

**UNIWERSYTET MEDYCZNY**  
**im. KAROLA MARCINKOWSKIEGO**  
**w POZNANIU**  
**WYDZIAŁ NAUK O ZDROWIU**

**Joanna Rutkowska**

**APOPTOZA LEUKOCYTÓW KRWI OBWODOWEJ**  
**INDUKOWANA PRZEZ *TRICHINELLA* SPP.**

**Praca wykonana pod kierunkiem**  
**prof. dr hab. Krzysztofa Wiktorowicza**  
**Katedra Biologii i Ochrony Środowiska**

**Poznań, 2011**

*Promotorowi*

**Panu Prof. dr hab.  
Krzysztofowi Wiktorowiczowi  
za pomoc merytoryczną i  
cenne uwagi, a wszystkim  
Pracownikom Katedry  
Biologii i Ochrony Środowiska  
za życzliwość  
SERDECZNIE DZIĘKUJĘ**

# SPIS TREŚCI

1.	Wykaz skrótów .....	6
2.	Wstęp .....	10
2.1.	Epidemiologia zarażeń <i>Trichinella</i> spp. ....	10
2.1.1.	Budowa i cykl rozwojowy <i>Trichinella spiralis</i> i <i>Trichinella britovi</i> .....	12
2.1.2.	Obraz kliniczny włośnicy .....	14
2.2.	Odpowiedź immunologiczna w zarażeniach pasożytniczych .....	17
2.2.1.	Odpowiedź immunologiczna w zarażeniach nicieniami (w tym <i>Trichinella spiralis</i> ) .....	17
2.2.2.	Nieswoiste mechanizmy obronne .....	18
2.2.3.	Eozynofile .....	19
2.2.4.	Komórki tuczne .....	20
2.2.5.	Bazofile .....	21
2.2.6.	Neutrofile .....	21
2.2.7.	Makrofagi .....	22
2.2.8.	Pozostałe elementy odpowiedzi wrodzonej .....	23
2.2.9.	Komórki dendrytyczne .....	24
2.2.10.	Mechanizmy odpowiedzi swoistej .....	25
2.3.	Apoptoza .....	29
2.3.1.	Szlak zewnętrzny indukcji apoptozy .....	30
2.3.2.	Szlak wewnętrzny indukcji apoptozy .....	31
2.3.3.	Szlaki alternatywne indukcji apoptozy .....	32
2.3.4.	Białka regulujące proces apoptozy .....	32
2.3.5.	Ostateczny etap procesu apoptozy .....	34
3.	Cel pracy .....	35
4.	Materiał .....	36
4.1.	Krew .....	36
4.2.	Larwy <i>Trichinella spiralis</i> i <i>Trichinella britovi</i> .....	36
5.	Metody .....	38
5.1.	Cytometria przepływową .....	38
5.1.1.	Materiał badawczy w cytometrii przepływowej .....	40
5.1.2.	Odczynniki .....	41

<b>5.1.3.</b>	Procedura badawcza .....	41
<b>5.1.3.1.</b>	Próby badane .....	41
<b>5.1.3.2.</b>	Próby kontrolne .....	43
<b>5.1.4.</b>	Pomiar .....	44
<b>5.1.4.1.</b>	Barwniki fluorescencyjne .....	44
<b>5.2.</b>	Analiza wyników .....	44
<b>5.3.</b>	Analiza statystyczna .....	47
<b>6.</b>	Wyniki .....	48
<b>6.1.</b>	Wpływ liczby dodanych larw (1, 10 lub 100) <i>Trichinella spiralis</i> lub <i>Trichinella britovi</i> na indukcję apoptozy komórek krwi obwodowej .....	48
<b>6.1.1.</b>	Wpływ liczby dodanych larw <i>Trichinella spiralis</i> lub <i>Trichinella britovi</i> na indukcję apoptozy limfocytów po 1, 3 i 24 godzinach inkubacji z pasożytami .....	48
<b>6.1.2.</b>	Wpływ liczby dodanych larw <i>Trichinella spiralis</i> lub <i>Trichinella britovi</i> na indukcję apoptozy granulocytów po 1 i 3 godzinach inkubacji z pasożytami .....	50
<b>6.2.</b>	Wpływ dodania 100 świeżo pobranych żywych, zamrożonych lub utrwalonych w alkoholu larw <i>Trichinella spiralis</i> lub <i>Trichinella britovi</i> na indukcję apoptozy komórek krwi obwodowej .....	52
<b>6.2.1.</b>	Wpływ dodania 100 świeżo pobranych żywych, zamrożonych lub utrwalonych w alkoholu larw <i>Trichinella spiralis</i> lub <i>Trichinella britovi</i> na indukcję apoptozy limfocytów krwi obwodowej po 1 i 3 godzinach inkubacji z pasożytami .....	52
<b>6.2.2.</b>	Wpływ dodania 100 świeżo pobranych żywych, zamrożonych lub utrwalonych w alkoholu larw <i>Trichinella spiralis</i> lub <i>Trichinella britovi</i> na indukcję apoptozy granulocytów krwi obwodowej po 1 i 3 godzinach inkubacji z pasożytami .....	54
<b>6.3.</b>	Porównanie apoptozy komórek krwi obwodowej indukowanej przez dodanie 100 świeżo pobranych żywych larw pasożytów <i>Trichinella</i> <i>spiralis</i> lub <i>Trichinella britovi</i> .....	56
<b>6.3.1.</b>	Wpływ 100 świeżo pobranych żywych larw obydwu gatunków <i>Trichinella</i> na indukcję apoptozy limfocytów po 1, 3 i 24 godzinach inkubacji z pasożytami .....	56

<b>6.3.2.</b>	Wpływ 100 świeżo pobranych żywych larw obydwu gatunków <i>Trichinella</i> na indukcję apoptozy granulocytów po 1 i 3 godzinach inkubacji z pasożytami .....	58
<b>7.</b>	Dyskusja .....	59
<b>8.</b>	Wnioski .....	67
<b>9.</b>	Streszczenie .....	68
<b>10.</b>	Abstract .....	69
<b>11.</b>	Piśmiennictwo .....	70
<b>12.</b>	Aneks .....	82

# 1. WYKAZ SKRÓTÓW

- A1/Bfl-1 – białko hamujące uwalnianie cytochromu C
- AAM (alternative activation macrophage) - alternatywnie aktywowane makrofagi
- AICD (activation- induced cell death) - śmierć komórki indukowana aktywacją
- AIF (apoptosis inducing factor) - czynnik indukujący apoptozę
- AMCase (acidic mammalian chitinase) -kwaśna chitynaza ssaków
- Apaf1 (apoptosis protease activating factor 1) - cytoplazmatyczny czynnik aktywujący białka apoptozy
- Bad (Bcl-2 antagonist of cell death- equivalent to Bcl-2 associated death promoter) - białko błonowe aktywujące apoptozę
- Bak (Bcl-2 antagonist/killer 1) - białko aktywujące apoptozę
- Bax (Bcl-2 associated x protein) - białko z rodziny Bcl-2, proapoptotyczne
- Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma-2) - rodzina endogennych białkowych regulatorów apoptozy
- Bcl-w (Bcl-2 widely expressed) - białko antyapoptotyczne
- Bcl-XL (Bcl-2 related gene, long form) - białko antyapoptotyczne
- Bcl-XS (Bcl-2 related gene, short isoform) - białko proapoptotyczne
- BH (Bcl-2 homology domain) - domena homologu Bcl-2
- Bid (BH3-interacting domain death agonist) - białko proapoptotyczne
- Bik/Nbk (Bcl-2 interacting killer) - białko proapoptotyczne
- Bim/Bod (Bcl-2 interacting mediator of cell death) - białko proapoptotyczne
- BIR (Baculoviral IAP Repeat) - domena endogennych białek hamujących apoptozę
- Blk – białko aktywujące apoptozę
- Bmf (Bcl-2 modifying factor) - białko aktywujące apoptozę
- Bok/Mtd (Bcl-2-related ovarian killer/ Spanish: Matador- the killer) - białko aktywujące apoptozę
- CAM (classical activation macrophage) - klasycznie aktywowane makrofagi
- CARD (caspase recruitment domain) - domena rekrutująca kaspazy
- CC- chemokina
- CCR- receptor dla chemokin
- CLR- receptor dla lektyny typu C

- CTMC (connective tissue mast cell) - komórka tuczna tkanki łącznej
- DD (death domain) - domena śmierci
- DED (death effector domain) - wykonawcza domena śmierci
- DFF (DNA fragmentation factor) - czynnik fragmentujący DNA
- DISC (death-inducing signaling complex) - kompleks sygnałowy indukujący śmierć komórki
- DNA- kwas deoksyrybonukleinowy
- ECP (eosinophilic cationic protein) - eozynofilowe białko kationowe
- EPO (eosinophil peroxidase) - peroksydaza eozynofilowa
- ER (endoplasmatic reticulum) - retikulum endoplazmatyczne
- ES (excretory/secretory antigens) - antygeny wydalniczo-wydzielnicze
- FADD (Fas- associated death domain) - związane z Fas białko adaptorowe z domeną śmierci
- FAM- karboksyfluoresceina
- Fas- receptor ligandu Fas (Apo-1)
- FasL- ligand Fas
- FcR- receptor dla fragmentu Fc immunoglobuliny
- FIZZ (found in inflammatory zone) - znalezione w strefie zapalnej
- FS (Forward Scatter) (FSC) - rozproszenie światła „w przód” pod kątem 0° do 10°
- GM-CSF (granulocyte and macrophage colony stimulating factor) - czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
- IAP (inhibitor of apoptosis protein) - inhibitor białek apoptotycznych
- IECs (intestinal epithelial cells) - jelitowe komórki nabłonka
- Ig- immunoglobulina
- IFN- interferon
- IL- interleukina
- iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase) - indukowalna syntaza tlenku azotu
- IP 10(interferon-inducible protein) - białko indukowane przez interferon
- K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>- węglan potasu
- L1- larwa *Trichinella spiralis* stadium 1
- MAP-1 (Modulator of Apoptosis 1) - białko modulujące apoptozę
- MBP (major basic protein) - główne białko zasadowe

- MC (mast cell) - komórka tuczna
- Mcl-1 (Myeloid cell leukemia-1) - białko hamujące apoptozę
- MHC (Major Histocompatibility Complex) - główny układ zgodności tkankowej
- ML (muscle larval) - larwa mięśniowa
- NaCl 0,9% – roztwór chlorku sodowego 0,9%
- MMC (mucosal mast cell) - komórka tuczna błon śluzowych
- mMCP (mouse mast cell protease) - mysia proteaza komórek tucznych
- MPP type 2 (multi-potent progenitor type 2) - multipotencjalna komórka progenitorowa typu 2
- MPTP (mitochondrial permability transition pore) - megakanał mitochondrialny
- MR – receptor dla mannozy
- NBL (new born larvae) - nowonarodzone larwy
- NFκB (nuclear factor κB) - transkrypcyjny czynnik jądrowy κB
- NH<sub>4</sub>Cl - chlorek amonu
- NHCs (natural helper cells) - naturalne komórki pomocnicze
- NK (natural killer) - komórki zabójcy
- NO (nitric oxide) - tlenek azotu
- Omi/HtrA2 (high temperature requiring protein A2) - proteaza serynowa, czynnik aktywujący apoptozę
- PAF (platelet-activating factor) - czynnik aktywujący płytki
- PAMP (pathogen associated molecular patterns) - molekularne wzorce związane z patogenami
- PI- (Propidium Iodide) - jodek propidionowy
- Puma/Bbc3 (p53- upregulated modular of apoptosis, Bcl-2 binding component 3) - białko aktywujące apoptozę
- RELMα (resistin-like molecules) - cząsteczki rezystynopodobne
- RIP1 (receptor interacting protein 1) - białko wykazujące powinowactwo do receptora TNF
- SC (Side Scatter) (SSC) - rozproszenie światła “w bok” pod kątem 90°
- Smac/DIABLO (second mitochondria derived activator of caspase/ direct IAP binding protein with low PI) - wtórny mitochondrialny aktywator kaspaz
- SMAF (*Schistosoma mansoni* apoptosis factor) - czynnik indukujący apoptozę przez *Schistosoma mansoni*



- STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) - przekaźnik sygnału i aktywator transkrypcji
- tBid (truncated Bid) - skrócona forma białka Bid
- TGF- $\beta$  (transforming growth factor) - transformujący czynnik wzrostu
- Th (T helper) - limfocyty T pomocnicze
- TLR (Toll-like receptor) - receptor Toll-podobny
- TNF (Tumor Necrosis Factor) - czynnik martwicy nowotworów
- TRADD (TNFR1-associated death domain protein) - białko związane z domeną śmierci receptora TNF
- TRAF2 (TNF receptor associated factor 2) - czynnik 2 związany z receptorem TNF
- TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) - ligand związany z TNF- $\alpha$  indukujący apoptozę
- Treg- limfocyty T regulatorowe
- TSL (*Trichinella spiralis* larvae) - larwa włośnia krętego
- TSL-1-antigen kojarzony z formą larwalną *T.spiralis* bytującą w mięśniach (L1)
- TSLP (thymic stromal lymphopoietin) - limfopoetyna macierzy grasicy, cytokina homologiczna z IL-7
- TSLPR- receptor dla TSLP
- Ym1- białko wydzielnicze, syntetyzowane przez mysie makrofagi otrzewnowe
- VAD-FMK- fluorometyloketonowa pochodna kwasu walinoalanoasparginowego

## 2. WSTĘP

### 2.1. Epidemiologia zarażeń *Trichinella* spp.

*Trichinella* spp. jest jednym z rozpowszechnionych pasożytów powodujących zarażenie ludzi, zwierząt mięsożernych, wszystkożernych, oraz czego dowodzą najnowsze badania - zwierząt roślinożernych [18, 42, 108]. Wywołuje on włośnicę (*trichinellosis*) - zoonozę, która stanowi wciąż duży problem epidemiologiczny [18, 62, 63]. Dotyczy on nie tylko Polski, ale również wielu krajów Europy, a także tych położonych na kontynentach Afryki, Ameryki Południowej, Północnej i Azji [38, 42, 62], niezależnie od klimatu. Globalne rozpowszechnienie choroby jest trudne do określenia, ale szacuje się, że na świecie aż 11 mln osób może być zarażonych włośnicą [25]. Na przestrzeni ostatnich kilkudziesięciu lat na świecie obraz epizootyczny i epidemiologii włośnicy uległ znaczącej zmianie. Opisano nowe gatunki włośnic, w tym patogenne dla człowieka (tabela 1) [18, 25, 38, 42, 98].

Gatunek lub genotyp <i>Trichinella</i>	Występowanie	Rezerwuar	Patogenność dla człowieka
<i>T. spiralis</i>	Europa, Afryka, Azja, Ameryka Płn. i Płd.	zwierzęta domowe i leśne	++++
<i>T. britovi</i>	klimat umiarkowany, z izotermą w styczniu powyżej -6°C	zwierzęta dzikie	++
<i>T. pseudospiralis</i>	Azja, Europa, USA, Tasmania	dzikie ssaki, ptaki	+++
<i>T. nativa</i>	obszar holoarktyczny i palearktyczny z izotermą w styczniu poniżej -5 °C Estonia, Finlandia, Rosja, Norwegia, Szwecja	zwierzęta dzikie, ssaki morskie	++++
<i>T. nelsoni</i>	Afryka	zwierzęta dzikie	++
<i>T. mirelli</i>	Stany USA położone w strefie neoarktycznej	zwierzęta dzikie	++++
<i>T. papuae</i>	Papua Nowa Gwinea	świnie dzikie i domowe	prawdopodobnie
<i>T. zimbabwensis</i>	Zimbabwe	krokodyl	nie stwierdzono
<i>T6</i>	USA	zwierzęta dzikie	+++
<i>T8</i>	Południowa Afryka	zwierzęta dzikie	nie stwierdzono
<i>T9</i>	Japonia	zwierzęta dzikie	nie stwierdzono

Tabela 1. Poznane gatunki i genotypy *Trichinella* spp. (++)/ (+++)/ (++++) - niska / średnia/ wysoka patogenność dla człowieka [18, 25, 38, 98, 105, 106]

Człowiek zaraża się spożywając surowe, niedogotowane, niedosmażone mięso zawierające larwy włośnia. Każdego roku rejestrowane są ogniska zachorowania na włośnicę, pomimo wprowadzania nowych przepisów, które regulują obrót, ubój oraz badania sanitarno-weterynaryjne zwierząt hodowlanych, a także mięsa [35, 38, 42]. Najbardziej istotnym czynnikiem sprzyjającym rozprzestrzenianiu się zarażenia wśród zwierząt hodowlanych są zaniedbania sanitarne (rozprzestrzenianie się populacji szczurów, skarmianie zwierząt rzeźnych padliną). Natomiast wpływ ludzi na powstawanie ognisk włośnicy i rozprzestrzenianie się choroby wśród dzikich zwierząt jest znikomy. Wydaje się, iż najważniejszym czynnikiem mogącym ograniczyć rozprzestrzenianie się tej zoonozy jest odpowiedni nadzór weterynaryjny nad produkcją mięsa. Obecnie za najbardziej czułą metodę badania mięsa pod kątem obecności larw włośnia uważa się metodę wytrawiania. Wykorzystywana wcześniej metoda trychinoskopii nie wykrywa obecności larw, jeśli 1 gram mięsa zawiera mniej niż 1-3 larw włośnia. Metodą inaktywacji larw włośni w mięsie wieprzowym, uznaną przez Międzynarodową Komisję Włośnicową jest czynnik cieplny-gotowanie, a także mrożenie. Czas i temperatura są ściśle opisane w załącznikach III i IV dokumentu [35].

W Polsce potwierdzono dotychczas występowanie dwóch gatunków włośnia: *Trichinella spiralis* i *Trichinella britovi* [37, 38]. W środowisku naturalnym *Trichinella spiralis* występuje u wielu zwierząt leśnych (dzik, lis, kuna, tchórz, borsuk, drobne gryzonie), a *Trichinella britovi* stwierdzono u lisów rudych oraz u dzika [38, 105]. Oba te gatunki włośnia są patogenne dla człowieka. Przebieg włośnicy spowodowanej *Trichinella britovi* opisywany jest w literaturze jako znacznie łagodniejszy, z dłuższym okresem inkubacji, w porównaniu z podobnym zarażeniem *Trichinella spiralis*, które to w najcięższych przypadkach może zakończyć się zgonem [18]. W środowisku przydomowym najważniejszy rezerwuuar włośni stanowią świnie. Nie bez znaczenia pozostają też konie, owce, kozy, myszy, szczury i hodowlane zwierzęta futerkowe [38, 42]. Klasyfikację przypadków zachorowań na włośnicę w naszym kraju przeprowadza się w oparciu o kryteria zamieszczone w definicji podanej przez Komisję Europejską w decyzji 2002/253/EC i wprowadzonej do nadzoru w Polsce w 2005 roku [37]. W przypadku, kiedy nie określono badaniami molekularnymi gatunku włośnia, zachorowanie jest klasyfikowane jako *Trichinella* spp. Liczba przypadków zachorowań na włośnicę w Polsce i Wielkopolsce w przeciągu 10 ostatnich lat przedstawia tabela 2.

