

WPŁYW FITOHEMAGLUTYNINY P NA ZACHOWANIE SIĘ KOMÓREK CD4⁺ I CD8⁺ W PRZEBIEGU EKSPERYMENTALNEJ WŁOŚNICY U MYSZY

KRYSTYNA KARMAŃSKA¹, MAREK HOUSZKA² I EWA STEFANIAK¹

¹ Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN, Wrocław

² Katedra Parazytologii i Chorób Inwazyjnych AR
50-375 Wrocław, ul. Norwida 31

THE INFLUENCE OF PHYTOHAEMAGGLUTININ P ON THE CD4⁺ AND CD8⁺ CELLS IN THE COURSE OF THE EXPERIMENTAL TRICHINELLOSIS IN MICE

Abstract. Experiments were carried out with mice of CFW inbred strain infected with 200 *Trichinella spiralis* larvae and divided into two groups: experimental and control. The experimental mice were injected with phytohaemagglutinin P (PHA-P), 24 h before infection. The all animals were killed between 7–133 days post infection and the pieces of spleens, mesenteric lymph nodes, jejunum and masseter muscles were sectioned in a cryostat and examined with monoclonal antibodies (anti-Thy 1, 2, anti-CD4⁺ and anti-CD8⁺) by immunoenzymatic method.

In the animals treated with PHA-P, more numerous CD4⁺ cells were observed in comparison with the control. The CD8⁺ cells were stimulated only in the muscles. The most important problem were the CD4⁺ and CD8⁺ cells inside the larvae capsules. The role of the CD4⁺ and CD8⁺ cells in the immunopathological changes in the course of trichinellosis was discussed.

WSTĘP

We wcześniejszych pracach naszego zespołu dotyczących zmian immunopatologicznych we włośnicy była mowa o licznych limfocytach T występujących w komórkowych naciekach zapalnych oraz wewnątrz torebek larw (KARMAŃSKA i MICHALSKA 1977, 1978, KARMAŃSKA i wsp. 1987, 1990), przy czym w badaniach tych posługiwaliśmy się metodą MUELLERA i wsp. (1975).

Ostatnie doświadczenia, w których zastosowaliśmy surowice monoklonalne (KARMAŃSKA i wsp. 1995) wykazały, zarówno w naciekach jak i wewnątrz torebek larw, obecność komórek CD4⁺ i CD8⁺, jednak w tych ostatnich większość komórek reagowała ujemnie.

Ponieważ u myszy, którym przed zarażeniem podano PHA-P (KARMAŃSKA i MICHALSKA 1978), obserwowaliśmy bardziej rozległe komórkowe nacieki zapalne, liczniejsze gromadzenie się komórek wewnątrz torebek larw oraz mniejszą liczbę larw mięśniowych niż w kontroli, postanowiliśmy obecnie sprawdzić czy, a jeśli tak, to w jakim stopniu PHA-P wpływa na pobudzenie komórek CD4⁺ i CD8⁺, by móc wnioskować o ich znaczeniu w przebiegu włośnicy.

Material i metody

Badania przeprowadzono na 116 myszach, samcach szczepu CFW, linii żółtej z hodowli prowadzonej wg metody „świeateł ulicznych” opisanej przez LANE PETTERA i PEARSONA (1971). Połowa zwierząt otrzymała dożylnie PHA-P (firmy Difco, rozpuszczoną w 0,85% NaCl) w ilości 10 mg/kg. Po 24 godz. wszystkie myszy zostały zarażone *per os* dawką 200 larw *Trichinella spiralis* i przez okres obserwacji były przetrzymywane w tych samych warunkach. Po 6 myszy z obu grup: doświadczalnej, której podano PHA-P i kontrolnej, której preparatu nie podawano, zabijano w 7, 14, 21, 28, 35, 42, 60 i 133 dniu po zarażeniu (dpz). Z każdego zwierzęcia pobierano wycinki śledziony, węzła limfatycznego krezkowego, jelita czczego i mięśnia żuchwowego, które po zamrożeniu w ciekłym azocie krojono w kriostacie. Uzyskane preparaty badano metodą immunofluorescencji bezpośredniej posługując się następującymi surowicami monoklonalnymi: anty-Thy 1, 2, anty-L3T4 (CD4⁺) i anty-Ly 2 (CD8⁺) wg metody opisanej przez ŻEROMSKIEGO (1990). Wszystkie znakowane surowice monoklonalne pochodziły z firmy Serva. W niektórych przypadkach, dla porównania, nastawiano także odczyn na esterażę niespecyficzną wg MUELLERA i wsp. (1975), którym identyfikowano limfocyty T we wcześniejszych badaniach (KARMAŃSKA i MICHALSKA 1978).

