

WPLYW ZARAŻENIA LARWAMI III STADIUM *ANISAKIS SIMPLEX*  
NA AKTYWNOŚĆ PROTEAZ W PRZEWODZIE POKARMOWYM  
ŚWINEK MORSKICH

JANINA DZIEKOŃSKA-RYNKO<sup>1</sup>, JERZY ROKICKI<sup>2</sup> I ZBIGNIEW JABŁONOWSKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra Biologii Ogólnej, Instytut Biologii i Ochrony Środowiska WSP  
10-561 Olsztyn, ul. Żołnierska 14

<sup>2</sup> Katedra Zoologii Bezkręgowców UG  
81-378 Gdynia, ul. Piłsudskiego 46

THE INFLUENCE OF INFECTION WITH III LARVAL STAGE OF *ANISAKIS SIMPLEX*  
ON THE ACTIVITY OF PROTEASES IN ALIMENTARY TRACT OF GUINEA PIGS\*

Abstract. The studies were carried out on guinea pig males. The animals were infected with 30 larvae (L<sub>3</sub>) of *Anisakis simplex*. After 6 hrs of invasion the animals were dissected. In homogenized pancreas and duodenal contents activities of trypsin were determined. In stomach content activities of pepsin were determined. The activities of trypsin in duodenal contents and in pancreas homogenate from infected animals were lower in comparison with the control animals. The activities of pepsin were higher in infected animals.

WSTĘP

Stwierdzono, że podczas zarażenia larwami (L<sub>3</sub>) *Anisakis simplex* występują rozległe uszkodzenia błony śluzowej przewodu pokarmowego żywiciela. U zarażonych większych ssaków a także u człowieka, larwy zakotwiczą się w ścianie żołądka lub jelita powodując uszkodzenia błony śluzowej (OSHIMA 1972), krwotoki, nekrozę tkanek, nacieki eozynofili (BOUREE i wsp. 1995). VAN THIEL i wsp. (1960) znajdowali larwy *A. simplex* w jelitach operowanych pacjentów. Badaniem mikroskopowym wykazali nacieki ropne we wszystkich warstwach ściany jelita. U małych zwierząt laboratoryjnych (szczur, świnka morska) larwy penetrują ścianę przewodu pokarmowego wędrują do innych narządów. YONG i LOWE (1969) oraz GIBSON (1970) stwierdzili, że u eksperymentalnie zarażonych szczurów, larwy *A. simplex* penetrują ścianę żołądka po upływie godziny od zarażenia; po 3–4 godzinach larwy znajdowano w jamie otrzewnej. Obecność tych larw była przyczyną zmian nekrotycznych

\* The research was supported by grant No 20508807 from the National Committee of Scientific Research, Warszawa.

tkanek żywiciela. W ścianie żołądka stwierdzono nacieki eozynofilne i limfocytarne oraz krwinki czerwone pochodzące ze zniszczonych naczyń krwionośnych. Podobne zmiany obserwowali RUITENBERG i wsp. (1971) u eksperymentalnie zarażonych królików. MYERS (1963) u doświadczalnie zarażonych świnek morskich znajdowała po 8 godz. od zarażenia larwy w trzustce, wątrobie, krezce, tarczycy i tkance tłuszczowej wokół nerek. U dwóch świnek znaleziono pod skórą larwy w cystach. Aktywna wędrówka larw powodowała uszkodzenia mechaniczne w postaci wybroczyn i stanów zapalnych w atakowanych narządach. Mikroskopowo stwierdzono nacieki limfocytów i makrofagów. Zmiany te obserwowano jeszcze po 24 godzinach od zarażenia, a po 48 godzinach ustępowały. Po 6 dniach od zarażenia autorka nie stwierdziła żywych larw w ciele świnek morskich.

W dostępnej literaturze nie znaleziono prac dotyczących wpływu zarażenia larwami ( $L_3$ ) *Anisakis simplex* na aktywność enzymów proteolitycznych przewodu pokarmowego żywicieli przypadkowych, takich jak człowiek bądź inne ssaki lądowe.

