

POZIOM GLIKOGENU W WĄTROBIE I MIĘŚNIACH
SZKIELETOWYCH LESZCZY (*ABRAMIS BRAMA*) ZARAŻONYCH
PLEROCERKOIDAMI *LIGULA INTESTINALIS* (CESTODA:
PSEUDOPHYLLIDEA)

ZBIGNIEW POKORA, SŁAWOMIR KWIATKOWSKI

Śląska Akademia Medyczna, Katedra i Zakład Biologii Ogólnej, Molekularnej i Genetyki,
ul. Medyków, 40-752 Katowice

Keywords: *Abramis brama*, glycogen, host-parasite relationship, *Ligula intestinalis*.

GLYCOGEN LEVEL IN THE LIVER AND SKELETAL MUSCLES OF BREAM (*ABRAMIS BRAMA*) INFECTED WITH PLEROCERCOIDS OF *LIGULA INTESTINALIS* (CESTODA: *PSEUDOPHYLLIDEA*)

The aim of the paper was to estimate the glycogen content in muscles and liver of bream infected with plerocercoids of the tapeworm *Ligula intestinalis* in classes distinguished on the ground of relative intensity of the infection (percentage ratio of the parasite weight to the host weight). The investigations were carried out on 45 bream, with mean body weight 194.3 ± 36.3 g and body length (*longitudo corporis*) 19.1 ± 1.2 cm, collected in summer and autumn seasons in selected anthropogenic water reservoirs in the Upper-Silesian Industrial Region. The infection was stated on dissection. Glycogen in segments of the liver and lateral muscles of the body wall (*musculus lateralis magnus*) was designated enzymatically, as equivalent number of glucose molecules, after its isolation from tissues and hydrolysis.

In infected fish significant ($p < 0.01$) decrease in glycogen concentration in muscles and liver, following the increase in relative intensity of the infection (in muscles $r = -0.8492$, in the liver $r = -0.7890$) was noted. Decrease in the glycogen concentration was faster in muscles than in the liver. At average relative intensity of the infection $1.70 \pm 0.09\%$ (range 1.69–1.95%) glycogen concentrations in the liver and muscles differed in relation to non-infected individuals 16% and 21%, respectively. In the class with relative intensity of the infection greater than 2.0% (mean $2.58 \pm 0.08\%$) these differences were respectively 37% and 54%.

Authors discuss the observed changes in the context of exploitational and pathogenic effects of the parasite.

Streszczenie

Celem pracy była ocena zawartości glikogenu w mięśniach i wątrobie leszczy zarażonych plerocercoidami tasiemca *Ligula intestinalis* w klasach wyróżnionych na podstawie względnej intensywności zarażenia (procentowego stosunku masy ciała pasożyta do masy żywiciela). Materiał do badań stanowiło 45 leszczy, o przeciętnej masie $194,3 \pm 36,3$ g i długości ciała (*longitudo corporis*) $19,1 \pm 1,2$ cm, odlawianych w sezonach letnim i jesiennym w wybranych antropogenicznych zbiornikach wodnych, usytuowanych w mczoregionie Górnośląskiego Okręgu Przemysłowego. Zarażenie ryb

stwierdzano w czasie sekcji. Glikogen w wycinkach wątroby i mięśni bocznych ściany ciała (*musculus lateralis magnus*) oznaczano enzymatycznie, jako równoważną ilość cząsteczek glukozy, po jego izolowaniu z tkanek i hydrolizie.

U zarażonych ryb obserwowano istotny ($p < 0,01$) spadek poziomu glikogenu zarówno w mięśniach, jak i w wątrobie, postępujący wraz ze wzrostem względnej intensywności zarażenia (w mięśniach $r = -0,8492$, w wątrobie $r = -0,7890$). Obniżenie stężenia glikogenu postępowo w mięśniach szybciej niż w wątrobie. Przy przeciętnej względnej intensywności inwazji $1,70 \pm 0,09\%$ (w granicach $1,69-1,95\%$) stężenia glikogenu w mięśniach i wątrobie różniły się w stosunku do osobników nie zarażonych odpowiednio o 16% i 21%. W klasie ryb o względnej intensywności zarażenia przekraczającej 2,0% (przeciętnie $2,58 \pm 0,08\%$) różnice te wynosiły odpowiednio 37% oraz 54%.

