

Larwy *Anisakis simplex* w śledziach bałtyckich jako organizmy wskaźnikowe w badaniach biologicznych i rybackich. II. Acetylocholinesterazy żywiciela i pasożyta.

Anisakis simplex larvae from the Baltic herring as tag organisms in biological and fisheries research. II. Host and parasite acetylcholinesterases.

Magdalena Podolska

Morski Instytut Rybacki, ul. Kołłątaja 1, 81-332 Gdynia; E-mail: bilbo@mir.gdynia.pl

ABSTRACT. Acetylcholinesterase (AChE) activity in the tissues of host and the parasite and the impact of carbofuran, a carbamate pesticide on the AChE activity in *A. simplex* larvae was investigated. Generalized linear models (GLM) were used for modeling enzymatic activity in herring and *A. simplex* nematodes.

Key words: herring, *Anisakis simplex*, Baltic, model, acetylcholinesterase, AChE

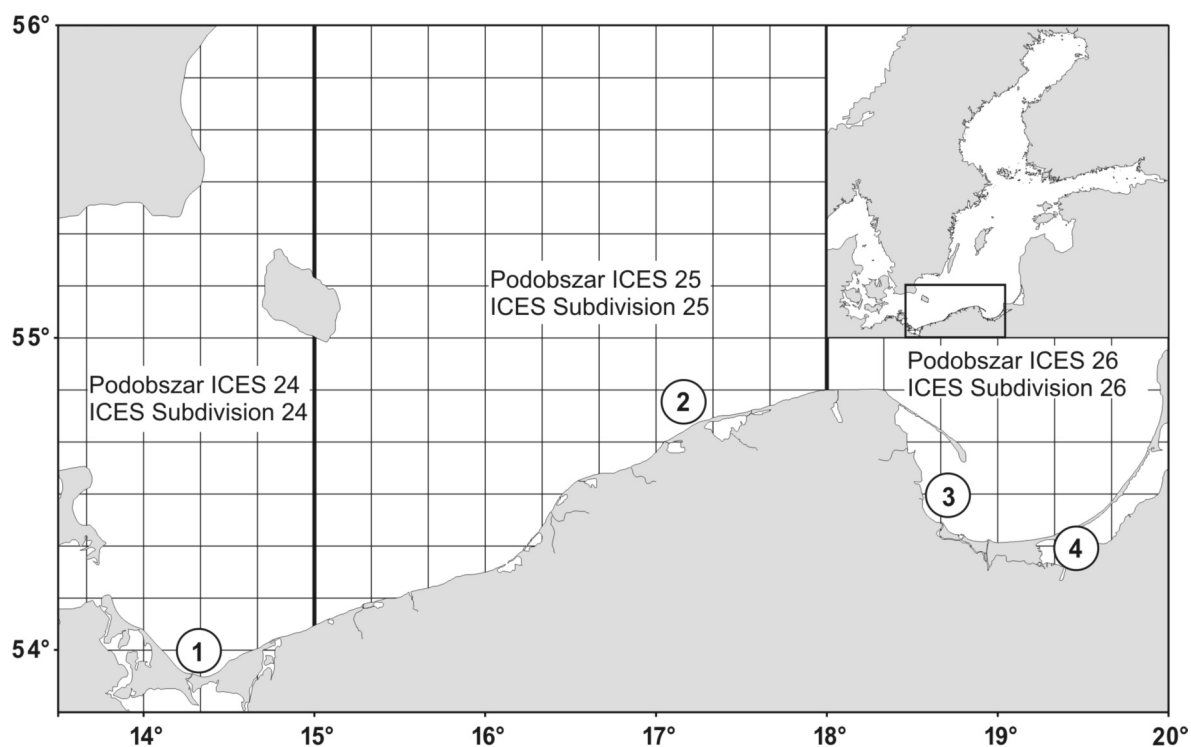
Omówiono rolę acetylocholinesterazy (AChE) obecnej w pasożytach. Enzym ten jest wykorzystywany w monitoringu biologicznych skutków zanieczyszczeń, jako marker ekspozycji na pestycydy. Do określenia aktywności AChE w tkankach śledzi i larw *A. simplex* zastosowano modele matematyczne. Przedstawiono wyniki badań, których celem było wykazanie wpływu karbofuranu na aktywność acetylocholinesterazy w tkankach nicieni. Poświęcono także uwagę zjawisku oporności na pestycydy, którego wcześniej nie wykazano u pasożytów ryb.

