

Zarażenia nicieniami u myszy – eksperymentalny model immunoregulacji¹

Nematode infections in mice – an experimental model of immunoregulation

Katarzyna Donskow-Schmelter, Kinga Jóźwicka, Maria Doligalska

Zakład Parazytologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa;
E-mail: mdolig@biol.uw.edu.pl

ABSTRACT. There has been a substantial increase in the incidence of autoimmune and allergic diseases in Western countries in the past few decades. However, in the geographic area endemic for parasitic helminth infections, such diseases remain relatively rare. It has been hypothesized that helminths may protect against immune disorders that have been observed in urbanized area. Studies on rodents infected with nematodes *Trichinella spiralis*, *Heligmosomoides polygyrus*, *Nippostrongylus brasiliensis* and *Trichuris muris* have provided considerable information about immune mechanisms in aspects of host-parasite interaction and immunoregulation. Helminths inducing a long-lasting asymptomatic infection are regarded as major modifiers of the host immune system. Parasitic worms can establish and reproduce in mammalian hosts switching off inflammation and inducing a tolerant response to parasitic antigens. In this review we summarized recent information on the immunoregulation during nematode infection and mechanisms used by nematodes, including the induction of regulatory T cells and apoptosis in the host. The innate immune response seems to determine the different sensitivity of mice to nematode infection. In this review we also discuss results of our own studies on *H. polygyrus*, demonstrating that it induces different mechanisms in different strains of mice which might play important role in the modulation of immune response. In the slow responder mice apoptosis would play a key role in the outcome of immune response. Contrary to that, in fast responder mice a defensive inflammatory response is mostly down-regulated via endogenous opioids pathway. Understanding the molecular mechanisms that mediate the effects that helminths have on the immune system will provide information that can be exploited to prevent inflammatory diseases.

Key words: nematode, mice, inflammation, immunoregulation, Treg, cytokines

Wstęp

Badania epidemiologiczne wykazują, że niski poziom higieny i nieskuteczna profilaktyka przeciwpasożytnicza sprzyjają utrzymywaniu się długotrwałych zarażeń nicieniami jelitowymi ludności społeczeństw ubogich. Jednocześnie w krajach uprzemysłowionych oraz na obszarach podlegających industrializacji, gdzie nastąpiła istotna poprawa warunków higienicznych, stwierdza się coraz więcej zachorowań na nieswoiste zapalenia jelit, stwardnienie rozsiane czy astmę. Nadmierna i prze-

wlekła reakcja zapalna, leżąca u podłoża tych chorób cywilizacyjnych najczęściej wzbudzana jest przez antygeny dotychczas nie rozpoznawane przez układ odpornościowy [1]. Odwrotna korelacja częstości występowania alergii i pasożytów była podstawą do wysunięcia hipotezy: coraz rzadsze zarażenia helmintami, szczególnie u osobników młodych w okresie dojrzewania układu odpornościowego, mogą warunkować zwiększoną zachorowalność na choroby cywilizacyjne w późniejszym wieku [2, 3].

Antygeny helmintów wzbudzają odpowiedź im-

¹ Badania finansowane z grantu MNiI: NN 303 357233

munologiczną, polegającą na aktywacji limfocytów subpopulacji Th2 [4]. Podczas długotrwałych zarażeń odpowiedź ta jest jednak hamowana [5, 6]. Reaktywność limfocytów T i B maleje, a wzrost poziomu IL-10 i TGF- β (ang. transforming growth factor beta) świadczy o aktywacji limfocytów T regulacyjnych [7]. Wzbudzenie immunoregulacji czy immunosupresji jest korzystne dla pasożyta i żywiciela; ochrania pasożyta i równocześnie zapobiega destrukcji tkanek w zasiedlanych przez pasożyty narządach. Immunosupresja jest swoista nie tylko wobec antygenów pasożyta, ale także wobec antygenów niezwiązanych z zarażeniem.

Oslabienie odpowiedzi immunologicznej podczas współistniejących zakażeń może również wynikać z zakłócenia przebiegu odpowiedzi immunologicznej przez równoczesne reakcje zapalne w różnych narządach. Wzmożenie migracji leukocytów w miejsce zasiedlone przez pasożyty zmniejsza naciek komórek w innych tkankach [8]. Wzbudzenie mechanizmów skutecznie hamujących reakcję zapalną, skłoniło badaczy do obdarzenia nicieni terminem „mistrzowie regulacji” [9]. Wprawdzie mechanizm tej regulacji nie jest jeszcze w pełni wyjaśniony, zjawisko to próbuje się już wykorzystać w terapii alergii, np. zarażając ochotników nicieniami jelitowymi [10]. Szeroko prowadzone badania w warunkach laboratoryjnych także potwierdzają obserwacje epidemiologiczne. Zarażenie nicieniami nie tylko hamuje zapalenie jelit, ale przywraca stan równowagi fizjologicznej [10].

Mechanizmy hamujące reakcje układu odpornościowego żywiciela ukształtowały się w procesie koewolucji gatunków tworzących układ pasożyt-żywiciel i oszczędzają zarówno pasożyta, jak i żywiciela co w dużej mierze wynika z genotypu żywiciela. Potwierdza to odmienna intensywność zarażenia i reakcji zapalnej u myszy różnych szczepów zarażonych tym samym gatunkiem nicienia [11]. Badania genetyczne wykazują, że odporność przeciw helmintom jest regulowana przez liczne geny i nie są to wyłącznie geny głównego kompleksu zgodności tkankowej MHC (ang. major histocompatibility complex, H-2 myszy) klasy II, jak do niedawna twierdzono. Bardzo istotne wydają się mechanizmy nieswoiste wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, wzbudzane zanim pojawi się swoista odporność nabyta [12]. Skuteczna aktywacja immunologiczna uwarunkowana jest docelową migracją odpowiedniej ilości komórek o właściwym dla reakcji fenotypie, jednak długotrwały patologiczny stan zapalny zazwyczaj wynika ze zbyt dużej liczby akty-

wowanych komórek [13]. Wydaje się, że bardzo istotną rolę w hamowaniu reakcji zapalnej odgrywa eliminacja komórek w procesie apoptozy. Jest to jeden z mechanizmów immunoregulacji wzbudzany przez pasożyty [14].