Lp.	Rok	woj. wielkopolskie		Polska	
		Liczba zachorowań	Zapadalność	Liczba zachorowań	Zapadalność
1	2000	26	0,77	36	0,09
2	2001	41	1,22	64	0,17
3	2002	14	0,42	42	0,11
4	2003	20	0,60	40	0,10
5	2004	79	2,35	172	0,45
6	2005	58	1,72	70	0,18
7	2006	67	1,99	132	0,35
8	2007	34	1,01	292	0,77
9	2008	1	0,03	4	0,01
10	2009	18	0,53	36	0,09
11	2010	16	0,47	51	0,13

Tabela 2. Liczba zachorowań na włośnicę na terenie Wielkopolski i Polski w latach 2000-2010

Dane pochodzą z Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego-Państwowego Zakładu Higieny, z Pracowni Monitorowania i Analizy Sytuacji Epidemiologicznej (dzięki uprzejmości Pani Anny Pawłowskiej)

### 2.1.1. Budowa i cykl rozwojowy *Trichinella spiralis* i *Trichinella britovi*

*Trichinella spiralis* i *Trichinella britovi* należą do typu obleńce (*Nemathelminthes*), gromady nicienie (*Nematoda*), podgromady *Aphasmidia* i rodziny *Trichinellidae* [62]. W cyklu rozwojowym włośnia występują formy dorosłe (samice i samce) oraz larwalne. Jest to najmniejszy nicienie pasożytujący u człowieka. Samica mierzy 3-4,8 mm długości, a samiec jest dużo mniejszy– 1,5-1,6 mm [16].

Ciało dojrzałego pasożyta pokryte jest gładkim warstwowym oskórkiem– kutikulą. Układ pokarmowy znajdujący się w przedniej części ciała obejmuje przełyk, który sięga do połowy długości ciała pasożyta. Zbudowany jest on z dwóch części: mięśniowej i gruczołowej. Część gruczołowa składa się ze stichocytów, które ułożone są pojedynczo jeden za drugim i tworzą stichosom [52]. Organ ten występuje u wszystkich form tego pasożyta, jednak liczba stichocytów zależy od płci, stopnia dojrzałości i gatunku włośnia [62]. Stichocyt zbudowany jest z jądra i ziarnistości, wśród których wyróżnia się 5 klas ( $\alpha_0$ ,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ ), lub 4 klasy ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ ) w zależności od metody ich identyfikacji [9]. Wyżej wymienione ziarnistości są miejscem powstawania antygenów ekskrecyjno/sekrecyjnych (ES), które wraz z antygenami powierzchniowymi indukują odpowiedź żywiciela. Układ pokarmowy kończy się otworem odbytniczym lub kloaką. Pasożyt nie posiada zróżnicowanego układu oddechowego i układu krążenia. Natomiast układ nerwowy, zbudowany z obrączki głównej, pni odchodzących na obwód i zwojów, odgrywa znaczącą rolę w cyklu życiowym pasożyta [62]. U samicy występują pojedyncze narządy rozrodcze. Jajnik znajdujący się w tylnym odcinku ciała

przechodzi w jajowód i w macicę. W macicy znajdują się jaja, będące na różnym etapie rozwoju. Narząd rozrodczy samca składa się z pojedynczego jądra, nasieniowodu połączonego z pęcherzykiem nasiennym i przewodem wytryskowym [16, 52, 62].

Wśród form larwalnych wyróżnia się larwy nowonarodzone (NBL - newborn larvae), larwy migrujące oraz larwy mięśniowe L1 [18], które z wyjątkiem gatunków: *Trichinella pseudospiralis*, *Trichinella papuae* i *Trichinella zimbabwensis* tworzą otoczki kolagenowe [42, 62]. W cyklu rozwojowym *Trichinella* spp. nastąpiło całkowite wyeliminowanie fazy wolno żyjącej [18]. Jeden żywiciel pełni początkowo funkcję żywiciela ostatecznego, a następnie pośredniego [92]. Włosień jest pasożytem tkankowym, postaci dorosłe bytują w ścianie jelita, a larwy w mięśniach [18, 62].

Otorbione w mięśniach zwierząt zarażonych, inwazyjne larwy *Trichinella spiralis*, po zjedzeniu ich przez ssaki drapieżne, także człowieka, po nadtrawieniu przez sok żołądkowy, w jelicie uwalniają się z otoczki, by po 2-4 dniach rozwinąć się do postaci dorosłych: samic i samców. Osiągają dojrzałość płciową w ciągu 3 dni, a od około 6. dnia po zarażeniu żyworodne samice rodzą setki larw (NBL), długości 100-120µm [18, 42, 98]. Młode larwy wędrują przez naczynia limfatyczne, węzły chłonne i piersiowy przewód limfatyczny do żyły głównej, a następnie przez serce, tętnicę płucną, płuca, żyłę płucną i przez krążenie duże roznoszone są po ciele żywiciela [42, 62, 92]. Larwy opuszczające naczynia krwionośne, mogą przenikać do wszystkich narządów i tkanek. Przejściowo mogą przebywać w mięśniu sercowym, tkance mózgowej, siatkówce oka, czy wątrobie [52, 62]. Osiedlają się jednak tylko w niektórych tkankach – inwazja dotyczy włókien mięśni szkieletowych poprzecznie prążkowanych, międzyżebrowych oraz mięśni przepony i języka. Wniknięcie larwy do włókna mięśniowego około 12.-13. dnia od zarażenia prowadzi do zmian morfologii i funkcji zajmowanego włókna mięśniowego [42, 92, 141]. Najczęściej jedna larwa zajmuje jedną komórkę mięśniową, a zajęty przez pasożyta fragment włókna powiększa się [92]. Wzrost pasożyta kończy się około 16. dnia po wniknięciu do włókna mięśniowego, larwy początkowo wyprostowane, skręcają się spiralnie osiągając długość 1,5 mm [16, 98]. Taki kompleks składający się z włókna mięśniowego zajętego przez larwę *Trichinella spiralis* nazywany jest „nursing cell” – komórką opiekunką. Pozostaje ona żywa, zaadaptowana do potrzeb pasożyta, stanowiąc jego źródło pokarmu i ochronę przed atakiem immunologicznym żywiciela [92]. W takiej formie larwy mogą żyć u ludzi do 40 lat [16, 42, 62]. Wokół tego kompleksu najpierw pojawia się sieć naczyń włosowatych, których zanikanie rozpoczyna proces wapnienia larw [62].

W przypadku zarażenia przez konsumpcję fragmentu tkanki mięśniowej zawierającej tak otorbioną larwę włośnia, pasożyt dostaje się do układu pokarmowego kolejnego żywiciela rozpoczynając nowy cykl życiowy.

### **2.1.2. Obraz kliniczny włośnicy**

Przebieg włośnicy zależy od gatunku włośnia i intensywności inwazji [62, 64, 98]. U ludzi nie jest znana najniższa dawka inwazyjna, niemniej niektóre źródła podają, że około 70-300 larw jest minimalną dawką inwazyjną dla wywołania objawów klinicznych. Natomiast przy liczbie 1000-3000 larw *Trichinella spiralis* wywołuje poważne objawy chorobowe [42], które w skrajnych przypadkach mogą doprowadzić do zgonu. Okres wylęgania włośnicy waha się od kilku do kilkudziesięciu (2-45) dni [62], w zależności od intensywności inwazji–liczby larw, co z kolei określa ciężkość przebiegu choroby [18]. Zmiany kliniczne w przebiegu włośnicy zależne są od patomechanizmów związanych z postaciami pasożyta podczas jego cyklu życiowego. U części osób, które zjadły mięso zawierające larwy włośnia, choroba może przebiegać bezobjawowo [18]. Opisywano również proces tzw. samowyleczenia (self-cure), któremu towarzyszą bardzo liczne wypróżnienia, będące efektem usuwania postaci dojrzałych pasożyta ze światła jelita [62]. U pacjentów z umiarkowaną i ciężką postacią włośnicy, choroba może zacząć się od niespecyficzných objawów, takich jak niepokój, bóle głowy, gorączka, dreszcze czy zespół biegunkowy [18]. Gorączka zwykle utrzymuje się przez okres 1-3 tygodni, w zależności od ciężkości zarażenia. Powyższe objawy związane są z pasożytowaniem postaci dojrzałych włośnia w jelicie cienkim. Po około tygodniu (lub do 20 dni w łagodniejszej postaci włośnicy) po zarażeniu rozwija się typowy zespół włośnicowy, który wiąże się z wnikaniem larw do włókien mięśniowych i silnym odczynem zapalnym w tkance mięśniowej. Tak rozpoczyna się faza pozajelitowa - mięśniowa. Objawy to: wysoka gorączka, sięgająca wartości 40°C, bóle mięśni karku, tułowia, kończyn górnych i dolnych i złe samopoczucie, a pacjenci mogą mieć trudności z połykaniem lub otwieraniem ust. Charakterystyczne we włośnicy jest to, że bóle mięśniowe nie poprzedzają gorączki, ale pojawiają się dopiero po jej wystąpieniu [98]. Tej fazie choroby często towarzyszą objawy związane z uszkodzeniem śródbłonna naczyń włosowatych, takie jak obrzęk wokół oczu, twarzy oraz krwawe wybroczyny (spojówka oka, łożysko paznokci). Najczęstsze zaburzenia ze strony układu nerwowego to bóle głowy o różnym nasileniu.

Obserwuje się również zaburzenia połykania, szczękoscisk, przykurcze mięśniowe, nadmierne pobudzenie lub senność i apatię. Część objawów, takich jak zawroty głowy i mdłości ma charakter przejściowy [18, 62, 98]. Mimo że włosień kręty nie zagnieżdża się w komórkach mięśnia sercowego, zaburzenia ze strony układu sercowo-naczyniowego występują dość często. U zarażonych pacjentów może pojawić się przyspieszenie akcji serca, bóle i głuchość tony serca [42, 62, 63].

W przebiegu ogólnoustrojowej choroby, jaką jest włośnica, właściwie na każdym jej etapie może dochodzić do powikłań. Najczęściej obserwowane jest to u pacjentów z ciężkim przebiegiem choroby. Powikłania ze strony układu oddechowego mogą dotyczyć pierwszych tygodni po zarażeniu i obejmują wówczas m.in. odczyny opłucnowe, skurczowy nieżyt oskrzeli. Natomiast późne powikłania obejmują zapalenie i zawał płuc, a także gromadzenie się płynu w jamach opłucnej [62, 98]. Nie bez znaczenia są zmiany zachodzące w gałce i mięśniach ocznych. Nastęstwem mogącym utrzymywać się do kilku tygodni po ustąpieniu innych objawów chorobowych jest ból oczu, wytrzeszcz, szybkie męczenie się przy czytaniu [62]. Powikłania ze strony serca i układu krążenia występują u 20% hospitalizowanych z powodu włośnicy [62, 64]. Przyczyną nagłych zgonów może być zator tętnicy płucnej [42, 62]. Powikłania neurologiczne obejmują: zapalenie opon mózgowych i mózgu, niedowłady, porażenia, nierówność źrenic, czy przejściową afazję [42, 62, 98]. Przewlekła biegunka prowadzi do niedoborów wodno-elektrolitowych, niedoborów białkowych, które to objawy należą do powikłań ze strony układu pokarmowego.

Proces zdrowienia w zarażeniu *Trichinella spiralis* zachodzi powoli. Objawy ze strony narządu ruchu, bóle mięśniowe, osłabienie ostrości wzroku, nawracające stany podgorączkowe, czy nadmierne pocenie się ustępują w przeciągu kilku miesięcy [62, 98].

W obrazie morfologicznym krwi obwodowej w przebiegu włośnicy najbardziej charakterystyczna jest leukocytoza i eozynofilia. Liczba leukocytów wzrasta do poziomu 15-30 tys. komórek/mm<sup>3</sup> w ostrej fazie włośnicy. Podwyższony poziom szybko jednak wraca do wartości prawidłowych wraz z ustępowaniem fazy ostrej. U chorych z ciężkim przebiegiem włośnicy w obrazie krwi obwodowej charakterystyczny dla fazy ostrej jest znaczny spadek limfocytów do wartości 6-8% [62].

Eozynofilia natomiast pojawia się jeszcze przed wystąpieniem pierwszych objawów choroby i dzięki temu jest charakterystycznym wykładnikiem włośnicy. Jej poziom koreluje z

intensywnością inwazji [18]. Maksymalne wartości, które mogą wynosić nawet 80-86% wszystkich białych krwinek, osiąga pomiędzy 3. a 4. tygodniem od zarażenia [18, 62, 98]. Eozynofilia utrzymuje się przez cały czas fazy ostrej i bardzo powoli wraca do wartości prawidłowych. Proces ten może trwać nawet do 3-4 miesięcy. Natomiast szybki i gwałtowny spadek liczby eozynofilów, lub też eozynopenia, która obserwowana jest w pierwszych dniach po zarażeniu, towarzyszy ciężkim postaciom choroby i zazwyczaj daje złe rokowania [62].



## 2.2. Odpowiedź immunologiczna w zarażeniach pasożytniczych

Bardzo ogólne pojęcie „pasożyta” (z greckiego: *parasitos*- współbiednik, darmozjad) obejmuje organizmy, które przynajmniej na pewnym etapie swojego życia są uzależnione od żywiciela [39]. Definicja ta określa różnorodność organizmów charakteryzujących się wieloetapowymi i często skomplikowanymi cyklami życiowymi. Rodzaj odpowiedzi immunologicznej uzależniony jest od stadia rozwoju, jak i zakresu umiejscowienia zarażeń pasożytniczych. Ogólnym, niemniej bardzo uproszczonym stwierdzeniem jest to, że odpowiedź humoralna (typu Th2) odgrywa główną rolę w eliminacji pasożytów zewnątrzkomórkowych, a odpowiedź komórkowa (typu Th1) wewnątrzkomórkowych. Promocja jednego z powyższych typów odpowiedzi nabytej w zarażeniach pasożytniczych uwarunkowana jest czynnikami produkowanymi przez komórki odpowiedzi wrodzonej po kontakcie z antygenem. Odpowiedź immunologiczna wrodzona i nabyta współdziałają, aby umożliwić zarówno skuteczne rozpoznanie, jak i usunięcie pasożyta z organizmu żywiciela [39, 80].

### 2.2.1. Odpowiedź immunologiczna w zarażeniach nicieniami (w tym *Trichinella spiralis*)

Zarażenia nicieniami silnie powiązane są z odpowiedzią typu Th2, uzależnioną głównie od wzmożonej produkcji cytokin takich jak IL-4, IL-5 czy IL-13, której bardzo charakterystycznym obrazem jest podwyższony poziom IgE i eozynofilia [3, 44, 97, 124].

Antygeny pasożytów są czynnikami inicjującymi odpowiedź immunologiczną żywiciela na inwazję. W tym procesie ważną rolę przypisuje się produktom wydalniczo/wydzielniczym nicieni, określanym mianem antygenów ES (excretory/secretory antigens). W przypadku *Trichinella spiralis* zidentyfikowano 43 białka, z których za najważniejsze uważa się proteazy, czy 5'- nukleotydazę [45]. Antygeny ES są bardzo różnorodną grupą białek, charakterystyczną dla poszczególnych gatunków pasożytów, niemniej jednak rola wielu z nich nie została opisana [45, 111]. W przypadku zarażeń *Trichinella spiralis* za najbardziej istotny uważany jest antygen TSL-1 [5, 9, 112, 142].

Należy on do glikoprotein (TSL-1 - TSL-8), których najważniejszą składową jest silnie immunogeny cukier – tywelozę [9, 142]. Ten antygen kojarzony jest z formą larwalną bytującą w mięśniach [43, 112], niemniej jego ekspresję stwierdzono również u dorosłych nicieni [140, 143]. TSL-1 opisywany jest zarówno jako antygen powierzchniowy, jak i antygen ES [9, 143].

### **2.2.2. Nieswoiste mechanizmy obronne**

Uruchomienie swoistej odpowiedzi immunologicznej wymaga czasu, dlatego też w pierwszych dniach inwazji istotne znaczenie mają mechanizmy odpowiedzi nieswoistej, które stanowią pierwszą linię obrony. Przy inicjowaniu odpowiedzi nieswoistej dużą rolę przypisuje się receptorom TLR (Toll Like Receptors), które selektywnie rozpoznają cząsteczki PAMP (wzorce molekularne związane z patogenami) [39, 80]. Głównym zadaniem receptorów TLR jest aktywacja komórek układu immunologicznego. Znajdują się one na powierzchni szeregu komórek, np. dendrytycznych, tucznych, śródbłonkowych czy makrofagów. Rola receptorów TLR w aktywacji odpowiedzi Th1 w zarażeniach bakteryjnych została dobrze poznana [80]. Antygeny ES nicieni bogate w glikoproteiny i lipidy potencjalnie mogą wchodzić w interakcje z komórkami odpowiedzi nieswoistej poprzez TLR [45]. Stosunkowo mało badań dotyczyło indukcji odpowiedzi poprzez TLR w przypadku nicieni. Opisywano w zarażeniu schistosomy i filarii możliwość aktywacji odpowiedzi Th2 [110, 131, 148]. Istnieją jednak rozważania dotyczące aktywacji tego typu odpowiedzi poprzez TLR jako mechanizmu obronnego pasożyta umożliwiającego przeżycie poprzez tłumienie odpowiedzi Th1 [110, 148]. Helminty mogą zarówno aktywować, jak i w dużo większym stopniu hamować sygnał przechodzący przez TLR [131], niemniej znaczenie tych mechanizmów w interakcji pasożyt - żywiciel wymaga dalszych badań.

Populacja komórek wrodzonego układu odpornościowego zaangażowanego w usunięcie nicieni jest podobna do tej uczestniczącej w eliminacji bakterii, pierwotniaków czy wirusów, jednak ich mechanizmy aktywacji, jak i funkcje efektorowe są odmienne [97]. Nawet podczas inwazji nicieniami, w czasie których następuje rozwój odpowiedzi Th2, pewne różnice w działaniu komórek odporności wrodzonej ujawniają się w zależności od

gatunku pasożyta [17]. Wskazuje to na olbrzymią elastyczność układu immunologicznego, którego działanie ulega modyfikacji w zależności od typu inwazji.