Aktywność acetylocholinesterazy w układzie pasżyt–żywiciel

Dynamika infekcji pasożytnej jest odzwierciedleniem zmian zachodzących w środowisku. Na zmiany te, zwykle złożone, reaguje zarówno żywiciel (śledź) jak i obecne w jego organizmie pasożyty. W interakcjach zachodzących w układzie pasżyt–żywiciel ważną rolę odgrywa acetylocholinesteraza (AChE). Rola AChE u gatunków pasożytniczych jest inna niż u organizmów wolno żyjących.

Enzym ten może być czynnikiem hamującym perystaltykę jelit. Określany jest mianem „biochemicznego imadła”, ułatwiającego nicieniom pozostanie w preferowanym przez nie środowisku [1]. Jedną z ważniejszych funkcji, którą odgrywa acetylocholinesteraza wydzielana przez nicienie, jest hamowanie odpowiedzi immunologicznej żywiciela [2,3]. AChE produkowana przez niektóre gatunki nicieni żyjące w przewodzie pokarmowym, może redukować stan zapalny poprzez hydrolizę acetylocholinylu, stymulującą wydzielanie kwasów żołądkowych [4]. Według Selkirka i wsp. [5], acetylocholinesterazy wydzielane przez pasożyty przewodu pokarmowego mogą pełnić rolę w produkcji alternatywnych substratów dla acetylocholinylu, co w konsekwencji może wpłynąć na hamowanie aktywności AChE żywiciela.

Pomiar aktywności AChE od szeregu lat jest wykorzystywany w monitoringu biologicznych skutków zanieczyszczeń jako marker ekspozycji na pestycydy. U większości organizmów morskich (również u ryb), w rejonach zanieczyszczonych wykazano spadek aktywności tego enzymu w tkankach



Rys. 1. Miejsca poboru prób: 1. Zatoka Pomorska; 2. Środkowe Wybrzeże (Rowy); 3. Zatoka Gdańska; 4. Zalew Wiślany

Fig. 1. Sampling areas: 1. Pomeranian Bay; 2. Middle Coast (Rowy); 3. Gulf of Gdansk; 4. Vistula Lagoon

[6–10]. Do inhibitorów AChE należą karbaminowe pestycydy, związki organofosforowe i metale ciężkie.

Podolska i Napierska [11] określiły aktywność AChE w tkance mięśniowej śledzi (zarażonych larwami *A. simplex* i wolnych od nicieni) oraz w tkankach larw *A. simplex*. Aktywność enzymu w tkankach ryb i nicieni mierzono metodą spektrofotometryczną, przy długości fali 412 nm. Próby ryb do badań pobrano w Zatoce Pomorskiej, Rowach, Zatoce Gdańskiej oraz w Zalewie Wiślany (Rys. 1). Średnią aktywność AChE [nM/min/mg protein] w tkankach śledzi i larw *A. simplex* w badanych rejonach przedstawiono w Tabeli 1. Do analizy zależności pomiędzy aktywnością enzymatyczną acetylocholinesterazy a wybranymi czynnikami i zmiennymi wykorzystano uogólnione modele liniowe (GLM):

Model 1) aktywność AChE u śledzi obejmująca osobniki zarażone i niezarażone (n=225)

$\ln(y) = DL + KON + \text{wiek} + \text{płeć} + \text{gon} + \text{rejon} + \text{inf} + \text{błąd losowy};$

Model 2) aktywność AChE u śledzi z uwzględnieniem z aktywności AChE pasożytów (n=98)

$\ln(y) = DL + KON + N + ACT + \text{wiek} + \text{płeć} + \text{gon} + \text{rejon} + \text{błąd losowy};$

Model 3) aktywność AChE u pasożytów (n=98)
 $\ln(y) = DL + KON + \text{wiek} + \text{płeć} + \text{gon} + \text{rejon} + \text{błąd losowy};$