Obserwowane zmiany autorzy dyskutują w kontekście eksploatacyjnego oraz patogennego działania pasożyta.

WSTĘP

Tasiemiec *Ligula intestinalis* pasożytuje w postaci plerocerkoidu w jamie ciała wielu gatunków ryb, zwłaszcza karpiowatych [1, 3, 6, 8, 9, 22, 25–28]. W Polsce drugimi pośrednimi żywicielami tasiemca są zwykle leszcze, właściwymi żywicielami ostatecznymi liczne gatunki ptaków rybożernych. Plerocerkoidy są silnie patogenne dla ryb żywicielskich, zwłaszcza w przypadku inwazji mnogich. Zarażone ryby mają wzdęte powłoki, są wychudzone i rosną powoli. Ucisk wywierany przez rosnące plerocerkoidy na narządy wewnętrzne upośledza ich funkcje i sprzyja stopniowej atrofii. Zmiany w gonadach, będące wynikiem mechanicznego i toksycznego działania plerocerkoidów oraz upośledzeniem przez pasożyta endokrynalnej aktywności przedniego płata przysadki mózgowej, prowadzą do zaburzeń płodności zarażonych ryb. W przebiegu ligulozy obserwowano także zmiany w obrazie elementów morfotycznych krwi oraz biochemii osocza i tkanek narządów wewnętrznych [4, 10, 14, 16, 23, 24]. W jamie ciała ryb zarażonych plerocerkoidami *Ligula intestinalis* Izvekova [11, 12] obserwowała wzrost stężenia białka całkowitego, przy jednoczesnym obniżeniu stężenia heksoz i aktywności enzymów amylolitycznych. Rzeczowska i Honowska [24] w mięśniach zarażonych ryb, w warunkach dość wysokiej względnej intensywności inwazji (przeciętnie 4,9%), stwierdziły obniżenie poziomu związków tłuszczowych, głównie fosfolipidów, czemu towarzyszyło nieznaczne, statystycznie nieznamienne obniżenie stężeń cukrów redukujących i białka. Zmiany te mogą być rozpatrywane jako wypadkowa zmienionego w warunkach inwazji metabolizmu organizmu żywicielskiego oraz bezpośredniego, eksploatacyjnego działania pasożyta. Argumentem na rzecz intensywnej absorpcji węglowodanów przez rozwijające się plerocerkoidy jest wysoki poziom tych związków w ich tkance parenchymatycznej [24].

Celem niniejszej pracy była ocena poziomu glikogenu w tkankach wątroby i mięśni szkieletowych zarażonych leszczy w grupach wyróżnionych na podstawie względnej intensywności inwazji.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiło 45 leszczy, o przeciętnej masie $194,3 \pm 36,3$ g i długości ciała (*longitudo corporis*) $19,1 \pm 1,2$ cm, odławianych w sezonach letnim i jesiennym w wybranych antropogenicznych zbiornikach wodnych w mezoregionie Górnośląskiego Okręgu Przemysłowego [21]. Zarażenie ryb plerocerkoidami *Ligula intestinalis*

stwierdzano w czasie sekcji. W badanym materiale nie stwierdzono ektopicznej lokalizacji pasożyta w tkance mięśniowej [15]. Zarażone ryby podzielono na dwie grupy w oparciu o kryterium względnej intensywności inwazji (procentowy stosunek masy plerocerkoidów do masy żywiciela [5]), przyjmując jako graniczną wartość 2%. Glikogen w homogenacie wątroby i mięśni bocznych ściany ciała (*musculus lateralis magnus*) oznaczano enzymatycznie, jako równoważną ilość cząsteczek glukozy, po jego izolowaniu z tkanek (hydroliza wiązań peptydowych i estrowych w gorącym 30% r-rze KOH, wytrącanie cząsteczek glikogenu w 96% etanolu przez odwodnienie) i kwaśnej hydrolizie (2 M r-r HCl w gorącej kąpieli wodnej) [13, 20]. Wyniki poddano analizie statystycznej. Istotność różnic między średnimi arytmetycznymi stężeń reszt glukozy w homogenacie określano za pomocą testu t Studenta, po analizie istotności różnic pomiędzy wariancjami prób, badanych za pomocą testu F Fishera-Snedecora. Normalność rozkładu zmiennych badano za pomocą testu chi-kwadrat. Zależność pomiędzy względną intensywnością zarażenia a stężeniem glikogenu w homogenacie analizowano za pomocą współczynnika korelacji Pearsona [19].

