WIADOMOŚCI PARAZYTOLOGICZNE
T. 48 (4) 2002: 413–417

PROCES APOPTOZY W PRZEBIEGU DOŚWIADCZALNEGO ZARAŻENIA *T. PSEUDOSPIRALIS* U MYSZY

AGNIESZKA WIDYMA I JOLANTA PIEKARSKA[1)]

Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

ABSTRACT. The apoptosis in the course of experimental infection with *T. pseudospiralis* in mice. The level of apoptic cells in the lamina propria of the mucosa of the jejunum and in the masseter muscle in the mice infected with 200 larvae *T. pseudospiralis* was observed. Cryostat preparations made from jejunum and muscle samples on 7, 14, 21, 28, 60, 180 and 360 day post infection (dpi), were examined employing the TUNNEL method with the use of "In situ Cell Death Detection KIT Fluorescein" of Roche. The number of apoptic cells in the lamina propria of jejunum started to increase as early as on 7 dpi. The highest number of the apoptic cells, on an average – 56,4 in the crypta-villus unit, was recorded on 28 dpi, whereas the return to the standard level took place only 360 dpi. The level of the apoptic cells in the masseter muscle was the highest on 28 and 60 dpi, which constituted some 30% of all the cells of infiltration.

Key words: apoptosis, jejunum, masseter muscle, *T. pseudospiralis*.

WSTĘP

Na problem apoptozy w parazytologii pierwsi zwrócili uwagę Garside i wsp. (1996) oraz Fush i wsp. (1996). Badania dotyczyły zarówno zarażenia pierwotniakami jak i helmintami. Badania nad tymi ostatnimi przeprowadzali również: Estaquier i wsp. (1997), Hyoh i wsp. (1999), Starke i Oaks (1999), Carneiro-Santos i wsp. (2000), Jung i wsp. (2000), O'Connel i Rogan (2000) oraz Shin (2000). Jednak żadna z tych publikacji nie poruszała zjawiska apoptozy we włośnicy. Nawiązując do wcześniejszych badań nad procesem apoptozy w przebiegu inwazji *Trichinella spiralis* (Karmańska i wsp. 2000) postanowiłyśmy zbadać czy (a jeśli tak, to w jakim stopniu) zjawisko apoptozy ma miejsce również w przebiegu zarażenia *Trichinella pseudospiralis*. Okres obserwacji tego zjawiska zarówno w jelicie jak i w mięśniu trwał cały rok, ponieważ *T. pseudospiralis* wykazuje inną niż *T. spiralis* strategię przetrwania w fazie mięśniowej.

[1)]Aktualny adres autorek: Agnieszka Widyma: Katedra Fizjologii Zwierząt; Jolanta Piekarska: Katedra Parazytologii i Chorób Inwazyjnych; Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Akademia Rolnicza, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław.

MATERIAŁ I METODY

Obserwacje przeprowadzono na 40 myszach wsobnego szczepu CFW, samcach, lini żółtej w wieku 3 miesięcy, pochodzących z własnej hodowli prowadzonej wg metody świateł ulicznych (Lane Peter i Pearson 1971). Zwierzęta zarażono per os 200 larwami *T. pseudospiralis* a następnie po 4 myszy zabijano w 7, 14, 21, 28, 60, 180 i 360 dniu po zarażeniu (dpz). Ze względów oszczędnościowych zrezygnowano z grupy kontrolnej, a w dyskusji uwzględniono wyniki badań Karmańskiej i wsp. (2000) nad apoptozą u zdrowych myszy. Na sekcji pobierano wycinki jelita czczego i mięśnia żuchwowego, z których po zamrożeniu sporządzono preparaty kriostatowe o grubości 4 μ. Uzyskane preparaty badano metodą TUNEL (Gavrieli i wsp. 1992) używając zestawu odczynników „In situ Cell Death Detection KIT Fuorescein" firmy Roche po dobarwieniu bromkiem etydyny wg własnej modyfikacji. Komórki wykazujące apoptozę rozpoznawano w mikroskopie fluorescencyjnym, przy czym w blaszce właściwej błony śluzowej jelita czczego liczono je w 10 jednostkach krypta-kosmek, zaś w mięśniu żuchwowym oceniano je w procentach w stosunku do wszystkich komórek nacieku w 10 polach widzenia. Wyniki przedstawiono w wartościach średnich. U wszystkich zabijanych zwierząt liczono pasożyty w jelitach lub larwy w mięśniach posługując się metodą Kozara i Kozar (1971). Dla liczenia tych ostatnich uśmiercano dodatkowo po 4 myszy w 60, 180 i 360 dniu po zarażeniu.

