznie normalnie funkcjonować.

Obserwowane rozmieszczenie i aktywność FZ i FK w larwach *N. cheilancristrotus* i *T. nodulosus* są bardzo zbliżone do lokalizacji tych enzymów u dojrzałych innych tasiemców ryb (NIEMCZUK 1993). Wysoka aktywność badanych fosfataz w oskórku i komórkach podoskórkowych informuje pośrednio o nasileniu przemiany materii i odpowiada wynikom badań dotyczących węglowodanowego odżywiania się tasiemców (DAVYDOV i wsp. 1973). Brak przewodu pokarmowego, m.in. u *Bothriocephalus acheilognathi* i *Khawia sinensis* rekompensowany jest posiadaniem takich struktur oskórkowych, jakie umożliwiają pobieranie pokarmu (NIEMCZUK 1993).

Obecność esterazy niespecyficzej alfa stwierdzono w obrębie przyssawek skoleksa u *N. cheilancristrotus* oraz w żółtnikach *T. nodulosus* (ryc. 3., tab.). Reakcja w narządzie czepnym odpowiada wynikom otrzymanym przez NIEMCZUKA (1993), który stwierdzał większą aktywność tego enzymu w festonach *Khawia sinensis* niż w skoleksie *Bothriocephalus acheilognathi*. Większa aktywność EN-alfa w obrębie ruchliwego ryjka *N. cheilancristrotus* oraz ruchliwych festonów *K. sinensis*, bardzo mobilnego pasożyta, w porównaniu z nie zmieniającą miejsca przyczepu bruzdą *B. acheilognathi* i nieaktywnym skoleksem larwy *T. nodulosus*, wydaje się oczywista.

LITERATURA

- DAVYDOV O. N. i wsp. 1973. Ob uglevodnom pitanii cestody *Bothriocephalus gowkongensis* (Yeh 1955). *Gidrobiol. Žurn.* 9 (6): 67-74.
- GOMORI G. 1953. *Microscopic histochemistry*. The University of Chicago Press.
- NIEMCZUK W. 1993. Lokalizacja i aktywność wybranych enzymów w tkankach tasiemców *Bothriocephalus acheilognathi* i *Khawia sinensis* pasożytujących u karpia. *Wiad. Parazytol.* 39: 189-197.
- CHORBIŃSKI P., NAWROCKA E. 1996. Zmiany histologiczne i histoenzymatyczne w jelicie narybku karpia (*Cyprinus carpio* L.) zarażonego plerocerkami *Neogryporhynchus cheilancristrotus* (Wedl 1855). *Komunikaty rybackie* 32 (3): 22-24.

POJMAŃSKA T. 1991. Pasożyty ryb Polski (klucze do oznaczania). Tasiemce – Cestoda. PAN Warszawa.

PROST M. 1994. Choroby ryb. PTNW Lublin.

ZAWISTOWSKI S. 1986. Technika histologiczna. PZWL Warszawa.

Otrzymano 29 III 1996, zaakceptowano 5 IX 1996