

APOPTOZA W REGULACJI ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNEJ U MYSZY ZARAŻONYCH *HELIGMOSOMOIDES POLYGYRUS*

KATARZYNA DONSKOW, JUSTYNA RZEPECKA I MARIA DOLIGALSKA

Zakład Parazytologii, Instytut Zoologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski,
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

ABSTRACT: Apoptosis in the regulation of immune response in mice infected with *Heligmosomoides polygyrus*. An unbalanced Th1 and Th2 cell subsets response was proposed as the main downregulating mechanisms operating in mice infected with *H. polygyrus*. During worm infections nonspecific inflammatory and specific immune reactions which might be regulated by apoptosis, coordinate the host protective response. The intensity of apoptosis and proliferation of lymphocytes, the concentration of Th1 and Th2 related cytokines were measured in BALB/c and C57BL6 mice on day 3, 6, 12, 24, 30 after infection with *H. polygyrus*. Mesenteric lymph nodes (MLN) and popliteal lymph nodes (PLN) lymphocytes underwent an apoptosis, with a different kinetics to the proliferation. Interleukine 5 and IL-6 concentrations increased on time when apoptosis was reduced. No changes in the level of IL-12 were related to intensity of proliferation or apoptosis in both examined strains of mice.

Key words: apoptosis, cytokines, *Heligmosomoides polygyrus*, nematode infection.

WSTĘP

Odpowiedź układu odpornościowego w inwazjach pasożytniczych kontrolowana jest przez limfocyty CD4⁺ (Urban i wsp. 1996), subpopulacji Th1, Th2 i Th3 (MacDonald i wsp. 2002). Uważa się, iż w odpowiedzi obronnej skierowanej przeciw nicieniom dominuje pobudzenie limfocytów Th2. Jednakże typ odpowiedzi żywiciela zależy od jego genotypu (Zhong i Dibson 1996, Grecis 2001). U szczepów myszy o różnej wrażliwości na zarażenie *H. polygyrus* usuwanie nicieni następuje w różnym tempie, pomimo że reakcja obronna jest hamowana przez formy dorosłe (Gause i wsp. 1996). Stan immunodepresji w tej inwazji charakteryzuje niski poziom IL-9 i IL-10 oraz brak nacieku komórek zapalnych w błonie śluzowej jelita cienkiego (Gause i wsp. 2003). Ben-Smith i wsp. 2003 sugerują, iż w tym czasie aktywne są dwie subpopulacje limfocytów, Th1 i Th2.

Proliferacja i programowana śmierć komórki (programmed cell death, PCD) decydują o liczbie komórek w ontogenezie, a także kształtują poziom odpowiedzi immunologicznej (Lüder i wsp. 2001). W czasie inwazji pojawiają się klony limfocy-

tów swoiście odpowiadające na antygeny pasożytnicze. Selekcja limfocytów, w tym także obdarzonych pamięcią immunologiczną zależy od nasilenia apoptozy. Ostatnio potwierdzono, iż ekskrecyjno/sekrecyjne antygeny nicieni (ES) wzbudzają apoptozę komórek w różnych narządach (O'Connell i Rogan 2000, Shin 2000).

Badano czy proliferacja i apoptoza są związane z Th1 lub Th2 – zależną ścieżką odpowiedzi immunologicznej u myszy zarażonych *H. polygyrus*. Celem doświadczenia było oznaczenie poziomu proliferacji i apoptozy limfocytów w mezenchymatycznych oraz w pachowych i pachwinowych węzłach limfatycznych u myszy szczepu BALB/c i szczepu C₅₇BL₆ różniących się stopniem wrażliwości na zarażenie *H. polygyrus*. Nasilenie odpowiedzi Th1 zależnej oceniono na podstawie poziomu IL-12, a odpowiedź Th2 zależną na podstawie zmian stężenia IL-5 i IL-6 w błonie śluzowej jelita cienkiego.

MATERIAŁ I METODY

Myszy szczepu BALB/c i C₅₇BL₆, samce w wieku 8 tygodni zarażono 120 L3 *H. polygyrus* za pomocą sondy doprzętykowej. Sekcje myszy zarażonych i kontrolnych wykonano w 3, 6, 12, 24 i 30 dni po zarażeniu (dpz). Pobierano węzły limfatyczne mezenchymatyczne (mesenteric lymph nodes, MLN) oraz pachowe i pachwinowe (popliteal lymph nodes, PLN), z których izolowano komórki. Apoptoza limfocytów oceniana była *ex vivo* po znakowaniu aneksyną V sprzężoną z fluorochromem oraz jodkiem propidyny (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I, BD Pharmingen) przy użyciu cytofluorometru przepływowego (FCM, Becton Dickinson).

Hodowla limfocytów z MLN *in vitro* prowadzona była w podłożu o składzie: RPMI 1640, 10% inaktywowana FCS 10 µl/ml L-glutaminy, 10 µl/ml penicyliny/streptomycyny oraz 1 µl/ml β-merkaptoetanol (Gibco) na płytkach (Corning) w 37°C i 5% CO₂.