WYNIKI

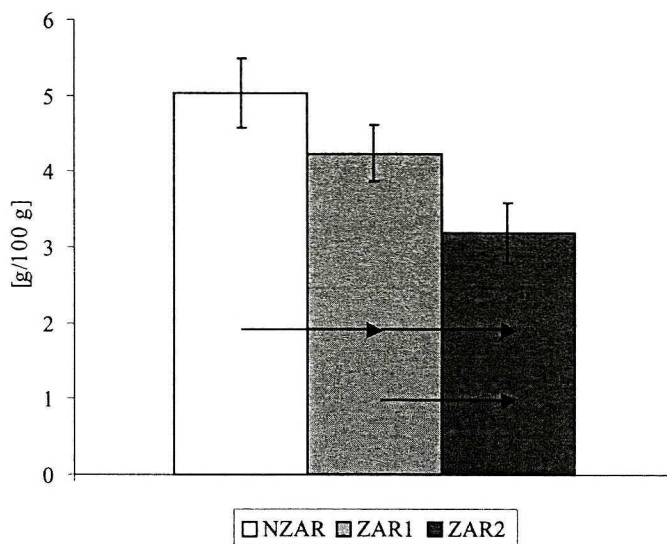
Biometryczną charakterystykę materiału przedstawiono w tabeli 1. U ryb zarażonych plerocerkidami tasiemca obserwowano istotny ($p < 0,01$) spadek poziomu glikogenu w mięśniach i wątrobie (Rys. 1, 2), postępujący wraz ze wzrostem względnej intensywności zarażenia (w mięśniach $r = -0,8492$, w wątrobie $r = -0,7890$; (Rys. 3, 4). Obniżenie stężenia glikogenu postępowało w mięśniach szybciej niż w wątrobie. Przy przeciętnej względnej intensywności inwazji $1,70 \pm 0,09\%$ (w granicach 1,69–1,95%) stężenia glikogenu w mięśniach i wątrobie różniły się w stosunku do osobników nie zarażonych o 21% i 16%, w klasie ryb o względnej intensywności zarażenia przekraczającej 2,0% (przeciętnie $2,58 \pm 0,08\%$) różnice te wynosiły odpowiednio 54% i 37%.

Tabela 1. Biometryczna charakterystyka badanych ryb
Biometrical characteristics of examined fish

	n	W	L	K
nzar	15	210,8 ± 41,1	19,1 ± 1,2	3,00 ± 0,38
zar 1	15	195,7 ± 28,1	19,0 ± 1,3	2,86 ± 0,31
zar 2	15	176,4 ± 32,0	19,3 ± 1,3	2,43 ± 0,28

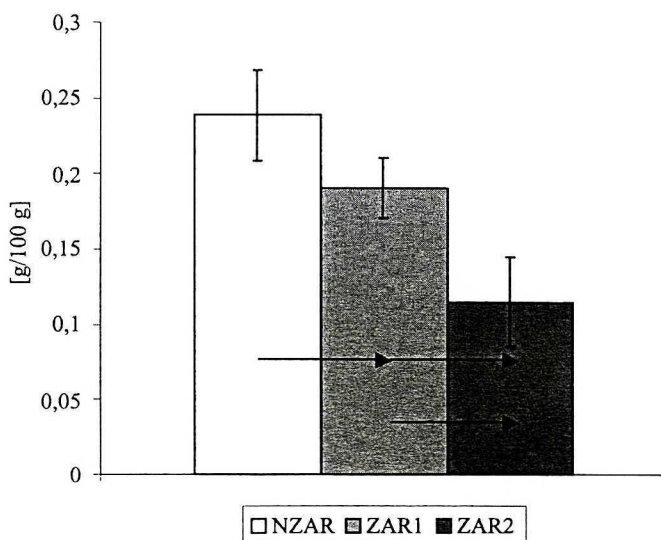
Objaśnienia: nzar – ryby nie zarażone, zar 1 – ryby zarażone plerocerkidami *Ligula intestinalis* o względnej intensywności inwazji mniejszej od 2%, zar 2 – ryby zarażone o intensywności inwazji przekraczającej 2%, n – liczba zbadanych ryb, W – masa ciała [g], L – długość ciała (*longitudo corporis*) [cm], K – współczynnik kondycji wg Fultona.