Inwazje eksperymentalne jako modele w badaniach inwazji nicieni jelitowych

Nicieniami występującymi w układzie pokarmowym człowieka najczęściej są glista (*Ascaris*), włośgłówka (*Trichuris*) czy tęgoryjce (*Necator* i *Ancylostoma*). Szczegółowe poznanie mechanizmów regulacji immunologicznej w czasie zarażeń nicieniami jelitowymi, jest możliwe w warunkach doświadczalnych w pełni kontrolowanych [15]. Eksperymenty koncentrują się wokół czterech modeli inwazji pasożytów myszy: *Nippostrongylus brasiliensis*, *Trichinella spiralis*, *Trichuris muris* i *Heligmosomoides polygyrus*.

Układ odpornościowy związany z błoną śluzową układu pokarmowego, której powierzchnia u człowieka wynosi ok. 300 m², jest szczególnie ekspozycyjny na antygeny patogenów i antygeny pokarmowe [16]. Liczba znajdujących się tu limfocytów znacznie przewyższa liczbę wszystkich komórek w obwodowych narządach limfatycznych. Tak duża populacja komórek immunologicznie kompetentnych w *lamina propria* gwarantuje ochronę śluzówki przed patogenami. Pojawiający się jednocześnie w układzie pokarmowym stan tolerancji na antygeny ma znaczenie ogólnoustrojowe i nie pozostaje bez wpływu na poziom odpowiedzi immunologicznej podczas zarażenia nicieniami jelitowymi [17].

Warunkiem zasiedlenia śluzówki przez larwy inwazyjne nicienia jest przełamanie odporności wrodzonej [18]. Rozpoznanie wzorów molekularnych właściwych nicieniom – NAMP (ang. nematode associated molecular patterns) za pośrednictwem receptorów TLR (ang. Toll-like receptors) komórek dendrytycznych, makrofagów czy komórek tucznych, aktywuje reakcje odporności wrodzonej [19, 20]. Aktywowane komórki produkują mediatorzy i cytokiny, aktywacji ulegają także komórki śródbłonna naczyń krwionośnych. Zmiany te prowadzą do pojawienia się reakcji zapalnej w błonie śluzowej jelita [21, 22].

Komórki prezentujące antygen (APC, ang. antigen presenting cells) poprzez cząsteczki MHC klasy II, prezentują go limfocytom T. Proces ten wzbudza reakcje odporności nabytej, swoistej. Skład i poziom cytokin determinuje polaryzację limfocy-

tów pomocniczych Th0 w subpopulację Th1 i/lub Th2, które odróżnia rodzaj wydzielanych cytokin. Aktywowane limfocyty subpopulacji Th1 preferencyjnie produkują IL-2 i IFN- γ , które stymulują produkcję przeciwciał IgG2a oraz działają pomocniczo na odpowiedź typu komórkowego. Limfocyty subpopulacji Th2 wydzielają przede wszystkim IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, które stymulują syntezę przeciwciał klasy IgG1 i IgE oraz wpływają na migrację eozynofików i komórek tucznych [23, 24]. Podczas zarażenia, antygeny nicieni działają jako „swoiste adiuwanty” wzbudzając lokalną odpowiedź Th2 zależną [25]. Świadczy o tym indukcja swoistej odpowiedzi Th2 zależnej pojawiającej się po wprowadzeniu do jelita myszy nicieni wolnożyjących *Caenorhabditis elegans* [26]. Limfocyty subpopulacji Th2 o fenotypie CD4⁺ są głównymi komórkami obronnej odpowiedzi immunologicznej przeciw nicieniom. Zablokowanie receptorów CD4 na limfocytach myszy zarażonych *T. muris* i *H. polygyrus* hamuje usuwanie nicieni z jelita [27]. Wśród cytokin wydzielanych przez tę subpopulację, głównie IL-4 przyczynia się do szybszego usuwania dorosłych form *H. polygyrus* [4]. Dotychczas tylko niektóre mechanizmy efektorowe odpowiedzi Th2 scharakteryzowano jako obronne, gdyż jednoznaczna funkcja eozynofików i komórek tucznych w odpowiedzi przeciw pasożytniczej nie została potwierdzona [25, 28]. Uniwersalny mechanizm obronny żywiciela przeciw nicieniom prawdopodobnie nie istnieje; w zależności od gatunku pasożyta w procesie ewolucji immunogenność wielu antygenów pasożytniczych malała. Jednocześnie wraz z obniżeniem immunogenności pojawiły się i wzmacniały mechanizmy pasożytnicze regulujące odpowiedź immunologiczną żywiciela [9].

Genetyczne uwarunkowania odporności

Zróźnicowanie między szczepami myszy na zarażenie *H. polygyrus* dotyczy intensywności, czasu trwania zarażenia oraz dynamiki i charakteru odpowiedzi immunologicznej żywiciela [11]. Szczepy myszy o wysokim stopniu odporności na zarażenie *H. polygyrus* określa się jako odporne lub szybko reagujące (ang. fast responders). Szczepem odpornym jest m.in. szczep FVB, który usuwa nicienie już po 8 tygodniach inwazji pierwotnej, a w przypadku powtórnego zarażenia już ok. 20 dnia [11]. Myszy szczepów o bardzo niskim stopniu odporności na zarażenie określane są jako wrażliwe lub słabo reagujące (ang. slow responders). Należą do nich

m.in. szczep C57Bl/6, u którego inwazja ma charakter przewlekły i trwa dłużej niż 30 tygodni zarówno pierwotna, jak i wtórna [11]. Szczepy myszy reagujące pośrednio na zarażenie to np. szczep BALB/c (ang. intramediate responders).