U wszystkich zabijanych zwierząt liczono włosnie jelitowe lub larwy mięśniowe wg metody KOZARA i KOZAR (1972). Ponadto w 60 dpz zabijano po 10 zwierząt z każdej grupy wyłącznie dla liczenia larw.

Wyniki

Śledziona. W obu grupach zwierząt (kontrolnej i doświadczalnej) liczne, intensywnie reagujące z surowicą anty-Thy 1, 2 komórki skupione były w pochewkach limfatycznych wokół tętnic pozabeleczkowych, a często także wokół *a. centralis*. Spotykano je także w strefie brzeżnej grudek. W samych grudkach limfocytów T w zasadzie nie notowano (czasami, zupełnie wyjątkowo, widziano jednak odosobnione komórki). Pojedyncze limfocyty T spotykano także w miazdze czerwonej. Dalsze badania z użyciem surowicy anty-CD4⁺ i anty-CD8⁺ wskazywały, że wszystkie komórki reagujące dodatnio znajdują się dokładnie w tych samych miejscach, co pozwala przypuszczać, że były to głównie komórki typu CD4⁺ i CD8⁺. Poziom limfocytów posiadających antygen CD4⁺ i CD8⁺ w obu grupach myszy był podobny. Nie zauważono także większych różnic związanych z przebiegiem zarażenia (jedynie w 21 i 28 dpz reakcja z surowicą anty-CD8⁺ u zwierząt otrzymujących PHA-P była nieco słabsza niż u myszy kontrolnych).

Węzeł limfatyczny krezkowy. Zarówno w grupie zwierząt kontrolnych jak i doświadczalnych komórki reagujące dodatnio z surowicą anty-Thy 1, 2 wys-

tępowały w obszarze korowym węzła, a ściślej w środkowym obszarze grudki oraz w jej części obwodowej, skierowanej ku środkowi węzła. Wynik, jaki otrzymano z surowicą anti-CD4⁺, był niemal identyczny w obu grupach: komórki CD4⁺ w dużych skupiskach obserwowano najczęściej w sąsiedztwie torebki narządu. Natomiast liczba komórek CD8⁺ była mniejsza w grupie myszy doświadczalnych. Komórki te leżały głównie (zwłaszcza w 21–28 dpz) na obwodzie grudki tworząc zagęszczenia, które płynnie przechodziły na dalszy obszar węzła. W obu grupach nie stwierdzono wyraźnych różnic w przebiegu zarażenia.

Jelito czcze. Komórki reagujące z surowicą anti-Thy 1, 2 w jelicie czczym obu grup zwierząt miały podobną lokalizację. Widziano je w blaszce właściwej błony śluzowej bezpośrednio pod nabłonkiem, a także w środku i u podstawy kosmków. W przebiegu zarażenia nie obserwowano jednak wyraźnych różnic ilościowych. Wydaje się, że w okresie między 14–42 dpz były nieco liczniejsze, choć i wtedy nie widziano ich we wszystkich kosmkach. W grupie zwierząt, którym podawano PHA-P, między 28 a 133 dpz obserwowano więcej niż u myszy kontrolnych komórek reagujących dodatkowo z surowicą anti-Thy 1, 2. Komórki reagujące pozytywnie z surowicą anti-CD4⁺ obserwowano zazwyczaj u podstawy i w centrum kosmka. Przez cały okres obserwacji było ich nieco więcej w grupie zwierząt otrzymujących PHA-P. Natomiast komórki CD8⁺ występowały przede wszystkim w postaci „sznurów” układających się bezpośrednio pod nabłonkiem. Komórki CD8⁺ były na ogół liczniejsze w jelicie czczym myszy z grupy kontrolnej.