Z kolei stwierdzono, że inne nicienie jelitowe, jak *Ascaris suum* i *Ascaridia galli* wpływają na zmianę aktywności enzymów proteolitycznych w przewodzie pokarmowym i trzustce żywiciela (HURWITZ i wsp. 1972b, ŻÓŁTOWSKA i wsp. 1989, 1995).

W niniejszym doświadczeniu postanowiono zbadać, czy zarażenie larwami ( $L_3$ ) *A. simplex* wpływa na zmianę aktywności enzymów proteolitycznych w przewodzie pokarmowym świnek morskich.

#### Material i metody

Badania przeprowadzono na 10 świnkach morskich wyrównanych pod względem wieku, masy ciała i jednakowej płci (samce). Grupę doświadczalną (5 osobników) zarażano dożołądkowo 30 larwami ( $L_3$ ) *Anisakis simplex* zawieszonych w roztworze 0,9% NaCl. Larwy pozyskiwano ze śledzi odłowionych w Morzu Bałtyckim. Do czasu użycia larwy przechowywano w roztworze TYRODA w temperaturze  $+4^{\circ}\text{C}$ . Zwierzętom z grupy kontrolnej w ten sam sposób podawano roztwór NaCl. Sekcje zwierząt przeprowadzono po 6 godz. od zarażenia. Przewód pokarmowy i inne narządy przeszukiwano na obecność wędrujących larw.

Do oznaczenia aktywności enzymów proteolitycznych pobierano z żołądka i dwunastnicy po 1 g treści pokarmowej i dodawano do niej po 5 ml soli fizjologicznej. Po odwirowaniu oznaczano w supernatancie z treści żołądka aktywność pepsyny, zaś z treści dwunastnicy aktywność trypsyny. Wyciągi z trzustki przygotowywano metodą opisaną przez ŻÓŁTOWSKĄ i wsp. (1989). Aktywność pepsyny i trypsyny oznaczano powszechnie stosowaną metodą ANSONA według KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ (1982). Wyniki wyrażano w milijed-

nostkach ANSONA (mUA) przeliczając je na miligram białka oznaczanego metodą LOWREGO i wsp. (1951).

Wyniki

Większość larw znajdowała się w treści bądź w ścianie żołądka oraz jelicie cienkim (tab.). Niektóre larwy zdążyły przebić ścianę żołądka i znajdowały się

TABELA

Aktywność proteaz [w mUA] oraz liczba i miejsce znajdowanych larw *A. simplex* w przewodzie pokarmowym świnek morskich

TABLE

The activity of proteases [in mUA] and number and place of sojourn *A. simplex* larvae in alimentary tract of guinea pigs

	Nr świnki morskiej No. of guinea pig	Świnki morskie grupy зараżonej Guinea pigs of infected group					Grupa kontrolna Control group	
		I	II	III	IV	V	Średnia arytmetyczna dla 5 świnek Arithmetic mean for 5 guinea pigs	
Liczba i miejsce znajdowanych larw Number and place of sojourn larvae	na zewnątrz żołądka outside of stomach	2	1	2	3	1	1,8	0
	w ścianie żołądka in stomach wall	3	4	5	1	2	3	0
	w treści żołądka in stomach contents	6	5	6	8	10	7	0
	w dwunastnicy in duodenum	4	3	2	1	0	2	0
Aktywność enzymów w: Activity of enzymes in:	żołądka stomach	2,14	2,71	2,76	2,64	2,44	2,54	1,63
	dwunastnicy duodenum	3,26	2,75	3,37	3,13	3,12	3,13	11,13
	trzustce pancreas	10,02	19,80	18,22	17,09	16,28	16,28	23,12

nofilne i limfocytów krwi (1971) u eksperymentalnie zarazy w trzustce, dwóch świnek powodowała ataków i makrożeńia, a po 48 godzinie stwierdziła

o zarazy steolitycznych zwierząt bądź

o *Ascaridia* w przewodzie pokarmowym i wsp.