Podczas zarażeń nicieniami, komórki żerne stanowiące element odporności wrodzonej spełniają funkcję efektorową – niszcząc i usuwając pasożyta, oraz funkcję immunomodulującą, między innymi wspierając różnicowanie komórek T naiwnych w kierunku odpowiedzi Th2 [97].

### 2.2.3. Eozynofile

Eozynofilia tymczasowa lub stała jest bardzo charakterystycznym elementem odpowiedzi żywiciela na inwazję większości pasożytów – eozynofile mogą stanowić ponad 40% wszystkich krążących leukocytów [17]. W zarażeniu *Trichinella spiralis* eozynofilia może przekroczyć nawet 80% [98]. Komórki te migrują do miejsc inwazji, gdzie ulegają degranulacji [3]. Ziarnistości eozynofilów zawierają specyficzne dla tych komórek substancje, tj. główne białko zasadowe (MBP), peroksydazę eozynofilową (EPO), czy główne białko kationowe (ECP), które są silnie toksyczne dla nicieni. Mogą one także indukować wyrzut histaminy z komórek tucznych, czy bazofilów [17, 39, 76]. Stężenie IL-5 jest ściśle związane z poziomem eozynofilów, ale różnicowanie tych komórek, migracja i rekrutacja do tkanek wymaga współdziałania innych cytokin (IL-4, IL-13) [60, 118], jak i chemokin, z których najbardziej istotne, szczególnie w przypadku gromadzenia się eozynofilów w tkankach, są eotoksyny wiążące się poprzez receptor CCR3 [14, 60, 118]. Ziarnistości eozynofilów zawierają również liczne cytokiny, z których IL-4 czy IL-13 są najistotniejsze dla rozwoju odpowiedzi Th2 [17, 118]. Wydaje się, iż eozynofilia jest pośrednio wywoływana przez antygeny pasożytów, inne komórki, lub ich produkty [148]. Antygeny *Trichinella spiralis* stymulują szlak odpowiedzi Th2. Aktywowane limfocyty produkują IL-3, IL-5 czy GM-CSF, które wpływają na zwiększoną produkcję eozynofilów, ich migrację do tkanek i wydłużają czas ich życia [14]. Znaczenie eozynofilów jako komórek efektorowych w pierwotnych inwazjach nicieniami nie jest jednoznaczne [60, 97]. Sugeruje się, iż eozynofilia nie odgrywa znamiennej roli w zwalczaniu inwazji *Trichinella spiralis* – blokowanie, czy niedobór IL-5 powodował spadek liczby eozynofilów, natomiast nie wpływał na eliminację *Trichinella spiralis* z organizmu [124]. Opisywano niemniej możliwość zabicia larw *Trichinella spiralis*

*in vitro* przez ziarnistości eozynofiliów [17, 97, 124]. Udział eozynofiliów w eliminacji innych pasożytów został jednak udokumentowany w przypadku: *Brugia* spp., *Nippostrongylus* spp., czy *Litomosoides* spp. [17, 60, 118]. W przypadku *Trichinella spiralis*, jak i innych gatunków nicieni, uważa się, iż eozynofile pełnią funkcję immunomodulatorów, wydzielając cytokiny promujące polaryzację limfocytów T naiwnych w kierunku Th2, oraz biorą udział poprzez sekrecję IL-13 czy IL-10 w przebudowie tkanek i usuwaniu pozostałości w miejscach uszkodzonych w wyniku inwazji [3, 118]. Pewną rolę ochronną przypisuje się tym komórkom podczas wtórnej inwazji *Trichinella spiralis* [14, 17]. Jedną z funkcji eozynofiliów może być prezentacja antygeny – takie właściwości opisywano w przypadku zarażenia *Strongyloides stercoralis* [118].

#### 2.2.4. Komórki tuczne

Komórki tuczne są ważnym elementem odpowiedzi immunologicznej podczas inwazji wieloma gatunkami pasożytów, takich jak: *Trichinella spiralis*, *Schistosoma mansoni*, czy *Heligmoïdes polygyrus* [17]. Spełniają one tak funkcję efektorową, jak i immunomodulującą, a przy zarażeniu *Trichinella spiralis* są kluczowym elementem odpowiedzi żywiciela na inwazję. Wzrost liczby komórek tucznych zlokalizowanych w błonach śluzowych (komórki tuczne błon śluzowych - MMC) jest obserwowany w zarażonych tkankach podczas inwazji nicieniami, a obok eozynofilii i podwyższonego poziomu IgE jest charakterystycznym, związanym z cytokinami Th2 elementem zarażenia [3]. W przypadku inwazji *Trichinella spiralis* opisano niezależny od IgE mechanizm aktywacji komórek tucznych przez antygen TSL-1. Antygen ten inkubowany ze szczurzymi komórkami tucznymi indukował produkcję IL-4 i INF- $\alpha$  [4, 91]. Produkcja IL-4 wskazuje na nieswoisty udział komórek tucznych w polaryzacji odpowiedzi Th2, jak i w usunięciu pasożyta z organizmu żywiciela [142]. Antygen TSL-1 indukował również wyrzut histaminy drogą  $Ca^{2+}$  niezależną, co również wskazuje na mechanizm nieswoisty, niezwiązany z obecnością IgE [5]. Komórki tuczne pełnią znaczącą rolę w usuwaniu dorosłych form *Trichinella spiralis* w przebiegu pierwotnego zarażenia [136, 143]. Mechanizm efektorowy w badaniach przeprowadzonych na myszach wskazuje na bezpośrednią i istotną rolę poziomu proteazy mMCP-1 komórek tucznych jako wskaźnika ich aktywacji i czynnika umożliwiającego usunięcie pasożyta z

organizmu [61]. Wykazano pewną rolę innej mysiej proteazy komórek tucznych - mMCP-6, której to brak wpływał na zmniejszoną rekrutację eozynofików, ale i również ograniczał eliminację larw [119]. Spadek liczby MMC i/lub poziomu mMCP-1 ograniczał wydalanie *Trichinella spiralis* z zarażonego organizmu [61, 71, 85]. MMC pełnią również funkcję regulującą, będąc we wczesnej fazie inwazji źródłem cytokin wspomagających polaryzację odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th2 [17, 91].

### **2.2.5. Bazofile**

Podwyższony poziom bazofików we krwi obwodowej w przeciwieństwie do eozynofików nie jest charakterystyczny u pacjentów zarażonych nicieniami, niemniej często występuje u zwierząt [90]. Bazofile posiadają na swojej powierzchni receptor FcεR1 o silnym powinowactwie do IgE i mogą w sposób zależny, jak i niezależny od IgE produkować cytokiny ściśle związane z odpowiedzią Th2: IL-4 czy IL-13 [17, 56, 89, 133], niemniej aktywacja tego szlaku nie wymaga IL-4 produkowanej przez te komórki [96]. Wzrost liczby bazofików związany jest natomiast z poziomem cytokin produkowanych przez limfocyty CD4+, takich jak IL-3 czy IL-18 [17, 56, 89, 133]. Wskazuje to na funkcję pomocniczą tych komórek podczas zarażeń helmintami w polaryzacji odpowiedzi Th2– ich nieobecność prowadzi do zahamowania rekrutacji komórek zapalnych w miejscu inwazji [96].

### **2.2.6. Neutrofile**

Dominującą funkcją neutrofilów jest fagocytoza mikroorganizmów, dlatego też ich rola w odpowiedzi na inwazję pasożytów wielokomórkowych wydaje się znikoma. Ziarnistości neutrofilów zawierające m.in. lizozym, defensyny, katepsyny czy mieloperoksydazę biorą udział w fagocytozie wewnątrzkomórkowej, a zabijanie pozakomórkowe jest zależne od nadtlenu wodoru [39, 80]. Opisano pojedyncze przypadki ochronnej roli neutrofilów w pierwotnej, czy wtórnej inwazji niektórych gatunków helmintów

[12, 100, 117, 135], jak i ich roli immunomodulującej [121, 125]. Co ciekawe, część prac opisująca rolę neutrofilów w indukcji odpowiedzi Th2 podczas zarażeń helmintami dotyczyła współdziałania bakterii w tym mechanizmie [12, 100]. W przypadku *Trichinella spiralis* opisano możliwość wpływu neutrofilów na modulowanie odpowiedzi komórek epitelialnych podczas inwazji [121]. Dużo większe znaczenie w określeniu roli tych komórek w inwazjach helmintami może dać odpowiedź na fakt produkcji przez wiele gatunków pasożytów czynników wpływających na hamowanie lub aktywację neutrofilów [17].

### 2.2.7. Makrofagi

Makrofagi wraz z neutrofilami są jednymi z pierwszych komórek pojawiających się w miejscu inwazji. Główną rolą klasycznie aktywowanych makrofagów (CAM - classical activation macrophage), ściśle związanych z odpowiedzią Th1 jest działanie bójcze mikroorganizmów połączone z możliwością produkcji NO oraz O<sub>2</sub> [3, 69]. Natomiast w odpowiedzi typu Th2 biorą udział alternatywnie aktywowane makrofagi (AAM - alternative activation macrophage), które nie są zdolne do syntezy NO, ale mogą produkować arginazę-1, TGF-β, IL-10, oraz białka: chitynazy i FIZZ (found in inflammatory zone) zaliczane do jednej rodziny białek, zawierające m.in. RELMα, Ym1 oraz AMCcase (kwaśną chitynazę ssaków) [3, 69, 145]. Nie wykazano bezpośredniego wpływu helmintów na rozwój AAM i uważa się, że są one aktywowane w sposób pośredni przez produkty innych komórek odporności wrodzonej, takich jak komórki tuczne, czy komórki NK. Limfocyty Th2, produkujące głównie IL-21 są niezbędne do uzyskania pełniej aktywności AAM [69, 99, 148].

Obecność tych komórek towarzyszy inwazji różnymi gatunkami helmintów [69], w tym również *Trichinella spiralis*. Przy zarażeniu świnek morskich zaobserwowano we wczesnej fazie inwazji obecność AAM, co wiązało się ze wzmożoną stymulacją syntezy arginazy-1, a nie iNOS [28]. Literatura dotycząca *Trichinella spiralis*, jak i *Schistosoma mansoni* wskazuje, iż główną rolą AAM jest udział w regulowaniu mechanizmów prowadzących do zahamowania odpowiedzi Th1, a promujących odpowiedź Th2 [22, 69, 97, 148]. Opisano udział AAM w mechanizmach ochronnych eliminujących pasożyty przy zarażeniu *Nippostrongylus brasiliensis* [3], a także ich udział w procesie naprawy uszkodzonych tkanek [83, 115].

### 2.2.8. Pozostałe elementy odpowiedzi wrodzonej

Pewną rolę w odpowiedzi na zarażenia helmintami przypisuje się jelitowym komórkom nabłonkowym - IECs (intestinal epithelial cells) [3, 84, 113, 147]. Spełniają one funkcję bariery anatomicznej, oraz są miejscem produkcji substancji immunomodulujących takich jak TSLP, IL-25, IL-33 [114, 147]. TSLP jest cytokiną homologiczną z IL-7 [147], wiążącą się z receptorami o wysokim powinowactwie do niej (TSLPR), które są obecne na powierzchni limfocytów T, B, komórek tłuszczowych, czy komórek dendrytycznych [127, 147]. Wzmoczona produkcja TSLP, IL-25, czy IL-33 w zarażeniu helmintami może wpływać na rozwój odpowiedzi Th2, ale nie jest niezbędna [3, 84, 114]. Wydaje się, że dużo istotniejszą funkcją TSLP jest blokowanie produkcji IL-12 przez komórki dendrytyczne i hamowanie dzięki temu odpowiedzi Th1 [3, 84, 127]. Opisano również komórki NK rezydujące pomiędzy komórkami epitelialnymi jelit, które w przypadku inwazji *Trichinella spiralis* są zdolne do produkcji IL-13 we wczesnej fazie inwazji, która może być odpowiedzialna za aktywację AAM [86, 148].

IL-25 i IL-33 są niezbędne do aktywacji niedawno opisanych komórek odporności wrodzonej – naturalnych komórek pomocniczych (NHCs), nuocytów, multipotencjalnych komórek progenitorowych typu 2 (MPP type 2), którym to przypisuje się ważną rolę w inicjowaniu i rozwoju odpowiedzi Th2 [113]. Populacje te są aktywowane przez wyżej wymienione interleukiny i w wyniku tego same stają się źródłem IL-4, IL-5 i IL-13 we wczesnych stadiach inwazji [113]. W przypadku *Trichuris muris* i *Nippostrongylus brasiliensis* opisywano podwyższony poziom wyżej wymienionych cytokin Th2, oraz inny mechanizm obrony, którym jest wzrost wydzielania śluzu przez komórki kubkowe nabłonka jelit (goblet cell mucin), co wiązało się ze spadkiem liczby pasożytów [113]. Wydaje się, iż komórki te we wczesnych stadiach inwazji mogą być istotnym źródłem cytokin Th2.

## 2.2.9. Komórki dendrytyczne

Opisane powyżej wrodzone mechanizmy odpowiedzi immunologicznej spełniają ważne funkcje ochronne jak i immunomodulujące, warunkując odpowiedź Th2 w wyniku zarażenia helmintami. Niemniej główna rola determinująca konkretny typ odpowiedzi swoistej, czyli Th1 lub Th2 przypada komórkom dendrytycznym, które nie tylko prezentują antygeny, ale i dostarczają sygnałów wpływających na polaryzację. Komórki te zlokalizowane są w tkankach obwodowych, a po aktywacji wędrują do węzłów chłonnych, gdzie stymulują limfocyty T naiwne prezentując antygen, jak i przesyłając sygnały decydujące o polaryzacji w kierunku Th1, Th2 czy Treg. Tylko komórki dendrytyczne są w stanie aktywować naiwne limfocyty T [55]. Mają one na swojej powierzchni szereg receptorów, z których najistotniejszymi są receptory: TLR, receptory dla mannozy (MR), receptory dla lektyny typu C (CLR). Znajdują się tam również antygeny zgodności tkankowej (MHC klasy I i II) i cząsteczki kostymulujące (CD40, CD80, CD86), które mogą reagować zarówno z antygenami samych nicieni, jak i ich produktami enzymatycznymi [110, 128, 148].

Uważa się, że sygnały determinujące typ Th1, Th2, czy Treg zależą od stopnia dojrzałości komórek dendrytycznych, który przejawia się ekspresją cząsteczek na ich powierzchni. Komórki charakteryzujące się wysoką ekspresją MHC i cząsteczek kostymulujących uważane są za w pełni dojrzałe i indukują odpowiedź Th1 [47, 70, 110]. Komórki dendrytyczne podczas inwazji helmintów mają status niedojrzałych, co przejawia się brakiem wzmożonej ekspresji części molekuł na ich powierzchni. Takie mechanizmy zaobserwowano przy inwazjach *Schistosoma mansoni*, *Nippostrongylus brasiliensis*, czy też *Trichinella spiralis* [47, 110, 148], chociaż w przypadku zarażenia *T. spiralis* są doniesienia, które tego nie potwierdzają [70]. Rozwój odpowiedzi Th2 w przypadku inwazji nicieniami wydaje się najbardziej zdeterminowany przez mechanizmy tłumiące rozwój odpowiedzi Th1 [31]. Kluczową rolę odgrywa blokowanie produkcji IL-12 i wzrost ekspresji IL-10 [31, 47, 148]. Inwazje nicieniami mogą też polaryzować odpowiedź nabytą w kierunku tolerancji, czyli szlaku Treg. Równowaga pomiędzy odpowiedzią Th1/ Treg definiuje szanse przeżycia żywiciela i pasożyta, przewaga odpowiedzi Th2 wiąże się ze wzmożonym stanem zapalnym, natomiast przewaga Treg hamuje usuwanie nicieni [31]. Wzajemna równowaga odpowiedzi swoistych zależna jest z jednej strony od blokowania IL-12, z drugiej natomiast od wpływu produktów innych komórek układu immunologicznego produkowanych w przypadku inwazji helmintami. TSLP, IL-33 komórek epitelialnych, czy IL-4 bazofilów wpływają na polaryzację



szlaku Th2, natomiast IL-10 i TGF- $\beta$  pochodzące z neutrofilów, AAM i limfocytów B warunkują dojrzewanie limfocytów w kierunku Treg [31, 74, 97].

### 2.2.10. Mechanizmy odpowiedzi swoistej

Prezentacja antygeny przez komórki dendrytyczne i związane z tym mechanizmy warunkują typ odpowiedzi swoistej. W trakcie inwazji nicieniami następuje wzmożona proliferacja limfocytów T CD4+, które produkują odpowiednie cytokiny. Autokrynną ekspresja IL-4 (wraz z IL-2) warunkowana przez limfocyty T CD4+ w zupełności wystarcza do zapewnienia różnicowania i proliferacji limfocytów Th2 [3, 97]. Opisywana wcześniej możliwość nieswoistej produkcji IL-4 przez komórki odporności wrodzonej spełnia funkcję pomocniczą. Inne cytokiny, których wzmożona produkcja ma miejsce podczas inwazji helmintami to: IL-5, IL-9, IL-13, IL-21 i IL-33 [3, 97]. W inwazjach nicieniami, w tym również *Trichinella spiralis*, kluczową rolę odgrywają IL-4 i IL-13 – ich brak powoduje znaczące zmniejszenie wydalania nicieni [3, 33, 116]. Charakteryzują się one podobieństwem funkcjonalnym i obie wiążą się poprzez receptor IL-4R, który jest heterodimerem składającym się z IL-4R $\alpha$  oraz IL-13R $\alpha$ 1 (typ II IL-4R) [3]. Ulega on ekspresji na komórkach pochodzących ze szpiku kostnego z wyjątkiem limfocytów T [3]–limfocytach B, makrofagach, granulocytach czy komórkach tucznych, oraz komórkach nie pochodzących ze szpiku, jak np.: komórki epitelialne, fibroblasty, czy komórki endotelialne. Na limfocytach T oraz wcześniej wymienionych komórkach wywodzących się ze szpiku obecny jest IL-4R - receptor typu I wiążący tylko IL-4 [3]. Oba typy receptorów mogą przesyłać sygnał poprzez czynnik transkrypcyjny 6 (STAT6) generując odpowiedź Th2 [33]. IL-4R $\alpha$  i STAT6 są niezbędne do usunięcia dorosłych postaci *Trichinella spiralis* i ograniczenia rozwoju larw w mięśniach [33, 129].