O ile geny MHC okazały się jednak dobrymi markerami wrażliwości osobniczej przeżuwaczy na zarażenie nicieniami żołądkowo-jelitowymi [29–31], o tyle różnice w odpowiedzi na zarażenie *H. polygyrus* u myszy szczepów o tym samym haplocybie H-2 wskazują na udział innych genów niż MHC klasy II. Coraz większą uwagę zwraca się na geny cech ilościowych QTL (ang. quantitative trait loci), wpływających na odporność. Są to tzw. geny tła, warunkujące fenotypowe przejawianie się cech ilościowych, które cechuje wysoki polimorfizm. Należą do nich m.in. geny kodujące cytokiny, immunoglobuliny czy receptory TCR (ang. T cell receptor) [32]. Określenie wrodzonych mechanizmów regulujących reakcje żywiciela przeciw nicieniom jelitowym będzie stanowiło istotne uzupełnienie wiedzy o poligenowej regulacji tej odpowiedzi.

Reakcja zapalna w jelicie

W wyniku reakcji zapalnej patogeny są eliminowane i wzbudzana jest nie tylko odpowiedź obronna, ale także pobudzane są procesy regeneracyjne i przywracana jest funkcja narządu. Zapalenie w jelicie rozwija się w warstwie podśluzówkowej błony śluzowej [33]. Towarzyszy mu wzrost liczby i aktywacja eozynofików, neutrofilów, monocytów, makrofagów i limfocytów, nasilony lokalny przepływ krwi, wzrost przepuszczalności naczyń krwionośnych, napięcie mięśni gładkich i wzmożone wydzielanie śluzu [33]. W początkowym etapie reakcji zapalnej szczególną rolę odgrywają mediatory zapalenia uwalniane przez śródbłonek naczyń oraz przez gromadzące się granulocyty, makrofagi i limfocyty głównie populacji CD4⁺ [34]. Komórki te wydzielają cytokiny prozapalne, chemokiny a także tlenek azotu (NO). Czynniki te stymulują i kontrolują przebieg reakcji zapalnej, a pod ich wpływem dochodzi do wzmożonej ekspresji cząsteczek adhezyjnych na leukocytach i śródbłonku naczyń. Zmiany te sprzyjają migracji leukocytów do ogniska zapalenia [34].

Pod wpływem prostaglandyn dochodzi do uwrażliwienia dotychczas nieaktywnych receptorów białych na włóknach nerwowych C jelita, dzięki czemu włókna te włączają się do przewodnictwa

bólu [35]. Równocześnie w komórkach zwojów rdzenia kręgowego zwiększa się synteza receptorów opioidowych (RO), endogennych opioidów (EO) i neuropeptydów takich jak substancja P, (VIP, ang. vasoactive intestinal peptide) oraz somatostatyny. Substancje te mogą aktywować komórki odpornościowe. Również limfocyty, eozynofile i neutrofile wydzielają EO pod wpływem czynnika uwalniającego kortykotropinę, CRF (ang. corticotropin-releasing factor) wydzielanego z uszkodzonej tkanki i IL-1 wydzielanej przez aktywowane makrofagi i monocyty. EO działają zarówno na receptory opioidowe na zakończeniach włókien nerwowych jak i na leukocytach [36, 37]. Pobudzenie receptorów opioidowych hamuje przewodzenie potencjału czynnościowego w komórkach nerwowych, hamując transmisję bólu. W ten sposób EO modulują odpowiedź immunologiczną za pośrednictwem receptorów komórek centralnego układu nerwowego i na leukocytach. Działając za pośrednictwem neuronów, poprzez oś stresową podwzgórze–przysadka–nadnercza, (HPA, ang. hypothalamic pituitary adrenal) opioidy regulują wydzielanie immunomodulujących glikokortykoidów: hormonu uwalniającego kortykotropinę (CRH), kortykotropiny (ACTH) oraz kortyzonu i prolaktyny. W warunkach równowagi fizjologicznej apoptoza leukocytów pozbawionych rezerw opioidowych sprzyja hamowaniu reakcji zapalnej [37].

Modyfikacja reakcji zapalnej w czasie zarażenia nicieniami

Od nasilenia reakcji zapalnej zależy poziom inwazji dlatego nicienie hamują prozapalną wrodzoną i nabytą odpowiedź immunologiczną [9]. Indukowane przez nicienie zmiany w funkcjonowaniu układu odpornościowego mają zwykle charakter przejściowy i są wynikiem szybkiej zmiany antygenów kolejnych stadiów rozwojowych pasożyta. Zmiana ta jest wyrazem ucieczki molekularnej pasożyta przed reakcją układu odpornościowego żywiciela [38, 39]. Od wielu lat poszukuje się czynników pochodzenia pasożytniczego o właściwościach immunoregulacyjnych [9]. Szczególnie interesujące są metabolity nicieni (antygeny wydalniczo-wydzielnicze, ES ang. excretory-secretory antigens), które mogą zmieniać przebieg reakcji obronnych żywiciela. Nicienie *Brugia malayi*, *Onchocerca volvulus* i *Nippostrongylus brasiliensis* wydzielają homologiczny z żywicielskim inhibitor proteinazy cysteinowej – cystatynę, która opóźnia dojrzewanie

komórek dendrytycznych, blokując proces prezentacji antygenów [7]. Wydzielane przez *B. malayi* białko ES-62, znosi wrażliwość makrofagów na indukcję IFN- γ [40].

Czynnikami regulującymi reakcję zapalną są cytokiny, dlatego pasożyty modyfikują poziom i skład cytokin pro- jak i antyzapalnych [15]. Mikrofilarie *B. malayi* produkują białka wykazujące funkcjonalną homologię z transformującym czynnikiem wzrostu TGF- β ; *Bm-TGH2* [7]. Nicienie ten wydziela również czynnik homologiczny do czynnika hamującego migrację makrofagów MIF (ang. macrophage migration inhibitory factor) [10].