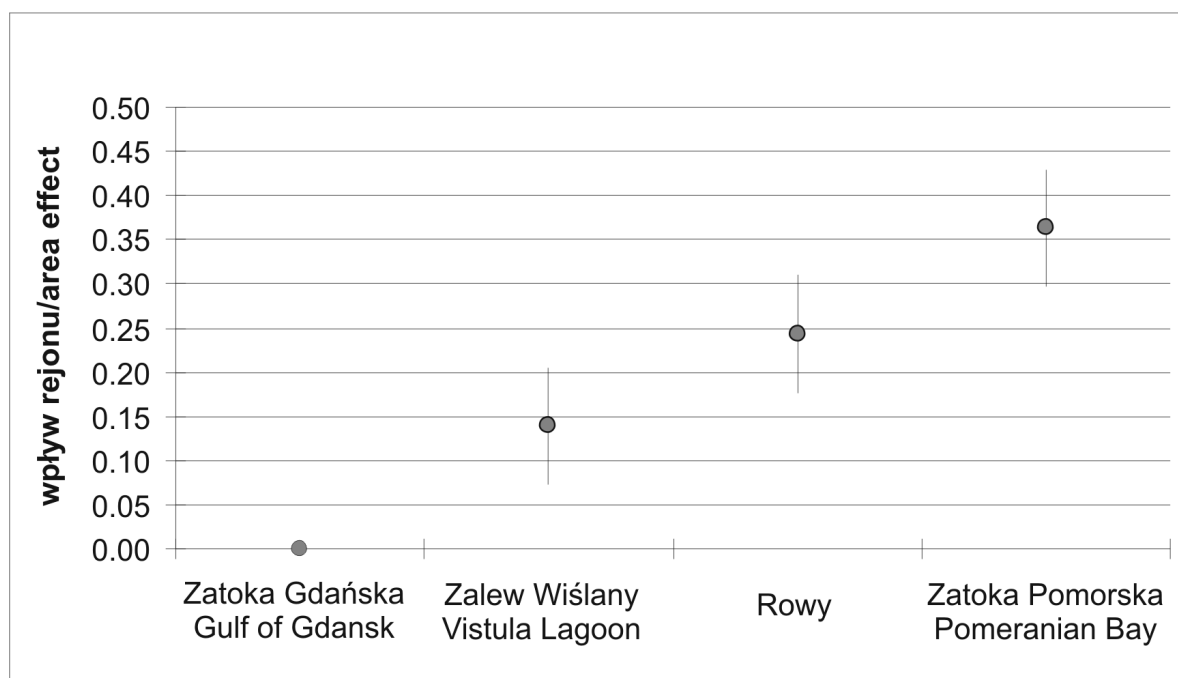
gdzie: y–zmienna określająca aktywność AChE; DL–długość całkowita ryby; KON–współczynnik kondycji ryby; N–liczba nicieni; ACT–aktywność AChE pasożytów; wiek–wiek ryby; płeć–płeć ryby; gon–stadium dojrzałości gonad; rejon–rejon połowu; inf–obecność lub brak larw *A. simplex*.

Założono rozkład normalny zmiennej zależnej. Wpływ czynników przedstawiony jest w odniesieniu do pierwszego poziomu analizowanego czynnika (tzw. parametryzacja rogowa). Wpływy czynników są przyjęte jako różnice pomiędzy wpływem poziomu danego czynnika a wpływem poziomu czynnika referencyjnego. Stąd wpływ poziomu czynnika referencyjnego wynosi zero, a przedstawione na wykresach wartości ujemne oznaczają, że wpływ poziomu czynnika jest mniejszy od wpływu czynnika referencyjnego.