Mięsień żuchwowy. W grupie zwierząt doświadczalnych obserwowano bardziej rozległy komórkowy naciek zapalny niż w grupie zwierząt kontrolnych. Między 21–28 dpz naciek ten towarzyszył około połowie torebek pasożytów w mięśniach zwierząt grupy kontrolnej i około 80% torebek w mięśniach myszy otrzymujących PHA-P. W 35 dpz komórkowy naciek zapalny otaczał około 75% torebek w mięśniach myszy kontrolnych i wszystkie torebki larw w grupie myszy traktowanych PHA-P. U tych ostatnich, nawet w 133 dpz, komórki nacieku widziano jeszcze przy około 50% torebek, podczas gdy u myszy kontrolnych obserwowano je przy około 10%.

W naciekach mięśniowych myszy, którym podawano PHA-P, było więcej niż w kontroli komórek reagujących z surowicą anti-Ty 1, 2, co szczególnie wyraźnie występowało między 21–42 dpz. Komórki CD4⁺ w nacieku przez cały okres obserwacji były liczniejsze w grupie zwierząt otrzymujących PHA-P. Między 21–28 dpz zanotowano także reakcję dyfuzyjną. Podobnie komórki reagujące z surowicą anti-CD8⁺, widziane w naciekach mięśniowych zwierząt doświadczalnych, były nieco liczniejsze (zwłaszcza w 42 dpz) niż u myszy kontrolnych.

Bardziej rozległy komórkowy naciek zapalny w mięśniach myszy doświadczalnych znalazł swoje odbicie w liczbie torebek pasożytów zawierających komórki. Już w 28 dpz procent torebek z komórkami nacieku był wyższy

w grupie zwierząt otrzymujących PHA-P (67,0) niż w grupie myszy kontrolnych (43,5). W 35 dpz odsetek torebek larw zawierających komórki u zwierząt, którym podawano PHA-P wynosił 60,6, podczas gdy u myszy kontrolnych spadał do 29,5. Natomiast w 42 dpz obie wartości były zbliżone: 23,4% w grupie myszy doświadczalnych i 23,0% w grupie kontrolnej.

Następnie, biorąc pod uwagę tylko torebki zawierające komórki, obliczano ich średnią liczbę przypadającą na jedną torebkę. Średnia ta w 28 dpz u zwierząt kontrolnych wynosiła 8,6, zaś u doświadczalnych – 13,3. Jednak w następnych terminach różnice były dużo mniejsze. I tak, w 35 dpz zanotowano odpowiednio 17,9 i 19,4, a w 42 dniu inwazji 20,3 i 21,3. W podobny sposób obliczano średnią liczbę komórek reagujących z surowicą anti-Thy 1, 2 znajdujących się w jednej torebce pasożyta. Średnia ta w grupie zwierząt kontrolnych w 28 dpz wynosiła 3,3, zaś u zwierząt doświadczalnych 4,2. W 35 dniu inwazji w grupie kontrolnej zanotowano jej spadek do 2,8, podczas gdy w grupie myszy doświadczalnych nastąpił wyraźny wzrost do 5,6. Natomiast w 42 dpz średnia liczba komórek $CD4^+$ w torebkach larw zmniejszyła się do 2,0 u myszy kontrolnych i do 3,2 u myszy otrzymujących PHA-P.

Średnia liczba komórek $CD4^+$ przypadająca na jedną torebkę wynosiła w 28 dpz u zwierząt kontrolnych 2,3, a u zwierząt doświadczalnych 2,5. W 35 dpz średnia ta w grupie kontrolnej spadła do 1,6, zaś w grupie doświadczalnej wzrosła do 3,9. Jednak już w 42 dpz wartości te zbliżyły się do siebie. I tak, u myszy kontrolnych zanotowano 1,2 a u zwierząt traktowanych PHA-P – 1,6.

Mniejsze różnice obserwowano w zachowaniu się komórek $CD8^+$. I tak, w 28 dniu inwazji średnia liczba komórek w torebce pasożyta w mięśniach grupy kontrolnej wynosiła 1,0 a w doświadczalnej 1,7. W 35 dpz u myszy kontrolnych wartość ta wzrosła do 1,2, a u zwierząt nie otrzymujących PHA-P nie zanotowano zmiany. W 42 dpz średnia liczba komórek $CD8^+$ w torebkach pasożytów w mięśniach myszy kontrolnych wynosiła w dalszym ciągu 1,0 a u zwierząt doświadczalnych 1,6.