WYNIKI

U myszy zarażonych *Trichinella pseudospiralis* już od 7 dpz średnia liczba komórek apoptycznych wynosiła 35,4 (SD 21,5), w 14 dpz 36,8 (SD 23,9), zaś w 21 dpz następował spadek do 27,5 (SD 13,3). Jednak w 28 dniu inwazji obserwowano ponowny wzrost liczby tych komórek gdyż średnia obliczana w jednostce krypta-kosmek doszła do 56,4 (SD 9,18). Kolejny spadek do 30,1 (SD 4,7) zanotowano w 60 dpz i dalszy w 180 dniu inwazji (29,5; SD 9,9). Najmniej komórek reagujących dodatnio z zastosowanym odczynnikiem notowano w 360 dpz (25,3; SD 18,1). Komórki apoptyczne obserwowane w blaszce właściwej błony śluzowej jelita czczego myszy zarażonych *T. pseudospiralis* już od początku doświadczenia leżały przede wszystkim wewnątrz kosmków. Stan taki trwał do 60 dpz. Wyraźnie mniej komórek reagujących w kosmkach zauważono dopiero w 180 dpz, zaś w 360 dniu inwazji komórki apoptyczne leżały niemal wyłącznie w strefie przypodstawnej.

W mięśniu żuchwowym u zwierząt zarażonych *T. pseudospiralis* pierwsze komórki apoptyczne pojawiły się razem z pierwszymi komórkami nacieku zapalnego. W 14 dpz poziom komórek wykazujących apoptozę wynosił 9,3% i bardzo zbliżony (9,8%) obserwowano w 21 dniu inwazji. Znacznie więcej komórek reagujących z odczynnikiem wykrywającym apoptozę stwierdzono

w 28 dpz (23,2%) i w 60 (29,4%) zaś wyraźnie mniej (20%) w 180 dniu inwazji. Natomiast w 360 dpz poziom komórek apoptycznych spadał do 4%. Należy zaznaczyć, że w komórkach pasożyta apoptozy nie obserwowano.

W wyniku badań parazytologicznych obecność ostatnich pasożytów w jelicie stwierdzono w 21 dniu inwazji. Średnia liczba larw mięśniowych przypadająca na jedną mysz wynosiła w 60 dpz 5625,0 (SD 1103,2), w 180 dpz – 4227,5 (SD 437,5) a w 360 dpz – 3910,0 (SD 533,1).

OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Zagadnieniem apoptozy w chorobach pasożytniczych, a ściślej w helmintozach pierwsi zainteresowali się Garside i wsp. (1996). Rozważając ten problem głównie w odniesieniu do komórek pasożyta autorzy zwracali uwagę na możliwość wykorzystania sekrecji rozpuszczalnych homologów Fas do indukowania apoptozy komórek Th1 żywiciela. W tym samym czasie Fush i wsp. (1996) obserwowali wysoki poziom spontanicznej apoptozy limfocytów T u pacjentów zarażonych *Schistosoma mansoni*. Również Estaquier i wsp. (1997), uważali, że mechanizm apoptozy ma duże znaczenie w patogenezie chronicznej schistosomatozy. Natomiast Nash i wsp. (1998), przeprowadzając badania na modelu *Toxoplasma gondii* stwierdzili, że komórki zarażone tym pasożytem są oporne na większość induktorów apoptozy. Kolejne prace z tego zakresu dotyczyły zarówno zarażenia pierwotniakami jak i helmintami. Hyoh i wsp. (1999) badając przyczynę atrofii kosmków jelitowych podczas inwazji *Nippostrongylus brasiliensis* u szczurów sugerowali, że proces ten jest ściśle związany ze wzrostem apoptozy i spadkiem adhezji w komórkach epithelialnych. Starke i Oaks (1999) śledząc mechanizm regulacji populacji komórek tucznych w blaszce właściwej błony śluzowej jelit w przebiegu zarażenia *Hymenolepis diminuta* stwierdzili, że apoptoza może odgrywać ważną rolę w rozwoju mastocytozy jelitowej indukowanej przez inwazję pasożytniczą. Obserwacje przeprowadzone w ostatnich latach (Carneiro-Santos i wsp. 2000, Jung i wsp. 2000, O'Connel i Rogan 2000, Shin 2000) sugerowały, że antygeny ES pasożytów wywołują apoptozę komórek żywiciela. Jednak żadna z tych publikacji nie poruszała zjawiska apoptozy we włośnicy. Wprawdzie w jednej z prac zarażano zwierzęta *T. spiralis*, jednak wykonano to w ramach badań nad *T. gondii*, gdzie wprowadzenie drugiego pasożyta obniżało poziom komórek apoptycznych obserwowany w przebiegu toksoplazmozy (Abou-Afifi i wsp. 2000).

Można zatem przyjąć, że Karmańska i wsp. (2000) byli pierwszymi, którzy badali zjawisko apoptozy we włośnicy. Autorzy zauważyli również, że w blaszce właściwej błony śluzowej jelita czczego zwierząt zdrowych liczba komórek apoptycznych obecnych w jednostce krypta-kosmek wahała się od 5–20, przy czym większość z nich leżała w strefie przypodstawnej. Porównując obecne wyniki z wynikami otrzymanymi w zarażeniu *T. spiralis* (Karmańska i wsp.

2000) należy stwierdzić istnienie dużych różnic między tymi inwazjami. W przebiegu zarażenia *T. pseudospiralis* komórki apoptyczne w blaszce właściwej błony śluzowej jelita czczego już od 7 dpz obserwowano w znacznie większej liczbie niż w inwazji *T. spiralis*. Wartości szczytowe zanotowano wprawdzie trochę później bo 28 dpz (a u myszy zarażonych *T. spiralis* już od 21 dnia inwazji) jednak jeszcze w 60 dpz średnia liczba komórek apoptycznych przypadająca na jednostkę krypta-kosmek była ciągle dużo wyższa niż w inwazji *T. spiralis*. Inny był też poziom komórek wykazujących apoptozę w mięśniu żuchwowym. Chociaż w mięśniach myszy zdrowych nie obserwowano komórek apoptycznych (Karmańska i wsp. 2000) to u zwierząt zarażonych *T. pseudospiralis* pojawiały się one wraz z pierwszymi komórkami nacieku zapalnego. W 21 dpz poziom ich był trzykrotnie niższy niż u myszy zarażonych *T. spiralis*. Analogiczne różnice notowano w 28 dniu inwazji. Dopiero w 60 dpz poziom komórek apoptycznych w mięśniach myszy z obu doświadczeń był zbliżony. Porównując wyniki uzyskane w przebiegu zarażenia *T. spiralis* (Karmańska i wsp. 2000) z obecnymi należy podkreślić, że w obu inwazjach nigdy nie obserwowano zmian apoptycznych w komórkach pasożyta.

Ponadto porównanie procesu apoptozy w obu inwazjach sugeruje, że antygeny larw *T. spiralis*, które najprawdopodobniej indukują proces apoptozy (Piekarska i Widyma w druku) są słabsze niż antygeny ES larw *T. pseudospiralis*.