Nicienie wykorzystują także mechanizmy żywiciela związane z aktywnością limfocytów T regulatorowych (Treg) [41]. Antygeny ES *Onchocerca volvulus* aktywują subpopulację limfocytów Treg CD4⁺ wykazujących konstytutywną ekspresję cząsteczki CD25 będącej łańcuchem α dla IL-2 (IL-2R) oraz GITR (ang. glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related gene) i CTLA-4 (ang. cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) [42]. Limfocyty tej subpopulacji posiadają receptory dla autoantygenów, indukujących tolerancję immunologiczną [43, 44] oraz hamują aktywację antygenowo-swoistych limfocytów T populacji CD4⁺, poprzez cząsteczki sygnałowe w błonie komórkowej, oraz wydzielając IL-10 i TGF- β [41]. IL-10 hamuje wydzielanie cytokin prozapalnych przez komórki tuczne oraz obniża aktywność eozynofili [45]. TGF- β obniża poziom czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za różnicowanie i proliferację limfocytów T [45].

Innym mechanizmem regulującym odpowiedź immunologiczną jest eliminacja komórek żywiciela przez czynniki pasożytnicze, przykładem jest limfotoksyna wydzielana przez larwy *T. spiralis* [46]. Wiele nicieni wykorzystuje także programowaną śmierć komórki – apoptozę, wpływając w ten sposób na poziom reakcji immunologicznych żywiciela [47, 48].

O ile sporo wiadomo na temat hamowania reakcji zapalnej przez dorosłe nicienie, o tyle niewiele wiadomo na temat mechanizmów regulujących reakcję zapalną skierowaną przeciwko formom inwazyjnym nicieni. Wiadomo, że w czasie zarażenia *T. muris* reakcja zapalna skierowana przeciwko larwom tego pasożyta charakteryzuje się naciekiem makrofagów i limfocytów, ale nie granulocytów. Sugeruje się, że jest to spowodowane niskim poziomem czynników chemotaktycznych i zmniejszoną przeżywalnością granulocytów [13].

Dotychczas nie ustalono w jakim stopniu nasilenie reakcji zapalnej ma związek z efektywnością procesu obronnego. Wydaje się jednak, że silna reakcja zapalna, prawdopodobnie zapobiega osiedlaniu się larw pasożyta, ale może także powodować rozregulowanie odpowiedzi immunologicznej prowadząc do uszkodzenia tkanek, dysfunkcję narządów, a w konsekwencji nawet do śmierci [4].

Apoptoza w zarażeniach nicieniami

Programowana śmierć komórki, PCD (ang. programmed cell death) typu I, zwana apoptozą, jest aktywnym procesem, równoważącym proliferację komórek [49]. Apoptoza leukocytów, które spełniły swoją funkcję immunologiczną jest bardzo istotna w ograniczaniu nadmiernej reakcji zapalnej. Proces ten zapobiega uszkodzeniu zdrowych komórek i tkanek [50]. W reakcji zapalnej produkowane przez granulocyty mediatory prozapalne oraz enzymy proteolityczne i reaktywne formy tlenu uszkadzają sąsiadujące komórki. Z tego powodu granulocyty, jako pierwsze są usuwane w procesie apoptozy [51]. Proces ten indukuje kontakt z komórkami śródbłonna i działającym prozapalnie czynnikiem martwicy nowotworu – α , TNF α (ang. tumor necrosis factor) [52]. Aktywowane w jelicie limfocyty są transportowane do krezkowych węzłów chłonnych, gdzie ulegają apoptozie [53]. Podczas apoptozy cząsteczki fosfatydyloseryny, PS (ang. phosphatidyloserine) przemieszczają się z wewnętrznej na zewnętrzną warstwę błony komórkowej, bez jej perforacji [54]. Zawartość obumierającej komórki otaczana jest fragmentami błony komórkowej formując tzw. ciała apoptotyczne [55]. W ten sposób błona komórkowa nie zmienia swojej antygenowości, a komórki podlegające apoptozie nie aktywują układu odpornościowego [53]. Ciała apoptotyczne fagocytowane przez makrofagi indukują wzrost syntezy czynników hamujących stan zapalny; prostaglandyn oraz czynnika TGF- β i IL-10 [56, 57]. W ten sposób eliminacja komórek na drodze apoptozy nie powoduje uszkodzenia otaczających tkanek i przyczynia się do hamowania reakcji zapalnej [53].

Opisano szereg czynników indukujących i regulujących proces apoptozy w komórkach [58]. Jednym z pozakomórkowych sygnałów proapoptotycznych są cytokiny pozapalne. Indukują one tzw. zewnątrzkomórkowy szlak apoptozy, poprzez receptory nadrodziny TNF [59]. Natomiast produkty stresu oksydacyjnego w tym NO oraz glikokortykoidy aktywują tzw. wewnątrzkomórkowy, mitochondrialny

szlak apoptozy [60, 61].

Główną rolę w regulacji apoptozy odgrywa rodzina białek Bcl-2. Do tej rodziny należą zarówno białka proapoptotyczne takie jak Bax i Bak, jak również białka antyapoptotyczne Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 [62]. Proporcja ilościowa białek pro- i antyapoptotycznych rodziny Bcl-2 decyduje o tym, czy komórka po otrzymaniu odpowiedniego sygnału wejdzie na drogę apoptozy [63].

Pasożyty regulują odpowiedź układu odpornościowego żywiciela wpływając na apoptozę jego komórek eliminując niektóre subpopulacje komórek immunologicznie kompetentnych [64]. Powoduje to zaburzenie równowagi między odpowiedzią zależną od limfocytów subpopulacji Th1 i Th2. Wpływa to na zmianę składu i stężenia cytokin oraz proporcję różnych populacji leukocytów [65]. Może to sprzyjać utrzymaniu się zarażenia, jak w przypadku apoptozy limfocytów pomocniczych CD4⁺ indukowanej przez mikrofilarie *B. pahangi* [66].

Dotychczas nie ustalono, w jakim stopniu apoptoza limfocytów aktywowanych indukowana przez nicienie determinuje wrażliwość żywicieli. Apoptoza limfocytów we wczesnym etapie zarażenia może decydować o wzbudzeniu tolerancji na antygeny pasożyta co może sprzyjać migracji i osiedlaniu się larw pasożyta. Indukcja apoptozy gwarantowałaby zatem słabą odpowiedź immunologiczną skierowaną przeciwko antygenom pasożyta. Wydaje się, że poprzez lokalną apoptozę limfocytów może być wzbudzana tolerancja obwodowa, stanowiąc jeden z najważniejszych mechanizmów sprzyjających przeżywaniu pasożytów w żywicielu [67].