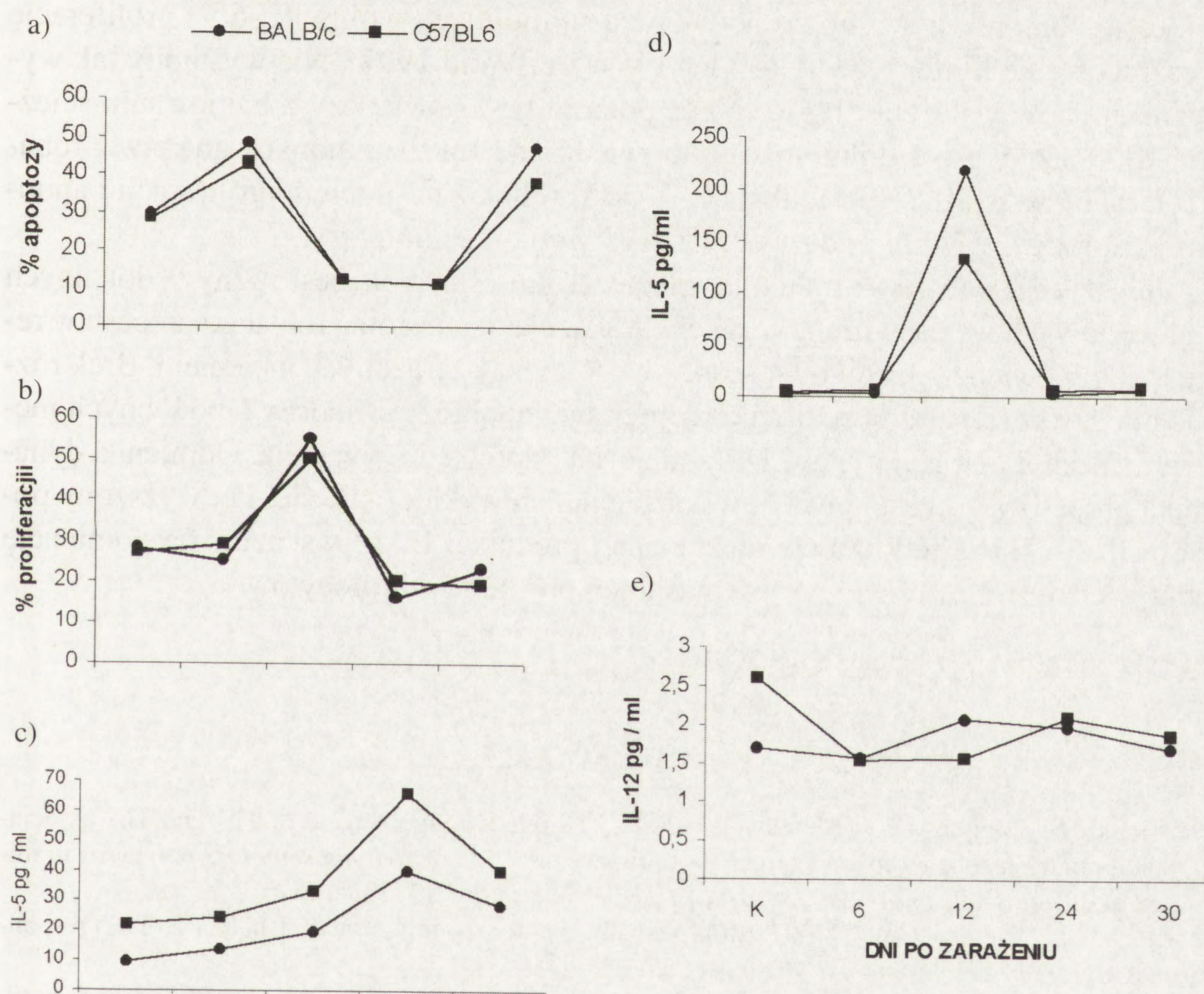
Poziom proliferacji limfocytów oznaczano w hodowli stymulowanej ConA i antygenem ES *H. polygyrus* w reakcji barwnej po zastosowaniu tetrazoliny (Promega). Wynik przedstawiono jako procent zmiany w odniesieniu do wartości OD odczytanej po niespecyficznym indukcji konkanawaliną A (ConA).

Metodą ELISA oznaczano cytokiny: IL-5, IL-6 i IL-12 w homogenacie błony śluzowej jelita cienkiego myszy stosując odpowiednie pary przeciwciał monoklonalnych (Pharmingen).

Wyniki analizowano w teście ANOVA w programie MINITAB. Różnice uznano za statystycznie istotne dla $P < 0.05$.