Rejon poboru prób miał istotny statystycznie wpływ na aktywność AChE w tkankach śledzi, zarówno zarażonych jak i niezarażonych. Wpływ rejonu był najniższy w Zatoce Gdańskiej, a najwyższy

Tabela 1. Średnia aktywność AChE [nM/min/mg protein] w tkankach śledzi (a) i larw *A. simplex* (b) w badanych rejonach
 Table 1. Mean AChE activity [nM/min/mg protein] in herring tissues (a) and *A. simplex* larvae (b) from the studied areas

a)	rejon/area	samce/males			samice/females			n	średnia average	SE		
		n	Aktywność AChE AChE activity	SE	n	Aktywność AChE AChE activity	SE					
śledzie niezarażone	Zatoka Gdańska	11	19.88	2.12	10	20.61	1.92	21	20.23	1.41		
non-infected herring	Zalew Wiślany	15	22.85	1.57	14	19.21	1.43	29	21.09	1.10		
	Rowy	12	20.02	1.63	14	23.90	2.66	26	22.11	1.64		
	Zatoka Pomorska	15	27.91	2.98	15	27.94	2.33	30	27.93	1.86		
niezarażone /non-infected		53	23.02	1.18	53	23.19	1.17	106	23.11	0.83		
śledzie zarażone	Zatoka Gdańska	15	17.88	1.31	16	19.16	1.38	31	18.54	0.94		
infected herring	Zalew Wiślany	4	26.37	1.38	24	22.17	1.20	28	22.77	1.08		
	Rowy	15	26.90	3.51	15	29.34	2.97	30	28.12	2.27		
	Zatoka Pomorska	15	28.56	2.18	15	29.13	2.92	30	28.84	1.79		
zarażone/infected		49	24.60	1.45	70	24.51	1.13	119	24.55	0.89		
suma		102	23.78	0.93	123	23.94	0.82	225	23.87	0.61		
b)												
	rejon/area	żywiciele samce/male hosts				żywiciele samice/female hosts				n	średnia average	SE
		n	Aktywność AChE AChE activity	SE	n	Aktywność AChE AChE activity	SE					
larwy <i>A. simplex</i>	Zatoka Gdańska	13	137.04	22.90	13	82.17	14.17	26	109.60	14.29		
<i>A. simplex</i> larvae	Zalew Wiślany	4	99.30	6.82	16	86.26	7.27	20	88.87	6.02		
	Rowy	15	39.04	4.56	11	35.10	6.16	26	37.37	3.65		
	Zatoka Pomorska	11	64.20	7.94	15	51.20	5.55	26	56.70	4.72		
suma		43	80.71	9.57	55	65.50	5.14	98	72.17	5.12		



Rys. 2. Wpływ rejonu (wraz z błędami standardowymi) na aktywność acetylocholinesterazy (AChE) u śledzi zarażonych i niezarażonych

Fig. 2. Area effect (with standard errors) estimated for acetylcholinesterase (AChE) activity of infected and non-infected herring