o zarazy larwami steolitycznych

o znalezionych pod mikroskopem świadek *Anisakis simplex* ze śledzi odchowiwano w kontrolnej grupie i przeprowadzano poszukiwania

o pobrano z żołądka 5 ml soli w treści żołądka i jeliciny. Wyciągi i wsp. (1989). Wyciągi i wsp. (1989). Wyciągi i wsp. (1989). Wyciągi i wsp. (1989).

na zewnętrznej jego ścianie. Nie znaleziono larw w okolicach trzustki bądź innych narządów wewnętrznych.

Zaobserwowano, że zarażenie larwami *A. simplex* wpływa na zmianę aktywności proteaz w przewodzie pokarmowym świnek morskich. W dwunastnicy aktywność trypsyny u zwierząt doświadczalnych była ponad trzykrotnie niższa niż u zwierząt kontrolnych. Tak samo oznaczana aktywność trypsyny w trzustce zwierząt doświadczalnych była niższa niż u zwierząt kontrolnych. Odwrotną zależność zaobserwowano przy oznaczaniu aktywności pepsyny w treści żołądkowej. U zwierząt zarażonych była ona znacznie wyższa niż u zwierząt kontrolnych.

#### Dyskusja

Według CASTRO (1981) obecność pasożytów w jelitach zwierząt ma wpływ na fizjologię układu pokarmowego. Obserwuje się między innymi zmiany sekrecji hormonów, takich jak sekretyna i cholecystokina, regulujących wydzielanie trzustkowe. Według LEE i FOSTER (1995) obecność nicieni w jelicie zarażonych zwierząt obniża aktywność perystaltyczną jelita cienkiego. Mechanizm tego zjawiska jest wciąż mało poznany. BAREJ i wsp. (1996) uważają, że to zjawisko można wyjaśnić obserwowanym wzrostem poziomu esterazy cholinowej, obficie wytwarzanej przez nicienie. Przypuszczalnie enzym ten rozkłada acetylcholinę, główny transmittor w neuronach zwojowych i włóknach parasympatycznych zazwojowych, aktywujących mięśniówkę żołądka i jelita. Również dużą rolę, według powyższych autorów, przypisuje się innemu czynnikowi, białku VIP-podobnemu, wytwarzanemu przez helminty. Powszechnie wiadomo, że VIP (wazoaktywny peptyd jelitowy) jest neurotransmiterem wytwarzanym w dużej ilości w interneuronach jelita, który, m.in. hamując przewodnictwo w cholinergicznym neuronach zwojów jelitowych, doprowadza do obniżenia aktywności ruchowej jelit. FRIELING i wsp. (1994) opisują u zarażonych przez *Trichinella spiralis* świnek morskich gromadzenie się mastocytów w bezpośrednim sąsiedztwie neuronów jelitowych i wzajemne ich oddziaływanie na siebie. Według tych autorów antygeny nicieni tworząc kompleks z IgE oddziałują na mastocyty wywołując gwałtowną ich degranulację i rozpad, czemu towarzyszy uwalnianie histaminy i serotoniny. Oba czynniki są odpowiedzialne za pobudzenie wydzielania soków trawiennych i elektrolitów. W warunkach patologicznych, przy wysokim wzroście ich wytwarzania, działanie to staje się wyniszczające dla żywiciela. Przy wysokim poziomie serotoniny w ścianie jelita, następuje zahamowanie normalnej perystaltyki jelita. Do jakich granic zależność ta może być uznana za mechanizm kompensacji fizjologicznej, a kiedy rozpoczyna się patologia, autorzy nie podejmują się rozstrzygnięcia. Zmiany aktywności trypsyny i pepsyny obserwowane w niniejszym doświadczeniu mogą być spowodowane

obe  
mo  
w  
prz  
róv  
pej  
lar  
try  
cze  
try  
prc  
(19  
mc  
ore  
cei  
„Z  
i N  
nic  
As  
(H