Explanations: nzar - non-infected fish, zar 1 – fish infected with plerocercoids of *Ligula intestinalis*, with intensity of the infection less than 2%, zar 2 – infected fish with intensity of the infection more than 2%, n – number of examined fish, W – body weight [g], L – body length (*longitudo corporis*) [cm], K – condition coefficient acc. to Fulton.



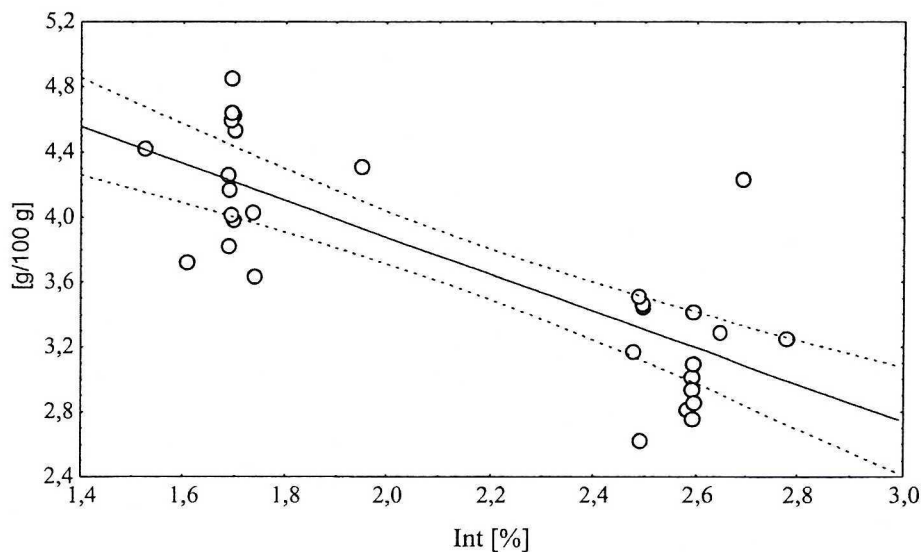
Rys. 1. Stężenie glikogenu (g równoważnych jednostek glukozy/100 g tkanki) w wątrobie badanych ryb: NZAR – ryby nie zarażone, ZAR1, ZAR2 – 1 i 2 klasa względnej intensywności zarażenia, strzałkami wskazano różnice statystycznie istotne ($p < 0,01$)

Glycogen concentration (g of equivalent glucose units/100 g of the tissue) in the liver of examined fish: NZAR – non-infected fish, ZAR1, ZAR2 – 1st and 2nd class of relative intensity of the infection, with arrows significant differences are indicated ($p < 0.01$)



