

Sesja 2

Rozmnażanie i rozwój pasożytów

***Heligmosomoides polygyrus*: rozwój wolno żyjących stadiów hamowany przez roślinne triterpenoidy pentacykliczne**

***Heligmosomoides polygyrus*: the development of free living stages inhibited by plant pentacyclic triterpenoids**

Maria Doligalska¹, Monika Grzelak¹, Marzena Laskowska¹, Katarzyna Donskow-Schmelter¹, Agnieszka Chołuj², Ewa Wiktorowska², Anna Szakiel² i Wirginia Janiszowska²

¹Zakład Parazytologii, Instytut Zoologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; E-mail: mdolig@biol.uw.edu.pl

²Zakład Biochemii Roślin, Instytut Biochemii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

Pomimo opracowania wielu sposobów zwalczania nicieni, tylko nieliczne są skuteczne, ale ze względów ekonomicznych i szybko pojawiającej się lekooporności nie mogą być powszechnie stosowane. Pentacykliczne triterpenoidy roślinne mogą zmieniać przepuszczalność kutikuli, modyfikować skład glikoprotein larw inwazyjnych, czy też zmieniać aktywność enzymów, zaburzając proces linienia nicieni. Wykorzystanie anty-pasożytniczych właściwości roślin wydaje się obiecującą metodą, nie tylko do hamowania rozwoju form dyspersyjnych nicieni, ale i osłabiania ich inwazyjności. Badano wpływ różnych mieszanin i pojedynczych związków roślinnych na rozwój wolno żyjących form *H. polygyrus*. Nicienie hodowano na podłożu agarowym uzupełnionym we frakcję glikozydów kwasu oleanolowego (OL) z korzeni buraka ćwikłowego, glukuronozydów OL z kwiatów nagietka lekarskiego oraz mieszaninę kwasu ursolowego i oleanolowego z owoców borówki czernicy. Hodowlę prowadzono w ciągu 6 dni. Po 24 godzinach określono procent jaj nicienia, w których była zahamowana embriogeneza. W 48 godzinie oznaczano procent larw L1, a po 7 dniach liczone żywe larwy. Wykazano, że wolne kwasy oleanolowy i jego izomer — kwas ursolowy praktycznie nie hamują rozwoju nicienia. Natomiast glikozydowe pochodne OL z buraka o stężeniu 350 µg ml⁻¹ opóźniły rozwój larwy w jajach, a w ciągu 7 dni o 10% obniżyły żywotność larw. Z kolei glukuronozidy OL z nagietka w stężeniu 400 µg ml⁻¹ w nieznacznym stopniu zmniejszyły procent wyklutych larw L1, ale aż o 50% obniżyły żywotność L3. W teście na przeżywanie larw L3 efekt toksyczny glikozydów OL z buraka stwierdzono po 30 dniach, a glukuronozydów z kwiatów nagietka już po 14 dniach. Uzyskane wyniki wskazują, że jedynie glikozydowe pochodne pentacyklicznego kwasu triterpenowego hamują w różnym stopniu, w zależności od budowy części cukrowej, rozwój form wolno żyjących *H. polygyrus*.

Preliminary study on the effect of power grid-frequency magnetic field (ELFMF) on hatching of *Fasciola hepatica* miracidia and fertility and survival rate of the snail *Lymnaea truncatula* infected with the liver fluke

Lidia Kołodziejczyk¹, Wanda Kuźna-Grygiel¹ and Bolesław Gonet²

¹Chair and Department of Biology and Medical Parasitology

²Chair and Department of Medical Biophysics, Pomeranian Medical University, al. Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin, Poland; E-mail: lkolo@sci.pam.szczecin.pl

The aim of this study was to examine the effects of extremely low-frequency magnetic field (ELFMF) on the hatching of *Fasciola hepatica* miracidia, as well as on the fertility and survival rate of its intermediate host, the snail *Lymnaea truncatula*.

Fasciola hepatica eggs were exposed to alternating electromagnetic field (ELFMF) at frequency 50 Hz and density 2 mT (rms) during embryogenesis for 10 days. The study has shown an accelerated hatching rate of the *F. hepatica* miracidia exposed to ELFMF by 2.4 times as compared with the control (non-exposed) group.

The *L. truncatula* snails were divided into three groups; the snails of groups I and II were infected with *F. hepatica* miracidia developed from the control eggs culture, while those of group III were infected with the eggs incubated under ELFMF. The snails of groups II and III were next exposed to ELFMF for 53 days, whereas those of group I were placed outside ELFMF.

At 14 dpi (days post infection), we found a significant decrease in the number of cocoons laid by group III snails compared with the control. Also, a significant drop was observed in the number of group III snails at 42 dpi. Increased mortality and a lower number of cocoons laid by group III snails have probably resulted from enhanced stimulation of metacercarial parthenogenetic reproduction in consequence of infecting the molluscs with miracidia previously developed in the ELFMF-exposed environment.

