

## Analiza antygenów somatycznych nicienia *Aspicularis tetraptera* (Oxyuridae) oraz ich rola w tworzeniu odpowiedzi immunologicznej u myszy laboratoryjnych

### The analysis of somatic antigens extracted from *Aspicularis tetraptera* (Oxyuridae) and their role in eliciting immune response in laboratory mice

Grzegorz Zalesny, Agnieszka Perec-Matysiak i Anna Okulewicz

Zakład Parazytologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław

Adres do korespondencji: G. Zalesny, Zakład Parazytologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław; E-mail: zalesny@microb.uni.wroc.pl

**ABSTRACT: Background.** The aim of this study was isolation and examination of *Aspicularis tetraptera* somatic proteins and somatic antigens role in eliciting of immune response in laboratory mice. **Material and methods.** In our investigation 40 laboratory mice (BALB/c strain) were used. To extract the somatic proteins Tris-HCl buffer with NaCl and Triton X-100 was used. The analysis of somatic antigens was undertaken by Western blotting. **Results.** The study showed the presence of 14 protein bands ranging from ~ 82 to 28 kDa. Glicoproteins detection revealed 13 bands in range between ~ 70 to 30 kDa. There was no reaction observed with immunoglobulins IgA. Comparision of these results with earlier studies concerning *S. obvelata* somatic antigens show that there are proteins and glicoproteins with the same molecular weights for both species. It is also observed that *S. obvelata* somatic extract is more diversed and have higher antigenicity than *A. tetraptera*. Hence, we may suppose this fact could favour easier colonization of the host by *A. tetraptera*.

**Key words:** *Aspicularis tetraptera*, immunology, laboratory mice, somatic antigens, *Syphacia obvelata*

#### Wstęp

Podstawowym źródłem obrony organizmów żywicielskich przed inwazjami pasożytniczymi jest układ odpornościowy, który rozpoznaje antygeny pasożyta jako obce i wytwarza reakcje, w których wyniku dochodzi do jego zwalczania. Współczesna parazytologia posiada cały szereg narzędzi, dzięki którym można badać relacje panujące w układach pasożyt-żywiciel. Zagadnienia te są jednak trudne ze względu na złożoność i różnorodność antygenową pasożytów, tworzenie się reakcji krzyżowych, jak również występowanie różnych stadiów rozwojowych pasożyta w organizmie żywiciela. Jednak

zrozumienie mechanizmów obronnych żywiciela oraz poznanie właściwości antygenowych nicieni może mieć duże znaczenie w zwiększaniu czułości metod wykorzystywanych w diagnostyce chorób pasożytniczych.

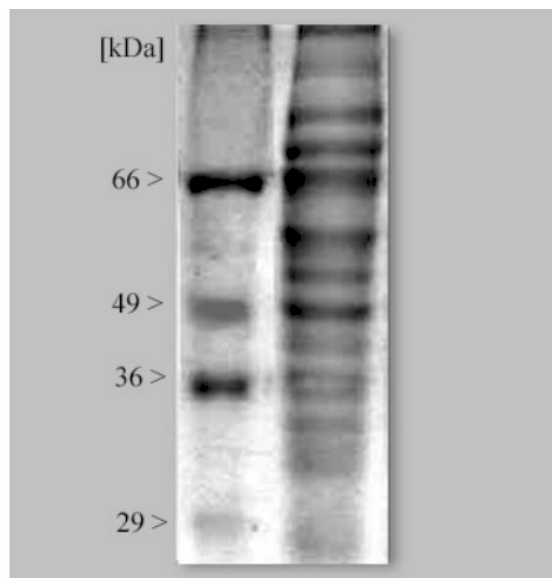
Zwierzęta laboratoryjne, w tym myszy, stanowią jedno z podstawowych narzędzi wykorzystywanych do wielu doświadczeń biologicznych i testów, gdzie uzyskanie wiarygodnych i powtarzalnych wyników jest bardzo istotnym elementem. Jednak bardzo często w konwencjonalnych hodowlach myszy notuje się infekcje powodowane przez różne patogeny, w tym także nicienie pasożytnicze, spośród których najczęściej występujące to *Aspicularis tetraptera*