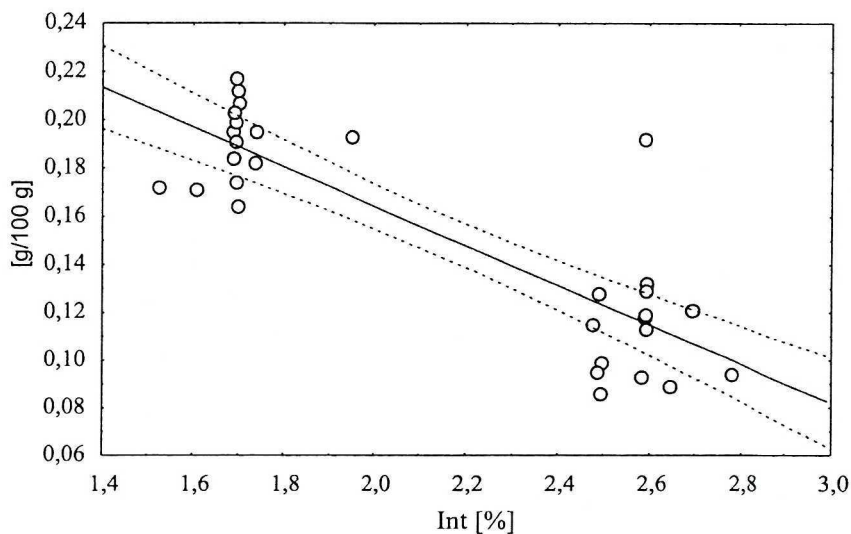
Rys. 2. Stężenie glikogenu (g równoważnych jednostek glukozy/100 g tkanki) w mięśniach szkieletowych badanych ryb, oznaczenia jak na rys. 1

Glycogen concentration (g of equivalent glucose units/100 g of the tissue) in skeletal muscles of examined fish, designations as in Fig. 1



Rys. 3. Zależność między stężeniem glikogenu w wątrobie badanych ryb (g równoważnych jednostek glukozy/100 g tkanki) a względną intensywnością zarażenia (Int), przerywaną linią zaznaczono 95% przedział ufności

Relationship between glycogen concentration in the liver of examined fish (g of equivalent glucose units/100 g of the tissue) and relative intensity of the infection (Int), with dashed line 95% confidence interval is marked



Rys. 4. Zależność między stężeniem glikogenu w mięśniach szkieletowych badanych ryb (g równoważnych jednostek glukozy/100 g tkanki) a względną intensywnością zarażenia (Int), przedział ufności jak na rys. 3

Relationship between glycogen concentration in skeletal muscles of examined fish (g of equivalent glucose units/100 g of the tissue) and relative intensity of the infection (Int), confidence interval as in Fig. 3

DYSKUSJA

Obserwowane u zarażonych ryb istotne obniżenie stężenia glikogenu w tkance wątroby można tłumaczyć skojarzonym z atrofią (*atrophia e compressione*) zwyrodnieniem (paratrofią) tego narządu, powodowanym uciskiem wywieranym przez rozwijające się w jamie ciała plerocerkoidy [14] oraz ograniczeniem dostępności glukozy, będącej substratem w procesie glikogenezy. Podstawowymi czynnikami warunkującymi stężenie glukozy we krwi są: przyjmowanie pokarmu, szybkość wnikania glukozy do mięśni i innych narządów oraz glukostatyczna aktywność wątroby [7]. Powodowana przez pasożyta deformacja kształtu ciała [17] oraz ucisk wywierany przez niego na pęcherz pławny [14] ograniczają aktywność ruchową zarażonej ryby i zmieniają jej behawior [2]. Zmiany te sprzyjają ograniczeniu aktywności żerowania oraz ilościowemu, być może także jakościowemu, zubożeniu diety. Ucisk wywierany przez plerocerkoidy na jelito cienkie może powodować dysfunkcję tego narządu, w tym zaburzenie funkcji resorpcji składników pokarmowych. Dodatkową przyczyną ograniczania ilości glukozy dostępnej dla żywiciela jest przyswajanie tego związku przez plerocerkoidy tasiemca. Izvekova [11, 12] analizując skład płynu jamy ciała leszczy zarażonych plerocerkoidami *Ligula intestinalis* stwierdziła wyraźne obniżenie stężenia cukrów redukujących (17%) w porównaniu z rybami nie zarażonymi. Cukry proste mogą być pozyskiwane przez plerocerkoid z di- i oligosacharydów, o czym świadczy obecność na powierzchni jego tegumentu enzymów amylolitycznych.

Biochemiczne działanie tego pasożyta na metabolizm zarażonej ryby wydaje się być ograniczane istnieniem bariery izolacyjnej, budowanej na jego powierzchni przez makrofagi, fibroblasty i limfocyty (za Guttową i Honowską [10]). Bariera ta nie jest całkowicie szczelna, ponieważ, poza nutrientami, pozwala ona prawdopodobnie na penetrację białek sekrecyjnych plerocerkoida [11], jednak może ona uczestniczyć w inaktywacji jego toksycznych katabolitów.