Badania parazytologiczne. Średnia liczba włośni dorosłych u myszy kontrolnych wynosiła w 7 dpz 136,7, w 14 – 27,3 i w 21 – 5,0. W 28 dniu inwazji pasożytów nie stwierdzono. Natomiast średnia liczba pasożytów w jelitach zwierząt otrzymujących PHA-P w 7 dpz równała się 98,0, w 14 dpz 6,1, zaś w 21 dniu inwazji włośni nie znaleziono. Średnia liczba larw mięśniowych obliczana w 60 dpz wynosiła 37.000 (SD 4256,42) w grupie zwierząt kontrolnych i 25.000 (SD 5648,32) w grupie myszy, którym podawano PHA-P.

Dyskusja

Z wcześniejszej pracy (KARMAŃSKA i MICHALSKA 1978) wynikało, że u myszy, którym podawano PHA-P przed zarażeniem *T. spiralis*, włośnie dorosłe były usuwane szybciej niż w kontroli. Równocześnie uzyskiwano mniejszą liczbę larw mięśniowych, czemu towarzyszyły bardziej rozległe komórkowe nacieki

zapalne i większa liczba komórek leżących wewnątrz torebek pasożytów. Uważaliśmy zatem, że przebadanie w takich warunkach zachowania się obu subpopulacji limfocytów T z osobna rzuci światło na ich rolę w przebiegu włośnicy.

Uzyskane obecnie wyniki wskazują, że o liczniejszych limfocytach T w blaszce właściwej błony śluzowej jelit zwierząt otrzymujących PHA-P decydował wyłącznie wzrost liczby komórek CD4⁺, ponieważ poziom limfocytów CD8⁺ był niższy niż w kontroli.

W tych warunkach szybciej przebiegający proces usuwania włośni dorosłych wydaje się wskazywać na ważną rolę komórek CD4⁺. Należy zaznaczyć, że już LETONJA i wsp. (1988) obserwowali, że po wyeliminowaniu tych komórek u myszy zarażonych *Taenia taeniaeformis*, pasożyty nie były zabijane, a KOYAMA i wsp. (1955) stwierdzili, że usuwanie *Trichuris muris* z jelit myszy, którym podawano przeciwciała anty-CD4⁺, były zahamowane. Problem ten wymaga jeszcze dalszych badań, gdyż należy z drugiej strony pamiętać, że spadek liczby komórek CD8⁺ łączy się ze wzrostem poziomu IgE (KENEMY i wsp. 1992).

Inną sytuację obserwowano w naciekach zapalnych w mięśniach, gdzie również komórki CD8⁺ były liczniejsze niż w kontroli, ale i tutaj wyraźnie przeważały komórki CD4⁺. Silniejsze pobudzenie limfocytów CD4⁺ przez PHA-P dotyczyło także komórek leżących wewnątrz torebek larw. W naszej poprzedniej pracy donosiliśmy już o obecności komórek CD4⁺ i CD8⁺ w torebkach pasożytów (KARMAŃSKA i wsp. 1995). Obecne badania wykazały, że do torebek z larwami włośni w mięśniach myszy otrzymujących PHA-P, w większym stopniu niż u zwierząt kontrolnych wnikają obie subpopulacje komórek; jednak wzrost poziomu CD4⁺ jest znacznie wyższy niż CD8⁺ (ryc. 1 i 2).

