

Doktoraty

Doświadczalna toksoplazmoza u myszy laboratoryjnych (*Mus musculus*) jako model do badań nad swoistą odpornością w zarażeniach *Toxoplasma gondii****Experimental toxoplasmosis in laboratory mice (*Mus musculus*) as a model to study specific immunity during *Toxoplasma gondii* infection****Justyna Gatkowska**

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Immunoparazytologii Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej Instytutu Mikrobiologii i Immunologii Uniwersytetu Łódzkiego i obroniona 15.11.2005 r.

Promotor: Prof. dr hab. Henryka Długońska

Recenzenci: Prof. dr hab. Barbara Różalska

Prof. dr hab. Edward Siński

ABSTRACT. The aim of the study was to determine serological and cellular markers of the infection with *T. gondii* potentially useful in diagnostics. Experiments were performed on two inbred mice strains differing in their natural susceptibility to toxoplasmosis — BALB/c — more resistant and C57BL/6 — more susceptible. Most aspects of immunological response were evaluated after infection with low virulent DX strain of *T. gondii*. The study of primary humoral response with the use of native and recombinant antigens led to the selection of two potential markers of the invasion phase — early infection was characterized by a high response to secretory antigen GRA7, while during the chronic phase of toxoplasmosis the level of antibodies against surface antigen SAG1 rose. Determination of humoral response of immunocompetent and immunosuppressed, by cyclophosphamide administration, mice reinfected with *T. gondii* strain of different genotype showed that reinfection can be detected with two combined serological methods — ELISA and immunoblot, which show not only the rise of antibody level but also the appearance of immunoglobulins with new specificity. Moreover, humoral response after reinfection was characterised by a high response to surface antigen SAG2, which makes this protein potentially useful in diagnostics. The examination of cellular response showed a higher proliferative response of BALB/c mice splenocytes stimulated with *T. gondii* lysate while cells isolated from C57BL/6 mice produced higher amounts of IFN- γ . The elevated level of IFN- γ in serum was characteristic for early infection in both mice strains and was considered as a potential marker of the phase of infection. The obtained results proved that mouse experimental model is very useful in monitoring immunological responses of an infected host and they revealed a few markers of invasion which may be used to develop new diagnostic methods for the detection of *T. gondii* infection.

Key words: experimental toxoplasmosis, humoral and cellular immunity, inbred mice, recombinant antigens, *Toxoplasma gondii*.

Streszczenie

Toksoplazmoza jest jedną z najbardziej rozpowszechnionych chorób pasożytniczych na świecie. Zagrożenie zdrowia i życia, powodowane przez zarażenie pierwotniakiem *Toxoplasma gondii*, dotyczy

osób z obniżoną odpornością oraz płodów, w przypadku pierwotnej inwazji u kobiety ciężarnej. Stosowane obecnie metody diagnostyczne bywają zawodne, ponieważ nie zawsze pozwalają na wczesne wykrycie zarażenia czy precyzyjne rozróżnienie fazy inwazji szczególnie w przypadku drastycznego

*Badania finansowane z grantu MNiI 2 P05A 048 26 oraz badań własnych UE 505/397 (2003, 2004) i 505/421 (2005)

obniżenia odporności żywiciela oraz nie uwzględniają naturalnej osobniczej podatności na zarażenie *T. gondii*.

Z uwagi na niedoskonałość stosowanej diagnostyki laboratoryjnej celem przedstawionych w pracy badań było wytypowanie markerów serologicznych i komórkowych toksoplazmozy o potencjalnie największej przydatności diagnostycznej. Do realizacji zadań badawczych posłużono się dobrze zdefiniowanym modelem mysim z użyciem samców dwóch szczepów wsobnych myszy o różnej naturalnej podatności na toksoplazmozę — BALB/c (haplotyp H-2d) — bardziej odpornych i C57BL/6 (haplotyp H-2b) — bardziej wrażliwych. Zwierzęta zarażano szczepami pierwotniaka o zróżnicowanej zjadliwości — szczepem DX należącym do wewnątrzgatunkowej grupy II *T. gondii*, o niskiej zjadliwości oraz wysoce zjadliwym szczepem BK z grupy II w dwóch wariantach: atenuowanym *in vitro* (aBK) oraz wirulentnym, pasażowanym *in vivo* (vBK). Następnie badano swoistą odpowiedź humoralną i komórkową myszy.