WYNIKI I DYSKUSJA

Nie wykazano różnic istotnych statystycznie w poziomie badanych reakcji między myszami szczepu BALB/c i C₅₇BL₆. Obserwowano natomiast zróżnicowanie



Rys. 1. Zmiany w poziomie apoptozy (a), proliferacji (b) w MLN i stężenia IL-5 (c), IL-6 (d) i IL-12 (e) w błonie śluzowej jelita cienkiego myszy szczepu BALB/c i C57BL/6 zarażonych *H. polygyrus*

procentu komórek apoptotycznych MLN i PLN, procentu proliferacji limfocytów MLN oraz stężenia cytokin w kolejnych dniach po zarażeniu (Rys. 1a, b). U myszy kontrolnych procent komórek apoptotycznych MLN wynosił 29, a w PLN, 40. W pierwszym tygodniu po zarażeniu nastąpił wzrost apoptozy z najwyższym poziomem w MLN w 3, a w PLN 6 dpz. Później, do 24 dpz obserwowano zmniejszanie apoptozy. Najśłabszej apoptozie towarzyszyła najwyższa proliferacja limfocytów MLN w 12 dpz, która osiągała 52%. Od 24 dpz poziom proliferacji obniżał się, uzyskując w 30 dpz tylko 30% wartości obserwowanej po indukcji ConA.

Przeprowadzone badania wykazały także zmiany w stężeniu IL-5, IL-6 i IL-12 w błonie śluzowej jelita myszy zarażonych nicieniem. Podwyższoną produkcję IL-5 stwierdzono na początku inwazji, do 6 dpz. Jest to zgodne z badaniami Svetic i wsp. (1993). Jednak najwyższy poziom tej cytokiny pojawił się dopiero w 24 dpz. Inna była dynamika produkcji IL-6, gdyż jej stężenie było 35-krotnie wyższe niż u myszy kontrolnych w 12 dpz. W tym samym dniu obserwowano maksymalną pro-

liferację komórek w MLN, co potwierdza stymulujący wpływ IL-6 na proliferację i różnicowanie limfocytów (Coffman i Van Der Weid 1997). Nie wystąpiły tak wyraźne zmiany w stężeniu IL-12. Niski poziom IL-12 świadczy o hamowaniu ścieżki Th1 zależnej przez dominującą odpowiedź Th2 zależną, indukowaną przez robaki (Urban i wsp. 1996). Produkcja cytokin koreluje z nasileniem proliferacji i apoptozy limfocytów MLN podczas inwazji *H. polygyrus* u myszy.

Inwazja *H. polygyrus* indukuje apoptozę, której poziom jest różny w lokalnych i obwodowych węzłach limfatycznych. Wskazuje to na istotną rolę tego procesu w regulacji odpowiedzi układu odpornościowego myszy zarażonych nicieniem. Brak różnic między szczepami w poziomie proliferacji i apoptozy świadczy o podobnych mechanizmach u obu genotypów, kształtujących odpowiedź żywiciela. Odmienna dynamika procesów w czasie inwazji wskazuje na ich wykluczanie się. Podwyższony poziom IL-5 i IL-6, przy prawie niezmienniej produkcji IL-12 wskazują na dominację odpowiedzi Th2 zależnej w czasie nasilonej proliferacji limfocytów.

Badania finansowano z grantu: KBN 3P04C 08724.

LITERATURA

- Ben-Smith A., Lammas D.A., Behnke J.M. 2003. The relative involvement of Th1 and Th2 associated immune responses in the expulsion of primary infection of *Heligmosomoides polygyrus* in mice of differing response phenotype *Journal of Helminthology* 77: 133-146.
- Coffman R.L., Van der Weid T. 1997. Multiple pathways for the initiation of T helper 2 (Th2) responses. *Journal of Experimental Medicine* 185: 373-375.
- Gause W.C., Lu P., Di Zhou X., Chen S.J. 1996. *H. polygyrus*: B7 independence of the secondary type 2 response. *Experimental Parasitology* 84: 264-273.
- Gause W.C., Urban J.J.F., Stadecker M.J. 2003. The immune response to parasitic helminths: insights from murine models. *Trends in Immunology* 24: 269-277.
- Grencis R.K. 2001. Cytokine regulation of resistance and susceptibility to intestinal nematode infection – from host to parasite. *Veterinary Parasitology* 100: 45-50.
- Lüder C.G.K., Gross U., Lopes M.F. 2001. Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interaction. *Trends in Parasitology* 17: 480-496.
- MacDonald A.S., Araujo M.I., Pearce E.J. 2002. Immunology of parasitic helminth infection. *Infection and Immunity* 70: 427-433.
- O'Connell K.M., Rogan M.T. 2000. Apoptosis in human Jurkat T cell after culture with live *Taenia crassiceps* cysticerci *in vivo*. *Parasitology* 120: 649-655.
- Urban J.F.R.Jr., Sullivan C., Goldhill J., Shea-Donohue T., Madden K., Morris S.C. 1996. Local Th1 and Th2 responses to parasitic infection in the intestine: regulation by IFN-gamma and IL-4. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 54: 337-344.
- 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.
- Svetic` A., Modden K.B., Zhou., Lu P., Katona I. M., Finkelman F.D., Urban J.F.Jr., Gause W.C. 1993. A primary intestinal helminthic infection rapidly induces a gut associated elevation of Th2-associated cytokines and IL-3. *Journal of Immunology* 150: 3434-3441.
- Zhong S., Dobson C. 1996. *Heligmosomoides polygyrus*: Resistance in inbred, outbred and selected mice. *Experimental Parasitology* 82: 122-131.