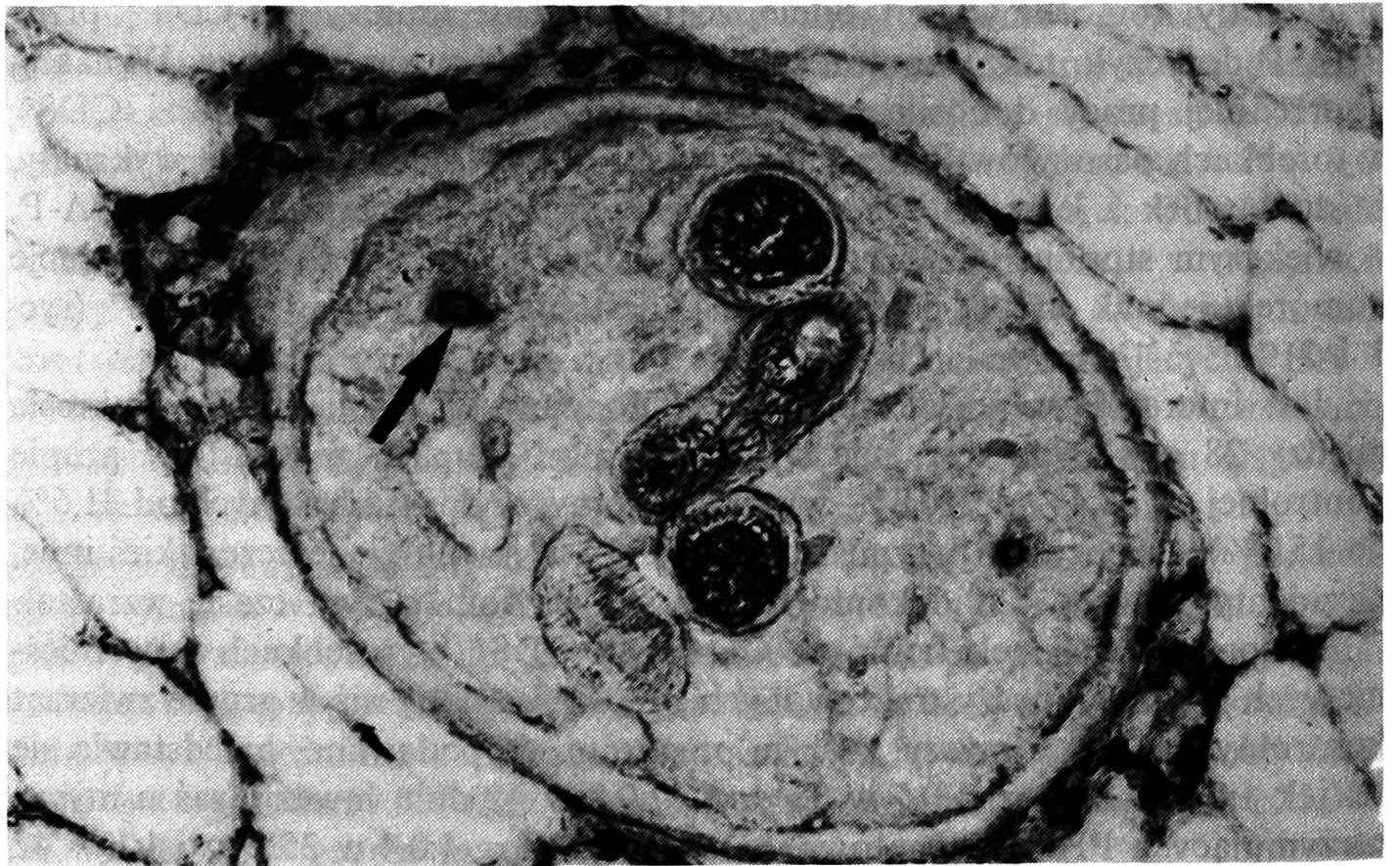
Jest interesujące, że łączna liczba limfocytów CD4⁺ i CD8⁺ w okresie między 28 a 42 dpz wyraźnie spadała w obu grupach zwierząt (w grupie kontrolnej od 38,4% do 10,8%, w grupie zaś myszy doświadczalnych od 31,6% do 15,0%), co pozwala przypuszczać, że PHA-P stymuluje jeszcze jakieś inne, niezidentyfikowane dotąd komórki, których poziom w tym czasie wzrastał.

Natomiast stosunek komórek CD4⁺ do CD8⁺ w torebkach larw mięśniowych w grupie myszy traktowanych PHA-P jest inny niż w grupie zwierząt kontrolnych. I tak u myszy, którym preparatu nie podawano, przedstawia się on jak 1:0,4 w 28 dpz, 1:0,7 w 35 dpz i 1:0,8 w 42 dniu inwazji, zaś u myszy otrzymujących PHA-P zanotowano 1:0,7 w 28 dpz, 1:0,4 w 35 dpz i 1:1 w 42 dniu zarażenia, przy czym obniżenie wartości dla CD8⁺ w 34 dniu inwazji nie oznacza spadku ich rzeczywistej liczby, lecz wynika z silnego pobudzenia komórek CD4⁺ w tym okresie (patrz: wyniki). Ponieważ z mięśni myszy otrzymujących PHA-P uzyskuje się mniejszą liczbę larw, można sądzić, że w tej fazie włośnicy oprócz limfocytów CD4⁺ pewną rolę odgrywają także komórki CD8⁺.

