

Sesja 4

Biochemia i biologia molekularna pasożytów

Evaluation of the developmental toxicity of *Ascaris* pepsin inhibitor in mice

Joanna Błaszowska

Department of Biology and Medical Parasitology, Chair of Biology and Medical Genetics, Medical University of Lodz, Pl. Hallera 1, 90-647 Łódź, Poland; E-mail: biolparazyt@poczta.onet.pl

The maternal and developmental toxicity of exposure to pepsin inhibitor isolated from *Ascaris suum* (API) was assessed in BALB/c mice. On gestational days (gd) 6-15, four groups of plug-positive females were injected intraperitoneally by API at 50, 100, 150, 200 mg/kg body weight/day. Control group received 0.9% NaCl solution (0.3 ml/30 g/body weight) during the same gestational days. Maternal food consumption, body weight, and clinical signs were monitored at regular intervals throughout gestation. At termination (gd 18), confirmed-pregnant females were evaluated for clinical status and gestational outcome. The uterine contents were inspected for the number of total implantation sites, early and late resorptions, and live and dead fetuses. Live fetuses were weighed and examined for external, visceral and skeletal variations and malformations. Maternal body weight on gd 18, weight gain, gravid uterine weight, food consumption were significantly decreased after injection of higher doses of API. All doses of API exhibited an embryotoxic effect (high rate of intrauterine resorption). The percentage of postimplantation loss in the groups with administered API was higher (over 5-11 times) than in control group. Fetotoxicity was observed as shown by the decrease in the number of live fetuses and mean fetal weight, intrauterine fetal deaths, delayed skeletal ossification, occurrence of pathological changes of fetal organs and tissues. At 150, 200 mg/kg/day, congenital malformations (hydronephrosis, internal hydrocephalus) were noted. In summary, the maternal toxicity no-observed-adverse-effect level (NOAEL) was 50 mg/kg/day and the low-observed-adverse-effect level (LOAEL) was 100 mg/kg/day under the conditions of this study. Similarly, the developmental toxicity LOAEL was 100 mg/kg/day based on decreased fetal body weight.

Spermatogenesis and mutagenicity of *Ascaris* chymotrypsin inhibitor in mice

Joanna Błaszowska

Department of Biology and Medical Parasitology, Chair of Biology and Medical Genetics, Medical University of Lodz, Pl. Hallera 1, 90-647 Łódź, Poland; E-mail: biolparazyt@poczta.onet.pl

Chymotrypsin inhibitor isolated from *Ascaris suum* (ACHI) was tested for the induction of dominant lethal mutations in male mice. Dominant lethal effects of ACHI for the main stages of germ cell development were analyzed by mating at specific time points after dosing. Two groups of adult BALB/c males received 24 or 40 mg/kg body weight (bw)/day intraperitoneal (ip) injection of ACHI in sterile PBS for five consecutive days. Males from third group were administered single ip injection of ACHI — 60 mg/kg bw. The control group received concurrent injections of PBS for five successive days. After the last dose, each male was mated with two untreated females. For fractionated examination with regard to successive germ cell stages (spermatozoa, spermatids, spermatocytes, spermatogonia), every second week two other untreated virgin females were placed with each male for mating. The uteri of the females were inspected on the 15th day of gestation, and preimplantation loss and postimplantation loss determined from dominant lethal parameters. Exposure of mice germ cells to ACHI did not impair mating activity of males or their fertility. In the females bred to ACHI-treated males, significant ($P < 0.05$) increase in preimplantation loss was observed at post-injection week 1 and 3 (reflecting exposure to spermatozoa and spermatids), regardless of dose and length of exposure to the inhibitor. A significant increase of this parameter was also noted at week 5 (reflecting exposure to spermatocytes), but only in 60 mg/kg bw group. During mating days 15-21 (reflecting exposure of mid and early spermatids) a significant ($P < 0.05$) increase in postimplantation loss and dominant lethal effects were observed. With the dose 60 mg/kg bw, dominant lethal effect was restricted to spermatocytes. These preliminary data suggest that ACHI induces dominant lethal mutations mainly at the postmeiotic stage of spermatogenesis, and spermatids are the most sensitive cell stage to the effect of ACHI. These results show that ACHI may be one of the factors causing disturbances in spermatogenesis leading to a reduction of host reproductive success.

Biochemical characteristics of trehalose synthesis in muscles of parasitic nematode *Ascaris suum*

Małgorzata Dmitryjuk, Elżbieta Łopieńska-Biernat and Marek Farjan

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

Trehalose (α -D-glucopyranosyl-1,1- α -D-glucopyranoside) can be biosynthesized from bacteria, some plants, as well as from nematode by using an enzymatic system of TPS (trehalose-6-phosphate synthase EC 2.4.1.15) and TPP (trehalose-6-phosphate phosphatase EC 3.1.3.12). This enzymatic system requires UDP-glucose and glucose-6-phosphate as the initial substrates and trehalose-6-phosphate as intermediate product.

There is much less information available on synthesis of trehalose in nematodes that's why in the present research we decided to mark the properties of both enzymes participating in trehalose synthesis in muscles of *A. suum*. We marked an optimum pH and temperature, thermal stability and effector's influence (MgCl₂, KCl, NaCl, FeCl₃, ZnCl₂, CaCl₂) on activity of both examine enzymes. Activity of TPS was determined using the method by Giaever at al. (1988), and that of TPP by Kaasen at. al. (1992). The end product of the reaction — trehalose was determined using HPLC.

We demonstrated that the optimum temperature of both studied enzymes were at 35°C. In the temperature above 50°C both enzymes were non-active. TPS was more resistant to thermal denaturation than TPP. The optimum of pH for TPS was at pH 4.2. At alkaline pH this enzyme is non-active. TPP showed the highest activity at pH 7.0.