i *Syphacia obvelata* należące do rodziny Oxyuridae [1]. Pasożyty te, jeśli nie są wykryte i wyeliminowane, mogą mieć wpływ na przebieg badań, a także na końcową interpretację wyników [2-4]. Zwykle zarażenie nicieniami jelitowymi u zwierząt laboratoryjnych przebiega bezobjawowo, chociaż znane są przypadki migracji larw w organizmie i pojawiania się niedojrzałych osobników w mózgu chomików [5] oraz w kręzkowych węzłach limfatycznych [6]. U intensywnie zarażonych żywicieli mogą występować takie objawy jak: wypadnięcie odbytu, zaczerwienienie jelita, słabe przyrosty masy ciała i szorstkość sierści. Ponadto u zarażonych myszy obserwuje się, choć rzadko, nieżytowe zapalenie jelit, ziarnikowość wątroby oraz podrażnienie okolicy okołoodbytniczej [7]. Zarażenie nicieniami jelitowymi wpływa także na zmianę humoralnej odpowiedzi immunologicznej względem niepasżytniczych bodźców antygenowych, co może wskazywać na modulację systemu odpornościowego w wyniku inwazji nicieni *S. obvelata* [8].

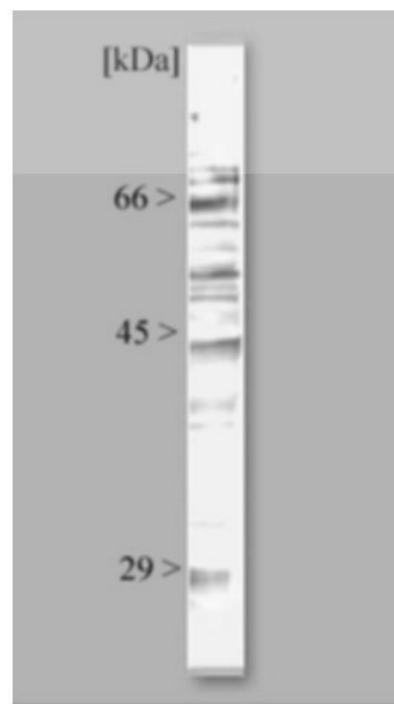
Celem pracy było wyizolowanie białek somatycznych, wykazujących właściwości antygenowe względem immunoglobulin klasy IgG, IgM, i IgA, zawartych w surowicy myszy zarażonych *A. tetraptera* oraz określenie ich roli w tworzeniu odpowiedzi immunologicznej.

## Materiały i metody

Materiał do badań stanowiły myszy laboratoryjne (szczep BALB/c) pochodzące z hodowli własnej



Rys. 1. Proteinogram białek somatycznych pozyskanych z *A. tetraptera*  
Fig. 1. Proteinogram of somatic proteins isolated from *A. tetraptera*



Rys. 2. Układ prążków glikoprotein *A. tetraptera* reagujących z konkawalina A  
Fig. 2. Glicoprotein bands reactive with conA

Instytutu Genetyki i Mikrobiologii UW. Z osobników żywych pobierano krew, a z martwych — nicienie podczas sekcji parazytologicznej. Wykorzystano 40 gryzoni, z których łącznie pozyskano 862 nicienie jelitowe. Myszy zarażone były wyłącznie jednym gatunkiem pasożytów — *A. tetraptera*. Uzyskaną krew myszy pozostawiano do wykrzepnięcia na 2 h w temperaturze pokojowej oraz 1 h w temperaturze 4°C. Po odwirowaniu zbierano surowicę, a następnie zamrażano w -70°C do dalszych badań, natomiast ekstrakcja białek somatycznych nicienia odbywała się przy użyciu buforu Tris-HCl zawierającego NaCl oraz Triton X-100 [9]. Rozdział poszczególnych frakcji białek somatycznych przeprowadzono w 12% żelu poliakrylamidowym w układzie buforów wg Laemmliego [10]. Masę cząsteczkową (MC) białek wyznaczano z zależności  $\log MC$  od współczynnika ruchliwości elektroforetycznej (Rf). Jako standardów masy użyto markerów firmy Sigma.