WNIOSEK

Podsumowując uzyskane wyniki można stwierdzić, że w przebiegu inwazji *T. pseudospiralis* w blaszce właściwej błony śluzowej jelita czczego występuje wyraźnie więcej komórek apoptycznych, zaś w mięśniu żuchwowym – mniej niż w zarażeniu *T. spiralis*. Jest to fakt, którego wyjaśnienie wymaga dalszych badań.

LITERATURA

Abou-Afifi M., Gamra M.M., Moustafa M.A, Hoseiny L.M. 2000. Modulation of the pathologic and apoptotic changes of experimental toxoplasmosis by concomitant infection with *Trichinella spiralis*. *Journal of Egypt Society of Parasitology* 30: 69–81.

Carneiro-Santos P., Martins-Filho O., Alves-Oliveira L.F, Silveira A.M., Coura-Filho P., Viana I.R., Wilson R.A., Correa-Oliveira R. 2000. Apoptosis: a mechanism of immunoregulation during human schistosomiasis mansoni. *Parasite Immunology* 2: 267–277.

Estaquier J., Marguesite M., Sahuc F., Bessis N., Auriault C., Ameisen J.C. 1997. Interleukin-10-mediated T cell apoptosis during the T helper type 2 cytokine response in murine *Schistosoma mansoni* parasite infection. *European Cytokine Network* 8: 153–160 (cyt. za *Helmintologinal Abstract* 1998. 67: 195).

Fush D., Bajer-Bitterlich G., Wachter H. 1996. Impaired Th1 - like immune response in *Schistosoma mansoni* infection. *Journal of Immunology and Infection Diseases* 174: 677–678.

Garside P., Sands W.A., Kusel J.R., Hagan P. 1996. Is the induction of apoptosis the mechanism of the protective effects of TNFα in helminth infection? *Parasite Immunology* 18: 111–113.

Gavrieli Y., Sherman Y., Bensesson S. 1992. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology* 119: 493–501.

Hyoh Y., Nishida M., Yamada M., Uchikawa R., Matsuda S., Arizono N. 1999. Enhancement of apoptosis with loss of cellular adherence in the villus epithelium of the small intestine after infection with the nematode *Nippostrongylus brasiliensis* in rats. *Parasitology* 119: 199–207.

Jung S.K., Mai A., Iwamoto M., Arizono N., Fujimoto D., Sakamaki K., Yonehara S. 2000. Purification and cloning of an apoptosis – inducing protein derived from fish infected with *Anisakis simplex*, a causative nematode of human anisakiasis. *Journal of Immunology* 165: 1491–1497.

Karmańska K., Houszka M., Piekarska J. 2000. The phenomenon of apoptosis in the course of experimental trichinellosis in mice. *Wiadomości Parazytologiczne* 46: 111–115.

Kozar Z., Kozar M. 1971. Diagnostyka chorób pasożytniczych człowieka. PZWL. Warszawa.

Lane Petter W., Pearson A. 1971. The labolatory animal – principles and practice. Academic Press, London – New York.

Nash P.B., Purner M.B., Leon R.P., Clarke P., Duke R.C., Curiel T.J. 1998. *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *Journal of Immunology* 160: 1823–1830.

O'Connell K.M., Rogan M.T. 2000. Apoptosis in human Jurkat T cell after culture with live *Taenia crassiceps* cysticerci *in vitro*. *Parasitology* 120: 649–655.

Piekarska J., Widyma A.0000. Apoptosis of cells isolated from mouse of lymphatic node induced by ES antigen of *T. spiralis*. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities* (w druku).

Shin M.H. 2000. Excretory-secretory product of newly excysted metacercariae of *Paragonimus westermani* directly induces eosinophil apoptosis. *Korean Journal of Parasitology* 38: 17–23.

Starke W., Oaks J. 1999. *Hymenolepis diminuta*: praziquantel removal of adult tapeworms is followed by apoptotic down – regulation of mucosal mastocytosis. *Experimental Parasitology* 92: 171–181.