Obie interleukiny wpływają na odpowiedź immunologiczną w wyniku inwazji nicieniami działając na dwie grupy komórek. Pierwsza duża grupa obejmuje komórki pochodzące ze szpiku kostnego - limfocyty B, komórki tuczne czy bazofile. Interleukiny te wpływają na nie, aktywując wzmożoną proliferację, a w przypadku komórek tucznych i bazofilów na zwiększanie czułości dla mediatorów pochodzących z tych komórek [3, 33]. Natomiast druga grupa to komórki nie pochodzące ze szpiku kostnego, głównie komórki epitelialne nabłonka jelit [3, 33].

IL-4 i IL-13 wpływają na limfocyty B, stymulują zmianę klas immunoglobulin i wzmożoną produkcję IgE [3]. IgE wiążąc się poprzez receptor o wysokim powinowactwie dla fragmentu Fc- FcεR1 uruchamia między innymi degranulację ziarnistości komórek tucznych, które jak wspomniano wcześniej są istotnym mechanizmem efektorowym w inwazji *Trichinella spiralis* [33, 61, 85, 116].

Limfocyty B nie są niezbędne do efektywnego usuwania *Trichinella spiralis* - myszy z deficytem tych komórek sprawnie usuwały pasożyty [3]. Z drugiej strony pojawiły się doniesienia o wpływie limfocytów B na odpowiedź Th2 niezależnie od produkcji przeciwciał [104, 132]. Subpopulacja limfocytów B określana jako B1 nie jest zależna od limfocytów pomocniczych, produkuje mało specyficzne przeciwciała niewiążące się z pasożytami, oraz może być źródłem IL-10 [145].

Wpływ IL-4 i IL-13 na komórki epitelialne nabłonka przejawia się wzmożoną produkcją śluzu oraz wzrostem przepuszczalności nabłonka jelit tworząc środowisko ułatwiające usunięcie dorosłych form nicieni z organizmu żywiciela [3, 97].

Obecność IL-4, IL-13, receptora IL-4R i drogi przesyłania sygnału poprzez STAT6 są niezbędne do kreowania odpowiedzi Th2 w reakcji na inwazję *Trichinella spiralis* [33, 116], aczkolwiek znaczenie wyżej wymienionych składowych na poszczególnych etapach odpowiedzi nie jest jednoznacznie określone [87, 116]. Część autorów zwraca uwagę na możliwość wpływu genotypu zwierząt doświadczalnych jako istotnej składowej rozwoju odpowiedzi immunologicznej żywiciela na inwazję [116]. Wydaje się, że pozostałe cytokiny Th2- zależne w mechanizmach odpowiedzi swoistej spełniają rolę wspomagającą, gdyż ich niedobory nie wpływały na usuwanie nicieni [3, 97]. Pozostałe cytokiny Th2 uczestniczą również w mechanizmach rozwoju tego szlaku odpowiedzi swoistej. Jednakże podczas inwazji *Trichinella spiralis* spełniają w mechanizmach obronnych rolę uzupełniającą w stosunku do IL-4 i IL-13 [3, 97]. Niedobory IL-5 i IL-9 nie miały kluczowego znaczenia dla efektywnego usuwania nicieni [59, 124].

Zarażenia *Trichinella britovi* u ludzi opisywane są sporadycznie [1, 36, 107]. Gatunek ten wywołuje typowe objawy włośnicy, natomiast sam przebieg choroby jest łagodniejszy niż przy zarażeniach *Trichinella spiralis* [107]. Oba gatunki wywołują podobną odpowiedź immunologiczną organizmu żywiciela, czyli możliwość aktywacji szlaku Th2 [26]. Zarażenie *Trichinella spiralis* indukuje jednak szybszą i silniejszą odpowiedź, niż ta wywołana przez

*Trichinella britovi* [15, 26, 40]. Charakteryzuje się ona silniejszą odpowiedzią układu immunologicznego w fazie jelitowej, która przekłada się na eliminację form dorosłych pasożyta ze światła jelita, oraz wyższym poziomem specyficznej IgG, który może być wykrywany nawet 3 lata po inwazji [27, 107]. Wysoki poziom specyficznej IgG utrzymuje się również w czasie zarażenia *Trichinella britovi* [54]. Odpowiada on stałej stymulacji systemu immunologicznego przez larwy osadzone w mięśniach [26]. *Trichinella spiralis* jest nie tylko gatunkiem bardziej immunogennym niż *Trichinella britovi*, ale opisywany jest jako najbardziej immunogeny ze wszystkich gatunków *Trichinella* [54, 79]. Wysoka rozrodczość samic *Trichinella spiralis* skutkuje dużą liczebnością form larwalnych w mięśniach wśród wszystkich gatunków *Trichinella* spp. [26, 40, 54, 107]. Najistotniejsze różnice w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej występują pomiędzy gatunkami, których larwy w mięśniach wytwarzają otoczkę kolagenową, np. *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi*, a tymi, których larwy są nieotorbione, np. *Trichinella pseudospiralis* [15, 26].

Podczas inwazji nicieniami końcowym etapem swoistej odpowiedzi immunologicznej jest produkcja przeciwciał. W przypadku zarażenia *Trichinella* spp. w organizmie żywiciela pojawiają się przeciwciała klasy IgA, IgE, IgG i IgM [27, 65]. Kolejność, jak i kinetyka ich produkcji nie jest jednakowa i uważa się, że zależy ona od: intensywności inwazji, gatunku włośnia, okresu, który upłynął od zarażenia i od stopnia odpowiedzi immunologicznej, jak i ewentualnego podania leku [62]. Zazwyczaj jako pierwsze pojawiają się przeciwciała klasy IgM i są wykrywalne 10.-15. dnia po zarażeniu [65]. Niskie dawki larw *Trichinella britovi* i *Trichinella spiralis* nie indukują wzrostu poziomu specyficznej IgM [27]. Również we wczesnej fazie zarażenia następuje wzrost poziomu IgA, z maksimum około 20. dnia po zarażeniu. Część autorów wiąże podwyższony poziom IgA z fazą jelitową zarażenia [27, 65]. Kinetyka IgA charakteryzuje się wolniejszym wzrostem poziomu w surowicy niż IgM i IgG [65]. Jednak najbardziej charakterystycznym obrazem włośnicy we wczesnym stadium inwazji jest bardzo gwałtowny wzrost poziomu IgE, który u zwierząt doświadczalnych może osiągnąć wartości stukrotnie wyższe od fizjologicznych [136]. Podwyższony poziom specyficznej IgE stwierdza się u większości zarażonych pacjentów, ale tylko u ok.10% utrzymuje się on powyżej trzech tygodni (ponad 1 rok) [136]. Wzrostowi poziomu IgE towarzyszy eozynofilia oraz mastocytoza [44]. Uważa się, że u ludzi wzrost i utrzymywanie się wysokiego poziomu IgE koreluje z niektórymi objawami włośnicy, jak i świadczy o ciężkości choroby, niemniej znaczenie tej immunoglobuliny w odporności przeciw

*Trichinella* spp. nie jest do końca wyjaśnione [136]. Podobną kinetykę produkcji specyficznej IgE zaobserwowano u *Trichinella spiralis* i *Trichinella britovi* [136].

Antygeny *Trichinella* spp. są wykrywalne już od 5. dnia inwazji, czemu nie towarzyszy jeszcze wykrywalność specyficznych przeciwciał [65]. Wraz z rozpoczęciem wędrówki NBL do tkanki mięśniowej obserwowany jest podwyższony poziom specyficznej IgG, którego maksimum przypada na 60. dzień po zarażeniu. W badaniach na modelu zwierzęcym zaobserwowano wzrost poziomu dwóch izotypów IgG: znacząco wyższego IgG1 związanego z odpowiedzią Th2 i IgG2 związanego z odpowiedzią Th1 [65]. Podwyższony poziom specyficznych przeciwciał w zarażeniu *Trichinella* spp. obserwowany jest przez długi okres czasu, nawet do 3 lat po zarażeniu [40]. Długotrwała obecność swoistych przeciwciał związana jest z antygenami ES oraz z produktami powstałymi w wyniku niszczenia larw przez komórki układu immunologicznego [65].

## 2.3. Apoptoza

Programowana śmierć komórki – apoptoza (z greckiego: *apoptosis*) jest istotnym mechanizmem warunkującym prawidłowe funkcjonowanie organizmu. Wraz z procesami namnażania i dojrzewania komórek zapewnia kontrolę nad prawidłową ich liczbą w organizmie. Apoptoza jest obok martwicy (nekrozy) sposobem eliminacji zarażonych, zarażonych czy uszkodzonych komórek z ustroju. Inne opisywane rodzaje śmierci komórek to: katastrofa mitotyczna, autofagia i starzenie się [122].

Nekroza jest procesem biernym i patologicznym. W komórkach ginących tą drogą następuje spadek poziomu ATP, wzrost poziomu  $Ca^{+2}$  w cytozolu, co prowadzi do dezintegracji organelli komórkowych [122]. Błona komórkowa ulega rozerwaniu, komórka rozpada się uwalniając swoją zawartość do przestrzeni międzykomórkowej, a jej struktury powodują powstanie odczynu zapalnego, który nie występuje podczas apoptozy.

Apoptoza to proces dezintegracji komórki podlegający regulacji i charakteryzujący się określonymi zmianami morfologicznymi i biochemicznymi [23]. W dużym uproszczeniu polega on na uruchomieniu kaskady swoistych reakcji biochemicznych, prowadzących do kondensacji chromatyny jądrowej i cytoplazmy, aktywacji endonukleaz komórkowych, czego konsekwencją jest fragmentacja DNA [66]. W procesach programowanej śmierci komórki nie dochodzi do uszkodzeń błony komórkowej, uwolnienia do otoczenia zawartości komórek, wobec czego nie dochodzi do reakcji zapalnej [78]. Ciałka apoptotyczne, które powstają podczas tego procesu są rozpoznawane m.in. przez makrofagi i fagocytowane [66]. Apoptoza jest procesem wieloetapowym. Na poziomie pierwszego etapu podejmowana jest decyzja o śmierci komórki pod wpływem zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych czynników [23, 66], do których należą między innymi: czynnik martwicy nowotworów (TNF - tumor necrosis factor), białko p53, promieniowanie jonizujące, transformujący czynnik wzrostu TGF- $\beta$  (transforming growth factor) [23]. Sygnały pobudzające komórki do apoptozy związane są z indukcją białek z rodziny Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma-2) i interakcją receptor błonowy Fas - ligand Fas [66].

Kolejny etap to aktywacja wewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych – kaspaz (caspases – cysteine aspartic acid specific enzymem). Są to enzymy rozszczepiające polipeptydy po reszcie kwasu asparaginowego. Występują one w cytoplazmie w postaci proenzymów – prokaspaz, które po aktywacji kaskadowo degradują białka strukturalne i

enzymatyczne [23]. Kaspazy dzieli się na inicjujące apoptozę: kaspazy 2, 8, 9 i 10 oraz kaspazy efektorowe: 3, 6 i 7 [23, 144].

Znane są dwie główne drogi aktywacji procesu apoptozy – zewnętrzna i wewnętrzna [49, 141, 144].

### **2.3.1. Szlak zewnętrzny indukcji apoptozy**

Pobudzenie receptora śmierci znajdującego się na błonie komórkowej uruchamia zewnętrzny (extrinsic) szlak apoptozy. Jest on indukowany poprzez cytokiny, do których należą: TNF- $\alpha$ , Fas ligand (FasL/CD95/Apo-1), TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) [39, 144] i każda z nich łączy się z odpowiednim dla siebie receptorem śmierci na powierzchni komórki. Receptory te należą do nadrodziny receptorów dla TNF (TNFR - tumor necrosis factor receptor) i są to odpowiednio: dla TNF- $\alpha$  jest to TNFR, dla FasL jest to Fas, a dla TRAIL jest to TRAILR (TRAIL receptor) [48, 68]. Interakcja pomiędzy receptorami błonowymi a ligandami doprowadza do zmiany konfiguracji wewnątrzplazmatycznych domen, tzw. domen śmierci (DD- death domain) [48, 122]. Dalsze przekazanie sygnału śmierci wymaga przyłączenia białka adaptorowego FADD (Fas-associated death domain). Sygnał śmierci przekazywany przez receptory TNFR i TRAILR wymaga dodatkowo cząsteczki TRADD [48]. Białka te poprzez swoją domenę efektorową apoptozy DED (death effector domain) wiążą się z odcinkiem DED prokaspazy 8 lub 10 tworząc pobłonowy kompleks DISC (death-inducing signaling complex) [2, 68, 122]. Czynne kaspazy aktywują się wzajemnie na zasadzie kaskady enzymatycznej. Inicjująca kaspaza 8 aktywuje prokaspazy: 3, 6 i 7 [49, 68, 141].

W przypadku indukcji receptora TNF, a braku czynników proapoptotycznych może zostać uruchomiony proces, który powoduje zablokowanie sygnału śmierci [144]. Odbywa się to poprzez stworzenie kompleksu podbłonowego zawierającego TRADD, TRAF2 (TNF receptor associated factor 2) i cząsteczkę RIP1 (receptor interacting protein 1) [48, 141, 144]. Sygnał z tego kompleksu aktywuje NF $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B) będący kluczowym czynnikiem indukcji syntezy licznych przeciwzapalnych i antyapoptotycznych białek [144].

Komórki, które ulegają apoptozie poprzez aktywację wyżej opisanego szlaku zewnętrznego określane są jako komórki typu I. Natomiast komórki typu II nie są wrażliwe na

indukcję śmierci poprzez receptory błonowe i wymagają uruchomienia szlaku wewnętrznego [144].

### **2.3.2. Szlak wewnętrzny indukcji apoptozy**

Drugą możliwą drogą programowanej śmierci komórki jest szlak wewnętrzny (intrinsic) – mitochondrialny [49, 68, 77, 144]. Sygnały w szlaku indukcji wewnętrznej powodują zaburzenia potencjału błonowego mitochondriów, zaburzenia integralności błony mitochondrium i prowadzą do otwierania kanałów w mitochondrium- MPTP (mitochondrial permability transition pore). Wpływająca kanałami woda powoduje pęcznienie macierzy, a skutkiem przerwania błony zewnętrznej jest przedostanie się cytochromu c do cytoplazmy. Związek ten łączy się z cytoplazmatycznym czynnikiem Apaf1 (apoptosis protease activating factor 1), który dzięki obecności domeny CARD (caspase recruitment domain) wiąże się z prokaspazą 9. Powstaje struktura zwana apoptosomem [49, 68, 77, 144]. Apoptosom uruchamia kaspazę 9, której aktywna forma stymuluje kaspazy wykonawcze, w tym kaspazę 3 [68].

Permeabilizacja błony mitochondrium powoduje uwolnienie do cytoplazmy szeregu innych czynników, które uczestniczą w procesie apoptozy. Należą do nich m.in. flawoproteina AIF (apoptosis inducing factor) i endonukleaza G, które pod wpływem czynników indukujących apoptozę przemieszczają się do jądra komórkowego, powodując fragmentację DNA i kondensację chromatyny jądrowej [77, 93, 122]. AIF został opisany jako pierwsze białko regulujące apoptozę na drodze niezależnej od kaskady kaspaz [93].

Inne białka proapoptotyczne to: Smac/DIABLO (second mitochondria derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low PI) i Omi/HtrA2, którym przypisywana jest rola hamowania działania inhibitorów kaspaz [49, 77].

Najlepiej poznanymi inhibitorami kaspaz są białka należące do grupy białek IAP (inhibitor of apoptosis protein) (np. XIAP, c-IAP-1, c-IAP-2, NAIP), które charakteryzują się obecnością od jednej do trzech domen BIR (Baclovirus IAP Repeat) [77, 144]. Mechanizm hamujący apoptozę polega na blokowaniu kaspaz: 3, 7 i 9 [144] poprzez wiązanie się z domenami BIR. Drugim mechanizmem jest pośredniczenie w degradacji kaspaz [77].

Jeśli sygnał aktywujący programowaną śmierć komórki poprzez związanie się z receptorami powierzchniowymi jest zbyt słaby, możliwe jest uzyskanie jego wzmocnienia poprzez połączenie szlaku zewnętrznego i wewnętrznego. Mechanizm ten polega na proteolizie białka Bid (BH3-interacting domain death agonist) przez kaspazę 8. Otrzymane w rezultacie białko tBid (truncated Bid) wiąże się z białkiem Bax (Bcl-2 associated x protein), które po przyłączeniu się do błony mitochondrium prowadzi do uwolnienia cytochromu c do cytoplazmy i aktywacji kaspazy 9 [49, 68, 77, 144].

### **2.3.3. Szlaki alternatywne indukcji apoptozy**

Oprócz zewnętrznego i wewnętrznego szlaku indukcji apoptozy istnieją drogi alternatywne. Jedną z nich, zwaną szlakiem pseudoreceptorowym, związana jest z produktami limfocytów cytotoksycznych i komórek NK – granzym B i perforyny [49, 134]. Granzym B może bezpośrednio aktywować kaspazę 3 lub białko Bid [49, 134]. Następnym mechanizmem inicjacji programowanej śmierci komórki jest uszkodzenie (poprzez stres) siateczki retikulum endoplazmatycznego - ER (endoplasmic reticulum). Jest to czynnik aktywującym kaspazę 12, która niezależnie od Apaf-1 i apoptosomu może aktywować kaspazę 9 [109]. Opisano również szlak sfingomielonowo-ceramidowy, który wiąże się ze wzrostem stężenia ceramidów w komórce i aktywacją sfingomielinazy [122].

### **2.3.4. Białka regulujące proces apoptozy**

Na poziomie mitochondrium za regulację procesu apoptozy odpowiadają białka należące do rodziny białek regulatorowych Bcl-2 [77]. Wpływają one na przepuszczalność błony mitochondrialnej, czego efektem jest wydzielanie do cytosolu czynników pro- lub antyapoptotycznych (cytochromu c, AIF, białka Smac/DIABLO i Omi/Htr 2). Charakteryzują się one obecnością co najmniej jednej z czterech homologicznych domen BH (Bcl-2 homology domain) (BH1, BH2, BH3 i BH4) i w zależności od liczby i typu tych domen, białka te dzielone są na pro- i antyapoptotyczne [94]. Domeny te dodatkowo umożliwiają interakcje pomiędzy członkami tej rodziny białek [150]. Do białek antyapoptotycznych



zalicza się: Bcl-2, Bcl-XL (Bcl-2 related gene, long form), Bcl-w (Bcl-2 widely expressed), Mcl-1 (Myeloid cell leukemia-1) i A1/Bfl-1.