Po elektroforezie, rozdzielone białka z żelu poliakrylamidowego przenoszono na membranę nitrocelulozową na drodze transferu metodą półsuchą, a następnie, w celu określenia swoistych białek i glikoprotein w stosunku do przeciwciał surowicznych gryzoni, wykonywano Western blot [11] z wykorzystaniem przeciwciał anti-mysich sprzężonych z peroksydazą chrzanową. Detekcja glikoprotein odby-

wała przy użyciu konkawaliny A według metody Schallinga [12] z modyfikacjami.

## Wyniki

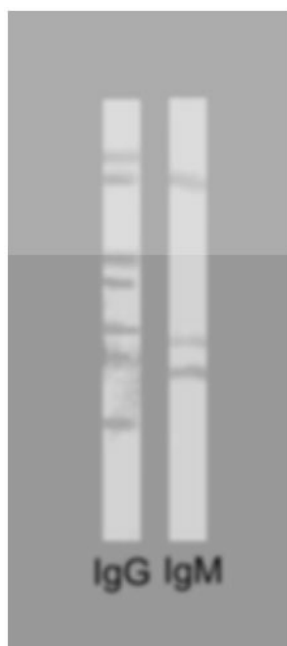
### Analiza białek somatycznych

Proteinogram ujawnił obecność 14 prążków o masach od ~ 82 do 28 kDa (Rys. 1) natomiast detekcja glikoprotein, przy użyciu konkawaliny A (Rys. 2), wykazała obecność 13 prążków o masach od ~ 70 do 30 kDa (Tabela 1). Wśród 14 białek somatycznych 3 miały resztę cukrową.

Tabela 1. Masy cząsteczkowe protein i glikoprotein somatycznych nicienia *A. tetraptera*

Table 1. Molecular weights of somatic proteins and glycoproteins isolated from *A. tetraptera*

Masa cząsteczkowa protein [kDa]											
82	81	73	68	66	58	55	53	50	45	42	8
35	28	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Masa cząsteczkowa glikoprotein [kDa]											
70	69	65	63	59	57	56	55	53	48	42	41
30	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—



Rys. 3. Western blot antygenów somatycznych *A. tetraptera*

Fig. 3. Western blot of somatic antigens isolated from *A. tetraptera*

### Western blotting

Western blot (Rys. 3) wykonano w celu ustalenia, które z protein i glikoprotein dają specyficzne reakcje z odpowiednimi klasami przeciwciał. Wyni-

ki były pozytywne w przypadku przeciwciał klasy IgG i IgM, gdzie przeciwciała swoiście rozpoznawały antygeny nicienia.

W odniesieniu do przeciwciał klasy IgG reakcję wykazywało 7 białek o masach od ~ 76 do 35 kDa, a w przypadku immunoglobulin klasy IgM 3 białka o masach ~ 73, 45, 40 kDa (Tabela 2). Nie stwierdzono reakcji z przeciwciałami klasy IgA.

Tabela 2. Masy cząsteczkowe frakcji białek somatycznych *A. tetraptera* wykazującej właściwości antygenowe w stosunku do przeciwciał zawartych w surowicy Table 2. Molecular weights of somatic proteins, isolated from *A. tetraptera*, which proves the antigens features in relation of immunoglobulins IgG and IgM

	Masa cząsteczkowa [kDa]						
IgG	76	73	55	53	45	42	35
IgM	73	45	40	—	—	—	—

## Dyskusja

Nicień pasożytnicze stanowią bogate źródło różnorodnych antygenów i wiele prac ma na celu poznanie ich właściwości. Obiektem badań są najczęściej nicienie pasożytujące u człowieka lub zwierząt hodowlanych, natomiast niewiele jest prac poświęconych antygenom pasożytów zwierząt dziko żyjących i laboratoryjnych.

Badania prowadzone w brazylijskich zwierzętarniach nad zarażeniem nicieniami jelitowymi u myszy laboratoryjnych [13] wykazały, że intensywność inwazji *A. tetraptera* wynosiła od 111 do 139 osobników, a prevalencja osiągnęła wartość 100%, natomiast w pracy Bazzano [14] intensywność była znacznie niższa i wynosiła 5–16 osobników w żywicielu. We wcześniejszych badaniach Klaus i Złotorycka [15] wykazały tylko 20% prevalencji. Natomiast Behnke [16] stwierdził 57% prevalencję *A. tetraptera* u dziko żyjących myszy. Ten sam autor wykazał, że jest ona wyższa u samców niż u samic [17].