Hipoglikemia kompensowana jest rozkładem glikogenu wątrobowego z następczym uwalnianiem glukozy do krwi oraz jej resyntezą na drodze glukoneogenezy. Chociaż udział tłuszczowców w tym procesie jest ilościowo ograniczony, ponieważ poza tworzeniem węglowodanów z glicerolu nie istnieje inna droga takiej przemiany, w warunkach niskiej podaży glukozy nasila się beta-oksydacja tych związków, prowadząca do produkcji cząsteczek acetylo-CoA, będącego niezbędnym substratem w cyklu Krebsa [7]. Udział tłuszczowców w kompensacji niedoboru węglowodanów może być zatem jedną z przyczyn obserwowanego uprzednio [21] spadku stężenia lipidów w wątrobie zarażonych ryb.

W przeciwieństwie do glikogenu wątrobowego, glikogen gromadzony w tkance mięśniowej jest łatwo dostępnym źródłem jednostek heksozowych do glikolizy wyłącznie w mięśniach [18]. Wyczerpywanie się rezerw glikogenowych w mięśniach szkieletowych zarażonych ryb spowodowane było prawdopodobnie zwiększonym kosztem wysiłku podczas pływania, po naruszeniu przez pasożyta optymalnej linii opływowej żywiciela [17].

LITERATURA

- [1] Black G. A., J. M. Fraser: *Dynamics of prevalence of Ligula intestinalis (L.) in Catostomus commersoni (Lacepede)*, J. Fish Biol., **25**, 139–146 (1984).
- [2] Brown S. P., G. Loot, B. T. Grenfell, J. F. Guegan: *Host manipulation by Ligula intestinalis: accident or adaptation?*, Parasitology, **123**, 519–529 (2001).
- [3] Claridge P. N., M. W. Hardisty, I. C. Potter, C. V. Williams: *Abundance, life history and ligulosis*