All examined chemical compounds increased the activity of TPS and TPP, except for KCl, which inhibited TPP.

This work was supported by Grant: 2PO4C 124 29, from 2005 to 2008.

Poziom prolaktyny (PRL) w surowicach a częstość zarażenia *Toxoplasma gondii* u ludzi

The relationship between the level of prolactin (PRL) in human sera and the frequency of *Toxoplasma gondii* infections

Katarzyna Dzitko*, Jan Komorowski i Henryka Długońska***

*Uniwersytet Łódzki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Zakład Immunoparazytologii
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; E-mail: dzika@biol.uni.lodz.pl

**Uniwersytet Medyczny, Katedra i Klinika Endokrynologii, ul. Sterlinga 1/3, 91-425 Łódź

Ochronne działanie prolaktyny (PRL) w zarażeniu wewnątrzkomórkowym pierwotniakiem *Toxoplasma gondii* wykazano na modelu doświadczalnej toksoplazmozy u myszy (Benedetto i wsp. 1995). Biorąc pod uwagę bardzo szerokie spektrum działania PRL, w tym jej aktywność immunomodulacyjną, określono częstość zarażenia ludzi *T. gondii* w zależności od poziomu PRL.

Badania przeprowadzono na 556 surowicach pacjentów Kliniki Endokrynologii UM w Łodzi z uwzględnieniem takich parametrów jak: obecność przeciwciał anti-*T. gondii*, poziom PRL, płeć i wiek. Porównując częstość zarażenia w grupie osób z poziomem PRL powyżej normy (kobiety > 23 ng/ml, n=168; mężczyźni > 16 ng/ml, n=66) z grupą osób o prawidłowym poziomie PRL (odpowiednio: n=205, n=76), stwierdzono niższą (45,58% → 33,9%) prewalencję toksoplazmozy u kobiet z hiperprolaktynemią (p < 0,05).

W celu poznania przyczyny hiperprolaktynemii, u kobiet z 5-krotnie podwyższonym poziomem badanego hormonu (> 86 ng/ml) przeprowadzono test w warunkach dynamicznych z użyciem blokera receptorów dopaminergicznych — metoklopramidu, a wyniki badania laboratoryjnego interpretowano zawsze w powiązaniu z obrazem klinicznym. Po wykluczeniu przypadków fizjologicznej i farmakologicznej hiperprolaktynemii, najniższą (8,6%, p > 0,05) prewalencję *T. gondii* zaobserwowano u kobiet z bardzo wysokim poziomem PRL i z gruczolakiem przysadki.

Przeprowadzone badania wskazują, iż stan hiperprolaktynemii może hamować rozwój infekcji wywołanej przez *T. gondii*. Nadal jednak pozostaje pytanie, czy ochronne działanie PRL wynika z bezpośredniego wpływu hormonu na pozakomórkowe toksoplazmy, czy też jest skutkiem immunoregulatorowej roli PRL, która aktywując komórki żywiciela prowadzi do zahamowania replikacji pasożyta i tym samym do jego stopniowej eradykacji.

The alterations of glutathione level in rat liver cells after exposure to *Fasciola hepatica* proteins

Agnieszka Gajewska, Katarzyna Smaga-Kozłowska*, Agnieszka Wesółowska* and Grzegorz Kotomski

Zakład Parazytologii i Inwazjologii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

*Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN, ul. Twarda 51/55, 00-818 Warszawa

A number of studies have shown that liver of infected rats is under oxidative stress during the parenchymal stage of *Fasciola hepatica* infection. An useful indicator of the oxidative stress is the concentration of low-weight antioxidant — reduced glutathione (GSH).

The purpose of this study was to investigate the level of glutathione in rat hepatocytes exposed to excretory-secretory products (ESPs) and somatic proteins (SDS and TBS fractions) of *Fasciola hepatica*. Determination of reduced glutathione levels was carried out using the Cayman Chemical Glutathione Assay Kit. Rat hepatocytes were incubated with 0.4 and 1 mg/ml of parasite proteins for 2, 24, 48 and 72 hrs.

The significant decrease of glutathione level in rat liver cells was observed after exposure to ESPs and somatic protein fractions of *Fasciola hepatica*. The concentration of GSH was lower by 51.30–57.99%, 53.69–69.36% and 63.73–68.44% after 2 hrs of incubation with SDS, TBS and ESPs, respectively, as compared to control. The degree of glutathione level decrease was not dependent on concentration of above-mentioned parasite proteins.

The decrease of glutathione level indicates that *Fasciola hepatica* proteins are involved in induction of oxidative stress in livers of infected hosts.

Amplification of *Fasciola hepatica* DNA from feces — importance of sample preparation

Aleksandra Garbacewicz¹, Monika Kozak-Cięszczyk² and Halina Wędrychowicz²

¹Department of General Biology and Parasitology, Medical University of Warszawa; E-mail: ola_garbacewicz@o2.pl

²Witold Stefański Institute of Parasitology, Polish Academy of Sciences, Warszawa

Collecting stool samples is one of the easiest methods to obtain material for diagnosis of infection. Traditional techniques to identify *Fasciola hepatica* are based on the detection of parasite eggs in host feces. This technique is reliable only after flukes attain sexual maturity and begin releasing eggs. However stool samples can also be used to diagnose the parasite by molecular methods such as PCR.

