

ENZYMY KATABOLIZMU WĘGLOWODANÓW Z *CYSTITIDICOLA FARIONIS*  
(*CYSTITIDICOLIDAE*)

KRYSTYNA ŻÓLTOWSKA<sup>1</sup>, ELŻBIETA ŁOPIEŃSKA<sup>1</sup>, JERZY ROKICKI<sup>2</sup>,  
MAŁGORZATA DMITRYJUK<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zakład Biochemii, Wydział Biologii, UWM, 10-561 Olsztyn, ul. Żołnierska 14

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

THE ENZYMES OF CARBOHYDRATES METABOLISM FROM *CYSTITIDICOLA*  
*FARIONIS* (*CYSTITIDICOLIDAE*)

**Abstract.** The content of glycogen, glucose and trehalose was measured in larvae and adults of *Cystidicola farionis*, the parasite isolated from the swim bladder of *Osmerus eperlanus* from Vistula Lagoon. Activity of glycogen phosphorylase,  $\alpha$ -amylase, glucoamylase, maltase, trehalase, and trehalose phosphorylase were measured. The highest activity was recorded for  $\alpha$ -amylase  $10,07 \pm 0,97$  mu/mg and  $7,47 \pm 0,24$  mu/mg, next maltase  $1,34 \pm 0,63$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$  and  $2,06 \pm 1,65$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$  respectively for larvae and adults. The activity of glucoamylase was nearly the same for adults and larvae (about  $0,20$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ). The trehalase activity was higher at adults ( $0,49 \pm 0,42$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ) than at larvae ( $0,18 \pm 0,12$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ). The activity of glycogen phosphorylase was much higher at larvae ( $3,58 \pm 1,49$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ) than at adults parasite ( $0,10 \pm 0,02$   $\mu\text{mol}/\text{mg}$ ). The trehalose phosphorylase was present in both stages of parasite, but its activity was low. The content of glycogen and glucose was two-times higher in the adults' body than in larvae.

WSTĘP

Nicień *Cystidicola farionis* jest pasożytem pęcherza pławnego ryb łososiowatych i stynkowatych, rzadziej występuje u przedstawicieli innych rodzin. W Europie jego żywicielem najczęściej jest troć (*Salmo trutta*) i stynka (*Osmerus eperlanus*) (MORAVEC 1994). Mimo iż jest pasożytem o wysokiej prewalencji, powodującym przy masywnej inwazji zmiany zapalne, a nawet zniszczenie ściany pęcherza pławnego, niewiele informacji znaleziono o jego biochemii i fizjologii (BOGOLEPOVA 1978, 1979, VALTONEN 1978, CUSACK i CONE 1986, WILLERS i wsp. 1991, OKAKA i KOURA 2000).

W niniejszej pracy postanowiono określić aktywność najważniejszych enzymów rozkładających węglowodany u larw i dorosłych osobników *C.*

*farionis* oraz ustalić zawartość głównych cukrów w ciele pasożyta. Wydaje się, że glukoza i jej wyższe polimery jak trehaloza i glikogen będą ważnymi związkami energetycznymi dla tego tkankowego pasożyta, podobnie jak ma to miejsce u larw innego pasożytniczego nicienia ryb *Anisakis simplex* (ŻÓLTOWSKA i wsp. 2000). Sprawdzenie tej sugestii stało się celem tej pracy.

## MATERIAŁ I METODY

Nicienie izolowano z pęcherzy pławnych stynki (*Osmerus eperlanus*), odławianej w Zatoce Gdańskiej od października 2000r. do lutego 2001r. Materiałem do badań były larwy L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub>, osobniki młodociane i dojrzałe postaci *C. farionis*. Po oczyszczeniu z resztek tkanki żywiciela i przepłukaniu w 0.65% roztworze NaCl łączono larwy obu stadiów oraz postaci dojrzałe z młodocianymi. Wyciągi do badań przygotowywano homogenizując naważki z 5 objętościami 0,65% NaCl. Homogenat wirowano przy 2 000 x g przez 10 min. w temp. 4<sup>o</sup> C. W uzyskanym supernatancie oznaczano zawartość białka wg BRADFORDA (1978), glikogenu wg SØLLINGA i ESMANNA (1975), glukozę i trehalozę metodami enzymatycznymi z użyciem odpowiednio oksydazy glukozy lub trehalazy izolowanej z *Saccharomyces cerevisiae* (KIENLE i wsp. 1993). Mierzono w nim również aktywność  $\alpha$ -amylazy wg Carawaya (za KARPIAKIEM 1974), wyrażano ją w milijednostkach międzynarodowych (mu). Aktywność hydrolityczną  $\alpha$ -glukozydaz glukoamylazy, maltazy i trehalazy oznaczano wg DAHLQVISTA (1968). Aktywność fosforylasy glikogenowej mierzono w kierunku rozkładu glikogenu, mierząc ilość tworzonego glukozy-1-fosforanu metodą enzymatyczną wg MICHALA (1984). Fosforylazę trehalozy oznaczano wg WANNETA i wsp. (1998). Aktywność enzymatyczną wyrażano w  $\mu$ molach produktów reakcji w przeliczeniu na 1 mg białka. Prezentowane wyniki są średnimi z trzech do pięciu powtórzeń.