BAJ  
Bo  
CA  
FR  
GT  
GC  
Hc  
Hu  
—  
Ju

trzustki bądź  
 za na zmianę  
 1. W dwunast-  
 ad trzykrotnie  
 ność trypsyny  
 kontrolnych.  
 ości pepsyny  
 ie wyższa niż

zają ma wpływ  
 nymi zmiany  
 regulujących  
 icieni w jelicie  
 kiego. Mecha-  
 uważają, że to  
 razy cholino-  
 ten rozkłada  
 włóknach pa-  
 ądka i jelita.  
 e się innemu  
 inty. Powsze-  
 rtransmitterem  
 n.in. hamując  
 , doprowadza  
 (1994) opisują  
 madzenie się  
 wzajemne ich  
 cieni tworząc  
 owną ich de-  
 toniny. Oba  
 trawiennych  
 wroście ich  
 Przy wysokim  
 ie normalnej  
 ó uznana za  
 się patologia,  
 ości trypsyny  
 spowodowane

obecnością larw *A. simplex* w przewodzie pokarmowym zarażonych świnek morskich i działaniem toksyn wytwarzanych przez te nicienie. Najwięcej larw w tym czasie znajdowano w treści bądź ścianie żołądka, co mogło być przyczyną wzrostu aktywności pepsyny w żołądku zarażonych świnek, w porównaniu z oznaczoną aktywnością u świnek kontrolnych. Zmiany aktywności pepsyny w treści żołądka mogą być także wynikiem mechanicznego działania larw na ścianę żołądka, a tym samym na wydzielanie żołądkowe. Aktywność trypsyny w dwunastnicy zarażonych świnek morskich w porównaniu z oznaczeniami dla świnek z grupy kontrolnej była niższa. Wpływ na aktywność trypsyny, oprócz wymienionych czynników, mogą mieć także inhibitory proteaz występujące u larw *A. simplex*, oznaczone przez MORRIS i SAKANARI (1994). Być może, dzięki endogennym inhibitorom proteaz, larwy *A. simplex* mogą neutralizować działanie proteaz ze środowiska. GOODMAN i wsp. (1983) oraz MARTZEN i wsp. (1985) wykazali to u *Ascaris suum*. Połączoną z fluoresceiną trypsynę i chymotrypsynę znajdowali w różnych częściach ciała pasożyta. „Znikanie” proteaz ze środowiska *A. suum* obserwowali wcześniej JUHASZ i MATSKASI (1979) oraz HOGAN (1980). Zmiany aktywności proteaz w dwunastnicy i trzustce obserwowano także podczas zarażenia świnek morskich larwami *Ascaris suum* (ŻÓŁTOWSKA i wsp. 1989) i kurcząt larwami *Ascaridia galli* (HURWITZ i wsp. 1972a, 1972b, ŻÓŁTOWSKA i wsp. 1995).