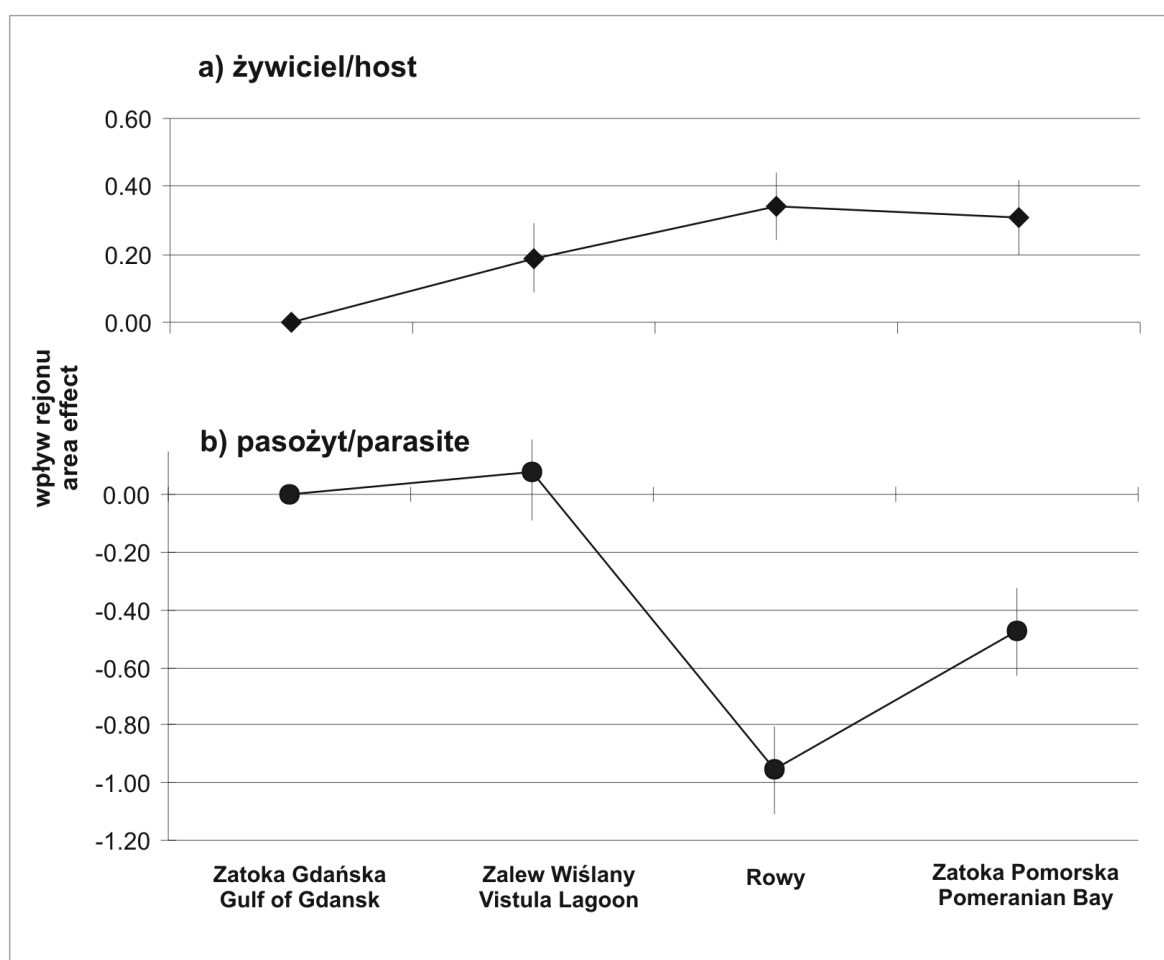
w Zatoce Pomorskiej (Rys. 2).

Uzyskane wyniki wykazały, że aktywność AChE była istotnie wyższa u nicieni pochodzących od samców niż od samic. W próbach pobranych w rejonach zanieczyszczonych (Zatoka Gdańska i Zalew Wiślany), niskiej aktywności AChE w tkance mięśniowej żywicieli towarzyszyła bardzo wysoka aktywność tego enzymu w tkankach pasożytów. Rejon poboru prób miał wpływ istotny statystycznie na aktywność acetylocholinesterazy w tkankach zarażonych śledzi (Rys. 3a). Wykazano także istnienie istotnej statystycznie, ujemnej korelacji pomiędzy aktywnością enzymu w tkankach pasożytów i ich żywicieli (Rys. 3a, b). Mechanizm tego zjawiska jest trudny do wyjaśnienia, gdyż u większości organizmów wykorzystywanych w monitoringu biologicznych skutków zanieczyszczeń, poddanych działaniu pestycydów i/lub innych związków wykazujących właściwości neurotoksyczne, z reguły dochodzi do hamowania aktywności AChE. Podolska i Napierska [11] sugerowały, że obecność pestycydów w zanieczyszczonym środowisku może wpływać hamująco na aktywność AChE w tkankach żywicieli, prowadząc do kumulacji acetylocholino. Taka reakcja biochemiczna zachodząca w organi-

zmie żywiciela może stwarzać niekorzystne warunki dla pasożytniczych nicieni, które wydzielają znaczne ilości AChE w celu inaktywacji acetylocholino żywiciela. Z drugiej strony, produkcja dużej ilości AChE przez pasożyty może być bezpośrednią reakcją na działanie pestycydów i stanowić adaptację do niekorzystnych warunków środowiska. W piśmiennictwie przedstawiono mechanizmy zabezpieczające organizm przed działaniem pestycydów i związków organofosforowych (nadprodukcja AChE, formy molekularne tego enzymu odporne na działanie pestycydów), jakkolwiek przeprowadzone badania odnoszą się do innych grup systematycznych [12–14].