Model *H. polygyrus*–mysz

Zarażenie myszy nicieniem *H. polygyrus* o stosunkowo prostym i krótkim cyklu życiowym oraz łatwa hodowla pasożyta w warunkach laboratoryjnych zdecydowały, że jest to modelowy układ pasożyt–żywiciel dla zarażenia człowieka tęgoryjcami takimi jak *Necator americanus* czy *Ancylostoma duodenale* [68]. Odmienna reakcja różnych szczepów myszy na zarażenie *H. polygyrus* umożliwia badanie genetycznych uwarunkowań odpowiedzi immunologicznej żywiciela. W czasie zarażenia obserwuje się hamowanie reakcji zapalnej. Z tego względu model ten stosuje się do badania supresji i tolerancji w układzie pokarmowym w aspekcie nadmiernego pobudzenia układu immunologicznego podczas alergii oraz autoimmunoagresji. Jest to również dogodny model do badania zarażeń krótko-

trwałych i chronicznych. O ile zarażenie pierwotne u większości badanych szczepów myszy trwa kilka miesięcy, ponowne zarażenie u myszy szczepów odpornych trwa zaledwie kilkanaście dni [68].

W czasie zarażenia *H. polygyrus* u myszy, pierwszy sygnał immunogeny pochodzi od larw zasiedlających błonę śluzową jelita, w fazie tkankowej zarażenia. Antygeny somatyczne i metabolity larw oraz ich wylinki indukują odpowiedź immunologiczną w błonie śluzowej jelita [68]. U myszy szczepów wrażliwych, podczas osiedlania się i linienia larw *H. polygyrus* nie obserwuje się reakcji zapalnej w jelicie. Natomiast u myszy szczepów odpornych wzbudzany jest stan zapalny; komórki układu odpornościowego migrują do *lamina propria* jelita [69]. Uważa się, że reakcja zapalna osłabia penetrację larw do błony śluzowej jelita, a wokół tych, które zasiedliły ścianę jelita powstają ziarninaki uformowane z leukocytów [70]. Zmiany zachodzące w błonie śluzowej to skrócenie kosmków jelitowych, pogłębienie krypt jelitowych, wzrost liczby limfocytów śród nabłonkowych oraz komórek kubkowych i Panetha. Powodują one pogorszenie warunków, w którym przebywają larwy i tylko pewna część larw rozwija się w formy dorosłe [70].

Formy młodociane pasożyta wychodzące na powierzchnię błony śluzowej jelita, hamują stan zapalny zarówno u myszy szczepów odpornych jak i wrażliwych na zarażenie. W fazie chronicznej zarażenia pomimo stwierdzanej aktywności subpopulacji limfocytów Th2, odpowiedź immunologiczna jest hamowana. Ponieważ osłabienie odpowiedzi obronnej Th2 obserwuje się u wszystkich szczepów myszy zarażonych *H. polygyrus*, uważa się, że pasożyt wydziela czynnik, a raczej czynniki immunomodulujące aktywność limfocytów T – IMF (ang. immunomodulatory factors) o niskiej masie molekularnej [71]. Czynniki te u myszy szczepów wrażliwych wywołują prawie całkowitą supresję odpowiedzi Th2 zależnej, a produkcja IL-9 [72], IL-13 [4] i IL-4 ulega zahamowaniu [73]. Silna aktywacja limfocytów Th2 u myszy szczepów odpornych na zarażenie *H. polygyrus* nie wzbudza dalszych etapów odpowiedzi immunologicznej; nie obserwuje się m.in. wyraźnego nacieku komórek tucznych w obrębie błony śluzowej jelita. Jest to spowodowane niską produkcją IL-9 przez limfocyty Th2 [74, 72]. Z kolei obniżenie produkcji IL-5 przez limfocyty Th2 hamuje lokalną eozynofilię [75].

Dorosłe nicienie nie tylko obniżają odporność wzbudzoną przez larwy, ale także zmieniają odpowiedź układu odpornościowego na inne pasożyty

i patogeny. Konkurencyjne zarażenie *H. polygyrus* hamuje usuwanie z jelita *N. brasiliensis* zmieniając przebieg inwazji z krótkotrwałej na przewlekłą, oraz zaburza odpowiedź obronną przeciwko *T. muris*, *T. spiralis* oraz *Trypanosoma musculi* [68]. Zarażenie *H. polygyrus* łagodzi również objawy nadwrażliwości na alergeny wziewne oraz pokarmowe [76], a także hamuje stan zapalny w jelicie wywołowany przez *Helicobacter pylori* [77] oraz w przewlekłej chorobie zapalnej jelita IBD (ang. inflammatory bowel disease) [9].

Do tej pory uważano, że u wszystkich szczepów myszy w czasie zarażenia *H. polygyrus* uruchamiane są te same mechanizmy odpornościowe, a możliwość eliminacji nicieni wynika tylko i wyłącznie z szybkości i natężenia tych procesów [78]. Na podstawie ostatnich badań wydaje się, że u różnych szczepów myszy pobudzane mogą być różne i/lub z różną intensywnością, mechanizmy regulujące poziom odpowiedzi immunologicznej.

Jak wykazały nasze badania, odmienne mechanizmy regulujące reakcję zapalną w fazie histotropowej zarażenia są wzbudzane przez antygeny *H. polygyrus* u myszy szczepów wrażliwych i odpornych na zarażenie. U myszy szczepu wrażliwego, C57Bl/6 niski poziom reakcji związany jest ze wzrostem poziomu limfocytów apoptotycznych o fenotypie CD4⁺ w krezkowych węzłach limfaticznych i śledzionie w fazie histotropowej w 3 dniu zarażenia [11]. Natomiast u myszy szczepu średnio odpornego BALB/c, antygeny nicienia nie indukują apoptozy limfocytów i wywołują silniejszą reakcję zapalną, która nie jest jednak wystarczająca do całkowitej eliminacji pasożyta [79]. Reakcja zapalna wzbudzona przez larwy stadium L4, jest z kolei u tego szczepu hamowana przez endogenne peptydy opioidowe [80]. Sugeruje się, że jest to spowodowane różnymi antygenami eksponowanymi i wydzielanymi przez pasożyta u myszy szczepów o różnej wrażliwości [81]. Włączenie czynników neurogennych i immunologicznych w zapobieganie patologii powodowanej nadmierną reakcją zapalną prawdopodobnie ochrania układ odpornościowy żywiciela przed nadmierną reaktywnością na antygeny pasożyta i inne współwystępujące antygeny.