#### LITERATURA

- BAREJ W., ZABIELSKI R., LEŚNIEWSKA V. 1996. Zaburzenia fizjologicznych procesów trawiennych u zwierząt. Konferencja: Choroby zakaźne i inwazyjne przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt, Kazimierz Dolny: 53-59.
- BOURÉE P., PAUGAM A., PETITHORY J. C. 1995. Anisakidosis: Report of 25 cases and review of the literature. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 18 (2): 75-84.
- CASTRO G. A. 1981. Gastrointestinal function in the parasitized host. In: Isotopes and radiation in parasitology IV. Panel proceedings series. Vienne. Int. Atomic Energy Agency: 143-153.
- FRIELING T., PALMER J. M., COOKE H. J., WOOD J. D. 1994. Neuroimmune communication in the submucous plexus of guinea pig colon after infection with *Trichinella spiralis*. *Gastroenterology* 107: 1602-1609.
- GIBSON D. I. 1970. Aspects of the development of 'Herringworm' (*Anisakis* sp. larva) in experimentally infected rats. *Nytt. Mag. Zool.* 18 (2): 175-187.
- GOODMAN R. B., MARTZEN M. R., PEANASKY R. J. 1983. Trypsin inhibitors from *Ascaris*: The reactive P<sub>1</sub> site of the inhibitors (a correction) and location of the inhibitors and host trypsin in cross-sections of *Ascaris*. *Acta. Biochim. Polon.* 30: 233-244.
- HOGAN B. J. 1980. Function of the gut in the parasitic roundworm *Ascaris lumbricoides* var. *suum*. *Proc. South Dakota Acad. Sci.* 59: 283.
- HURWITZ S., SHAMIR N., BAR A. 1972a. Protein digestion and absorption in the chick: effect of *Ascaridia galli*. *Am. J. Clin. Nutr.* 25: 311-316.
- — NITSAN 1972b. Effect of *Ascaridia galli* on lumen activity of enzymes in the intestine of chicks. *Poultry Sci.* 51: 1462-1463.
- JUHASZ S., MATSKASI I. 1979. Proteolytic enzymes and enzyme inhibitors in *Ascaris suum*. III. *In vitro* study of proteinase inactivation by parasite. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 27: 93-97.

- KŁYSZEJKO-STEFANOWICZ L. 1982. Ćwiczenia z biochemii. Warszawa—Poznań, PWN.
- LEE D. L., FOSTER N. 1995. Gastrointestinal nematodes and host gut motility. *Helminthologia* 31: 107-110.
- LOWRY O. H., ROSENBOUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- MARTZEN M. R., GEISE G. L., HOGAN B. J., PEANASKY R. J. 1985. *Ascaris suum*: localization by immunochemical and fluorescent probes of host proteases and parasite proteinase inhibitors in cross-sections. *Exp. Parasitol.* 60: 139-149.
- MORRIS S. R., SAKANARI J. A. 1994. Characterization of the serine protease and serine protease inhibitor from the tissue-penetrating nematode *Anisakis simplex*. *J. Biol. Chem.* 269: 27650-27656.
- MYERS B. 1963. The migration of *Anisakis*-type larvae in experimental animals. *Canad. J. Parasit.* 41: 147-148.
- OSHIMA T. 1972. *Anisakis* and anisakiasis in Japan and adjacent area. In: K. Morishita, Y. Komiya, H. Matsubayashi (eds), Progress of Medical Parasitology in Japan 4, Meguro Parasitological Museum, Tokyo: 301-393.
- RUITENBERG E. J., BERKVEN J. M., DUYZINGS J. M. 1971. Experimental *Anisakis marina* infections in rabbits. *J. Comp. Path.* 81: 157-163.
- VAN THIEL P. H., KUIPERS F. C., ROSKAM T. H. 1960. A nematode parasitic to herring, causing acute abdominal syndromes in man. *Trop. Geograph. Medicine* 12: 97-113.
- YOUNG P. C., LOWE D. 1969. Larval nematodes from fish of the subfamily Anisakinae and gastro-intestinal lesions in mammals. *J. Comp. Path.* 79: 301-313.
- ŻÓLTOWSKA K., DZIEKOŃSKA-RYNKO J., JABLONOWSKI Z. 1989. Aktywność trypsyny i alfa amylazy w trzustce świnek morskich. I. Wpływ dawki zaraziowej i czasu trwania inwazji *Ascaris suum* Goeze, 1782. *Wiad. Parazytol.* 35: 565-570.
- SUDOŁ K., JABLONOWSKI Z. 1995. Aktywność alfa-amylazy, trypsyny i lipazy w trzustce i treści dwunastniczej kurcząt zarażonych *Ascaridia galli* żywionych paszą o różnej zawartości białka. *Ibid.* 41: 217-220.

Otrzymano 29 I 1997, zaakceptowano 19 IV 1997