Eksperymentalna ekspozycja larw *A. simplex* na karbofuran

W celu wykazania, jaki wpływ wywierają pestycydy na aktywność enzymatyczną acetylocholinesterazy nicieni, Podolska i wsp. [15] poddały larwy *A. simplex* ekperymentalnej ekspozycji *in vivo* na karbofuran. Materiał do eksperymentu został pobrany w rejonie względnie wolnym od zanieczyszczeń (środkowe wybrzeże Bałtyku, Rys. 1). Larwy

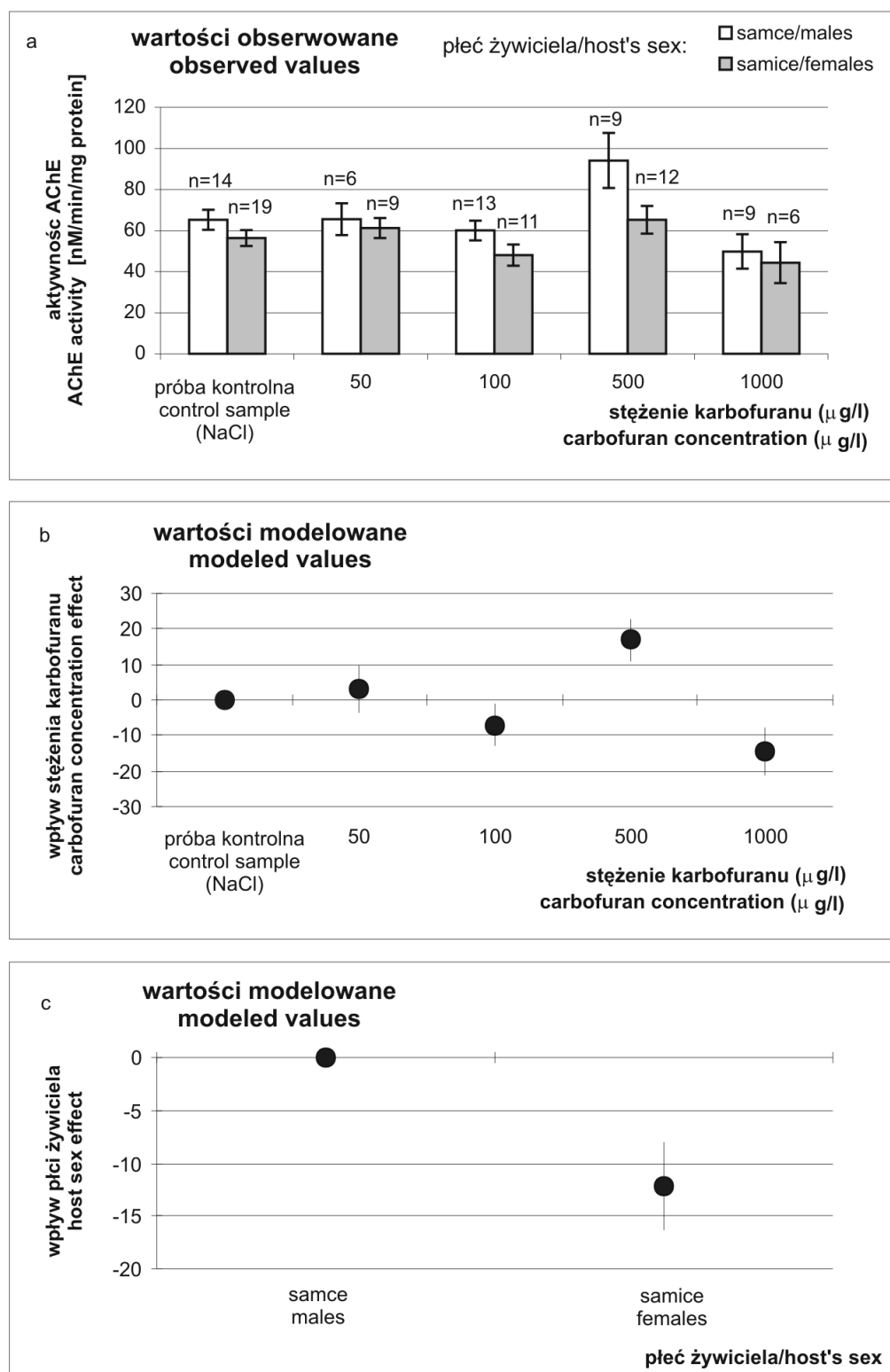


Rys. 3. Wpływ rejonu (wraz z błędami standardowymi) na aktywność acetylocholinesterazy (AChE) u zarażonych śledzi (a, żywiciel) i larw *A. simplex* (b, pasożyt)