## WYNIKI I DYSKUSJA

Stężenie cukrów u *C. farionis* nie było wysokie (Tabela 1). Poziom glikogenu wynosił ok. 2,5% u larw i ok. 5% u dorosłych pasożytów. Jest to zgodne ze spostrzeżeniami VON BRANDA (1978) i SELVANA i wsp. (1993), że nicienie żywiące się krwią lub tkankami żywiciela znajdują się w bardziej stabilnej sytuacji, jeśli chodzi o dostępność pożywienia, niż na przykład pasożyty jelitowe. Dlatego też pula ich rezerwowych węglowodanów nie musi być zbyt wielka.

Zawartość badanych składników w ciele dorosłych osobników była zdecydowanie wyższa niż u stadiów larwalnych *C. farionis* (Tabela 1). Stężenie glukozy i glikogenu było około dwukrotnie wyższe u dorosłych pasożytów niż

u stadiów larwalnych. Również poziom trehalozy był u nich o prawie 50 % wyższy niż u larw. Różnice te wynikać mogą z większego zapotrzebowania energetycznego osobników dojrzałych płciowo spowodowanego ich funkcjami rozrodczymi.

TABELA 1.

Zawartość węglowodanów w ciele *Cystidicola farionis* (mg/g)

TABLE 1.

The concentration of carbohydrates in *Cystidicola farionis* body (mg/g)

Składnik Compounds	Larwy Larvae	Dorośle Adults
Glikogen Glycogen	25,33 ± 20,10	50,37 ± 33,78
Trehaloza Trehalose	2,07 ± 1,25	2,97 ± 2,48
Glukoza Glucose	0,66 ± 0,34	1,36 ± 1,24

Wyższe stężenie glikogenu u postaci dorosłych pasożyta wynikać może również z niższej aktywności enzymów rozkładających ten polisacharyd u dorosłych *C. farionis* niż u larw (Tabela 2). U stadiów larwalnych pasożyta aktywność fosforylasy glikogenowej była prawie 35-krotnie wyższa niż dorosłych osobników. Również aktywność drugiego z najważniejszych enzymów katabolizmu glikogenu  $\alpha$ -amylazy była u nich prawie o 25% wyższa. Natomiast aktywność glukoamylazy w materiale pochodzącym z obu grup rozwojowych, była podobna. Z kolei pośród disacharydaz maltaza wyraźnie przewyższała aktywność trehalazy zarówno u larw jak i dorosłych pasożytów. Oba porównywane enzymy wykazywały wyższą aktywność u dorosłych *C. farionis* niż u stadiów larwalnych (Tabela 2).

Stwierdzono, że w wyciągach z *C. farionis* jest obecny enzym rozkładający na drodze fosforolitycznej trehalozę - fosforylaza trehalozy. Po raz pierwszy u nicieni opisano jej występowanie u *Ascaris suum* (DMITRYJUK i wsp. 2000). Jest to więc kolejny przedstawiciel gromady Nematoda, u którego wykazano obecność fosforylasy trehalozy. Aktywność tego enzymu w ciele osobników dorosłych *C. farionis* była o połowę wyższa niż u larw.

Porównanie aktywności enzymów obu torów katabolizmu glikogenu - hydrolitycznego i fosforolitycznego, obecnych u larw pasożytów ryb z rzędu *Clupeiformes*, nicieni należących do rodzin *Anisakidae* i *Cystidicolidea* pozwala zauważyć pewne ich odrębności. Aktywność enzymów hydrolizujących glikogen, to jest  $\alpha$ -amylazy i glukoamylazy, u larwy *C. farionis* była zdecydowanie niższa w porównaniu z występującą u trzeciego stadium larwalnego *A. simplex*.

TABELA 2.

Aktywność enzymów katabolizmu cukrowego z *Cystidicola farionis* ( $\mu\text{mol/mg}$ )

TABLE 2.

The activity of enzymes of carbohydrate metabolism from *Cystidicola farionis* ( $\mu\text{mol/mg}$ )

Enzym The enzyme	Larwy Larvae	Dorośle Adult
$\alpha$ -Amylaza $\alpha$ -Amylase	$10,07 \pm 0,97^*$	$7,47 \pm 0,24^*$
Glukoamylaza Glucoamylase	$0,20 \pm 0,09$	$0,22 \pm 0,09$
Maltaza Maltase	$1,34 \pm 0,63$	$2,06 \pm 1,65$
Trehalaza Trehalase	$0,18 \pm 0,12$	$0,49 \pm 0,42$
Fosforylaza trehalozy Trehalose phosphorylase	$0,067 \pm 0,013$	$0,091 \pm 0,011$
Fosforylaza glikogenowa Glycogen phosphorylase	$3,58 \pm 1,49$	$0,10 \pm 0,02$

