

Doktoraty

Wpływ albendazolu na cytoplazmatyczną transferazę-S-glutationową i ekspresję receptorów Toll-podobnych w jelitowej fazie włośnicy

The influence of albendazole on the cytosolic glutathione-S-transferase (GST) and on the expression of Toll-like receptors (TLR2 and TLR4) during the intestinal phase of trichinellosis

Agnieszka Wojtkowiak-Giera

Praca doktorska wykonana w Katedrze i Zakładzie Biologii i Parazytologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu i obroniona 15 października 2008 r.

Promotor: prof. dr hab. Krystyna Boczoń
Recenzenci: prof. dr hab. Krystyna Żółtowska
prof. dr hab. Wanda Kocięcka

ABSTRACT. Research into changes in the activity and kinetics of the reaction catalysed by the important detoxifying enzyme, glutathione-S-transferase (GST), in the intestinal phase of trichinellosis as presented in the present study is a pioneering achievement. In every instance of infection – or if infection is only suspected – the patient receives anthelmintics that are effective against mature intestinal forms, newborn larvae and encysted larvae of *Trichinella spiralis*. This group of drugs includes benzimidazoles such as albendazole. The primary action of these drugs concerns β -tubuline. The functions of microtubules are damaged by bonding β -tubuline with benzimidazoles, which inhibits the polymerisation of microtubules. Newly considered fields of action of benzimidazoles on the pathological changes occurring in the host during the course of parasitic diseases are the following elements taking part in the immunological defence against a parasitic infection: for example, detoxifying enzymes such as glutathione-S-transferase (GST), and Toll-like receptors (TLRs). Occurrence of cell resistance to drugs is attributed to certain enzymes, (such as GST), which perform the detoxification of these drugs and facilitate their removal from cells through a pump dependent on compounds coupled with glutathione. In the case of the intestinal phase of trichinellosis, GST may remove toxins secreted by both the adult and newborn larvae of *T. spiralis*. The structure of a dimeric enzyme of the host, such as GST, may be impacted by various factors, for example excretory-secretory products (ES), as well as drugs used. Over the past few years, the interest of researchers in the innate immune response as the first line of defense of vertebrates against pathogens, was increased. The number of works devoted to the role of Toll-like receptors, which enable the immediate commencement of protective action by the host against various infections without engaging lymphocytes, is on the noticeable. The experimental material consisted of small and large intestine from BALB/c mice infected with *T. spiralis* strain MSUS/PO/60/ISS3. Mice were inoculated orally with about 400 *T. spiralis* larvae per mouse. On the 2nd day post-infection, the mice were treated with albendazole, in a dose of 0.5 mg/mouse. The activity and kinetics of the GST were determined spectrophotometrically. An evaluation of the expression of TLRs (TLR2 and TLR4 on the mRNA level) was examined using the RT-PCR technique with the appropriate starter sequences for TLR2 and TLR4. The presence of Toll-like receptors and their expression on the protein level was confirmed using the immunohistochemical method (Santa Cruz ABC Stainig system sc-2023 test) with specific polyclonal antibodies anti-TLR2 and anti-TLR4. My results pointed to the participation of GST, as well as Toll-like receptors, in defence processes of the host during the intestinal phase of trichinellosis in mice. The adult and newborn larvae of *T. spiralis* present in

the intestines of infected mice are a source of excretory-secretory (ES) products, which appear to stimulate the activity and change catalytic properties of conformers GST. It is supposed that ES products secreted by the parasite acts on GST as an allosteric activator. Additionally, the presence of Toll-like receptors (TLR2 and TLR4) in the intestinal phase of trichinellosis was investigated. Thus, the infection with *T. spiralis* leads to strong biochemical reactions with the involvement of GST, and immunological reactions with the involvement of TLR2 and TLR4 receptors. Administration of albendazole, resulted in 2-fold decrease of the total activity of GST in comparison with its activity in infected and untreated animals. Also, drug administration had weakened expression of gene of TLR4 and TLR2 in the large intestine, and expression of gene of TLR2 in the small intestine. My results confirmed destructively action of albendazole on *T. spiralis* (resulted in 4-fold decrease in the intensity of infection measured in muscles). The destruction by the drug of a adult and newborn larvae of *T. spiralis* lowers the quantities of their ES products stimulated the activation of the host's response. This is apparent as weakening the innate immune response, in which take part Toll-like receptors play a role, and in biochemical processes with the participation of the GST enzyme. In summary my results contribute new data on the participation of Toll-like receptors and GST in the defence mechanisms of the host during in the intestinal phase of experimental trichinellosis in mice.

Key words: trichinellosis, glutathione transferase, toll-like receptors, albendazole

Streszczenie

Badania zmian aktywności i kinetyki reakcji katalizowanej przez ważny enzym detoksykujący, jakim jest transferaza-S-glutationowa (GST) w jelitowej fazie włośnicy, podjęte w niniejszej pracy mają charakter pionierski.