Druga grupa to białka proapoptotyczne: Bax, Bak (Bcl-2 antagonist/killer 1), Bok/Mtd (Bcl-2-related ovarian killer/ Spanish: Matador- the killer) i Bcl-XS (Bcl-2 related gene, short isoform). Podrodzina białek charakteryzująca się obecnością domeny BH3 (BH3 only) to białka również promujące apoptozę: Bid, Bim/Bod (Bcl-2 interacting mediator of cell death), Bad (Bcl-2 antagonist of cell death- equivalent to Bcl-2 associated death promoter), MAP-1, Bmf (Bcl-2 modifying factor), Bik/Nbk (Bcl-2 interacting killer), Blk, Noxa, Puma/Bbc3 (p53- upregulated modular of apoptosis) [23, 46, 77, 94, 150]. Białka te mogą występować w postaci homo- lub heterodimerów, których równowaga gwarantuje stabilność komórki. Informacja o uruchomieniu apoptozy zależy od przewagi białek proapoptotycznych w komórce. W tym mechanizmie najbardziej istotna wydaje się obecność domeny BH3. Tworzenie heterodimerów, białek pro- i antyapoptotycznych przeciwdziała uruchomieniu procesów prowadzących do programowanej śmierci komórki [46, 66, 94].

Inną możliwością wpływu białek antyapoptotycznych: Bcl-2 i Bcl-XL na zahamowanie apoptozy jest połączenie się tych białek z Apaf-1, co zapobiega powstaniu apoptosomu i aktywacji kaspazy 9 [46, 77].

Nadrzędną rolę w regulacji procesu apoptozy odgrywa gen *p53*. Jest to jeden z najlepiej poznanych genów supresorowych. Produktem ekspresji tego genu jest białko p53, które indukuje proces apoptozy i nasila ekspresję białka proapoptotycznego Bax. Jednocześnie białko to blokuje gen *bcl-2*, co zmniejsza ekspresję białka Bcl-2, stymuluje również ekspresję receptora Fas na błonie komórkowej [66].

Białko p53 może też działać proapoptotycznie na poziomie mitochondrium. Pod wpływem stresu komórkowego przemieszcza się ono do mitochondrium, gdzie bierze udział w permeabilizacji błony komórkowej i wyrzucie cytochromu c poprzez wiązanie się z białkami antyapoptotycznymi Bcl-2 i Bcl-XL [82, 88]. Tym samym hamuje sygnały promujące przeżycie komórki. Niedobór tego białka poprzez defekt na poziomie transkrypcyjnym może doprowadzić do niekontrolowanego rozrostu komórek, co jest charakterystyczne dla nowotworów [30].

### 2.3.5. Ostateczny etap apoptozy

Końcowy etap apoptozy cechuje określona sekwencja zmian biochemicznych i morfologicznych. Komórka na skutek utraty wody kurczy się, cytoplazma ulega kondensacji, chromatyna się zagęszcza, poprzedzając degradację DNA. Kaskada kaspaz aktywuje kompleks DFF (DNA fragmentation factor) [67], który dzieli jądrowe DNA na fragmenty po około 180-200 par zasad [23, 46, 66], doprowadzając do całkowitej dezintegracji komórki. Następnie zanika błona jądrowa, a całe jądro ulega fragmentacji. Pofragmentowane jądro wraz z innymi elementami cytoplazmy jest otaczane błoną cytoplazmatyczną i tak powstałe ciała apoptotyczne ulegają fagocytozie przez makrofagi [23, 66, 120]. Podczas tego procesu dochodzi do wzrostu produkcji przez makrofagi czynników hamujących stan zapalny: prostaglandyny E2 (PGE<sub>2</sub>– prostaglandin E2), TGF- $\beta$ , czynnika PAF (platelet-activating factor) [23]. Wydzielana IL-10 hamuje reakcję zapalną i pobudza limfocyty regulatorowe, dochodzi również do obniżenia sekrecji cytokin prozapalnych: TNF- $\alpha$ , IL-1 i IL-12 [23].

W przypadku inwazji pasożytniczych uważa się, że pasożyty modulują procesy programowanej śmierci komórek żywiciela, dzięki czemu mogą przeżyć, rozmnażać się i rozwijać [49]. Dokładna znajomość tego procesu jest istotna dla zrozumienia strategii przetrwania, modulowania i kontrolowania reakcji żywiciela przez pasożyty [23].

### 3. CEL PRACY

Celem pracy była ocena indukcji apoptozy limfocytów i granulocytów krwi obwodowej człowieka przez larwy *Trichinella spiralis* lub *Trichinella britovi* *in vitro*.

Cel ten obejmował następujące cele szczegółowe:

1. Badanie wpływu liczby larw *Trichinella spiralis* lub *Trichinella britovi* na indukcję apoptozy limfocytów i granulocytów krwi obwodowej *in vitro*.
2. Ocenę wpływu czasu inkubacji larw *Trichinella spiralis* lub *Trichinella britovi* na indukcję apoptozy limfocytów i granulocytów krwi obwodowej *in vitro*.
3. Zależności pomiędzy gatunkiem włośnia a indukcją apoptozy limfocytów i granulocytów krwi obwodowej *in vitro*.
4. Porównanie zdolności utrwalonych i nieutrwalonych larw pasożyta na indukcję apoptozy limfocytów i granulocytów krwi obwodowej *in vitro*.

## 4. MATERIAŁ

Materiał do badań stanowiły leukocyty krwi obwodowej zdrowych dawców i larwy *Trichinella spiralis* i *Trichinella britovi*.

### 4.1. Krew

W badaniu wykorzystano pełną krew (7,5 ml), pobraną do próbek z heparyną litową (Sarstedt Germany). Pochodziła ona od zdrowych dawców- kobiet i mężczyzn w różnym wieku, a została zakupiona w Wojewódzkiej Stacji Krwiodawstwa w Poznaniu.

Zgodę na przeprowadzenie badań wyraziła Komisja Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

### 4.2. Larwy *Trichinella spiralis* i *Trichinella britovi*

Do badań wykorzystano larwy mięśniowe (ML) *Trichinella spiralis* i *Trichinella britovi*, które pozyskiwano od zarażonych samic myszy laboratoryjnych (szcep BALB/c) w Katedrze i Zakładzie Biologii i Parazytologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Wybrane do zarażenia osobniki przetrzymywano w klatkach ze ściółką i poidełkami, w liczbie gwarantującej swobodne poruszanie się. Zarażanie myszy odbywało się według poniższego schematu.

1. Mysz przenoszono do oddzielnego pomieszczenia, a następnie dootrzewnowo podawano ketaminę (Gedeon Richter, Węgry) oraz petydynę (Gedeon Richter, Węgry) i obserwowano zachowanie usypianego zwierzęcia w celu uchwycenia momentu, w którym znajdzie się ono w płytkiej narkozie, by rozpocząć procedurę zarażania.
2. Zwierzę układano na grzbiecie i przy pomocy pęsetki otwierano i unieruchamiano pyszczek i język. Wykalibrowaną strzykawką zakończoną sondą pobierano 0,1 ml wcześniej przygotowanego roztworu z dawką około 400 larw *Trichinella* i podawano doprzętykowo.
3. Po około 60 dniach od zarażenia mysz była usypiana, a po dekapitacji pozbawiona skóry.
4. Proces izolacji larw mięśniowych przebiegał w następujący sposób:

- mechanicznie pobierano fragmenty tkanki mięśniowej, które były dzielone na mniejsze fragmenty, a te następnie rozdrabniane na skrawki wielkości 1-2 mm
- tak uzyskane skrawki wytrawiano w tzw. sztucznym soku żołądkowym, który sporządzony został na bazie stężonego HCl (POCH, Polska) i pepsyny (Zakład Enzymów i Peptonów, Polska) tak, by uzyskać roztwór o stężeniu 1%
- po trawieniu, dekantacji i oczyszczeniu, larwy włośnią liczone i segregowano tak, aby uzyskać założoną w badaniu liczbę larw, które zawieszano w 0,1 ml 0,9% NaCl (Wytwórnia Płynów Infuzyjnych, Polska).

Opisany powyżej sposób jest procedurą zalecaną przez Międzynarodową Komisję Włośnicową [35] i stosowany jest również do uzyskiwania materiału od zwierząt dzikich i hodowlanych.

Wyizolowane świeżo pobrane larwy *Trichinella spiralis* i *Trichinella britovi* przygotowywano do badań w dwóch rodzajach nośnika:

1. w 0,1 ml soli fizjologicznej, po 1, 10 lub 100 sztuk larw

Część próbek zawierających 100 larw zawieszonych w 0,1 ml soli fizjologicznej zamrażano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  do czasu badania (min. 7 dni).

2. w 0,1 ml 96% alkoholu etylowym, po 100 sztuk larw, które przechowywano w temperaturze  $+4^{\circ}\text{C}$  do czasu badania (min. 24h)

Larwy utrwalone w alkoholu i zamrożone, w dniu badania przed dodaniem krwi i pomiarem, rozmrażano, przepłukiwano jednokrotnie 1ml 0,9% NaCl, wirowano 7 minut przy 550g, odciągano nadsącz i zawieszano w 0,1 ml 0,9% NaCl.

Jakiegokolwiek odpady powstałe podczas selekcjonowania gromadzono w workach foliowych, oznaczano i przekazywano firmie utylizującej. Natomiast po zakończeniu badań wszystkie pozostałości przekazywano do spalania.

## 5. METODY

Podstawową metodą wykorzystaną w pracy była inkubacja krwi z larwami *Trichinella spiralis* lub *Trichinella britovi* w określonych przedziałach czasowych i następująca po niej analiza za pomocą cytometrii przepływowej.

### 5.1. Cytometria przepływowa

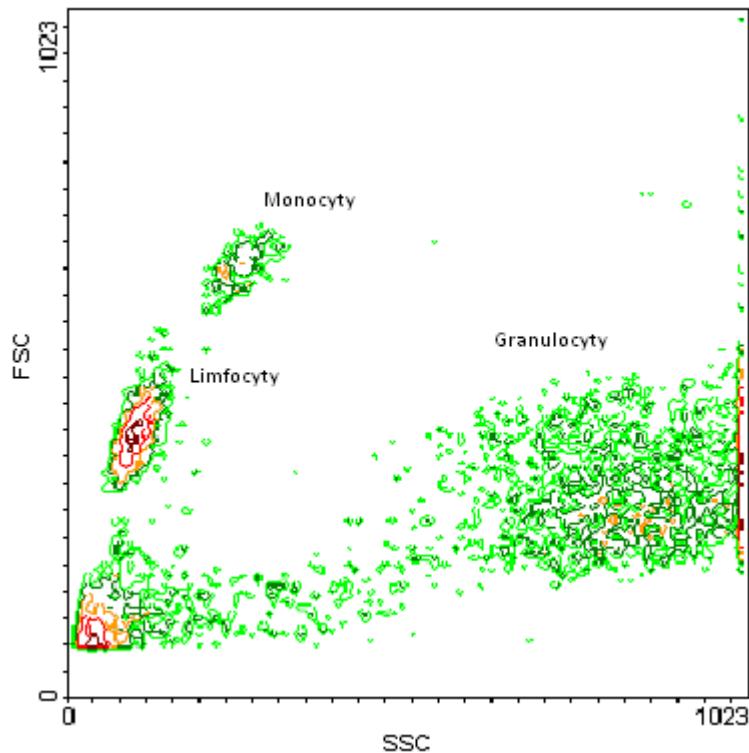
Cytometria przepływowa jest techniką badawczą umożliwiającą pomiar właściwości fizycznych i biologicznych bardzo wielu komórek (do 100000 komórek na sekundę) w momencie ich przepływu przez układ pomiarowy w krótkim czasie [53, 73]. Zaletą cytometrii przepływowej jest zdolność do szybkiego i powtarzalnego pomiaru rozpraszania światła i fluorescencji pojedynczej komórki, co umożliwia oszacowanie heterogenności wymieszanej populacji komórek [20, 29, 53, 72]. Technika ta pozwala jakościowo i ilościowo ocenić stan układu immunologicznego i dostarczyć danych o mechanizmach aktywacji i funkcji komórek układu odpornościowego [51].

Cytometr przepływowy jest aparatem pomiarowym składającym się z trzech głównych układów: układu transportu cieczy i powiązanego z nim układu powietrznego - czyli łącznie hydraulicznego, oraz optycznego i elektronicznego. Układ hydrauliczny dostarcza zawiesinę badanych komórek do komory pomiarowej w sposób laminarny, tak by komórki przepływały pojedynczo przez środek kanału. Dzięki temu na każdą komórkę przepływającą pada prostopadle do kierunku jej przepływu wiązka światła lasera [73]. Na układ optyczny składają się: źródło światła (laser), układ kształtujący i ogniskujący wiązkę laserową oraz filtry.

Parametrami mierzonymi za pomocą cytometrii przepływowej są: natężenie światła rozproszonego na komórce i światła wysyłanego przez wzbudzony fluorochrom. Dwa detektory mierzą światło rozproszone. Pierwszy z nich rejestruje światło rozproszone w kierunku wiązki laserowej - pod niewielkim kątem od 0 do 10°. Wielkość tę oznacza się symbolem FS lub FSC (Forward Scatter). Drugi detektor rejestruje rozproszenie pod kątem 90° i jest oznaczany jako SC lub SSC (Side Scatter) [51, 53, 73, 81].

Wartość FSC jest miarą wielkości komórek, rośnie z jej wzrostem i nie zależy od współczynnika załamania światła cząsteczki i jej kształtu. Natomiast wartość SSC rozdziela

komórki ze względu na ich kształt i wewnętrzną ziarnistość i jest tym wyższa, im więcej ziarnistości zawierają komórki. Analizując komórki w przestrzeni dwuwymiarowej w układzie współrzędnych FSC na SSC można je różnicować ze względu na ich wielkość oraz kształt i wewnętrzną ziarnistość. Wykres powstały z nałożenia tych danych w układzie dwuwymiarowym umożliwia rozróżnienie we krwi obwodowej populacji limfocytów, monocytów i granulocytów (rycina 1) [51, 53].



Rycina 1. Populacja limfocytów, monocytów i granulocytów w obrazie cytometrycznym (cytometr FACScan firmy Becton Dickinson)

W technice cytometrii przepływowej powszechnie wykorzystuje się także zjawisko fluorescencji pewnych związków, którymi znakuje się komórki. Fluorescencja o określonej długości fali pojawia się na skutek powrotu elektronów na pierwotną orbitę [73]. W przypadku cytometrii wzbudzenie atomu lub cząsteczki następuje na skutek pochłonięcia kwantu światła emitowanego przez laser. W większości cytometrów stosowany jest laser argonowy o niskiej mocy, chłodzony powietrzem, o wyznaczonej długości fali emisji 488 nm [20, 81]. Ponieważ atomy lub cząsteczki powracają zazwyczaj do stanu podstawowego poprzez stany pośrednie, część energii wzbudzenia jest tracona w wyniku przejść bezpromienistych, a spektrum emisji jest przesunięte w kierunku fal dłuższych w stosunku do widma absorpcji [73]. Zjawisko fluorescencji przebiega bardzo szybko, widmo fluorescencji

jest szerokie, aby więc umożliwić jednoczesny pomiar dwóch lub trzech parametrów stosuje się filtry przepuszczające tylko pożądane długości fal [53].

Światło o różnych długościach fali rozdzielone za pomocą specjalnych filtrów zostaje skierowane do czujników (detektorów), które są częścią układu elektronicznego. Czujniki te, zwane fotopowielaczami przekształcają falę świetlną w impuls elektryczny, który musi zostać wzmocniony, a następnie zamieniony na postać cyfrową, rejestrowaną przez komputer zewnętrzny, który jest integralną i niezbędną częścią każdego cytometru [51, 53, 73, 81].

System komputerowy wraz z oprogramowaniem umożliwia zbieranie i analizowanie danych. Wyniki pomiarów uzyskane w cytometrze można przedstawić w postaci dokładnych danych o każdej badanej populacji komórek, ale również w postaci wykresów jednowymiarowych (histogram), dwuwymiarowych (kropkowy, gęstości, konturowy), lub trójwymiarowych (perspektywiczny) [73]. Podczas analizy możliwe jest „bramkowanie”, czyli zaznaczanie na wykresie odpowiednich regionów, w których znajdują się badane populacje komórek, oraz ilościowa ocena komórek w danym regionie, czy obliczanie dla nich podstawowych wielkości statystycznych [51].

### **5.1.1. Materiał badawczy w cytometrii przepływowej**

Materiałem do badań cytometrycznych jest zawiesina pojedynczych komórek [20, 58, 73, 81, 130], w związku z czym najdogodniejszym materiałem badawczym u ludzi są komórki krwi lub innych płynów ustrojowych, szpik kostny czy popłuczyny pęcherzykowo-oskrzelikowe [58, 149]. Możliwe jest również wykorzystanie do pomiaru komórek uzyskanych z węzłów chłonnych, czy tkanek litych, np. guzy nowotworowe po ich wcześniejszym rozdrobnieniu [73].

Cytometria przepływowa jest przydatnym narzędziem w bardzo wielu dziedzinach nauki, jednakże najszersze zastosowanie znajduje w diagnostyce klinicznej dotyczącej układu krwiotwórczego [149]. Do powszechnie stosowanych badań należy badanie immunofenotypu komórek limfoidalnych [149], określanie zawartości DNA w komórkach nowotworowych, ocena apoptozy i martwicy komórek [21], czy badanie aktywności neutrofilów.

Coraz bardziej zaawansowana technika optyki, elektroniki, komputerów i oprogramowania czyni z cytometrii przepływowej bardziej kompleksową, ale również łatwiejszą metodę stosowaną w wielu laboratoriach i pracowniach naukowych.



## 5.1.2. Odczynniki

### 1. Płyn lizujący

Płyn lizujący wykorzystywany w badaniach przygotowano samodzielnie. W 1 litrze wody destylowanej rozpuszczono 8,26 g chlorku amonu ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (POCH, Polska), 1,0 g węgla potasu ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) (POCH, Polska) i 0,037 g soli czterosodowej EDTA (Lubelskie Przedsiębiorstwo Produkcyjno-Handlowe OCH, Polska). Roztwór miał pH w granicach 7,2 do 7,4 i był przechowywany w temperaturze  $+4\text{ }^\circ\text{C}$ .