Fig. 3. Area effect (with standard errors) estimated for acetylcholinesterase (AChE) activity in infected herring (a, host) and *A. simplex* larvae (b, parasite)

A. simplex podzielono na grupy eksperymentalne liczące po 4–7 nicieni w grupie, uwzględniając także podział na pasożyty pochodzące od samców i samic śledzi. Nicienie poddano ekspozycji na karbofuran (PESTANAL®, Riedel-de Haën, synonim: 2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranol N-methylcarbamate) w stężeniach 50, 100, 500 i 1000 mg/l. Próby kontrolne stanowiły larwy umieszczone w roztworze NaCl bez pestycydów. Aktywność enzymu w tkankach nicieni mierzono metodą spektrofotometryczną, przy długości fali 412 nm. Średnie aktywności acetylocholinesterazy w badanych próbach przedstawiono na Rys. 4a. Do analizy zależności pomiędzy aktywnością AChE a stężeniem karbofuranu, czasem ekspozycji i parametrami biologicznymi ryb zastosowano uogólnione modele liniowe. Na aktywność AChE pasożytów w sposób istotny statystycznie wpływało stężenie karbofuranu

($p < 0.001$) i płeć żywiciela ($p = 0.007$). Wpływ stężenia 500 mg/l był istotnie wyższy ($p < 0.001$), a stężenia 1 mg/l istotnie niższy ($p = 0.04$) w stosunku do prób kontrolnych (Rys. 4a, b). Wpływ płci żywiciela był istotnie wyższy w przypadku pasożytów pochodzących od samców (Rys. 4a, c). Istotny wpływ płci śledzia może wskazywać, że na aktywność enzymu pasożytów wpływają mechanizmy zależne od procesów biologicznych zachodzących w organizmie żywiciela (np. wpływ hormonów). Uzyskane wyniki sugerują istnienie u larw *A. simplex* wysokiego progu wrażliwości na karbofuran, za który być może jest odpowiedzialna acetylocholinesteraza oporna na działanie niektórych pestycydów. Wyższa niż w próbach kontrolnych aktywność AChE w tkankach larw poddanych działaniu karbofuranu o znacznym stężeniu (500 mg/l), może wskazywać na zjawisko nadprodukcji AChE pod wpły-



Rys. 4. Średnie aktywności AChE (z odchyleniami standardowymi) w tkankach larw *A. simplex* poddanych ekspozycji na karbofuran (a, wartości obserwowane) oraz wpływ stężenia karbofuranu (b) i płci żywiciela (c) na aktywność AChE u larw *A. simplex* (n–liczba grup eksperymentalnych)

Fig. 4. Average AChE activities (with standard deviations) in *A. simplex* larvae exposed to carbofuran (a) and effects of host sex (b) and carbofuran concentration (c) on AChE activity in *A. simplex* larvae (n–the number of experimental groups)

wem działania pestycydów. Zdaniem Fournier'a i wsp. [12] nadprodukcja AChE stanowi mechanizm zabezpieczający niektóre gatunki owadów przed toksycznym działaniem pestycydów. Mutacje, prowadzące do powstania AChE odpornej na działanie insektycydów wykazano m.in. u muchy domowej *Musca domestica* [13, 14] i u muszki owocowej *Drosophila melanogaster* [16]. Istnienie opornych na działanie pestycydów form acetylocholinesterazy wykazano również u pasożytów roślin – nicieni *Meloidogyne* [17] oraz u małży *Adamussium colbecki* i *Pecten jacobaeus* [18].

Skutki długotrwałego stosowania pestycydów w rolnictwie dotyczą nie tylko terenów upraw. Pestycydy wymywane z pól przedostają się do rzek, jezior i mórz, docierając do miejsc, w których nigdy nie były stosowane. Wyniki uzyskane przez Podolską i wsp. [15] sugerują, że odporność na pestycydy może powstać również u pasożytniczych nicieni żyjących w środowisku wodnym. Tego rodzaju zjawiska zachodzące w pasożytach ryb nie zostały wcześniej opisane w literaturze.