Podsumowanie

Próby wyjaśnienia przyczyn chorób cywilizacyjnych uświadomiły badaczom jak bardzo ważna jest zdolność organizmu do przywracania stanu równowagi fizjologicznej, który *per se* uwarunkowany ge-

netycznie stanowi ochronę przed patogenami. Z tego powodu obok złożonych mechanizmów immunologicznych angażujących różne populacje komórek regulatorowych bardzo ważną okazała się skuteczna odporność wrodzona i reakcje towarzyszące rozpoznaniu immunologicznemu.

Badania tych procesów są możliwe dzięki doświadczeniom na ogólnie dostępnych modelach laboratoryjnych, takich jak zarażenie myszy *H. polygurus*. Jak wykazano w badaniach prowadzonych przez nas na tym modelu, w zapobieganiu patologii powodowanej nadmierną reakcją zapalną włączona jest apoptoza i układ endogennych opioidów. Stwierdzenie odmiennych mechanizmów regulujących odpowiedź immunologiczną w czasie zarażenia nicieniami pasożytniczymi wydaje się szczególnie istotne. Do tej pory uważano, że u myszy wszystkich szczepów w czasie zarażenia określonym gatunkiem nicienia pobudzone są te same mechanizmy odpornościowe, a ich skuteczność wynika tylko i wyłącznie z szybkości i natężenia tych procesów [78]. Z tego powodu obok odporności wrodzonej i nabytej wyjaśnienie mechanizmów działających na poziomie fizjologicznym nie może być pomijana w dalszych dociekaniach zmierzających do zrozumienia mechanizmów kontrolujących reakcję zapalną w czasie inwazji nicieni pasożytniczych. Jedynie gruntowne poznanie tych mechanizmów pozwoli zrozumieć, w jaki sposób nicienie zgodnie z „hipotezą higieny” przywracają prawidłowe funkcjonowanie układu odpornościowego osłabiając nadmierne reakcje immunologiczne co być może w przyszłości wskaże skuteczny kierunek postępowania terapeutycznego w infekcjach pasożytniczych.

Literatura

- [1] Harnett W., Harnett M.M. 2008. Therapeutic immunomodulators from nematode parasites. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 19: 10–18.
- [2] Yazdanbakhsh M., Van den Biggelaar A., Maizels R.M. 2001. Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. *Trends Immunology* 22: 371–377.
- [3] Bach J.F. 2002. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *The New England Journal of Medicine* 347: 911–920.
- [4] Finkelman F.D., Morris S.C., Orekhova T., Mori M., Donaldson D., Reiner S.L., Reilly N.L., Schopf L., Urban J.F. Jr. 2000. Stat-6 regulation of *in vivo* IL-4 responses. *Journal of Immunology* 164: 2303–2310.
- [5] Reddy A., Fried B. 2007. The use of *Trichuris suis* and other helminth therapies to treat Crohn's disease. *Parasitology Research* 100: 921–927.
- [6] Zaccane Z., Fehervari P., Phillips J.M., Dunne D.W., Cooke A. 2006. Parasitic worms and inflammatory diseases. *Parasite Immunology* 28: 515–523.
- [7] Maizels R.M., Yazdanbakhsh M. 2003. Immune regulation by helminth parasite: cellular and molecular mechanisms. *Nature Reviews. Immunology* 3: 733–744.
- [8] Barthlott T., Kassiotis G., Stockinger B. 2003. T cell regulation as a side effect of homeostasis and competition. *The Journal of Experimental Medicine* 197: 451–460.
- [9] Maizels R.M., Balic A., Gomez-Escobar N., Nair M., Taylor M.D., Allen J.E. 2004. Helminth parasites – masters of regulation. *Immunological Review* 201: 89–116.
- [10] Falcone F.H., Pritchard D.I. 2005. Parasite role reversal: worms on trial. *Trends in Parasitology* 4: 157–160.
- [11] Donskow-Schmelter K., Doligalska M., Rzepecka J., Jedlina-Panasiuk L. 2007. *Heligmosomoides polygurus*: Decreased apoptosis in fast responder FVB mice during infection. *Experimental Parasitology* 117: 149–156.
- [12] Gorham J.D., Guler M.L., Steen R.G., Mackey A.J., Daly M.J., Frederick K., Dietrich W.F., Murphy K.M. 1996. Genetic mapping of a murine locus controlling development of T helper 1/T helper 2 type responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 12467–12472.
- [13] Garside P., Kennedy M.W., Wakelin D., Lawrence C.E. 2000. Immunopathology of intestinal helminth infection. *Parasite Immunology* 22: 605–612.
- [14] James E.R., Green D.R. 2004. Manipulation of apoptosis in the host-parasite interaction. *Trends in Parasitology* 20: 280–287.
- [15] Else K.J., Finkelman F.D. 1998. Intestinal nematode parasites, cytokines and effector mechanisms. *The International Journal for Parasitology* 28: 1145–1158.
- [16] Iijima H., Takahashi I., Kiyono H. 2001. Immune network in the gut for the control of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology* 11: 27–133.
- [17] Fiocchi C. 1997. Intestinal inflammation: a complex interplay of immune and nonimmune cell interactions. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 273: 769–775.
- [18] Beutler B. 2004. Innate Immunity: an overview. *Molecular Immunology* 40: 845–859.
- [19] De Veer M.J., Kemp J.M., Meeuse E.N.T. 2007. The innate host defence against nematode parasites. *Parasite Immunology* 29: 1–9.
- [20] Teixeira M.M., Correa-Olivier R., Gazzinelli R.T. 2000. Immunoregulation in parasitic infection: insights from therapeutic intervention. *Immunology Today* 536: 536–538.
- [21] Coussens L.M., Werb Z. 2002. Inflammation and