In the experiment, 34 male and female Wistar rats were used as laboratory hosts. Animals were infected by gastric intubation with different numbers of *F. hepatica* metacercariae. Stool samples were collected weekly and various sample preparation methods were tested to obtain DNA of sufficient quality for PCR amplification. In faeces are present PCR inhibitors therefore the purification of DNA is important step. The optimal procedure included washing in TE buffer prior to DNA isolation with the NucleoSpin(r) Tissue kit (Macherey-Nagel) according to protocol number designated for fecal samples. This procedure was necessary to refine and condense the samples, ensuring high sensitivity of the PCR test. Molecular diagnosis based on the modified isolation protocol enabled detection of the parasite in stool samples as early as 5 weeks after infection, compared to 10-12 weeks using the conventional method.

Komórki rozrodcze i zarodki jako drogi szerzenia *Neospora caninum* u bydła

Germinative cells and embryos as a source of *Neospora caninum* transmission in cattle

Katarzyna Goździk, Bożena Moskwa i Władysław Cabaj

Instytut Parazytologii im. W. Stefańskiego PAN, ul. Twarda 51/55, 00-818 Warszawa;
E-mail: moskwa@twarda.pan.pl

Neosporoza jest chorobą pasożytniczą bydła wywoływaną przez wewnątrzkomórkowego pierwotniaka *Neospora caninum*. Rozprzestrzenianie *N. caninum* w stadzie hodowlanym odbywa się drogą pionową i poziomą. Przenoszenie pasożyta z pokolenia na pokolenie jest główną drogą szerzenia parazytozy (81-95%).

Celem podjętych badań była ocena ryzyka przeniesienia neosporozy drogą płciową lub poprzez przenieszenie zarodków — tzw. embriotransfer. Embriotransfer jest rekomendowany przez Międzynarodowe Towarzystwo Embriotransferu (International Embryo Transfer Society; IETS) (Stringfellow 1998, Baillargeon i wsp. 2001) jako procedura zapobiegająca rozprzestrzenianiu *N. caninum* w stadzie hodowlanym.

W badaniach wykorzystano metodę PCR wg. Yamage i wsp. (1999) z własnymi modyfikacjami (Moskwa i wsp. 2007). Analizie molekularnej poddano nasienie buhajów zarodowych, w surowicach których stwierdzono specyficzne przeciwciała IgG przeciw pasożytowi. Badano także oocyty i wczesne stadia zarodkowe wyizolowane od krów serododatnich.

W nasieniu od dodatnich buhajów zarodowych stwierdzono DNA *N. caninum*. Wynik ten wskazuje na możliwość przenoszenia parazytozy drogą płciową. Jest on szczególnie istotny ze względu na fakt, że wykazano możliwość zarażenia krów podczas inseminacji nasieniem zawierającym doświadczalnie wprowadzone tachyzoity (Ferre i wsp. 2006, Serrano-Martinez i wsp. 2007). Natomiast nie stwierdzono DNA pasożyta w oocytach ani wczesnych stadiach zarodków. Jest to niezwykle istotny wynik, w przypadku powszechnie stosowanej procedury przenoszenia zarodków. Uzyskany wynik oznacza, że pasożyt przenika do zarodka w znacznie późniejszym okresie rozwoju, czyli po implantacji do krów biorczyń.

Enzymy związane z glikolizą w redii i cercarii *Fasciola hepatica* oraz w wątrobotrzustce ślimaka *Galba truncatula*

Enzymes associated with glycolysis in redia and cercaria of *Fasciola hepatica* and in hepatopancreas of *Galba truncatula*

Mirosława Humiczewska

Uniwersytet Szczeciński, al. Piastów 40 B, 71-065 Szczecin; E-mail: mhumiczewska@pnet.pl

Celem pracy było określenie lokalizacji oraz nasilenia aktywności enzymów związanych z glikolizą tj. glukozy-6-fosfatazy (G6P), heksokinazy (Hk) oraz aldolazy (Ald) w rediach i cercariach motylicy wątrobowej oraz w wątrobotrzustce ślimaka (*Galba truncatula*), u którego larwy pasożytowały.

Materiał do badań stanowiły ślimaki zarażone miracydiami motylicy, w warunkach laboratoryjnych. Enzymy wykrywano metodami histochemicznymi, po 40 i 60 dniach od zarażenia, kiedy w wątrobotrzustce ślimaków rozwijały się redie i cercarie. Ponadto do oznaczenia ilościowego enzymów dokonywano pomiarów preparatów w cytofotometrze. Cytofotometryczną analizę przeprowadzono wykonując pomiary zawartości enzymów w tkankach redii i cercarii oraz w komórkach trawiennych wątrobotrzustki ślimaków. Otrzymane wartości odpowiadające względnej ilości badanych enzymów poddawano obliczeniom statystycznym, określając istotność różnicy ilości enzymów w komórkach trawiennych wątrobotrzustki po 40 i 60 dniach od zarażenia oraz niezarażonej, a także w pasożytach.

Uzyskane wyniki wykazały, że największe ilości aktywnych enzymów u pasożytów występują w kulach zarodkowych, gardzieli i jelicie redii oraz w tegumencie i przyssawkach cercarii, a więc w tkankach aktywnych metabolicznie. Występują też różnice w aktywności poszczególnych enzymów, najwyższą aktywnością odznacza się G6P, a najniższą Ald. Silna aktywność badanych enzymów w tkankach pasożytów świadczy o tym, że odgrywają one istotną rolę w ich metabolizmie. Szczególnie wysoka aktywność w kulach zarodkowych redii wydaje się być związana z intensywnymi podziałami komórek zarodkowych i różnicowaniem się embrionów cercarii.

W komórkach trawiennych wątrobotrzustki po 40 i 60 dniach zarażenia aktywność G6P jest silna i wykazuje wzrost w porównaniu z wątrobotrzustką nie zarażoną. Natomiast heksokinaza wykazuje wzrost aktywności w wątrobotrzustce po 40 dniach zarażenia i wyraźny spadek po 60 dniach w porównaniu z niezarażoną. Różnice w zawartości enzymów są istotne statystycznie ($p < 0,01$). Świadczą one o zaburzeniu metabolizmu w zarażonej wątrobotrzustce ślimaka, szczególnie silne po 40 dniach zarażenia.