Literatura

- [1] Edwards A.J., Burt J.S., Ogilvie B.M. 1971. The effect of immunity upon some enzymes of the parasitic nematode *Nippostrongylus brasiliensis*. *Parasitology* 62: 339–347.
- [2] Pritchard D. 1993. Why do some parasitic nematodes secrete acetylcholinesterase (AChE)? *International Journal for Parasitology* 23: 549–550.
- [3] Rhoads M.L. 1984. Secretory cholinesterases of nematodes: possible functions in the host-parasite relationship. *Tropical Veterinarian* 2: 3–10.
- [4] Lee D.L. 1996. Why do some nematode parasites of alimentary tract secrete acetylcholinesterase? *International Journal for Parasitology* 26: 499–508.
- [5] Selkirk M.E., Henson S.M., Russell W.S., Hussein A.S. 2001. Acetylcholinesterase secretion by nematodes. In: *Parasitic Nematodes – Molecular Biology, Biochemistry and Immunology*. (Eds. M.W. Kennedy, W. Harnett). CABI Publishing, Wallingford: 211–228.
- [6] Bocquené G., Bellanger C., Cadiou Y., Galgani F. 1995. Joint action of combinations of pollutants on the acetylcholinesterase activity of several marine species. *Ecotoxicology* 4: 266–279.
- [7] Varò I., Navarro J.C. Amat F., Guilhermino L. 2003. Effect of dichlorvos on cholinesterase activity of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 75: 61–72.
- [8] Napierska D., Podolska M. 2003. Preliminary results of AChE and GST measurements in flounder, *Platichthys flesus*, from the southern Baltic Sea. *Bulletin of the Sea Fisheries Institute* 2: 51–66.
- [9] Napierska D., Podolska M. 2005. Biomarkers of contaminant exposure: results of a field study with flounder (*Platichthys flesus*) from the southern Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin* 50: 758–767.
- [10] Napierska D., Podolska M. 2006. Field studies of eelpout (*Zoarces viviparus* L.) from Polish coastal waters (southern Baltic Sea). *Science of the Total Environment* 371: 144–155.
- [11] Podolska M., Napierska D. 2006. Acetylcholinesterase activity in hosts (herring *Clupea harengus*) and parasites (*Anisakis simplex* larvae) from the southern Baltic. *ICES Journal of Marine Science* 63: 161–168.
- [12] Fournier D., Mutero A., Pralavorio M., Bride J. M. 1993. *Drosophila* acetylcholinesterase: mechanisms of resistance to organophosphates. *Chemico-Biological Interactions* 87: 233–238.
- [13] Kozaki T., Shono T., Tomita T., Kono Y. 2001. Fenitroxon insensitive acetylcholinesterases of the housefly, *Musca domestica* associated with point mutations. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31: 991–997.
- [14] Walsh S.B., Dolden T.A., Moores G.D., Kristensen M., Lewis T., Devonshire A.L., Williamson M.S. 2001. Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *Biochemical Journal* 359: 175–181.
- [15] Podolska M., Mulkiewicz E., Napierska D. 2008. The impact of carbofuran on acetylcholinesterase activity in *Anisakis simplex* larvae from Baltic herring. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 91: 104–109.
- [16] Charpentier A., Fournier D. 2001. Levels of total acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster* in relation to insecticide resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 70: 100–107.
- [17] Chang S., Opperman, C.H. 1991. Characterization of acetylcholinesterase molecular forms of the root-knot nematode, *Meloidogyne*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 49: 205–214.
- [18] Romani R., Corsi I, Bonacci S., Focardi S., De Medio G.E, De Santis A., Incarnato F., Giovannini E., Rosi G. 2006. Organophosphate-resistant forms of acetylcholinesterases in two scallops – the Antarctic *Adamussium colbecki* and the Mediterranean *Pecten jacobaeus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 145: 188–196.

Wpłynęło 20 marca 2009

Zaakceptowano 2 czerwca 2009