### 2. Zestaw FAM Caspase Activity Kit (MP BIOMEDICALS, LLC) zawierający:

- Propidium Iodide– jodek propidionowy- PI
- FAM-VAD-FMK FLICA Reagent- karboksylfluoresceina sprzężona z syntetycznym inhibitorem kaspaz fluorometyloketonową pochodną kwasu walinoalanoasparginowego
- Wash Buffer- bufor płuczący

## 5.1.3. Procedura badawcza

Oznaczenia wykonywano na pełnej krwi, a materiał przygotowano w następujący sposób:

### 5.1.3.1. Próby badane

1. Do 400  $\mu\text{l}$  krwi pełnej dodawano odpowiednią liczbę pasożytów zawieszonych wcześniej w 0,1 ml soli fizjologicznej (1, 10 lub 100 sztuk larw z gatunku *Trichinella spiralis* lub *Trichinella britovi*).
2. Próbkę inkubowano w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  przez 1, 3 lub 24 godziny.
3. Po zakończeniu inkubacji, pobierano 10  $\mu\text{l}$  krwi i dodawano 2  $\mu\text{l}$  ApoFluor Green.
4. Próbkę inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  w atmosferze 5%  $\text{CO}_2$ , w tym czasie były one delikatnie dwukrotnie mieszane, aby zapewnić równomierną dystrybucję ApoFluor Green między komórkami.
5. Następnie dodawano 0,5 ml płynu płuczącego (wash buffer) do każdej próbki i dokładnie mieszano.
6. Próbkę wirowano przez 7 min przy prędkości 550g, delikatnie usuwano nadsącz i do osadu dodawano 3  $\mu\text{l}$  PI.

7. Po wymieszaniu próby inkubowano 10 minut w ciemności w temperaturze pokojowej.
8. Następnie dodawano 400 µl płynu lizującego i inkubowano przez 15 minut bez dostępu światła w temperaturze pokojowej.
9. Po inkubacji wykonywano pomiary cytometryczne – ich schemat uwzględniający czas inkubacji, sposób utrwalenia i liczbę larw przedstawia tabela 3. Schemat ten dotyczy obydwu badanych gatunków *Trichinella*.

<i>Trichinella spiralis</i> lub <i>Trichinella britovi</i>							
Liczba larw i badane komórki							
L- limfocyty, G- granulocyty							
Czas inkubacji z krwią (h)	Sposób utrwalenia larw	1		10		100	
		L	G	L	G	L	G
1 3 24	Świeżo pobrane żywe	+	+	+	+	+	+
1 3	Zamrożone					+	+
1 3	Alkohol					+	+

Tabela 3. Schemat badania krwi z uwzględnieniem badanych komórek, czasu inkubacji, liczby dodawanych larw obu gatunków włośnia i sposobu utrwalenia pasożyta

Liczbę pomiarów z uwzględnieniem gatunku pasożyta, liczby dodanych larw i sposobu ich utrwalenia, czasu inkubacji i rodzaju badanych komórek przedstawia tabela 4.

Sposób utrwalenia	Liczba pasożytów	Czas inkubacji	Liczba prób			
			<i>T. spiralis</i>		<i>T. britovi</i>	
			Limfocyty	Granulocyty	Limfocyty	Granulocyty
Świeże	0	1h	26	26	8	6
		3h	26	26	8	6
		24h	5	-	5	-
	1	1h	6	5	8	7
		3h	6	5	8	7
		24h	6	-	6	-
	10	1h	6	5	8	7
		3h	6	5	8	7
		24h	5	-	5	-
	100	1h	26	25	8	7
		3h	26	25	8	7
		24h	5	-	5	-
Zamrożone	0	1h	31	26	23	24
		3h	31	26	23	24
	100	1h	35	35	27	27
		3h	35	35	27	27
Alkohol	0	1h	30	33	10	11
		3h	30	33	10	11
	100	1h	34	34	14	14
		3h	34	34	14	14

Tabela 4. Liczba pomiarów z uwzględnieniem gatunku pasożyta, liczby dodanych larw i sposobu ich utrwalenia, czasu inkubacji i rodzaju badanych komórek

### 5.1.3.2. Próby kontrolne

- kontrola (-), która zawierała samą krew (bez larw, PI i ApoFluoru) i jako kontrola wewnętrzna służyła do ustawienia parametrów pomiaru
- kontrola (+), która zawierała krew z PI, ApoFlourem (bez larw) i była kontrolą do badanych prób

Procedura przygotowania do pomiaru próbek kontrolnych była identyczna jak badanych, z pominięciem dodania larw, PI i ApoFluoru w kontroli (-), a w kontroli (+) larw pasożyta.

#### 5.1.4. Pomiar

Pomiary wykonywano na cytometrze FACScan firmy Becton Dickinson (USA), wyposażonym w laser argonowy, emitujący światło o długości fali 488 nm.

##### 5.1.4.1 Barwniki fluorescencyjne

Wykorzystano zestaw ApoFluor Green zawierający:

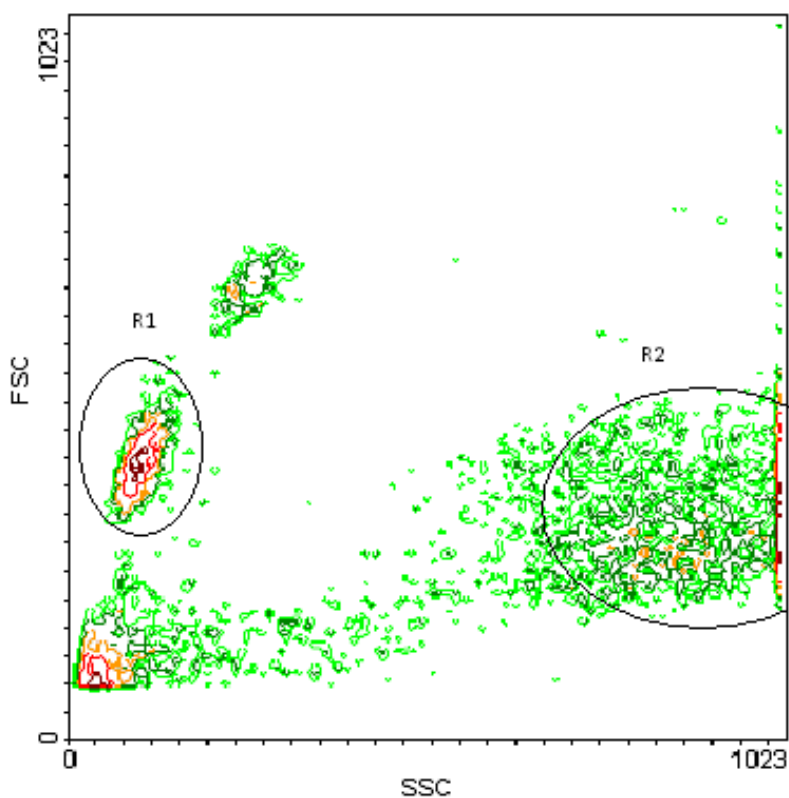
**Jodek propidionowy (PI)**, który jest barwnikiem stechiometrycznie wiążącym się z dwuniciowymi kwasami nukleinowymi. Nie przechodzi on przez błonę komórkową żywych komórek, dzięki temu stosowany w niewielkich stężeniach służy do barwienia przyżyciowego i różnicowania komórek żywych od martwych. Jego maxima absorpcji przypadają na fale o długości 495 i 342nm, a maximum emisji na 635nm [95].

**Karboksyfluoresceina (FAM)** sprzężona z syntetycznym inhibitorem kaspaz VAD-FMK (fluorometyloketonowa pochodna kwasu walinoalanoasparginowego). Inhibitor wnika do komórek i wiąże się bezpośrednio z aktywnymi kaspazami. Ponieważ może uczestniczyć w wiązaniu różnych kaspaz na wielu szlakach ich aktywacji, pozwala ocenić ogólny poziom tych enzymów. Dla karboksyfluoresceiny maximum światła wzbudzenia to 485nm, a maximum emisji przypada na 525nm.

Oba wykorzystane w badaniu fluorochromy wzbudzano światłem lasera argonowego o długości fali 488nm. Pomiaru fluorescencji PI dokonywano w zakresie widma światła czerwonego poniżej 630 nm, natomiast FAM w zakresie widma światła zielonego 515-545 nm [7], stosując logarytmiczne wzmocnienie sygnału.

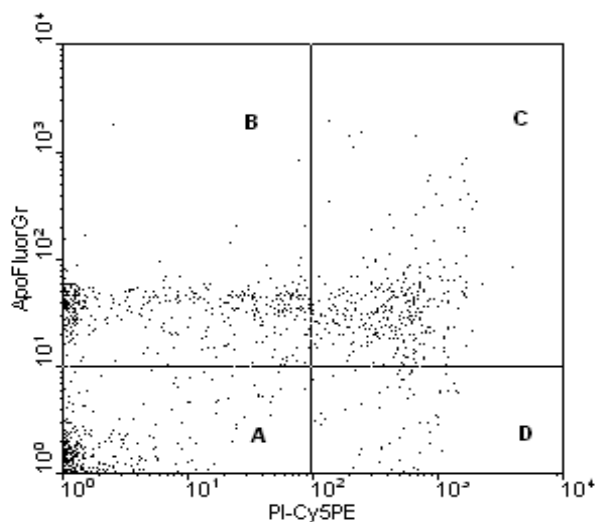
## 5.2. Analiza wyników

W pracy analizowano limfocyty i granulocyty krwi obwodowej *in vitro*. Do wyodrębnienia badanych populacji komórek wykorzystano rozproszenie światła w kierunku biegu promienia lasera (FSC) i światła rozproszonego pod kątem 90° (SSC). Zaznaczenie bramkami uwzględnianych w badaniu komórek przedstawia rycina 2.



Rycina 2. Wyodrębnione bramkami populacje limfocytów (R1) i granulocytów (R2) krwi obwodowej w obrazie uzyskanym podczas badania na cytometrze FACScan firmy Becton Dickinson

Jednoczesne użycie PI i FAM umożliwiło wyodrębnienie i odsetkowe określenie 4 grup komórek, których lokalizację przedstawia rycina 3.



Rycina 3. Obraz z cytometru przepływowego FACScan firmy Becton Dickinson przedstawiający rozdział badanych komórek na: **A.** Komórki żywe - FAM(-)PI(-), **B.** Komórki umierające - FAM(+ )PI(-), **C.** Komórki apoptotyczne - FAM(+ )PI(+), **D.** Komórki nekrotyczne - FAM(-)PI(+)

W pracy analizowano odsetek limfocytów i granulocytów FAM(+)PI(+), opisanych jako **komórki apoptotyczne** [120], z uwzględnieniem przedziałów czasowych, sposobu przechowywania i liczby dodanych larw obu gatunków *Trichinella*. Do tego celu wykorzystano program CellQuest.

Ocenie statystycznej poddano:

**1. odsetek komórek apoptotycznych krwi obwodowej po dodaniu 1, 10 lub 100 świeżo pobranych żywych larw obydwu badanych gatunków *Trichinella***

- limfocyty– po 1, 3 i 24 godzinach inkubacji
- granulocyty– po 1 i 3 godzinach inkubacji

**2. odsetek komórek apoptotycznych krwi obwodowej po dodaniu 100 larw świeżo pobranych żywych, zamrożonych lub utrwalonych w alkoholu obydwu badanych gatunków *Trichinella***

- limfocyty– po 1 i 3 godzinach inkubacji
- granulocyty– po 1 i 3 godzinach inkubacji

**3. analizę pomiędzy gatunkami *Trichinella spiralis* i *Trichinella britovi*, która została wykonana po dodaniu 100 świeżo pobranych żywych larw dla:**

- limfocytów– po 1, 3 i 24 godzinach inkubacji
- granulocytów– po 1 i 3 godzinach inkubacji

Punktem odniesienia były właściwe próby kontrolne, nie zawierające larw pasożytów.

### 5.3. Analiza statystyczna

Pozyskane dane przetworzone zostały w arkusz kalkulacyjny Excel (Microsoft 2008). Analizę statystyczną i ilustrujące ją ryciny wykonano przy użyciu oprogramowania: STATISTICA (v. 9.1. StatSoft, Inc.), StatXact (Cytel Studio v. 8,0, Cytel Inc., Cambridge, MA, USA) oraz GraphPad InStat wersja 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Wyliczono podstawowe statystyki opisowe (średnia, odchylenie standardowe).

Zgodność rozkładu badanych zmiennych w poszczególnych grupach z rozkładem normalnym analizowano przy wykorzystaniu testu normalności Shapiro-Wilka. Do porównania średnich między dwiema grupami zależnymi wykorzystano test t-Studenta (przy niespełnieniu założenia o normalności - stosowano test Wilcoxon). Porównania wielu zależnych grup wykonano za pomocą analizy wariancji ANOVA, w przypadku niespełnienia warunków normalności, czy równości wariancji, stosowano test Friedmana.

W celu porównania dwóch niezależnych grup stosowano test t-Studenta dla zmiennych niepowiązanych. Gdy dane nie spełniały założeń dla zastosowania powyżej wymienionego testu, stosowano test z niezależną estymacją wariancji, tzw. test Cochran-Coxa (niespełnione założenie o równości wariancji) lub test Manna-Whitneya (niespełnione założenie o normalności).

Porównanie wielu niezależnych grup wykonano za pomocą analizy wariancji ANOVA, w przypadku niespełnienia warunków normalności, czy równości wariancji, stosowano test Kruskala-Wallisa. Jako testy post hoc do szczegółowej identyfikacji różniących się statystycznie grup stosowano test Tukeya-Kramera (dla ANOVA) oraz testy wielokrotnych porównań (do testu Kruskala-Wallisa; nieparametryczny).

We wszystkich analizach przyjęto poziom istotności statystycznej  $p < 0,05$ .

## **6. WYNIKI**

Analizie poddano wpływ larw *Trichinella spiralis* lub *Trichinella britovi* na indukcję apoptozy komórek krwi obwodowej z uwzględnieniem liczby dodawanych larw, sposobu ich utrwalenia w określonych przedziałach czasowych.

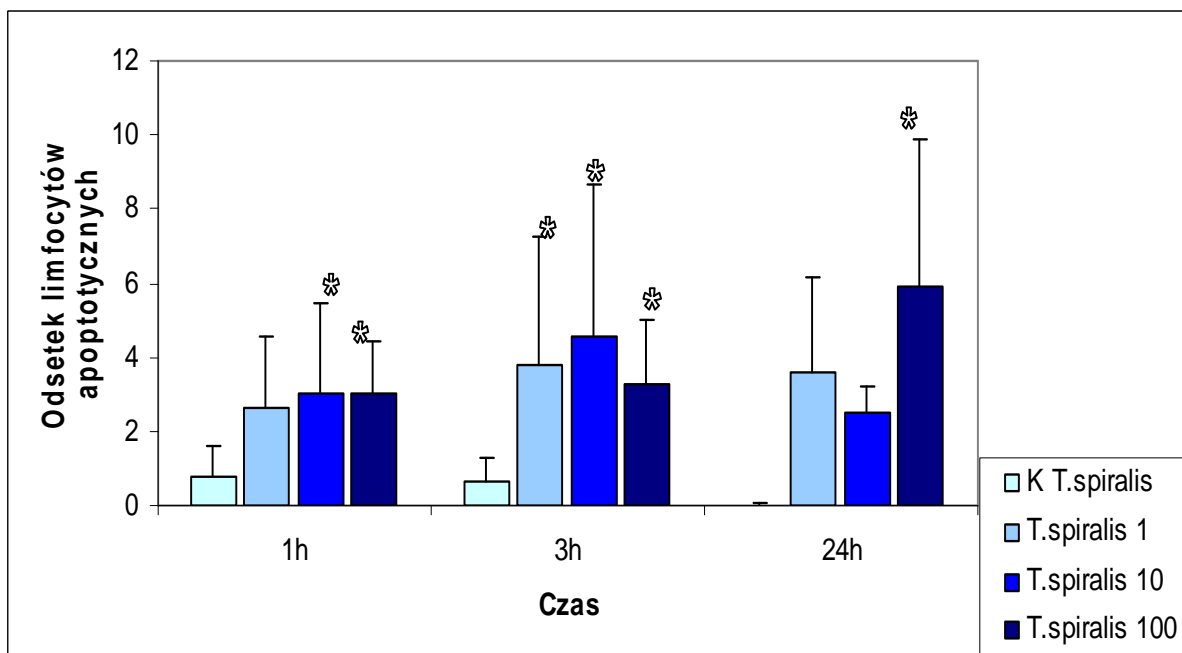
### **6.1. Wpływ liczby dodanych larw (1, 10 lub 100) *Trichinella spiralis* lub *Trichinella britovi* na indukcję apoptozy komórek krwi obwodowej**

#### **6.1.1. Wpływ liczby dodanych larw *Trichinella spiralis* lub *Trichinella britovi* na indukcję apoptozy limfocytów po 1, 3 i 24 godzinach inkubacji z pasożytami**

Dodanie 1, 10 lub 100 świeżo pobranych żywych larw *Trichinella spiralis* lub *Trichinella britovi* do badanej krwi skutkowało wzrostem odsetka limfocytów apoptotycznych w stosunku do właściwych prób kontrolnych.

Nie stwierdzono znamiennej różnicy w odsetku limfocytów apoptotycznych pomiędzy próbami krwi po dodaniu różnej liczby larw *Trichinella spiralis* lub *Trichinella britovi*, ani po różnym czasie inkubacji krwi z larwami pasożytów (rycina 4, 5).