Niektóre enzymy cyklu pentozofosforanowego w metacerkarii *Fasciola hepatica*

Some enzymes of the pentose phosphate pathway in metacercariae of *Fasciola hepatica*

Mirosława Humiczewska

Uniwersytet Szczeciński, al. Piastów 40 B, 71-065 Szczecin; E-mail: mhumiczewska@pnet.pl

Celem prezentowanych badań histochemicznych i cytofotometrycznych było wykrycie lokalizacji i aktywności enzymów biorących udział w przemianach glukozy w cyklu pentozofosforanowym tj. dehydrogenaz: glukozo-6-fosforanowej (DG6P) i 6-fosfoglukonianowej (D6PG) w tkankach metacerkarii motylicy wątrobowej.

Metacerkarie uzyskiwano w warunkach laboratoryjnych ze ślimaków *Galba truncatula* zarażonych miracydiami *Fasciola hepatica*. Metacerkarie pobierano do badań na drugi dzień po encystacji oraz po 60 dniach. Dehydrogenazy wykrywano metodami histochemicznymi. Ponadto do oznaczenia ilościowych zmian enzymatycznych zastosowano pomiary preparatów w cytofotometrii, wykonując pomiary komórek tegumentu, parenchymy i przysawek w ubu grupach metacerkarii. Otrzymane wartości odpowiadające względnej ilości badanych enzymów poddawano obliczeniom statystycznym, określając istotność różnicy ilości enzymów w metacerkariach dwutygodniowych i 6-miesięcznych.

W metacerkariach dwudniowych wykryto pozytywne odczyny obu badanych enzymów. DG6P odznaczała się dosyć silnym odczynem w tegumencie i w parenchymie, a w przysawkach i jelicie umiarkowanym. D6PG przy podobnej lokalizacji wykazuje nieco słabsze nasilenie aktywności w większości badanych tkanek. Po upływie 6 miesięcy od encystacji lokalizacja aktywnych enzymów w tkankach metacerkarii nie uległa zmianie. Nasilenie odczynów enzymatycznych było nieco słabsze niż w metacerkarii dwudniowej. Jednakże pomiary cytofotometryczne wykazały, że różnice w ilości enzymów między tymi dwoma grupami metacerkarii były nieistotne statystycznie.

Utrzymująca się aktywność obu dehydrogenaz na prawie niezmiennym poziomie po 6 miesiącach od encystacji, wskazuje na ważną rolę cyklu pentozowego w metabolizmie metacerkarii. Jak wiadomo cykl pentozowy służy głównie do produkcji zredukowanych nukleotydów (NADPH) potrzebnych do wielu syntez, m.in. kwasów tłuszczowych i sterydów, a przede wszystkim fosforanów pentoz, które są niezbędne do budowy nukleotydów i kwasów nukleinowych.

A comparison of protectivity of cDNA vaccination against *Fasciola hepatica* infections using a novel cathepsin L (FhPcW2) and previously tested cathepsin Ls

**S. Jaros¹, K. Januszkiewicz¹, K. Smaga-Kozłowska¹, A. Wesołowska¹,
W. Zygnier² and H. Wędrychowicz^{1,2}**

¹Laboratory of Molecular Parasitology, W. Stefański Institute of Parasitology PAS, 51/55 Twarda Str., 00-818 Warszawa, Poland

²Division of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw Agricultural University, Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa, Poland

Fasciola hepatica infections in farm animals and humans are of great global medical and economical significance. The drug of choice in the treatment of fasciolosis in ruminants is triclabendazole, a member of the benzimidazole family of anthelmintics. Unfortunately, resistance to this drug is rising worldwide. Moreover, pharmacological therapy is expensive and harmful for the environment. Therefore it is hoped that a new generation of vaccines could improve the control of fasciolosis.

Cysteine proteinases are promising vaccine antigens. These enzymes are very important in the host-parasite interactions playing a key role in parasite feeding, migration through the host tissues as well as in immune evasion.

In the present study we performed a comparison of cDNA and protein sequences of different isoforms of *F. hepatica* cysteine proteinases, including a novel one of cathepsin L family (FhPcW2), attempting to identify the most immunogenic regions which could be used for vaccination as recombinant peptides. Preliminary vaccination trials in rats using cDNA of FhPcW2 and pCMV vector revealed 42.6 % level of protection against *F. hepatica* metacercariae challenge. We also performed bioinformatic characterization of FhPcW2 using following programs: Dipro 2.0, DOMPro 1.0, NetPhos 2.0, NetOGlyc 3.1, Peptide Mass, SSPro, SignalP 3.0, Swiss Model, The Sulfinator, SYFPEITHI, TargetP 1.1, TMHMM 2.0, WoLF PSORT Prediction, Protein-Protein BLAST, VAST Search.

Molecular cloning of cDNA and preliminary analysis of cathepsin L like enzyme from metacercariae of *Fasciola hepatica*

S. Jaros¹, A. Zawistowska², K. Januszkiewicz¹, M. Wiśniewski² and H. Wędrychowicz^{1,2}

¹Department of Molecular Biology, Laboratory of Molecular Parasitology, W. Stefański Institute of Parasitology, Polish Academy of Sciences, 51/55 Twarda Str., 00-818 Warszawa, Poland

²Division of Parasitology, Department of Preclinical Sciences, Warsaw Agricultural University, Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa, Poland

Fasciola hepatica infections cause significant global problem in veterinary and human medicine. The fluke causes huge losses in cattle and sheep production. Because of its economical importance efforts of many scientists are focused on constructing an effective vaccine against this parasite.