- cancer. *Nature* 420: 860–867.
- [22] Mantovani A., Sica A., Locati M. 2005. Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 23: 344–346.
- [23] Mosmann T.R., Coffman R.L. 1989. TH1 and TH2 Cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology* 7: 145–173.
- [24] Abe T., Nawa Y. 1988. Worm expulsion and mast cell response induced by repetitive administration in *Strongyloides ratti*-infected nude mice. *Immunology* 63: 181–185.
- [25] Grecis R.K. 1997. Th-2 mediated host protective immunity to intestinal nematode infections. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences* 352: 1377–1384.
- [26] Tawill S., Le Goff L., Ali F., Blaxter M., Allen J.E. 2004. Both free-living and parasitic nematodes induce a characteristic Th2 response that is dependent on the presence of intact glycans. *Infection and Immunity* 72: 398–407.
- [27] Koyama K., Tamanchi H., Ito Y. 1995. The role of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in protective immunity to the murine parasite *Trichuris muris*. *Parasite Immunology* 17: 161–165.
- [28] Meeusen E.N., Balic A. 2000. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitology Today* 7: 95–100.
- [29] Stear M.J., Strain S., Bishop S.C. 1999. Mechanisms underlying resistance to nematode infection. *International Journal for Parasitology* 29: 51–56.
- [30] Stear M.J., Belch A., Donskow-Schmelter K., Fitton L.A., Innocent G.T., Ishikane C., Mateus A., Murphy L., Rennie K., Smith A. 2007. Detection of genes with moderate effects on disease resistance using ovine MHC and resistance to nematodes as an example. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 120: 3–9.
- [31] Stear M.J., Doligalska M., Donskow-Schmelter K. 2007. Alternatives to anthelmintics for the control of nematodes in livestock. *Parasitology* 134: 139–151.
- [32] Menge D.M., Behnke J.M., Lowe A., Gibson J.P., Iraqi F.A., Baker R.L., Wakelin D. 2003. Mapping of chromosomal regions influencing immunological responses to gastrointestinal nematode infections in mice. *Parasite Immunology* 25: 341–349.
- [33] Bimczok D., Rothkotter H.J. 2006. Lymphocyte migration studies. *Veterinary Research* 37: 325–338.
- [34] McKay D.M. 1999. Intestinal inflammation and the gut microflora. *Canadian Journal of Gastroenterology* 6: 509–516.
- [35] Artis D., Grecis R.K. 2008. The intestinal epithelium: sensors to effectors in nematode infection. *Mucosal Immunology* 1: 252–264.
- [36] Schaefer M., Mousa S.A., Stein C. 1997. Corticotropin releasing factor in antinociception and inflammation. *European Journal of Immunology* 323: 1–10.
- [37] Rittner H.L., Brack A., Machelska H., Mousa S.A., Bauer M., Schafer M., Stein C. 2001. Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain. *Anesthesiology* 95: 500–508.
- [38] Loukas A., Constant S.L., Bethony J.M. 2005. Immunobiology of hookworm infection. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 43: 115–124.
- [39] Dzik J.M. 2006. Molecules released by helminth parasites involved in host colonization. *Acta Biochimica Polonica* 53: 33–64.
- [40] Goodridge H.S., Wilson E.H., Harnett W., Campbell C.C., Harnett M.M., Liew F.Y. 2001. Modulation of macrophage cytokine production by ES-62, a secreted product of the filarial nematode *Acanthocheilonema vitae*. *Journal of Immunology* 167: 940–945.
- [41] Belkaid Y., Mouse B.T. 2005. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nature Immunology* 6: 353–360.
- [42] Hesse M., Piccirillo C.A., Belkaid Y., Prufer J., Mentink-Kane M., Leusink M., Cheever A.W., Shevach E.M., Wynn T.A. 2004. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *The Journal of Immunology* 172: 3157–3166.
- [43] Hsieh C.S., Liang Y., Tyznik A.J., Self S.G., Liggitt D., Rudensky A.Y. 2004. Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25⁺CD4⁺ T cell receptors. *Immunity* 21: 267–277.
- [44] Maloy K.J., Powrie F. 2001. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nature Immunology* 2: 819–822.
- [45] Lin T.J., Befus A.D. 1997. Differential regulation of mast cell function by IL-10 and stem cell factor. *Journal of Immunology* 159: 4015–4023.
- [46] Bozic F., Marinculic A., Durakovic E. 2000. Analysis of intestinal intraepithelial lymphocyte populations in experimental *Trichinella spiralis* infection of mice. *Folia Parasitologica (Praha)* 47: 55–59.
- [47] Garside P., Sands W.A., Kusel J.R., Hagan P. 1996. Is the induction of apoptosis the mechanism of the protective effects of TNF- α in helminth infection? *Parasite Immunology* 18: 111–113.
- [48] Donskow K., Doligalska M. 2005. Apoptoza jako mechanizm ochronny dla patogenów i ich żywicieli. *Wiadomości Parazytologiczne* 51: 271–280.
- [49] Bursch W., Ellinger A., Gerener C.H., Frohwein U., Schulte-Hermann R. 2000. Programmed Cell Death (PCD): Apoptosis, autophagic PCD, or others? *Annals of the New York Academy of Sciences* 926: 1–12.
- [50] Vaux D.L. i Korsmeyer S.J. 1999. Cell death in development. *Cell* 98: 245–254.
- [51] Osborne B.A. 1996. Apoptosis and the maintenance of homeostasis in the immune system. *Current Opinion of Immunology* 2: 245–54.
- [52] Haanen C., Vermes I. 1995. Apoptosis and inflammation. *Mediators of Inflammation* 4: 5–15.
- [53] Savill J. 1997. Apoptosis in resolution of inflamma-