Porównanie rezultatów obecnych badań (z użyciem surowic monoklonal-



1



2

Komórki wewnątrz torebki larwy w mięśniu żuchwowym myszy traktowanych PHA-P (35 dzień po zarażeniu): ryc. 1 – $CD4^+$; ryc. 2 – $CD8^+$

Ze względu na lepszą czytelność obrazu zdjęcia zostały zrobione z preparatów wykonanych metodą immunoperoksydazy (w układzie A-B)

nych) z wynikami badań metodą MUELLERA i wsp. (op. cit.) (KARMAŃSKA i MICHALSKA 1977, 1978) pozwoliło stwierdzić, że są one tylko częściowo zgodne (znacznie więcej limfocytów T indentyfikowano metodą MUELLERA i wsp., zwłaszcza wewnątrz torebek larw).

Przedstawione badania są pierwszymi tego typu obserwacjami i wnoszą nowe, szczegółowe dane do immunopatologii włośnicy, a zwłaszcza do jej fazy mięśniowej.

Wnioski

1. PHA-P wyraźnie wpływa na wzrost liczby komórek CD4⁺ i spadek (z wyjątkiem mięśni) komórek CD8⁺.
2. U myszy otrzymujących mitogen stwierdzono szybsze wydalanie włośni dorosłych z jelit i mniejszą liczbę larw w mięśniach niż w kontroli. Przypuszczalnie wiąże się to nie tylko z podwyższonym poziomem komórek CD4⁺, ale i z odmiennym zachowaniem się komórek CD8⁺.

LITERATURA

- KARMAŃSKA K., HOUSZKA M., MIŚTA D., STEFANIAK E. 1995. CD4⁺ and CD8⁺ cells during infection with *Trichinella spiralis* in mice. *Acta Parasitol.* 40: 53-57.
- MICHALSKA Z. 1977. B and T lymphocytes in the course of experimental trichinellosis in mice. *Acta Parasitol. Pol.* 25: 191-197.
- – 1978. The influence of phytohemagglutinin P on the course of experimental trichinellosis in mice. *Ibid.* 26: 61-74.
- – MIELCZAREK J., ŚLASKA B. 1987. Dynamika zmian immunopatologicznych w mięśniowej fazie włośnicy. *Wiad. Parazytol.* 33: 509-515.
- – – 1990. An attempt at modifying immunopathological changes in the muscles of mice by infection with *Trichinella spiralis* larvae of identical age. *Acta Parasitol. Pol.* 35: 167-172.
- KENEMY M., NOBLE A., DIAZ-SANCHEZ D., STAYNOV D., LEE T. 1992. Ricin-sensitive early activated CD8⁺ T cells suppress IgE responses and regulate the production of IFN- γ and IL-4 by splenic CD4⁺, CD8⁺ T cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 99: 362-365.
- KOYAMA K., TAMAUCHI H., ITO Y. 1995. The role of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in protective immunity to the murine nematode parasite *Trichuris muris*. *Parasite Immunol.* 17: 161-165.
- KOZAR Z., KOZAR M. 1972. Diagnostyka chorób pasożytniczych człowieka. PZWL, Warszawa.
- LANE PETTER W., PEARSON A. E. G. 1971. The laboratory Animal-Principles and practice. Academic Press, London–New York.
- LETONJA T., HAMMERBERG C., DAVIS S., HAMMERBERG B. 1988. *Taenia taeniaeformis*: cellular reconstruction of athymic mice and role of L3T4 helper T lymphocytes in the early infection. *J. Parasit.* 74: 985-992.
- MUELLER J., BRUN DEL RE G., BUERKI H., KELLER H., HESS M., COTTIER H. 1975. Nonspecific acid esterase activity: a criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes. *Europ. J. Immunol.* 5: 270-274.
- ŻEROMSKI J. 1990. Metody immunofluorescencyjne. W: M. Zabel [red.] Immunocytochemia, PWN, Warszawa: 92-120.