Our approach is to construct vaccine targeting genes crucial for parasite development and pathogenesis. One group of promising vaccine antigens are cysteine proteinases, which play a key role in parasite feeding, migration through host tissues and in immune evasion. However, so far only enzymes from flukes dwelling in final host have been analysed. In the present experiments we aimed to identify cysteine proteinases expressed by the developmental stage of *F. hepatica* infective for the final host.

A total RNA was isolated from metacercariae *F. hepatica* and reverse transcribed. First strand cDNA was synthesized using Reverse Transcriptase and the primer *pTXho*. Based on analysis of variety of cDNA sequences encoding cathepsins L, which are deposited in GenBank database, conserved regions were identified and specific gene primers were designed. The 5' (750 bp) and 3' end (531bp) were amplified using *poliG* or *pTXho* and internal specific gene primers by the method of RACE-PCR. Obtained products were cloned into the pBluescript SK+ vector and sequenced using T7 and T3 primers. Sequence analysis showed the highest similarity to procathepsin L from NEJ stage (newly excysted juvenile) of *Fasciola hepatica*. We found also its high similarity to cathepsin Ls from *Fasciola gigantica*. At present a bioinformatics analysis is being performed in order to identify biochemical properties, potential function and structure of the metacercarial cathepsin L.

Ekspresja receptorów toll-podobnych na poziomie mRNA w jelitach (jelito cienkie i jelito grube) myszy zarażonych larwami *T. spiralis*

mRNA — expression of Toll-like receptors in mice intestine (small intestine and colon) during infection of *T. spiralis*

Mariusz Kaczmarek, Agnieszka Wojtkowiak i Krystyna Boczoń

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, ul. Fredry 10, 61-701 Poznań; E-mail: kboczon@ump.edu.pl

W ostatnich latach duże zainteresowanie immunologów wzbudzają receptory, znajdujące się na powierzchni komórek odpowiedzialnych za rozpoczęcie szybkich działań obronnych żywiciela na różne infekcje, bez angażowania limfocytów. Receptory te należą do rodziny białek Toll — receptory Toll-podobne (TLRs — Toll Like Receptors), a odpowiedź immunologiczna inicjowana przez te receptory może stanowić stary ewolucyjny mechanizm obrony żywiciela przed patogenami. W parazytologii pionierski cykl badań nad rolą TLRs w odpowiedzi immunologicznej na inwazję pasożytniczą rozpoczęto kilka lat temu tylko w przypadku leiszmaniozy i dlatego nasze planowane badania dotyczą również inwazji tkankowej, o dwufazowym cyklu rozwojowym, jaką jest włośnica. Dodatkowym celem badań będzie zbadanie wpływu działania leku przeciw pasożytniczego — Albendazolu na rolę TLRs w odpowiedzi immunologicznej żywiciela na obecność larw a później postaci dorosłych *T. spiralis* w jelicie. Ten dodatkowy cel badań ma pewien aspekt praktyczny, bowiem może potwierdzić czy lek przeciw pasożytniczy — Albendazol ma szerokie pole działania obejmujące nie tylko metabolizm samego pasożyta (tubulinę), ale także układ immunologiczny żywiciela.

Materiał do badań stanowił wyizolowany RNA z jelit (jelito cienkie i jelito grube) myszy szczepu BALB/c zarażonych larwami *T. spiralis*. Z RNA otrzymywano cDNA przy zastosowaniu techniki RT-PCR. W reakcji PCR użyto następujących primerów dla Toll-4 o sekwencjach 5'TCATGG-CACTGTTCTTCTCC3' i 5'GTCTCCACAGCCACCAGATT3'.

Planuje się również potwierdzenie istnienia Toll-4 i Toll-2 na poziomie białka metodami immunohistochemicznymi z użyciem specyficznych przeciwciał poliklonalnych.

W mięśniach zdrowych jak i zarażonych larwami *T. spiralis* zwierząt, jak wynika z naszych wstępnych badań, Toll-4 nie bierą udziału w odpowiedzi immunologicznej. Wobec powyższych stwierdzeń nasze badania są planowane tylko w jelitowej fazie włośnicy.

Natomiast wyraźna ekspresja mRNA Toll-4 zachodzi w różnych odcinkach jelita; u myszy zdrowych ekspresja mRNA Toll-4 znacznie silniej zaznaczona jest w jelicie grubym aniżeli w jelicie cienkim. Badania immunohistochemiczne Toll-4 w obu odcinkach jelita przed i po leczeniu przy zastosowaniu Albendazolu są w toku.

The proteolytic-antiproteolytic balance in rat serum during *Fasciola hepatica* infection

Lidia Kołodziejczyk¹, Ewa Zapora² and Elżbieta Skrzydlewska²

¹Department of Biology and Medical Parasitology, Pomeranian Medical University, al. Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin; E-mail: lkolo@sci.pam.szczecin.pl

²Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Medical University of Białystok, Mickiewicza 2, 15-230 Białystok, Poland

Fasciola hepatica infection is accompanied by increased generation of reactive oxygen species. Moreover the low level of non-enzymatic antioxidants and decreased activity of antioxidant enzymes is observed in rat liver and serum in the course of fasciolosis. Such situation may be the reason of oxidative modification of cellular components such as lipids and proteins.

The aim of the study was to determine the effect of *Fasciola hepatica* infection on antioxidant status of the blood serum as well as on the activity of serine proteases — cathepsin G and elastase and their inhibitors — α_2 -macroglobulin and α_1 -proteinase inhibitor (α_1 -antitrypsin) in rats serum. Wistar rats were infected with 30 metacercariae of *Fasciola hepatica* and the antioxidant status as well as the activities of proteases and their inhibitors were determined using spectrophotometric methods at 4, 7 and 10 weeks post infection (wpi).