Zarażenie doświadczalne świnek wietnamskich larwami inwazyjnymi *Elaphostrongylus cervi*

Experimental infection of vietnamese pigs by invasive larvae of *Elaphostrongylus cervi*

Izabela Kuligowska i Aleksander W. Demiaszkiewicz

Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego, Polska Akademia Nauk, ul. Twarda 51/55, 00-818 Warszawa;
E-mail: kuligowska@twarda.pan.pl

W celu zbadania podatności Suidae na elafostromylozę zarażono doświadczalnie 6 świnek wietnamskich w wieku 3,5 miesiąca doustnie dawkami 500, 1000, 2000, 3000, 5000 i 10000 larw inwazyjnych *Elaphostrongylus cervi*. Po zarażeniu zwierzęta poddawano codziennej obserwacji w celu stwierdzenia klinicznych objawów inwazji. Nie zaobserwowano żadnych objawów klinicznych u zarażonych świnek. Wszystkie zwierzęta wykazywały znaczne przyrosty masy ciała. Po upływie miesiąca od zarażenia wykonano sekcję świnki która otrzymała dawkę 5000 larw. Jedynie na powierzchni wątroby znaleziono 6 guzków barwy białawej o wielkości od 2 do 6 mm. Stwierdzono także, że węzły chłonne krezkowe były powiększone. Poddano badaniu mikroskopowemu krezkę, przeponę i sieć, rozdrabniając je na drobne kawałki (ok. 1000) i oglądając w kompresorze pod mikroskopem stereoskopowym. W węzłach chłonnych krezkowych stwierdzono larwy III stadium *E. cervi*. Większość z tych larw była martwa, jednak niektóre z nich po wyizolowaniu wykazywały żywotność. Nie wykazywały jednak cech dalszego rozwoju. Pozostałe świnki zarażone dawkami 3000 larw, 2000 larw, 1000 larw, 500 larw i 10000 larw sekcjonowano kolejno po 2 miesiącach, a następnie po 3, 4, 5 i 6 miesiącach po zarażeniu. Nie stwierdzono żadnych zmian w narządach. U świnki sekcjonowanej po 2 miesiącach w węzłach chłonnych krezkowych stwierdzono martwe larwy *E. cervi* lub ich fragmenty a u pozostałych świnek w tej samej lokalizacji obserwowano fragmenty martwych larw, lub detrytus pozostały po ich resorpcji. Wyniki badań sekcyjnych wykazały, że świnię wykazują naturalną oporność na zarażenie larwami inwazyjnymi *E. cervi*, a w ich organizmie larwy te zatrzymywane są przez barierę węzłów chłonnych krezkowych, gdzie obumierają i ulegają zresorbowaniu. W świetle przedstawionych wyników mięso świń nie może być źródłem elafostromylozy dla ludzi, ponadto należy przypuszczać, że podobną oporność na omawianą pasożytozę wykazują również inne gatunki wszystkożerne, jak również człowiek.

Effect of temperature and starvation on the metabolism of trehalose in the third larval stage (L₃) of *Anisakis simplex* (Nematoda)

Elżbieta Łopińska-Biernat¹, Małgorzata Dmitryjuk¹, Krystyna Żółtowska¹ and Jerzy Rokicki²

¹Department of Biochemistry, Faculty of Biology, University of Warmia and Mazury, Oczapowskiego 1A, 10-957 Olsztyn, Poland; E-mail: ela.lopienska@uwm.edu.pl

²Studio of Marine Zoology, Faculty of Biology Geography and Oceanology, University of Gdansk, Piłsudskiego 46, 81-378 Gdynia, Poland

Anisakis simplex is a parasitic gastrointestinal nematode with a complex life cycle; the definitive hosts — marine mammals — as well as in humans. As anisakiosis is a serious condition that be fatal to a patient and may cause allergic reaction in patients sensitive to *A. simplex* allergens, it is necessary to intensify research on biochemistry of the parasite larvae. For example, little is known about its carbohydrates metabolism, in particular — trehalose. This sugar is of special importance for parasites owing to its physical and chemical properties. Besides the function of energy reserve, it fulfills a protective role under stress conditions. Free-living and parasitic nematodes synthesize trehalose in reaction to desiccation and cooling. In parasites of animals trehalose is the reserve sugar and a transport from supplying glucose to tissues.

There is no information available on synthesis of trehalose in the third larval stage of *A. simplex* that's why in the present research we decided to mark determine the activity of enzymes participating in synthesis and decomposition of trehalose and content of trehalose during starvation of *A. simplex*. Activity of TPS (EC 2.4.1.15), was determined using the method by Giaever et al. (1988), and that of TPP (EC3.1.3.12) by Kaasen et al. (1992). The end of the product of reaction — trehalose and content of that sugar was determined using HPLC. Trehalase (EC 3.2.1.28) activity was measured using a modified Dahlqvist method (1968), protein content according to Bradford (1976).

