

Doktoraty

Wpływ wolnych rodników na przebieg infekcji *Trichinella spiralis* u myszy

Influence of free radicals on *Trichinella spiralis* infection in mice

Marta Kołodziej-Sobocińska

Praca doktorska wykonana w Instytucie Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN w Warszawie i obroniona 20 czerwca 2006 r.

Promotor: Prof. dr hab. Barbara Machnicka-Rowińska

Recenzenci: Prof. dr hab. Henryka Długońska

Dr hab. Antoni Schollenberger, prof. nadzw. SGGW

ABSTRACT. The aim of the study was to examine the influence of free radicals: nitric oxide (NO), hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide anion (O_2^-) on *Trichinella spiralis* infection in mice. The studies were performed on two strains of mice: C57BL/6 and BALB/c, which differ in immunological response to *T. spiralis* infection. Also the influence of AG — inhibitor of inducible nitric oxide synthase (iNOS) administered in the first days after *T. spiralis* infection (1–5 dpi) on the cytotoxic immune response and on the number of adult parasites as well as the influence of AG administered at the beginning of muscle phase of the *T. spiralis* infection (16–29 dpi) on the cytotoxic immune response and the number of muscle larvae was studied. Activation of macrophages can cause pathology. Contact of macrophages with antigens stimulates these cells to produce, among others, highly reactive inorganic compounds. There are free radicals: NO, H_2O_2 and O_2^- . NO, O_2^- , and their metabolites are highly toxic for most pathogens, including parasites. However, little is known about their role in the defense against *T. spiralis* infection. The performed studies have proved, that free radicals play role in the host immune response during both intestinal and muscle phase of *T. spiralis* infection in mice. In the intestinal phase of the *T. spiralis* infection cytotoxic immune response is activated in mice peritoneal cavity and in the muscle phase, the local immune response activated in the neighborhood of larvae in muscles appeared as the higher level of free radicals in blood and urine. Administration of AG between 1–5 dpi causes opposite reactions in two different strains of mice. In BALB/c mice AG causes fast expulsion of adult *T. spiralis* from the intestine but in C57BL/6 mice the expulsion of parasites is slower after AG. However, there are no differences between two strains of mice after treatment with AG between 16 and 29 dpi. AG causes diminution of larvae in muscles of both BALB/c and C57BL/6 mice. Inflammatory response in peritoneal cavity is observed later during the infection in „low responders” (C57BL/6) mice in comparison with „high responders” (BALB/c) mice. Th1 like mice (C57BL/6) react stronger to AG treatment than Th2 like mice (BALB/c). It occurs as changes and fluctuations in free radicals levels and the number of peritoneal cells after AG treatment in C57BL/6 mice. Weak or no reaction on AG injections in BALB/c mice is responsible for more stable and more sufficient defense response of the host to *T. spiralis* infection.

Key words: aminoguanidine, BALB/c mice, C57BL/6 mice, iNOS inhibitor, nitric oxide, reactive oxygen intermediates, *Trichinella spiralis*.

Streszczenie

Trichinella spiralis (włosień kręty) (Owen, 1835) to wewnątrzkomórkowy pasożyt o złożonym

cyklu rozwojowym. Postacie dorosłe bytują w enterocytach, a larwalne w mięśniach zwierząt kręgowych. Człowiek zaraża się tym nicieniem w sposób

naturalny, tak jak inne gatunki zwierząt kręgowych: ssaki drapieżne (koty, psy, wilki, lisy), wszystkożerne (świnie, dziki), gryzonie (szczury, myszy) czy gady (krokodyle) poprzez zjedzenie mięsa zawierającego pasożyty. Rozpoznanie kliniczne włośnicy jest wiarygodne dopiero około 14 dni po zarażeniu, a immunologiczne około 20 dni po zarażeniu. Późna diagnoza oraz bytowanie pasożyta wewnątrz komórek zarówno w fazie jelitowej jak i mięśniowej znacznie utrudnia leczenie tej parazytozy, z powodu konieczności zastosowania leków, które penetrują do wnętrza komórki. Uzasadnione jest więc poszukiwanie takich dróg biologicznych, które wspomagane odpowiednimi farmaceutykami mogłyby być użyteczne w leczeniu włośnicy. Wczesne zdiagnozowanie i podjęcie leczenia jest o tyle ważne, że już po osiedleniu i otorbieniu się larw w mięśniach całkowite wyleczenie chorego jest niemożliwe. Dlatego jedynie terapia wczesnych etapów infekcji mogłaby doprowadzić do całkowitego wyleczenia lub znacznie ograniczyć patologię tej parazytozy.

Wolne rodniki, takie jak tlenek azotu (NO) i reaktywne formy tlenu (RFT), są reaktywnymi cząsteczkami mogącymi przechodzić przez błony biologiczne. Jest to bardzo ważne w przypadku konieczności penetracji do enterocytów, gdzie znajdują się postacie dorosłe *T. spiralis* w pierwszej fazie infekcji, jak i do otorbionych larw *T. spiralis* w mięśniach. Nadmierna ilość wolnych rodników w organizmie może wywoływać efekty patologiczne np. uszkodzenia komórek i tkanek. Musi więc istnieć w organizmie mechanizm kontrolujący ich produkcję. Ponieważ znana jest rola NO i RFT produkowanych przez aktywowane makrofagi w niszczeniu innych patogenów na drodze niespecyficzej, cytotoksycznej odpowiedzi komórkowej, uzasadnione było przeprowadzenie badań nad poznaniem roli tych cząsteczek w przebiegu zarażenia *T. spiralis*. W przebiegu włośnicy występują nacieki komórek zapalnych, obserwuje się złożoną odpowiedź immunologiczną organizmu oraz immunosupresję. Dlatego podjęto badania nad rolą wolnych rodników zaangażowanych we wszystkie te zjawiska i podjęto próbę zrozumienia mechanizmów ich różnorodnego działania, stosując inhibitor syntezy NO oraz dwa szczepy myszy różniące się odpowiedzią na zarażenie włośniem krętym.