- tion. *Journal of Leukocyte Biology* 61: 375–80.
- [54] Fodok V.A., Voelker D.R., Campbell P.A., Cohen J.J., Brotton D.L., Henson P.M. 1992. Exposure of phosphatidyle-serine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Journal of Immunology* 148: 2207–2216.
- [55] Bellone M., Iezzi G., Rovere P., Galati G., Ronchetti A., Protti M.P., Davoust J., Rugarli C., Manfredi A.A. 1997. Processing of engulfed apoptotic bodies yields T cell epitopes. *The Journal of Immunology* 159: 5391–5399.
- [56] Chen W., Frank M.E., Jin W., Wahl S.M. 2001. TGF- β released by apoptotic T cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity* 14: 715–725.
- [57] Fadok V.A., Bratton D.L., Konowal A., Freed P.W., Westcott J.Y., Henson P.M. 1998. Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE-2 and PAF. *Journal of Clinical Investigation* 101: 890–898.
- [58] O'Flaherty E., Wong W.K., Pettit S.J., Seymour K., Ali S. 2000. Regulation of T-cell apoptosis: a mixed lymphocyte reaction model. *Immunology* 3: 289–299.
- [59] Baker S.J., Reddy E.P. 1998. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 17: 3261–3270.
- [60] Brenner C., Kroemer G. 2000. Apoptosis. Mitochondria – the death signal integrators. *Science* 289: 1150–1151.
- [61] Kofler R. 2000. The molecular basis of glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoblastic leukemia cells. *Histochemistry and Cell Biology* 114: 1–7.
- [62] Korsmeyer S.J. 1999. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Research* 7: 1693–1700.
- [63] Adrain C., Creagh E.M., Martin S.J. 2001. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *The EMBO Journal* 23: 6627–6636.
- [64] James E.R., Green D.R. 2004. Manipulation of apoptosis in the host-parasite interaction. *Trends in Parasitology* 20: 280–287.
- [65] Estaquier J., Marquerite M., Sahuc F., Bessis N., Ausialt C., Ameisen J.C. 1997. Interleukin – 10 mediated T cell apoptosis during the T helper type 2 cytokine responses in murine *Schistosoma mansoni* parasite infection. *European Cytokine Network* 8: 153–160.
- [66] Jenson J.S., O'Connor R., Osborne J., Devaney E. 2002. Infection with *Brugia microfilariæ* induces apoptosis of CD4⁺ T lymphocytes: a mechanism of immune unresponsiveness in filariasis. *European Journal of Immunology* 32: 858–867.
- [67] Ferguson T.A., Stuart P.M., Herndon J.M., Griffith T.S. 2003. Apoptosis, tolerance, and regulatory T cells – old wine, new wineskins. *Immunological Review* 193: 111–123.
- [68] Monroy F.G., Enriquez F.J. 1992. *Heligmosomoides polygyrus*: a model for chronic gastrointestinal helminthiasis. *Parasitology Today* 8: 49–54.
- [69] Pritchard D.I., Lawrence C.E., Appleby P., Gibb I.A., Glover K. 1994. Immunosuppressive proteins secreted by the gastrointestinal nematode parasite *Heligmosomoides polygyrus*. *International Journal for Parasitology* 4: 495–500.
- [70] Cywińska A., Czumińska K., Schollenberger A. 2004. Granulomatous inflammation during *Heligmosomoides polygyrus* primary infections in FVB mice. *Journal of Helminthology* 78: 17–24.
- [71] Telford G., Wheeler D.J., Appleby P., Bowen J.G., Pritchard D.I. 1998. *Heligmosomoides polygyrus* immunomodulatory factor (IMF) targets T-lymphocytes. *Parasite Immunology* 20: 601–611.
- [72] Behnke J.M., Bernard C.J., Wakelin D. 1992. Understanding chronic nematode infections: evolutionary considerations, current hypothesis and the way forward. *International Journal for Parasitology* 22: 861–907.
- [73] Urban J.F. Jr, Katona I.M., Paul W.E., Finkelman F.D. 1991. Interleukin 4 is important in protective immunity to a gastrointestinal nematode infection in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 5513–5517.
- [74] Wahid F.N., Behnke J.M. 1992. Stimuli for acquired resistance to *Heligmosomoides polygyrus* from intestinal tissue resident L3 and L4 larvae. *The International Journal for Parasitology* 22: 699–710.
- [75] Doligalska M., Rzepecka J., Dreła N., Donskow K., Gerwel-Wronka M. 2006. The role of TGF- β in mice infected with *Heligmosomoides polygyrus*. *Parasite Immunology* 28: 387–395.
- [76] Onah D.N. i Nawa Y. 2000. Mucosal immunity against parasitic gastrointestinal nematodes. *The Korean Journal of Parasitology* 4: 209–236.
- [77] Svetic A., Madden K.B., Zhou X.D., Lu P., Katona I.M., Finkelman F.D., Urban J.F. Jr, Gause W.C. 1993. A primary intestinal helminthic infection rapidly induces a gut-associated elevation of Th2 associated cytokines and IL-3. *The Journal of Immunology* 150: 3434–3441.
- [78] Ben-Smith A., Lammas D.A., Behnke J.M. 2003. The relative involvement of Th1 and Th2 associated immune responses in the expulsion of a primary infection of *Heligmosomoides polygyrus* in mice of differing response phenotype. *Journal of Helminthology* 77: 133–146.
- [79] Doligalska M., Donskow-Schmelter K., Rzepecka J., Dreła N. 2007. Reduced apoptosis in BALB/c mice infected with *Heligmosomoides polygyrus*. *Parasite Immunology* 29: 283–291.
- [80] Donskow-Schmelter K., Laskowska M., Doligalska M. 2007. *Heligmosomoides polygyrus*: Opioid pepti-

des are involved in immune regulation of histotropic phase of infection. *Experimental Parasitology* 118: 338–44.

- [81] Morgan C., LaCourse E.J., Rushbrook B.J., Greetham D., Hamilton J.V., Barret J., Bailey K., Brophy P.M. 2006. Plasticity demonstrated in the proteome of

parasitic nematode within the intestine of different host strains. *Proteomics* 6: 4633–4645.

Wpłynęło 25 listopada 2008

Zaakceptowano 9 lutego 2009