Pierwszym etapem pracy była izolacja białek somatycznych nicieni *A. tetraptera*. Podobne badania nad proteinami somatycznymi u innych nicieni pasożytniczych były prowadzone już wcześniej, i tak np. analiza białek somatycznych *Ancylostoma ceylanicum* wykazała obecność 12 pasm białkowych o masach od ~ 144 do 13 kDa [18]. U *Capillaria resecta* Frońska-Popiel [19] stwierdziła obecność 31 prążków w zakresie od ~ 104 do 26 kDa, natomiast analiza glikoprotein somatycznych wykazała 23 pa-

sma białkowe. Badania Percec [20] nad udziałem antygenów *S. obvelata* w tworzeniu odpowiedzi immunologicznej u myszy laboratoryjnych wykazały obecność 23 pasm białkowych o masach od ~ 90 do 27 kDa a detekcja glikoprotein ujawniła 15 prążków w zakresie od ~ 112 do 30 kDa.

Kolejnym etapem było określenie, które z oznaczonych protein wyizolowanych z *A. tetraptera* wykazują właściwości antygenowe w stosunku do przeciwciał surowicznych klasy IgG, IgM i IgA. Badania ekstraktu somatycznego, uzyskanego z *S. obvelata*, w odniesieniu do IgG pokazują większą liczbę białek o charakterze antygenowym [20] niż w przypadku *A. tetraptera*. W cytowanych badaniach stwierdzono 14 protein o masach od ~ 104 do 31 kDa, gdzie najsilniejszą reaktywność wykazywały 3 białka (~ 66, 65 i 63 kDa).

W badaniach nad *S. obvelata* reakcje swoiste w stosunku do immunoglobulin klasy IgM, wykazywało 10 białek [20], a w przypadku *A. tetraptera* tylko trzy. *S. obvelata* wykazuje również właściwości antygenowe w stosunku do przeciwciał klasy IgA — 8 białek reagujących swoiście względem tych immunoglobulin, natomiast białka somatyczne *A. tetraptera* nie wykazywały właściwości antygenowych w stosunku do tej klasy przeciwciał. Może to wynikać z faktu, że odpowiedź obwodowa myszy na zarażenie *S. obvelata* jest silniejsza niż w przypadku *A. tetraptera*. Nie prowadzono badań nad odpowiedzią lokalną, gdzie najprawdopodobniej dominowałyby odpowiedź w stosunku do immunoglobulin klasy IgA.

U myszy laboratoryjnych bardzo często dochodzi do koinwazji nicieni *A. tetraptera* i *S. obvelata*. Uzyskane wyniki dotyczące analizy białek somatycznych tych dwóch gatunków nicieni pozwalają stwierdzić, że ekstrakt somatyczny uzyskany z *S. obvelata* jest bardziej zróżnicowany niż uzyskany z *A. tetraptera*. Zastosowanie techniki Western blotting pokazuje, że więcej białek immunogennych występuje u *S. obvelata*. Można zatem przypuszczać, iż w przypadku współwystępowania obu gatunków bardziej immunogenne dla myszy są inwazje *S. obvelata*. Organizm skupia więc swoją reakcję obronną na tym nicieniu, umożliwiając w ten sposób łatwiejsze osiedlenie się nicieni *A. tetraptera*, które zajmują podobną lokalizację w jelicie żywiciela. Badania Paciona i Piekarskiej [1] nad pasożytami myszy laboratoryjnych we wrocławskich laboratoriach wykazały, że znacznie częstsze są inwazje *A. tetraptera* (33,3–75%) niż *S. obvelata* (5,5–15%) co może podtrzymywać powyższą hipotezę.

## Wnioski

Uzyskane wyniki badań wykazują duże zróżnicowanie antygenowe dwóch pokrewnych gatunków nicieni oraz wskazują na rolę, jaką mogą odgrywać w przebiegu inwazji pasożytniczych. Prowadzenie badań z zastosowaniem technik immunologicznych może mieć duży wpływ na zrozumienie mechanizmów panujących w układach pasożyt-żywiciela.