- in the gobies (Teleostei) of the inner Severn Estuary, J. mar. biol. Ass. U. K., **65**, 951–968 (1985).
- [4] Dąbrowski K. R.: *Amino-acid composition of Ligula intestinalis (L.) (Cestoda) plerocercoids and of the host parasitized by these cestodes*, Acta Parasitol. Polon., **27**, 45–48 (1980).
- [5] Dąbrowski K., K. Szpilewski: *Studies on the roach Rutilus rutilus (L.), infected with Ligula intestinalis (L.) plerocercoids (Cestoda, Pseudophyllidea)*, Acta Parasitol. Polon., **27**, 37–44 (1980).
- [6] Dence W. A.: *Studies on Ligula-infected common shiners (Notropis cornutus frontalis Agassiz) in the Adirondacks*, J. Parasitol., **44**, 334–348 (1958).
- [7] Ganong W. F.: *Fizjologia*, PZWL, Warszawa 1994.
- [8] Grabda B.: *Katalog fauny pasożytniczej Polski (Catalogus faunae parasiticae Poloniae). Część II. Pasożyty kręgloustych i ryb (Parasiti cyclostomatorum et pisces)*, PWN, Warszawa, Wrocław 1971.
- [9] Grabda-Kazubska B., B. Baturó-Warszawaska, T. Pojmańska: *Dynamics of parasite infestation of fish in lakes Dgál Wielki and Warniak in connection with introduction of phytophagous species*, Acta Parasitol. Polon., **32**, 1–28 (1987).
- [10] Guttowa A., M. Honowska: *Changes in serum protein fractions in the course of Ligula intestinalis L. plerocercoid infestation in the bream Abramis brama (L.)*, Acta Parasitol. Polon., **21**, 107–114 (1973).
- [11] Izvekova G. I.: *Nekotorye aspekty parazitno-chozjainnykh otnošenij v sisteme Ligula intestinalis (L.) (Cestoda, Pseudophyllidea) - lešč*, Izdatelstvo Rossijskoj Akademii Nauk, Serija Biologičeskaja, **4**, 432–438 (1999).
- [12] Izvekova G. I.: *Some aspects of parasite-host relationship between Ligula intestinalis (Cestoda) and bream (Abramis brama L.)*, Wiad. Parazyt., **44**, 338 (1998).
- [13] Jansson E.: *Acid soluble and insoluble glycogen in human skeletal muscle*, Acta Physiol. Scand., **113**, 337–340 (1981).
- [14] Jara Z., A. Chodyniecki: *Ichtiopatologia*, Wydawnictwo Akademii Rolniczej we Wrocławiu, Wrocław 1999.
- [15] Jeżewski W., G. Karbowski: *Ligula intestinalis (L., 1758) in muscles of bream Abramis brama (L.) from the lake Gosławskie – the first record in Poland*, [in:] 5 slovenské a české parazitologické dni. Program a zborník abstraktov. Stara Lesná, Vysoké Tatry, Slovenská republika, 28–31 mája 2002, 51.
- [16] Kwiatkowski S.: *Blood picture of bream Abramis brama (L.) infected with Ligula intestinalis (L.) plerocercoids*, Wiad. Parazyt., **44**, 345 (1998).
- [17] Loot G., S. Lck, S. P. Brown, S. F. Guegan: *Phenotypic modification of roach (Rutilus rutilus L.) infected with Ligula intestinalis L. (Cestoda: Pseudophyllidea)*, J. Parasitol., **87**, 1002–1010 (2001).
- [18] Murray R. K., D. K. Granner, P. A. Maycs, V. W. Rodwell: *Biochemia Harpera*, PZWL, Warszawa 1995.
- [19] Oktaba W.: *Elementy statystyki matematycznej i metodyka doświadczalnictwa*, PWN, Warszawa 1974.
- [20] Ostrowski W., B. Filipowicz (red.): *Ćwiczenia z chemii ogólnej i fizjologicznej*, PZWL, Warszawa 1980.
- [21] Pokora Z., S. Kwiatkowski: *Poziom lipidów w wątrobie leszczy (Abramis brama) zarażonych plerocerkoidami tasiemca Ligula intestinalis*, Ann. Acad. Med. Siles., w druku.
- [22] Pollard D. A.: *The biology of a landlocked form of the normally catadromous salminiform fish Galaxias maculatus (Jenyns). IV. Effect of cestode and nematode parasites*, Aust. J. Mar. Freshwat. Res., **25**, 105–120 (1974).
- [23] Prost M.: *Choroby ryb*, Polskie Towarzystwo Nauk Weterynaryjnych, Lublin 1994.
- [24] Rzeczowska A., M. Honowska: *Biochemiczne efekty oddziaływania plerocerkoida na żywiciela w układzie tasiemiec Ligula intestinalis (L.) – leszczy Abramis brama (L.)*, Wiad. Parazyt., **34**, 19–27 (1988).
- [25] Szalai A. J., X. Yang, T. A. Dick: *Changes in numbers and growth of Ligula intestinalis in the spottail shiner (Notropis hudsonius), and their roles in transmission*, J. Parasitol., **75**, 571–576 (1989).
- [26] Waluga D., T. Własow: *Występowanie pasożytów u leszcza (Abramis brama L.), płoci (Rutilus rutilus L.) i sandacza (Stizostedion lucioperca L.) we wrocławskim zbiorniku zaporowym na rzece Wiśle*, Wiad. Parazyt., **34**, 65–75 (1988).
- [27] Weckes P. J., B. Penlington: *First record of Ligula intestinalis (Cestoda) in rainbow trout, Salmo gairdneri, and common bully, Gobiomorphus cotidianus, in New Zealand*, J. Fish Biol., **28**, 183–190 (1986).
- [28] Własow T., K. Kukliński, B. Majewska, M. Skrok: *Parazytofauna wzdręgi (Scardinius erythrophthalmus) i leszcza (Abramis brama) z jeziora poddanego oligotrofizacji*, [in:] Mat. XVI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Parazytologicznego, Poznań, 12–13 września 1991, 34.