\* Aktywność  $\alpha$ -amylazy podano w  $\mu\text{u/mg}$ .\* The activity of  $\alpha$ -amylase was expressed in  $\mu\text{u/mg}$ 

Z kolei aktywność enzymu toru fosforolitycznego - fosforylazy glikogenowej była u nich o rząd wielkości wyższa ( $3,58 \pm 1,49 \mu\text{mol/mg}$ ) niż u larw *A. simplex* ( $0,18 \pm 0,03 \mu\text{mol/mg}$ ) (ŻÓŁTOWSKA i wsp. 2000). Różnice te wiążąc można z odmiennymi warunkami bytowania obu pasożytów, ich lokalizacją w organizmie ryb. *C. farionis* żyje i rozwija się w pęcherzu pławnym, w warunkach tlenowych, gdy larwy *A. simplex* spotyka się w układzie pokarmowym lub jamie ciała, gdzie ilość tlenu jest zdecydowanie niższa.

Podziękowania: Autorzy dziękują Dr. Haraldowi Zähringerowi z Institute für Biochemie und Molekularbiologie z Freiburg Universität za cenne rady oraz Dr. Stefanowi Hohmannowi z Institute for Cell and Molecular Biology/ Microbiology z Göteborg University za szczep mutanta *suc2 S. cerevisiae* z którego izolowano kwaśną trehalazę.  
Acknowledgegment: The authors thank Dr. Harald Zähringer from Institute für Biochemie und Molekularbiologie of Freiburg Universität for his valuable pieces of advice, and Dr. Stefan Hohmann from Institute for Cell and Molecular Biology/ Microbiology of Göteborg University for his gift *suc2* mutant of *S. cerevisiae* from which acid trehalase was isolated.

## LITERATURA

- BOGOLEPOVA I. I. 1978. Electron microscopic studies on the intestinal cells of *Cystidicola farionis* (SPIRURA). *The IV-th International Congress of Parasitology, 10-26 August 1978, Warsaw*. Short communications, sec. B. 49.
- BOGOLEPOVA I. I., KUZNETSOVA L. V. 1979. DNA content in the middle section of the intestine of parasitic nematodes from different taxonomic i ecological groups. *Sbornik Nauchnykh Trudov, Leningradskii Vet. Inst.* 56: 20-24.
- CUSACK R., CONE D. K. 1986. A review of parasites as vectors of viral and bacterial diseases of fish. *J. Fish Dis.* 9: 167-171.
- DAHLQVIST A. 1968. Assay of intestinal disaccharidases. *Anal. Biochem.* 22: 99-107.
- DMITRYJUK M., ŻÓŁTOWSKA K., ŁOPIEŃSKA E. 2000. Aktywność trehalazy i fosforylasy trehalozy w tkankach *Ascaris suum* Goeze 1782 (Nematoda). *Streszczenia XXXVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego Poznań 2000*. P05-69, 126.
- KARPIAK S. E. 1974. Hydrolazy działające na związki glikozydowe. W: *Enzymologia kliniczna* (Szczeklik, E. red.), PZWL, Warszawa. 332-337.
- KIENLE I., BURGERT M., HOLZER. H. 1993. Assay of trehalose with acid trehalase purified from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 9: 607-611.
- MICHAL G. 1984. D-Glucose 1-phosphate. W: *Methods of enzymatic analysis*. (H.U. Bergmeyer Ed.), Verlag Chemie, Weinheim, v. 6, 185-191.
- MORAVEC F. 1994. Parasitic nematodes of freshwater fishes of Europe. Kulwer Academic Publishers, Dordrecht/ Boston/London. Pp.360-366.
- OKAKA C. E., KOURA E. A. 2000. The ecology of endohelminth parasites of fish in the Driffield trout stream, Yorkshire, England *J. Aqua. Sci.* 15: 41-45.
- SØLLING, H., ESMANN W. 1975. A sensitive method of glycogen determination in the presence of interfering substances utilizing the filter - paper technique. *Anal. Biochem.* 68: 664-668.
- VALTONEN E. T. 1978. *Cystidicola farionis* as a swimbladder parasite of the whitefish in the Bothnian Bay. *J. Fish. Biol.* 13: 557-561.
- WANNET W. J. B., HUUB J. M., WISSELINK H. W., VAN DER DRIF C. H., LEO J., VAN GRINSVEN L. D., VOGELS G. D. 1998. Purification and characterization of trehalose phosphorylase from the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1425: 177-188.
- WILLERS W. B., DUBIELZIG R. R., MILLER L. 1991. Histopathology of the swim bladder of the cisco due to the presence of the nematode *Cystidicola farionis* Fischer. *J. Aqua. Anim. Health* 3: 130-133.
- ŻÓŁTOWSKA K., ŁOPIEŃSKA E., ROKICKI J. 2000. Content of carbohydrates and activity of sugar metabolism enzymes present in stage III larvae of *Anisakis simplex*. *Acta Parasitol.* 45: 186.