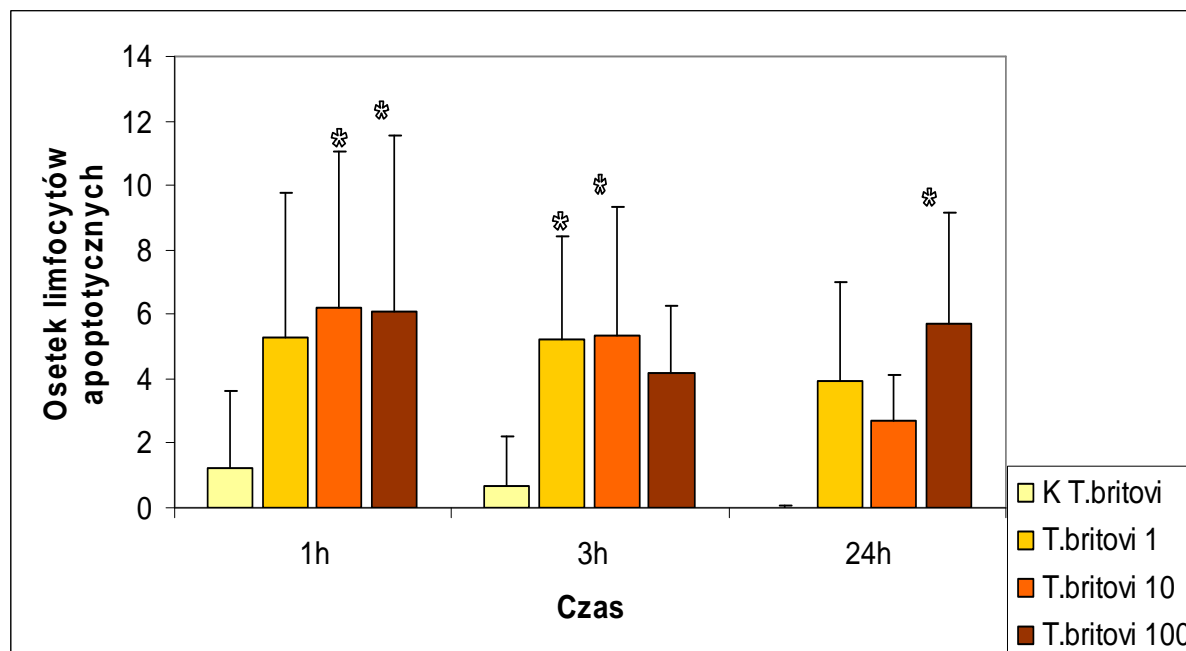




Rycina 4. Wzrost odsetka limfocytów apoptotycznych po różnym okresie inkubacji (h) z 1, 10 lub 100 świeżo pobranymi żywymi larwami *Trichinella spiralis* względem właściwej kontroli (K)

\* zaznaczono istotności pomiędzy liczbą dodanych larw a właściwą grupą kontrolną,  $p < 0,05$

Nie wykazano różnic istotnych statystycznie pomiędzy odsetkami komórek apoptotycznych przy różnej liczbie dodanych larw, ani przy różnym czasie inkubacji



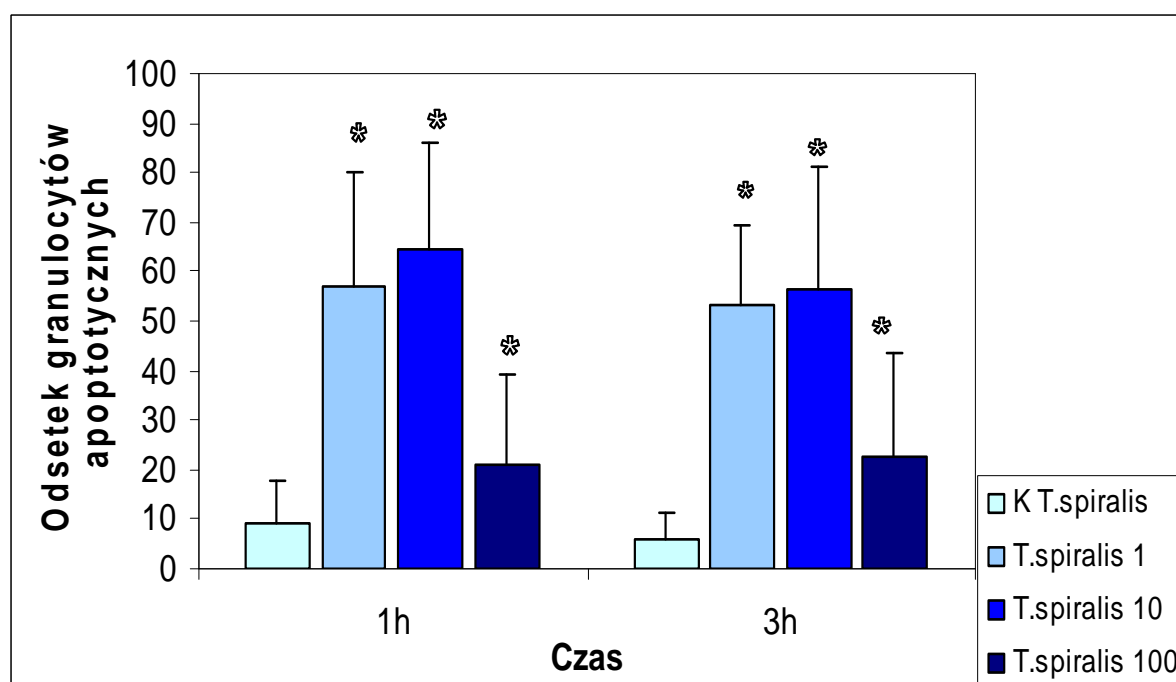
Rycina 5. Wzrost odsetka limfocytów apoptotycznych po różnym okresie inkubacji (h) z 1, 10 lub 100 świeżo pobranymi żywymi larwami *Trichinella britovi* względem właściwej kontroli (K)

\* zaznaczono istotności pomiędzy liczbą dodanych larw a właściwą grupą kontrolną,  $p < 0,05$

Nie wykazano różnic istotnych statystycznie pomiędzy odsetkami komórek apoptotycznych przy różnej liczbie dodanych larw, ani przy różnym czasie inkubacji

### 6.1.2. Wpływ liczby dodanych larw *Trichinella spiralis* lub *Trichinella britovi* na indukcję apoptozy granulocytów po 1 i 3 godzinach inkubacji z pasożytami

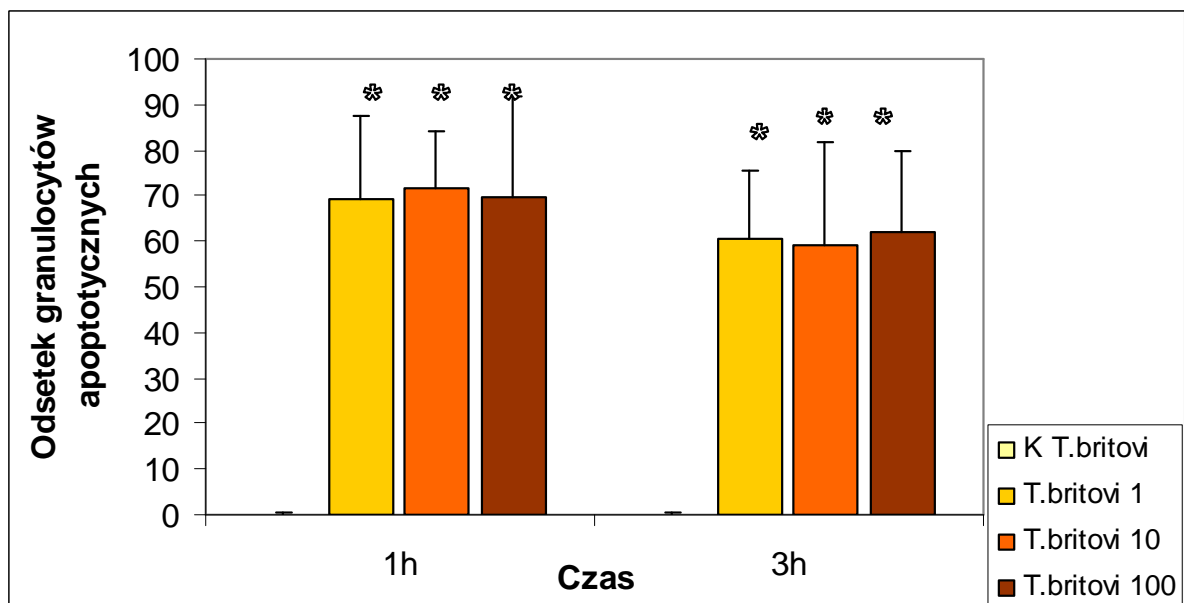
Dodanie 1, 10 lub 100 świeżo pobranych żywych larw *Trichinella spiralis* lub *Trichinella britovi* do badanej krwi skutkowało wzrostem odsetka granulocytów apoptotycznych w stosunku do właściwych prób kontrolnych dla każdej dodanej liczby larw w 1. i 3. godzinie badania. Różnica ta była istotna statystycznie (rycina 6 i 7). Zaobserwowano różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi po dodaniu 1 i 10 w stosunku do 100 dodanych larw w 1. i 3. godzinie badania dla *Trichinella spiralis*, jednakże analiza statystyczna nie wykazała istotności (rycina 6). Nie wykazano również różnic pomiędzy wynikami uzyskanymi w poszczególnych przedziałach czasowych.



Rycina 6. Wzrost odsetka granulocytów apoptotycznych po różnym okresie inkubacji (h) z 1, 10 lub 100 świeżo pobranymi żywymi larwami *Trichinella spiralis* względem kontroli (K)

\* zaznaczono istotności pomiędzy liczbą dodanych larw a właściwą grupą kontrolną,  $p < 0,05$

Nie wykazano różnic istotnych statystycznie pomiędzy odsetkami komórek apoptotycznych przy różnej liczbie dodanych larw, ani przy różnym czasie inkubacji



Rycina 7. Wzrost odsetka granulocytów apoptotycznych po różnym okresie inkubacji (h) z 1, 10 lub 100 świeżo pobranymi żywymi larwami *Trichinella britovi* względem kontroli (K)

\* zaznaczono istotności pomiędzy liczbą dodanych larw a właściwą grupą kontrolną, dla  $p < 0,05$

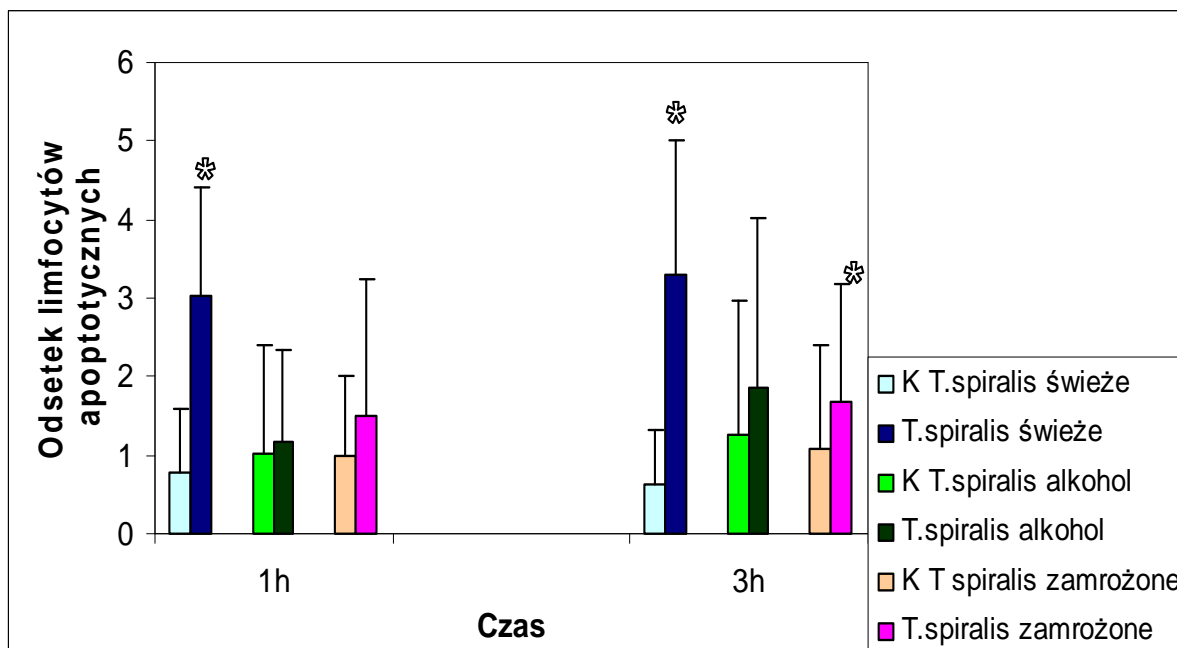
Nie wykazano różnic istotnych statystycznie pomiędzy odsetkami komórek apoptotycznych przy różnej liczbie dodanych larw, ani przy różnym czasie inkubacji

## **6.2. Wpływ dodania 100 świeżo pobranych żywych, zamrożonych lub utrwalonych w alkoholu larw *Trichinella spiralis* lub *Trichinella britovi* na indukcję apoptozy komórek krwi obwodowej**

Badanie to miało na celu ustalenie czy sposób utrwalenia larw pasożyta ma wpływ na indukcję apoptozy komórek krwi obwodowej.

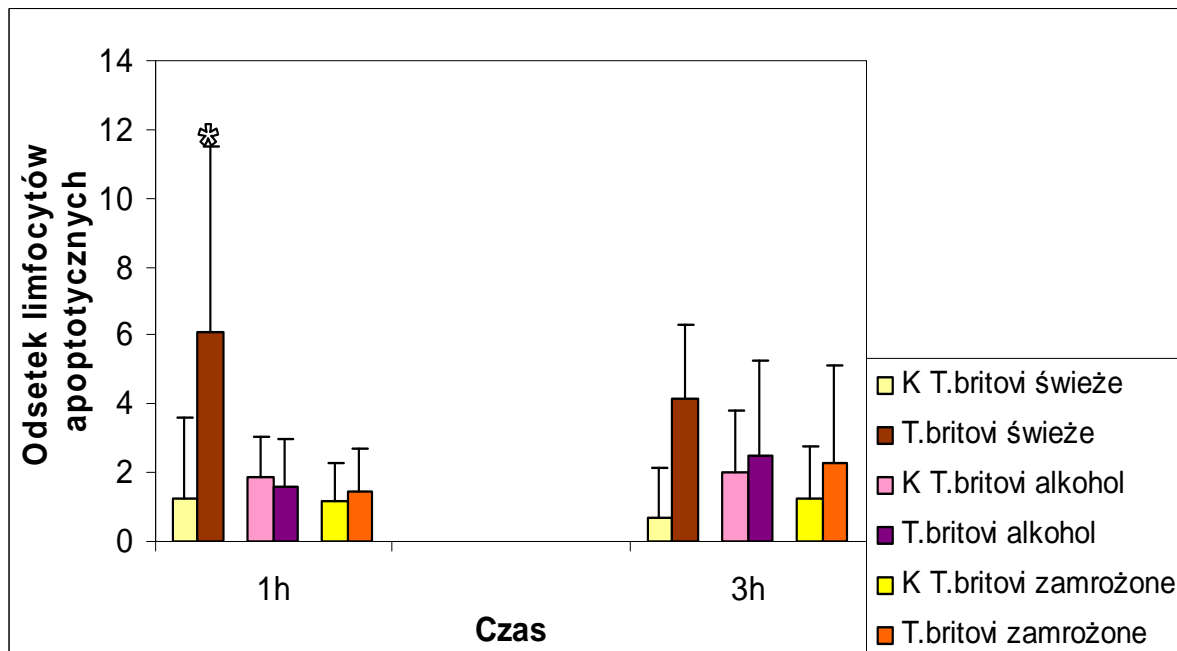
### **6.2.1. Wpływ dodania 100 świeżo pobranych żywych, zamrożonych lub utrwalonych w alkoholu larw *Trichinella spiralis* lub *Trichinella britovi* na indukcję apoptozy limfocytów krwi obwodowej po 1 i 3 godzinach inkubacji z pasożytami**

Po dodaniu 100 larw świeżo pobranych żywych, zamrożonych lub utrwalonych w alkoholu obydwu gatunków *Trichinella* do badanej krwi, jedynie żywe larwy powodowały wzrost odsetka limfocytów apoptotycznych w stosunku do właściwych kontroli. Różnice te były istotne statystycznie. Obserwowane odsetki komórek apoptotycznych po dodaniu larw zamrożonych lub utrwalonych w alkoholu obu gatunków włośnia były na poziomie właściwych prób kontrolnych w każdej godzinie badania (rycina 8 i 9). Nie wykazano również różnic istotnie statystycznych pomiędzy wynikami uzyskanymi w poszczególnych przedziałach czasowych.



Rycina 8. Wzrost odsetka limfocytów apoptotycznych w różnym okresie inkubacji (h) ze 100 świeżo pobranymi żywymi, utrwalonymi w alkoholu lub zamrożonymi larwami *Trichinella spiralis* względem właściwych kontroli (K).

\* zaznaczono istotności pomiędzy próbą badaną a właściwą kontrolą;  $p < 0,05$

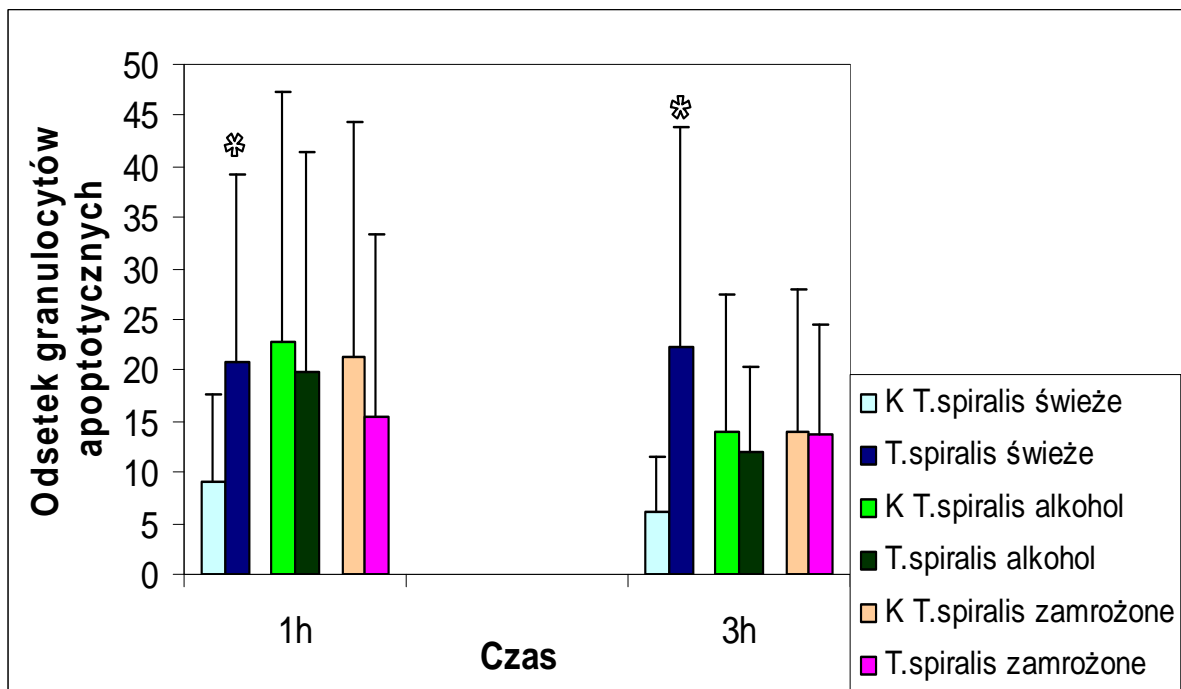


Rycina 9. Wzrost odsetka limfocytów apoptotycznych w różnym okresie inkubacji (h) ze 100 świeżo pobranymi żywymi, utrwalonymi w alkoholu lub zamrożonymi larwami *Trichinella britovi* względem właściwych kontroli (K)

\* zaznaczono istotności statystyczne pomiędzy próbą badaną a właściwą kontrolą;  $p < 0,05$