Jedynie użycie szczepu DX *T. gondii*, należące do grupy szczepów będących najczęściej czynnikiem etiologicznym toksoplazmozy u ludzi, umożliwiło szczegółową analizę reakcji odpornościowych w czasie i wyraźnie uwidocznilo wpływ genotypu zwierząt na rozwój zarażenia. Myszy BALB/c przeżywały pierwotną inwazję pasożytniczą, natomiast myszy C57BL/6 padały w fazie przewlekłej toksoplazmozy.

Zastosowanie różnych antygenów natywnych i rekombinowanych *T. gondii* do badania pierwotnej odpowiedzi humoralnej pozwoliło na wytypowanie dwóch antygenów o potencjalnie dużej przydatności diagnostycznej przy różnicowaniu fazy zarażenia. Stwierdzono, że wczesna faza inwazji pasożytniczej charakteryzuje się wysokim poziomem przeciwciał rozpoznających antygen wydzielniczy pierwotniaka GRA7, natomiast przewlekłą toksoplazmozę cechuje silna produkcja przeciwciał reagujących z powierzchniowym antygenem SAG1.

Określano również reakcję humoralną myszy o prawidłowej i obniżonej podawaniem cyklofosfa-

midu odporności po reinwazji szczepem homologicznym i heterologicznym. Zaobserwowano, że choć pierwotna inwazja *T. gondii* DX wzbudza silną odporność chroniącą przed inwazją tym samym szczepem, to możliwe jest jej przełamanie i rozwój zarażenia przez szczep pasożyta odmienny genotypowo (*T. gondii* BK). Wykazano, że łączne zastosowanie testu ELISA i techniki immunoblotu umożliwia nie tylko wykrycie reinwazji na podstawie wzrostu miana przeciwciał, nawet w przypadku bardzo znacznego osłabienia odporności, ale także pozwala na wykazanie obecności przeciwciał o nowej swoistości. Ponadto analiza wytwarzanych w czasie reinwazji przeciwciał z użyciem antygenów rekombinowanych ujawniła preferencyjnie wysoką odpowiedź humoralną na antygen powierzchniowy SAG2, co może stanowić o jego potencjalnym zastosowaniu w diagnostyce toksoplazmozy.

Badania nad swoistą reaktywnością komórkową podczas pierwotnej inwazji ujawniły różnice pomiędzy szczepami wsobnymi myszy. Stwierdzono, że naturalna większa odporność na zarażenie wyraża się wyższą aktywnością proliferacyjną splenocytów stymulowanych lizatem tachyzoitów *T. gondii*, natomiast większa naturalna podatność na toksoplazmozę wiąże się z nasiloną produkcją IFN- γ , którego wysoki poziom stwierdzono zarówno w surowicach zwierząt, jak i w supernatantach hodowli komórek śledziony. Ponieważ podwyższony poziom surowiczego IFN- γ obserwowano już we wczesnej fazie ostrej inwazji *T. gondii*, określenie stężenia tej cytokiny w próbce surowicy może być wykorzystywane jako test pomocniczy przy różnicowaniu faz zarażenia *T. gondii*.

Uzyskane w pracy wyniki potwierdziły szczególną przydatność modelu mysiego do monitorowania przebiegu reakcji odpornościowych żywiciela w odpowiedzi na inwazję *T. gondii* oraz ujawniły kilka markerów zarażenia, zarówno humoralnych, jak i komórkowych, potencjalnie przydatnych w opracowaniu nowych bardziej swoistych metod diagnostycznych toksoplazmozy.

Wpłynęło 19 czerwca 2006

Zaakceptowano 4 sierpnia 2006