The serum level of total antioxidant status (TAS) in the course of fasciolosis was significantly decreased at 4, 7 and 10 weeks post infection (by about 24, 39 and 27%, respectively).

Activities of proteases and their inhibitors were also significantly changed in the course of fasciolosis. The activity of cathepsin G at 4, 7 and 10 wpi was increased by about 25, 37 and 30%, and respectively the activity of elastase was increased by 18, 16 and 9% in the comparison with control group. The activity of α_1 -protease inhibitor was decreased by 36, 55 and 25% at 4, 7 and 10 wpi, and the activity of α_2 -macroglobulin by 14, 17 and 8%.

Our results indicate that the oxidative stress observed during *Fasciola hepatica* infection leads into the shift in proteolytic-antiproteolytic balance in host organism.

Ekspresja genu dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w komórkach krwi i hepatocytach u żywicieli pośrednich zarażonych *Echinococcus granulosus*

Expression of superoxide dismutase on DNA, mRNA and protein levels in the blood and hepatocytes wells in pigs infected with *Echinococcus granulosus*

Jolanta Kozłowska-Łój i Jolanta Rzymowska

Katedra i Zakład Biologii z Genetyką, Akademia Medyczna, Lublin

Dysmutaza ponadtlenkowa (SOD) odgrywa ważną rolę w detoksykacji organizmu. Funkcja jej polega na ochronie organizmów przed cytotoksycznym działaniem wolnych rodników. Enzym ten występuje w wielu różnych organellach komórkowych oraz wszystkich tkankach, w których zachodzą reakcje metaboliczne w warunkach tlenowych. Ten biochemiczny antyutleniacz stanowi naturalny system regulacji metabolizmu oraz ochrony przed toksycznym wpływem nadtlenu i tlenu cząsteczkowego.

Adaptacją na stres jest synteza na wysokim poziomie enzymów antyoksydacyjnych i ekspresji ich w układzie pasożyt-żywicieli.

Nieliczne badania aktywności SOD odnotowano u tasiemców. Scharakteryzowano go u *Taenia taeniaeformis* oraz *Echinococcus granulosus* podczas badań różnych izolatów pasożytów od różnych żywicieli, z wielu rejonów geograficznych.

Materiał do badań pozyskiwano w Zakładach Mięśnych w Lublinie.

Krew zwierząt grupy kontrolnej i zarażonej pobierano z serca bezpośrednio po uboju w trakcie skrwawienia. Wątrobę grupy kontrolnej i zarażonej tasiemcem pobierano w trakcie rozbiórki tusz wieprzowych.

Z pobranego materiału izolowano DNA metodą fenolowo-chloroformową Hirta. Następnym etapem było przeprowadzenie reakcji PCR. W reakcji użyto startery o sekwencji: — CTGGGCAATGTGACTGCTGGCA — TTGTGCGGCCAATGATGGAATG.

Następnie przeprowadzono elektroforezę produktów na 2% żelu agarozowym.

Ekspresja genu dysmutazy ponadtlenkowej jest najwyższa w miejscu bąbla oraz nieco niższa w tkance oddalonej od miejsca infekcji. Ekspresja tego genu w komórkach krwi jest nieznacznie niższa od ekspresji zaobserwowanej w hepatocytach.

Resolution of relationships in the genus *Corynosoma* Lühe, 1904 (Acanthocephala) by the Bayesian analysis based on ribosomal DNA sequences

Z. Laskowski¹, K. Zdzitowiecki¹, R. Milanowski² and J. Kwiatowski²

¹W. Stefański Institute of Parasitology, Polish Academy of Sciences, Twarda 51/55, Warszawa, Poland

²Department of Plants Systematic and Geography, Warsaw University, Aleje Ujazdowskie 4, Warszawa, Poland

Two new sequences of internal transcribed spacers and 5.8S rDNA from Antarctic species — *Corynosoma arctocephali* Zdzitowiecki, 1984 and *C. shackletoni* Zdzitowiecki, 1978 — together with ten homologous sequences available in the GenBank, were used to resolve relationships in the genus *Corynosoma*. The phylogenetic tree of twelve nominal species of *Corynosoma* obtained by a Bayesian analysis is composed of two sister clades. One group consists of two species (*C. cetaceum* and *C. shackletoni*), while the other of the remaining ten. This second clade consists of three monophyletic groups, whose relationships remain unresolved. The first of these three clades consists of two species (*C. bullosum* and *C. australe*). The second clade is composed of three species, of which *C. arctocephali* diverges first, whereas *C. villosum* and *C. validum* are sister species. Finally, the third clade is composed of two sister groups, one of which includes *C. caspicum* and *C. magdaleni* and the other the three remaining species, of which *C. hamanni* branches off first, while *C. strumosum* and *C. enhydri* are sister species. Other methods of phylogenetic inference produced similar trees, generally however without significant support of several deeper nodes. The hypotheses regarding evolution of morphological features and geographical distribution of *Corynosoma* species are being presented based on the obtained phylogenetic tree.

This study was supported by the Grant 2 PO4C 016 26 from the Ministry of Education and Science, Poland.

Sequencing of the *Ashworthius sidemi* genomic rRNA genes and internal transcribed spacers

Erland L. Ljunggren and Katarzyna Goździk

Witold Stefański Institute of Parasitology of the PAS, Warszawa, Poland; E-mail: erllju@twarda.pan.pl

The nematode *Ashworthius sidemi* is a blood-sucking gastro-intestinal parasite that is present in deer populations and herds of *Bison bonasus* in Poland. The parasite is considered to be as pathogenic as *Haemonchus* sp., consequently making it a potentially important pathogen in wildlife and domesticated animals. However, despite its importance very little sequence data is available about the parasite. Sequence information from the ribosomal RNA (rRNA) genes including the internal transcribed spacers (ITS) 1 and 2, has in numerous parasite species proven to be valuable for extended investigations, for example taxonomical, diagnostic and epidemiological studies.