Myszy szczepu C57BL/6 charakteryzują się słabą odpowiedzią na zarażenie *T. spiralis* (tzw. szczep „low responders”) i są szczepem typu Th1. Potwierdza to utrzymywanie się postaci dojrzałych pasożyta w jelicie myszy tego szczepu przez ponad 18 dni

po zarażeniu. Makrofagi M-1 izolowane od tych myszy są łatwo aktywowane do produkcji NO i wpływają na odpowiedź typu Th1. Drugim użytym w badaniach szczepem były myszy szczepu BALB/c odpowiadające silniej i szybciej na zarażenie *T. spiralis* (tzw. szczep „high responders”). Jest to szczep typu Th2. Makrofagi izolowane od myszy BALB/c należą do M-2 makrofagów, które produkują mniejsze ilości NO niż makrofagi M-1, a ich aktywacja wpływa głównie na indukcję odpowiedzi typu Th2. U myszy należących do tego szczepu postacie dojrzałe pasożyta utrzymują się w jelicie tylko przez 14-15 dni po zarażeniu.

Celem pracy było poznanie wpływu wolnych rodników takich jak: tlenek azotu (NO), nadtlenek wodoru (H_2O_2) i anionorodnik ponadtlenkowy (O_2^-) na przebieg infekcji *Trichinella spiralis* u myszy C57BL/6 i BALB/c, różnie odpowiadających na zarażenie *T. spiralis*, po i bez zastosowania selektywnego inhibitora indukowalnej syntazy NO (iNOS) — aminoguanidyny (AG).

Badania opierały się na metodach kolorymetrycznych oceny ilości NO i szybkości wytwarzania wybranych RFT, prowadzeniu hodowli komórek *in vitro* oraz na ocenie liczby pasożytów w zarażonych zwierzętach doświadczalnych w kolejnych etapach infekcji.

Przeprowadzone badania pozwoliły ustalić, czy inhibitor iNOS działa w ten sam sposób na myszy obu badanych szczepów niezależnie od czasu jego podawania, czy też właśnie czas podawania AG, faza infekcji *T. spiralis* i szczep myszy mają znaczenie. Okazuje się, że w przebiegu włośnicy wszystkie badane czynniki są istotne. Najważniejsze jest chyba to, że wolne rodniki są zaangażowane w odpowiedź obronną żywiciela w obu etapach infekcji *T. spiralis*, niezależnie od użytego szczepu myszy. W fazie jelitowej odpowiedź cytotoksyczna jest aktywowana głównie w jamie otrzewnej na samym początku infekcji, a w fazie mięśniowej lokalna odpowiedź aktywowana w sąsiedztwie larwy skutkuje wzrostem poziomu wolnych rodników we krwi i w moczu i nasila się z czasem.

Ponadto zastosowanie AG w dwóch różnych okresach po zarażeniu, we wczesnej fazie jelitowej (1-5 dpz) i wczesnej fazie mięśniowej (16-29 dpz), ma wpływ na spadek liczby pasożytów zarówno w jelicie jak i w mięśniach. Wykazano, że podawanie AG w dniach 1-5 pz wywołuje przeciwstawne efekty w dwóch badanych szczepach myszy. U myszy BALB/c powoduje bardzo szybkie usuwanie postaci dorosłych z jelita, a u myszy C57BL/6 je

spowalnia. Natomiast podawanie AG w dniach 16-29 pz ma podobne działanie na myszy obu badanych szczepów; powoduje, że mniej larw zasiedla mięśnie. Potwierdzono oraz uzupełniono o nowe dane zjawisko odmiennego przebiegu włośnicy i różnic w odpowiedzi immunologicznej na zarażenie *T. spiralis* między dwoma szczepami myszy „low responders” (C57/BL/6) i „high responders” (BALB/c) niezależnie i przy udziale inhibitora iNOS. U myszy „low responders” odpowiedź zapalna w jamie otrzewnej jest znacznie opóźniona w stosunku do myszy „high responders”, ogromne znaczenie ma typ odpowiedzi immunologicznej dominujący w każdym z badanych szczepów. Myszy typu Th1 (C57BL/6) silniej reagują na podawanie AG niż myszy Th2. Skutkiem tego są m.in. znaczne wa-

hanie w liczbie komórek izolowanych z jamy otrzewnej i wahania w produkcji wolnych rodników. Brak lub słaba reakcja myszy typu Th2 (BALB/c) na iniekcje AG skutkuje stabilniejszą i szybszą reakcją na zarażenie *T. spiralis*.

Należy więc zawsze pamiętać, że na przebieg włośnicy wpływa wiele czynników genetycznych, immunologicznych oraz farmakologicznych. Może się to okazać bardzo ważne nie tylko w badaniach doświadczalnych i poznawczych, ale i w stosowanej obecnie terapii u ludzi (interakcje ze stosowanymi lekami wpływającymi m.in. na poziom NO) czy w szukaniu nowych metod zwalczania tej parazytozy (potencjalna rola inhibitorów produkcji NO).

Wpłynęło 22 czerwca 2006

Zaakceptowano 26 czerwca 2006