W przypadku zarażenia lub podejrzenia o włośnicę są podawane leki przeciw pasożytnicze, skuteczne zarówno w przypadku postaci dojrzałych *Trichinella spiralis*, jak i larw nowo urodzonych i larw otorbionych we włóknach mięśniowych. Do tej grupy leków zaliczamy benzimidazole, do których należy albendazol. Za pierwotny punkt uchwytu tych leków uważa się β -tubulinę. Po jej związaniu z benzimidazolami dochodzi do uszkodzenia funkcji mikrotubul poprzez hamowanie ich polimeryzacji.

Nowy, badany w niniejszej pracy, obszar wpływu benzimidazoli na zmiany patologiczne zachodzące w żywicielu w przebiegu chorób pasożytniczych to czynniki biorące udział w procesach immunologicznych przeciw pasożytom: np. enzymy detoksykujące takie jak transferaza-S-glutationowa (GST) lub receptory Toll-podobne (TLRs).

Zjawisko oporności na leki przypisuje się niektórym enzymom (np. GST), przeprowadzającym ich detoksykację i ułatwiającym ich usuwanie na zewnątrz komórki poprzez pompę zależną od związków sprzęganych z glutationem. W przypadku jelitowej fazy włośnicy GST może brać udział w detoksykacji toksyn wydzielanych zarówno przez postaci dojrzałe jak i nowo urodzone larwy. Na strukturę dimerycznego enzymu, jakim jest GST żywiciela, mogą wpływać różne czynniki, w tym np. produkty

wydzielniczo-wydalnicze (ES), a także stosowane leki.

W ostatnich latach nastąpił wzrost zainteresowania badaczy wrodzonym układem odpornościowym jako pierwszą linią obrony organizmów kręgowych przed patogenami. Świadczy o tym liczba prac dotyczących roli receptorów Toll-podobnych, pozwalających na natychmiastowe rozpoczęcie działań obronnych żywiciela w różnych infekcjach bez angażowania limfocytów.

Materiał do badań stanowiły jelito cienkie i grube myszy szczepu BALB/c zarażonych *T. spiralis* szczep MSUS/PO/60/ISS3 dawką ok. 400 larw na mysz. W drugim dniu po zarażeniu myszom podawano albendazol w dawce 0.5 mg/mysz. Aktywność i kinetykę reakcji GST oznaczano spektrofotometrycznie. Ocenę ekspresji TLRs (TLR2 i TLR4) wykonywano przy zastosowaniu techniki RT-PCR z użyciem odpowiednich sekwencji starterów dla TLR2 i TLR4. Potwierdzenie obecności receptorów Toll-podobnych i ich ekspresji na poziomie białka uzyskiwano metodą immunohistochemiczną (test Santa Cruz ABC Stainig system Sc-2023) z użyciem specyficznych przeciwciał poliklonalnych anty-TLR2 i TLR4.

Wyniki badań wskazują na udział w mechanizmach obronnych żywiciela podczas fazy jelitowej włośnicy doświadczalnej u myszy zarówno GST, jak i receptorów Toll-podobnych. Postaci dojrzałe i larwy *T. spiralis* obecne w jelicie zarażonych myszy są źródłem produktów wydzielniczo-wydalniczych (ES), które wydają się odpowiadać za silną stymulację aktywności i zmianę właściwości katalitycznych konformerów GST. Można przypuszczać, że wydzielane przez pasożyty ES działają na GST

jak allosteryczny aktywator.

Ponadto w fazie jelitowej włośnicy wykazano obecność receptorów Toll-podobnych (TLR2 i TLR4). Stąd można sądzić, że inwazja wyzwała zarówno silne reakcje biochemiczne z zaangażowaniem GST, jak i reakcje immunologiczne związane z obecnością receptorów TLR 2 i TLR4.

Podanie albendazolu spowodowało 2-krotne zmniejszenie całkowitej aktywności GST w porównaniu do aktywności, jaką zaobserwowano u zwierząt zarażonych i nieleczonych. Równocześnie podanie leku osłabiło ekspresję genów TLR4 i TLR2 w jelicie grubym i dodatkowo ekspresję genu TLR2 w jelicie cienkim.

W przedstawionej pracy potwierdzono zabójcze działanie albendazolu na *T. spiralis*, uzyskując 4-krotne zmniejszenie liczby larw w mięśniach

po podaniu leku. Zabicie przez lek części postaci dojrzałych i nowo urodzonych larw zmniejszyła ilość produktów ES wpływających na stymulację odpowiedzi immunologicznej żywiciela. Dotyczy to zarówno osłabienia wrodzonej reakcji immunologicznej z udziałem receptorów Toll-podobnych, jak i zmniejszenia biochemicznych mechanizmów obronnych z udziałem GST.

Reasumując, wyniki badań wnoszą nowe dane o udziale receptorów Toll-podobnych i GST w mechanizmach biochemicznych i immunologicznych podczas fazy jelitowej włośnicy doświadczalnej u myszy.

Wpłynęło 3 marca 2010

Zaakceptowano 27 maja 2010