In the presented work we amplified and sequenced a fragment spanning from the 3'-end of small subunit rRNA (ssrRNA) to the 5'-end of large subunit rRNA (lsrRNA) genes that includes the ITS1, 5.8S and ITS2 regions. The primers were designed based on alignments with known sequences from closely related nematodes and were directed towards highly conserved regions in ssrRNA and lsrRNA. The PCR successfully amplified a 1055 bp fragment that was cloned into a basic cloning vector. Multiple clones were selected for sequencing to investigate variations within the target sequences. The sequences were subsequently compared to the public non-redundant database using the BLASTn algorithm and showed highest similarity to other members of the Haemonchidae family (84-85%). The genomic sequence corresponding to the *A. sidemi* rRNA region has been submitted to the public database at NCBI (Genbank accession: EF467325). The significance of the obtained sequence information and its possible applications will be discussed.

Regulation of the kinetoplast DNA replication in trypanosomatids

Neta Milman, Dotan Sela, Aviad Zick, Irit Kapeller, Nurit Yaffe and Joseph Shlomai

The Kuvim Center for the Study of Infectious and Tropical Diseases, The Hebrew University-Hadassah Medical School, Jerusalem 91102, Israel; E-mail: josephs@ekmd.huji.ac.il

Replication of kinetoplast DNA (kDNA) minicircles initiates at conserved origin sequences that are bound by the universal minicircle sequence binding protein (UMSBP). Knocking down the two USBBP encoding genes in *Trypanosoma brucei* (*TbUMSBP1* & *TbUMSBP2*) by RNA interference (RNAi), results in the cells growth arrest and a significant decreased rate of minicircles replication initiation. These analyses have also suggested a post replication role for USBBP. Fluorescent microscopy analysis of *T. brucei* cells after RNAi induction of both *TbUMSBP* genes revealed the generation of giant kinetoplasts and significantly enlarged nuclei in these cells. Analysis of kDNA networks isolated from these cells revealed a dramatic increase in the networks size. Electron microscopy analysis demonstrated the generation of large kDNA networks that apparently failed to segregate. Interestingly, analyses of USBBP activity in synchronized *Crithidia fasciculata* cell cultures showed that USBBP activity, which is regulated *in vivo* through a cell cycle dependent control of the protein redox state, displays cycling of USBBP activity with peaks during S and M phases of the cell cycle. Searching for an enzymatic mechanism that may function in the redox mediated regulation of USBBP we have found that USBBP reduction by tryparedoxin enabled its interaction with the replication origin. Recently, we have observed that a trypanosomal 2-Cys tryparedoxin peroxidase is capable of oxidizing USBBP *in vitro*, inhibiting the binding of USBBP to DNA. We have immunolocalized a 2 Cys tryparedoxin peroxidase that could potentially function in this reaction, at the kDNA region within the *C. fasciculata* kinetoplast.

Molecular identification of *Echinococcus granulosus* cysts isolated from patients in Warsaw

Monika Turkowicz, Danuta Cielecka, Anna Gierczak and Bogdan Michałowicz*

Zakład Biologii Ogólnej i Parazytologii; E-mail: mon.tu@gmx.net

*Katedra i Klinika Chirurgii Ogólnej, Transplantacyjnej i Wątroby, Akademia Medyczna, Warszawa

Echinococcus granulosus is an aetiological agent of cystic hydatid disease affecting man and livestock. The cestode requires a carnivore as the definitive host and a herbivore, omnivore and eventually man as the intermediate host. Many *E. granulosus* genetic variants has been identified and the majority of genotypes (G1, G2, G5, G6, G7, G8 and G9) are infective to humans. The hydatid cyst in humans tends to develop mostly in liver, sometimes in lung or brain, heart and bones. A biological examination of *E. granulosus* larva isolated from human tissues, based on conventional morphological study (microscopic observation of wet and stained preparations), is not sufficient for proper species and strain differentiation, therefore in order to identify the genotype, PCR and sequencing were applied. 9 samples, containing larva fragments (parts of cysts and/or protoscolices) obtained after hepatectomy, were examined. The fragment of the mitochondrial NADH dehydrogenase 1 (ND1) gene was amplified and sequenced. PCR analysis confirmed *E. granulosus* presence in 7 cases; 2 were negative. These 2 negative samples proved to be previously misdiagnosed and did not include any parasite tissue. It confirms that molecular analysis of cystic hydatosis is a reliable tool for parasite/non-parasite detection. Sequence alignment of 7 positive isolates showed identity with the G7 (pig) strain of *E. granulosus* that affirms the pig strain is the most frequent causative agent of human cystic hydatid disease in Poland.

Transferaza glutationowa (GST) — ważny enzym detoksykujący w fazie jelitowej włośnicy eksperymentalnej przed i po leczeniu myszy albendazolem

Glutathione transferase (GST) — important detoxification enzyme in intestinal phase of experimental trichinellosis before and after treatment with albendazole

Agnieszka Wojtkowiak i Krystyna Boczoń

Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego, ul. Fredry 10, 61-701 Poznań; E-mail: kboczon@ump.edu.pl

Transferazy glutationowe (GST) to ważna rodzina enzymów metabolizmu glutationu, które neutralizują toksyczny wpływ wolnych rodników. Na strukturę tych dimerycznych enzymów mogą mieć wpływ różne czynniki, np. produkty przemiany materii pasożytów, a także stosowane leki. Enzym ten został uprzednio przebadany przez nas w mięśniach myszy zarażonych larwami *T. spiralis* natomiast zmiany zapalne towarzyszące postaciom dorosłym *Trichinella* w jelicie były do tej pory obiektem szeregu badań ale udziału w tym procesie enzymów metabolizmu glutationu nie badano. Wpływ Albendazolu na GST również wydawał się godny zbadania, ponieważ dla GST z mięśni myszy lek ten okazał się w naszych poprzednich badaniach allosterycznym aktywatorem.