The presence of activity of TPS (21.013 ± 0.034 u/mg) and TPP (19.367 ± 0.041 u/mg) in L₃ of *A. simplex* is shown for first time in this paper. Experiment of culturing L₃ larvae without nutrients at five temperature, i.e. 0, 4, 10, 37 and 45°C was carried out. During the 6 hours of kipping the larvae at 4, 10 and 45°C the content of trehalose increased by 70% than that measured in the larvae freshly isolated from fish. In this time activity of trehalase was the same at the beginning cultivation. Activity of enzyme of synthesis of trehalose decreasing rapidly during all the time experiment. During the following hours of starvation at 0, 4 and 45°C the content of trehalose was maintained at a similar level and on 18h and 30h it was lower by *ca* 70% than at the beginning of the experiment.

These results demonstrate that enzymes responsible for both pathways of trehalose metabolism: anabolism and catabolism are present in *A. simplex*.

Origin and ultrastructure of the outer coat surrounding mature eggs of *Mosgovoyia ctenoides* (Cestoda, Anoplocephalidae)

Daniel Młocicki^{1,2}, Zdzisław Świdorski^{1,3}, Jordi Miquel⁴ and Catarina Eira^{4,5}

¹W. Stefański Institute of Parasitology, PAS, Warszawa, Poland; E-mail: danmlo@twarda.pan.pl

²Department of Medical Biology, Medical University of Warsaw, Poland

³Department of General Biology and Parasitology, Medical University of Warsaw, Poland

⁴Laboratori de Parasitologia, Facultat de Farmacia, Universitat de Barcelona, Spain

⁵Departamento de Biologia, Universidade do Minho, Braga, Portugal

The aim of this study was to describe the origin and formation of the outermost protective layer, the so-called "outer coat", previously described as "outer shell", in the mature eggs of the anoplocephalid cestode *Mosgovoyia ctenoides*. At the beginning, the fertilized oocyte is surrounded by a single vitellocyte that contains precursor material for capsule formation. This material is released under the influence of Mehlis' gland secretion and gradually forms a delicate capsule surrounding the early embryo. At first, on the surface of the developing embryo are formed labyrinths like structures composed of numerous infolded membranes. They gradually merge together into condensed structure and finally produce the embryonic capsule, delimited by a double-unit plasma membrane. The early blastomeres are embedded directly in the capsular matrix. This arrangement of the capsule remains unchanged until the preoncospherical stage. In the mature eggs the delicate capsule is progressively replaced with an electron-dense, hard and rigid outer coat. This is formed by a material secreted from the uterine epithelium, progressively laid down on the thin residual layer of the capsule and forms a thick, electron-dense layer of the outer coat. This layer is covered by numerous microprocesses oriented perpendicularly to the egg surface. They represent, probably, the remnants of encrustation and fusion of the finely granular material secreted from the uterine epithelium. A presence of secretory granules in the uterine cells and long projections of uterine epithelium adjacent to the developing eggs both confirm high secretory activity of this tissue. The large amount of secretory material is accumulated in the uterine lumen and often adjoining to the egg surface of *M. ctenoides*. The above results, in comparison with available data on the egg-shell of lower cestodes, indicate that the "outer coat" observed in anoplocephalids in spite of similar protective function, has entirely different origin and mode of formation.

Możliwość zamknięcia cyklu rozwojowego *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809) w południowym Bałtyku

The possibility of completing the life cycle of *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809) at the South Baltic Sea

Jerzy Rokicki

Katedra Zoologii Bezkręgowców, Uniwersytet Gdański, Al. Piłsudskiego 46, 81-378 Gdynia;
E-mail: rokicki@univ.gda.pl

Anisakis simplex jest szeroko rozprzestrzenionym nicieniem, głównie w zimniejszych i polarnych wodach. Jego pierwszym żywicielem pośrednim są skorupiaki należące do Euphausiacea. Uważano, że jest to główna grupa Crustacea, u których odbywa się rozwój wczesnych stadiów larwalnych pasożyta. Niedawno Klimpel i wsp. (2004) wykazali, że w Morzu Północnym również widłonogi Copepoda należące do gatunku *Calanus finmarchicus* i *Paraeuchaeta norvegica* mogą być żywicielem pośrednim tego nicienia. Czy w Morzu Bałtyckim może zachodzić podobne zjawisko? W południowym Bałtyku larwy III stadium *A. simplex* notowane są często u śledzia *Clupea harengus*, rzadziej u dorsza *Gadus morhua*, storni *Platichthys flesus*, sandacza *Sander lucioperca*, ciernika *Gasterosteus aculeatus*, czarniaka *Pollachius virens* i belony *Belone belone*. Żywicielem ostatecznym tego pasożyta są ssaki morskie, Cetacea i Pinnipedia. W południowym Bałtyku dojrzałe nicienie notowane były w ścianie żołądka u morświna *Phocoena phocoena* i delfina białonosego *Lagenorhynchus albirostris*. Jednak możliwość zamknięcia cyklu rozwojowego *Anisakis simplex* w wodach południowego Bałtyku jest w dalszym ciągu sprawą otwartą. Jakie gatunki skorupiaków są źródłem zarażenia dla ryb i gdzie to ma miejsce. Gdzie następuje zarażenie ssaków morskich występujących w tym obszarze wodnym.