## Literatura

- [1] Pacoń J., Piekarska J. 2004. Pasożyty myszy w wybranych hodowlach zwierząt laboratoryjnych. *Wiadomości Parazytologiczne* 50: 93-94.
- [2] Gabrielle F., Wakelin D., Palmas C. 1988. Specific cross-immunity between *Hymenolepis nana* and *Hymenolepis diminuta*: immunization with heterologous and homologous light infections. *Journal of Helminthology* 62: 115-123.
- [3] Pinto R.M., Vicente J.J., Noronha D., Gonçalves L., Gomes D.C. 1994. Helminth parasites of conventionally maintained laboratory mice. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 89: 33-49.
- [4] Pinto R.M., Gonçalves L., Noronha D., Gomes D.C. 2001. Worm burdens in outbred and inbred laboratory rats with morphometric data on *Syphacia muris* (Yamaguti, 1935) Yamaguti, 1941 (Nematoda, Oxyuroidea). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 133-136.
- [5] Taffs L.F. 1976. Pinworms infections in laboratory rodents: a review. *Laboratory Animals* 10: 1-13.
- [6] King V.M., Cosgrove G.E. 1963. Intestinal helminths in various strains of laboratory mice. *Proceedings of the Animal Care Panel* 13: 46-48.
- [7] Jacobson R.H., Reed N.D. 1974. The thymus dependency of resistance to pinworm infection in mice. *Journal of Parasitology* 60: 976-979.
- [8] Sato Y., Ooi H.K., Nonaka N., Oku Y., Kamiya M. 1995. Antibody production in *Syphacia obvelata* infected mice. *Journal of Parasitology* 81: 559-562.
- [9] De Graaf D.C., Berghen P., Moens L., De Marez T.M., Raes S., Blaxter M.L., Vercruysse J. 1996. Isolation, characterization and immunolocalization of a globin-like antigen from *Ostertagia ostertagi* adults. *Parasitology* 113: 63-69.
- [10] Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- [11] Towbin H., Stacklin T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 4350-4354.
- [12] Schalling H.D.F., Baczkowska A.M., Wędrychowicz H. 1995. Biochemical characterization of surface an-

- tigens of infective larvae and adults of *Haemonchus contortus*. *Acta Parasitologica* 40: 217–224.
- [13] Goncalves L., Pinto R.M., Vincente J., Noronha D., Gomes D.C. 1998. Helminth parasites of conventionally maintained laboratory mice. II. Inbred strains with an adaptation of the anal swab technique. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 93: 121–126.
- [14] Bazzano T., Restel T.I., Pinto R.M., Gomes D.C. 2002. Patterns of infection with the nematodes *Syphacia obvelata* and *Aspiculuris tetraptera* in conventionally maintained laboratory mice. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 97: 847–853.
- [15] Klaus E., Złotorzycka J. 1979. Ecto- and endo-parasites of reared and wild mice (*Mus musculus*). *Wiadomości Parazytologiczne* 25: 295–299.
- [16] Behnke J.M. 1976. *Aspiculuris tetraptera* in wild *Mus musculus*. Age resistance and acquired immunity. *Journal of Helminthology* 50: 197–202.
- [17] Behnke J.M. 1975. *Aspiculuris tetraptera* in wild *Mus musculus*. The prevalence of infection in male and female mice. *Journal of Helminthology* 49: 85–90.
- [18] Wędrychowicz H., Orzeł A., Behnke J.M. 1996. Host antibody recognition of surface and somatic antigens of the parasitic developmental stages of *Ancylostoma ceylanicum*. *Acta Parasitologica* 41: 43–49.
- [19] Frońska-Popiel A. 2000. Charakterystyka antygenów nicieni *Capillaria resecta* (Capillariinae). Rozprawa doktorska, Wrocław, UWr.
- [20] Perec A. 2004. Udział antygenów nicieni *Syphacia obvelata* (Oxyuridae) w powstawaniu odpowiedzi immunologicznej u myszy laboratoryjnej (szczep BALB/c). Rozprawa doktorska. Wrocław, UWr.

Wpłynęło 14 listopada 2005,  
Zaakceptowano 14 lutego 2006