Materiał do badań stanowiły jelita (jelito cienkie i jelito grube) myszy szczepu Balb/c zarażonych larwami *T. spiralis* w dawce ok. 400 larw *T. spiralis* pobierane do badań w 3 i 4 w dniu po zarażeniu (dpz). W drugim dniu po zarażeniu myszy poddano terapii przy użyciu Albendazolu (Zentel, SmithKline, Beecham) w dawce 0,5 mg/kg. Aktywność GST oznaczano spektrofotometrycznie, mierząc ilość tioeteru (S-2-4dinitrofenyloglutationu), powstałego jako produkt reakcji zredukowanego glutationu (GSH) z 1-chloro-2,4-dinitrobenzenem (CDNB) katalizowanej przez GST. Szybkość powstawania barwnego koniugatu określano mierząc przyrost absorpcji przy długości fali 340nm.

Z dotychczasowych badań można wyciągnąć następujące wnioski: (1) W fazie jelitowej włośnicy enzym GST ulega w jelicie cienkim wyraźnej indukcji już w 3 dpz nasilającej się w 4 dpz (odpowiednio do 254% i 391% wartości aktywności u myszy kontrolnych). W jelicie grubym natomiast indukcja do 319% wartości kontrolnych następowała dopiero w 4dpz; (2) Po leczeniu zarażonych larwami *T. spiralis* myszy przy użyciu Albendazolu indukcja GST zarówno w 3 jak i w 4 dpz utrzymywała się, ale była o połowę słabsza niż u myszy zarażonych i nieleczonych; (3) Zarażenie nie wpływa w zasadniczy sposób na kinetykę GST, którą charakteryzuje sigmoidalność krzywych wysycenia substratem.

Wydaje się więc, że silnie indukowana w fazie jelitowej włośnicy GST może neutralizować wolne rodniki wytworzone w tej fazie włośnicy w jelitach pod wpływem wydaliny postaci dorosłych, ale Albendazol podany w 2 dpz w standardowej dawce osłabia ten proces.

Enzymy metabolizmu trehalozy u *Contracaecum rudolphii* (Nematoda)

Enzymes of trehalose metabolism from *Contracaecum rudolphii* (Nematoda)

Krystyna Żółtowska¹, Elżbieta Łopieńska¹, Jerzy Rokicki²
i Małgorzata Dmitryjuk¹

¹Katedra Biochemii Wydziału Biologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, ul. Oczapowskiego 1A, 10-719 Olsztyn:
E-mail: k.zoltowska@uwm.edu.pl

²Katedra Zoologii Bezkręgowców, Uniwersytet Gdański, Al. Piłsudskiego 46, 81-378 Gdynia

Biochemia należącego do *Anisakidae* pasożytniczego nicienia *Contracaecum rudolphii* Hartwich, 1964 jest szczególnie interesująca z uwagi na złożoność cyklu życiowego. W postaci dorosłej występuje on w żołądkach i jelitach ptaków odżywiających się rybami, głównie u kormoranów i pelikanów. Jego stadium dyspersyjne (wczesna larwa L₂) jest wolno żyjące, natomiast larwy inwazyjne pasożytują u skorupiaków planktonowych i bentosowych oraz u ryb słodkowodnych i morskich. Piśmiennictwo dotyczące tego gatunku ogranicza się głównie do analizy morfologicznej i ekologicznej oraz dynamiki zarażenia. Nie znaleziono, w dostępnej literaturze, informacji na temat metabolizmu *C. rudolphii*. Z uwagi na to, że trehaloza jest ważnym materiałem energetycznym dla pasożytniczych nicieni, postanowiono wykazać jakie enzymy ją metabolizujące są obecne w ekstraktach z *C. rudolphii* i jaka jest ich aktywność. Według naszej oceny są to jedne z pierwszych badań z zakresu enzymologii dotyczące tego gatunku, który, jak stwierdzono w 2000 roku, zaczyna zamykać swój cykl rozwojowy również w Polsce.

Dorosłe osobniki oraz larwy stadium L₃₋₄ *C. rudolphii* izolowano z żołądków kormorana czarnego. W ekstraktach badano aktywność głównych enzymów rozkładających trehalozę — trehalazy i fosforylasy trehalozy oraz ją syntetyzujących — syntetazy trehalozo-6-fosforanu i fosfatazy T-6-P. Określono ich aktywność oraz optymalne warunki działania. Aktywność enzymów katabolizmu trehalozy była zdecydowanie wyższa u samic niż u samców pasożyta. Osobniki dorosłe rozkładają trehalozę intensywniej niż stadia larwalne. Interesujące jest to, że u dojrzałych samic i wyhodowanych z pozyskanych od nich jaj larw L₂, aktywność syntetazy T-6-P była bardzo wysoka w porównaniu do aktywności fosfatazy T-6-P. Odmienną sytuację obserwowano u larw starszych (L₄), u których najwyższą aktywność wśród badanych enzymów wykazywała fosfataza T-6-P. Uzyskane wyniki wskazują na istnienie u *C. rudolphii* różnic w aktywności enzymów metabolizmu trehalozy i antyoksydacyjnych, związanych z płcią i stadium rozwojowym pasożyta.