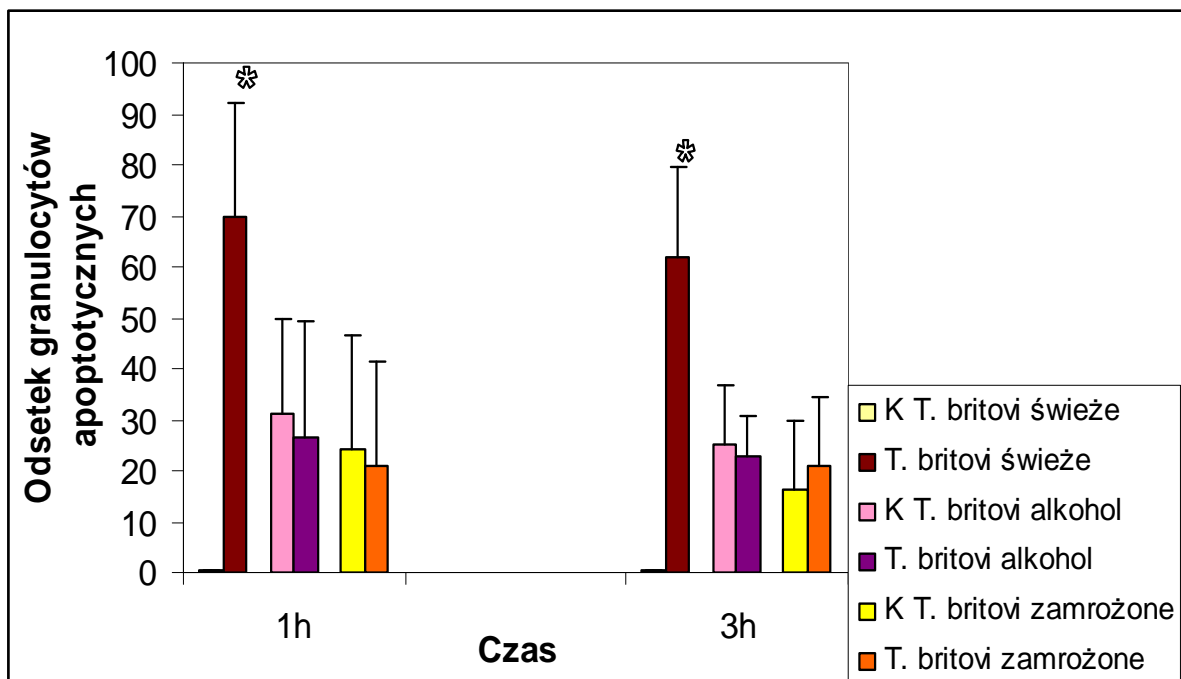
### **6.2.2 Wpływ dodania 100 świeżo pobranych żywych, zamrożonych lub utrwalonych w alkoholu larw *Trichinella spiralis* lub *Trichinella britovi* na indukcję apoptozy granulocytów krwi obwodowej po 1 i 3 godzinach inkubacji z pasożytami**

Po dodaniu 100 larw świeżo pobranych żywych, zamrożonych lub utrwalonych w alkoholu obydwu gatunków *Trichinella* do badanej krwi, jedynie żywe larwy powodowały wzrost odsetka granulocytów apoptotycznych w stosunku do właściwych kontroli. Różnice te były istotne statystycznie. Obserwowane odsetki komórek apoptotycznych po dodaniu larw zamrożonych lub utrwalonych w alkoholu obu gatunków włośnia były na poziomie właściwych prób kontrolnych w każdym badanym przedziale czasowym (rycina 10 i 11). Analiza statystyczna w obu przedziałach czasowych wykazała istotną zmianę odsetka komórek apoptotycznych dla próby badanej *Trichinella britovi* inkubowanej ze świeżo pobranymi żywymi larwami względem prób z zamrożonymi lub utrwalonymi w alkoholu larwami, natomiast w przypadku *Trichinella spiralis* takiej istotności nie wykazano. Nie wykazano różnic istotnych statystycznie pomiędzy wynikami uzyskanymi w poszczególnych przedziałach czasowych.



Rycina 10. Wzrost odsetka granulocytów apoptotycznych w różnym czasie inkubacji (h) po dodaniu 100 larw *Trichinella spiralis*: świeżo pobranych żywych, utrwalonych w alkoholu lub zamrożonych względem właściwych kontroli (K)

\* zaznaczono istotności statystyczne pomiędzy próbą badaną a właściwą kontrolą;  $p < 0,05$



Rycina 11. Wzrost odsetka granulocytów apoptotycznych w różnym czasie inkubacji (h) po dodaniu 100 larw *Trichinella britovi*: świeżo pobranych żywych, utrwalonych w alkoholu lub zamrożonych względem właściwych kontroli (K)

\* zaznaczono istotności statystyczne pomiędzy próbą badaną a właściwą kontrolą;  $p < 0,05$

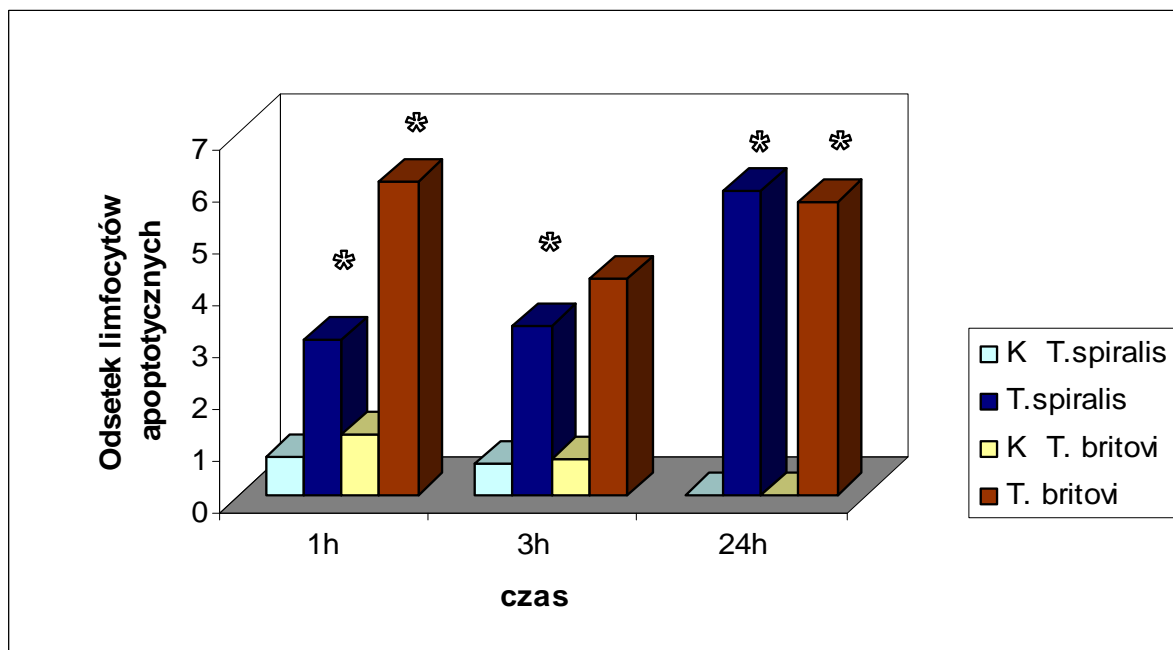
### **6.3. Porównanie apoptozy komórek krwi obwodowej indukowanej przez dodanie 100 świeżo pobranych żywych larw *Trichinella spiralis* lub *Trichinella britovi***

Badanie to miało na celu sprawdzenie, czy różnice międzygatunkowe, opisywane jako różnice antygenowe i epidemiologiczne znajdują odzwierciedlenie w zdolności larw *Trichinella spiralis* lub *Trichinella britovi* do indukcji apoptozy komórek krwi obwodowej.

#### **6.3.1. Wpływ 100 świeżo pobranych żywych larw obydwu gatunków *Trichinella* na indukcję apoptozy limfocytów po 1, 3 i 24 godzinach inkubacji z pasożytami**

Po dodaniu 100 świeżo pobranych żywych larw do krwi, obserwowano w obu badanych gatunkach *Trichinella* wzrost odsetka limfocytów apoptotycznych. Wzrost ten wykazano w każdym z przedziałów czasowych (rycina 12). Różnice w odniesieniu do właściwych prób kontrolnych były istotne statystycznie, z wyjątkiem badania w 3. godzinie dla *Trichinella britovi*, choć zmiany były podobne jak w przypadku *Trichinella spiralis*. Wielkość apoptozy limfocytów krwi obwodowej indukowanej przez larwy obu gatunków *Trichinella* nie różniła się statystycznie w żadnym badanym przedziale czasowym.





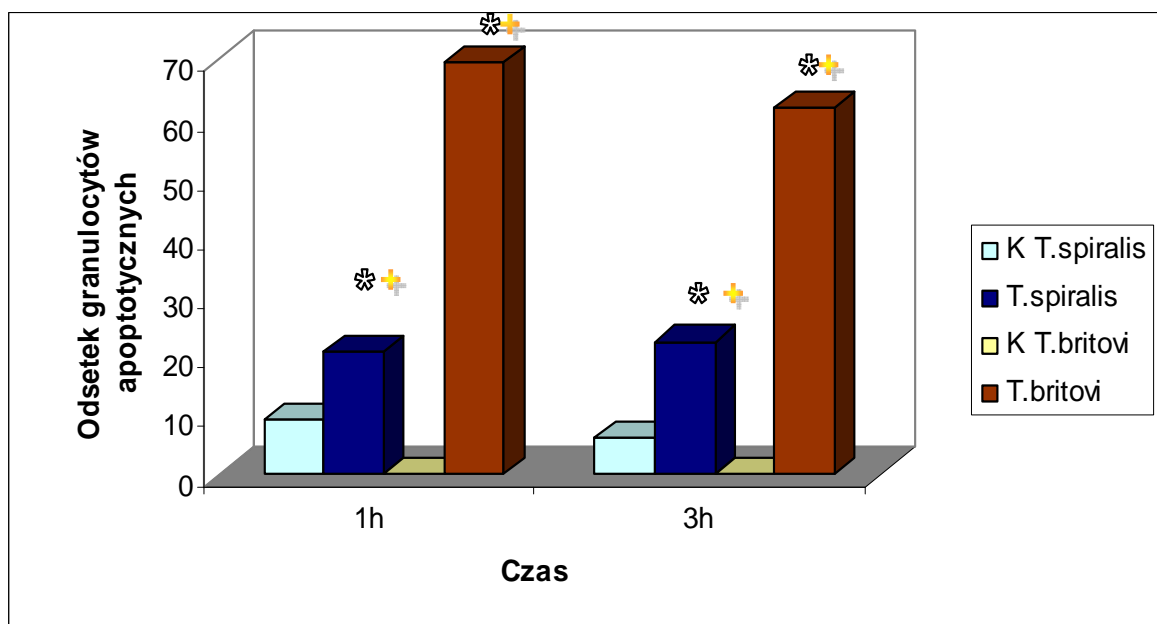
Rycina 12. Wzrost odsetka limfocytów apoptotycznych po dodaniu 100 świeżo pobranych żywych larw *Trichinella spiralis* lub 100 świeżo pobranych żywych larw *Trichinella britovi*, względem właściwych kontroli (K). Odsetek limfocytów apoptotycznych oznaczano po 1, 3 i 24 godzinach

\* zaznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy grupą badaną a jej kontrolą;  $p < 0,05$ .

Pomiędzy badanymi gatunkami *Trichinella spiralis* a *Trichinella britovi* nie wykazano różnic istotnych statystycznie. Nie wykazano różnic istotnych statystycznie pomiędzy wynikami uzyskanymi w poszczególnych przedziałach czasowych

### 6.3.2. Wpływ 100 świeżo pobranych żywych larw obydwu gatunków *Trichinella* na indukcję apoptozy granulocytów po 1 i 3 godzinach inkubacji z pasożytami

Po dodaniu 100 świeżo pobranych żywych larw pasożyta do krwi, obserwowano w obu badanych gatunkach *Trichinella* wzrost odsetka granulocytów apoptotycznych. Wzrost ten wykazano w każdym z przedziałów czasowych (rycina 13). Różnice w odniesieniu do właściwych prób kontrolnych były istotne statystycznie. Odsetek granulocytów apoptotycznych po dodaniu larw *Trichinella britovi* w 1. i 3. godzinie był wyższy niż po dodaniu, w analogicznym czasie, larw *Trichinella spiralis*. Różnica ta była istotna statystycznie. Odsetek apoptotycznych granulocytów krwi obwodowej w poszczególnych przedziałach czasowych nie ulegał zmianom istotnym statystycznie.



Rycina 13. Wzrost odsetka granulocytów apoptotycznych po dodaniu 100 świeżo pobranych żywych larw *Trichinella spiralis* lub 100 świeżo pobranych żywych larw *Trichinella britovi*, względem właściwych kontroli (K). Odsetek granulocytów oznaczano po 1 i 3 godzinach

\* oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy grupą badaną a jej kontrolą;  $p < 0,05$

+ oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy próbami badanymi w obu przedziałach czasowych;  $p < 0,05$

## 7. DYSKUSJA

W pracy wykazano, że larwy *Trichinella spiralis* i *Trichinella britovi* mogą indukować apoptozę limfocytów i granulocytów krwi obwodowej człowieka *in vitro*.

Użyty zestaw ApoFluor Green zawierający syntetyczny inhibitor kaspaz VAD FMK sprzężony z karboksylfluoresceiną w połączeniu z PI umożliwia w badanych komórkach zróżnicowanie trzech kolejnych etapów apoptozy [120]:

1. aktywacja kaspaz bez zmian przepuszczalności błony komórkowej - FAM(+)PI(-), jest charakterystyczna dla **komórek wchodzących w apoptozę**,
2. utrata możliwości usuwania PI przez błonę komórkową z obecnością aktywnych kaspaz-FAM(+)PI(+) - jest charakterystyczna dla późniejszego etapu apoptozy - **komórki apoptotyczne**,
3. utrata możliwości wiązania inhibitorów kaspaz FAM(-)PI(+), charakterystyczna dla **komórek nekrotycznych**.

**Komórki żywe**, w których nie zostały uruchomione procesy apoptotyczne, nie wykazujące aktywności kaspaz oraz zmian przepuszczalności błony komórkowej to FAM(-)PI(-).

Okno czasowe pomiędzy pobraniem krwi w Wojewódzkiej Stacji Krwiodawstwa, a początkiem eksperymentu mogło powodować uruchomienie procesów aktywujących kaspazy. Dotyczyło to głównie granulocytów krwi obwodowej, które po wynaczynieniu utrzymują swoje właściwości przez około 6 - 8 godzin. Procedura doświadczenia od momentu pobrania krwi do wykonania pomiarów nie przekraczała 6 godzin. Niemniej różnice w wynikach prób kontrolnych dotyczące odsetka komórek wchodzących w apoptozę pomiędzy limfocytami i granulocytami zadecydowały o poddaniu ocenie tylko komórek apoptotycznych [tabela 5, 6, 7 i 8 w Aneksie].

### Indukcja apoptozy w komórkach krwi obwodowej

W toku ewolucji pasożyty wytworzyły mechanizmy umożliwiające im przetrwanie w organizmie żywiciela. Zasadlając organizm żywiciela wywołują one reakcje odporności wrodzonej i swoistej, które mają na celu eliminację intruza. Z drugiej zaś strony pasożyty wykształciły liczne sposoby unikania odpowiedzi immunologicznej, co umożliwia im

zapewnienie ciągłości cyklu życiowego. Zaliczyć do nich można hamowanie sygnałów w komórce żywiciela, zmienność antygenową, mimikrę molekularną, immunosupresję bezpośrednią, apoptozę [10, 23, 39, 49, 98, 137], czy, jak w przypadku *Trichinella spiralis*, wydzielanie czynnika immunosupresyjnego uszkadzającego bezpośrednio limfocyty-limfopoetyny [11, 98].

## Limfocyty

W pracy wykazano możliwość indukcji procesu apoptozy limfocytów krwi obwodowej przez żywe larwy *Trichinella spiralis* i *Trichinella britovi*. Aktywacja tego procesu następowała bardzo szybko – w ciągu jednej godziny. Chociaż badane limfocyty w oznaczanej próbie zetknęły się z antygenami larw w jednym czasie, apoptozie uległy tylko niektóre, podatne na nią. Czas inkubacji nie wpłynął na wzrost odsetka limfocytów apoptotycznych. Celem niniejszej pracy nie było wykazanie, od czego ta reakcja mogła zależeć. Zagadnienie to wymaga dalszych badań.

W piśmiennictwie nie znaleziono danych dotyczących badania możliwości wpływu *Trichinella spiralis* i *Trichinella britovi* na proces programowanej śmierci limfocytów krwi obwodowej człowieka podczas inwazji. Apoptozę w przypadku zarażenia *Trichinella spiralis* obserwowano w limfocytach uzyskanych ze śledziony i krezkowych węzłów chłonnych u zwierząt doświadczalnych [101]. Dotychczasowe badania nad tym procesem podczas zarażenia *Trichinella spiralis* dotyczą odmiennych od niniejszej pracy modeli badawczych. Różnice te dotyczą:

- pochodzenia badanych komórek: ludzie - zwierzęta doświadczalne
- rodzaju analizowanych tkanek: limfocyty i granulocyty krwi obwodowej - komórki mięśniowe, nabłonka jelit, limfocyty uzyskane ze śledziony czy węzłów chłonnych
- przedziałów czasowych: 1, 3 godziny - dni, tygodnie po zarażeniu
- lokalizacji ekspozycji na larwy: *in vitro* – *in vivo* [101, 102, 103].

Indukcja apoptozy w limfocytach krwi obwodowej przez 100 świeżo pobranych żywych larw *Trichinella spiralis* lub *Trichinella britovi* dotyczyła odpowiednio od 3% do 5,9% limfocytów dla *Trichinella spiralis* i od 4,3% do 5,7% limfocytów dla *Trichinella britovi* w badanych przedziałach czasowych. Uzyskane wyniki świadczą, iż zapoczątkowanie

procesu zaprogramowanej śmierci komórki może dotyczyć tylko pewnych subpopulacji limfocytów krwi obwodowej, oraz że nie ma różnic pomiędzy obydwoma gatunkami *Trichinella*, jeśli chodzi o ich wpływ na limfocyty.

Podczas inwazji *Trichinella spiralis* zaobserwowany został wzrost, jak i przesunięcia w fenotypie limfocytów krwi obwodowej ludzi i zwierząt [8, 40]. W obu cytowanych badaniach wykazano wzrost liczby limfocytów CD3. U zwierząt inwazja wiązała się ze wzrostem limfocytów CD4, a w miarę trwania zarażenia, w fazie mięśniowej, wzrastał również odsetek komórek CD8 [8]. U ludzi wykazano wzrost odsetka limfocytów CD8, który wiązał się z początkiem fazy mięśniowej inwazji [40]. Powyższe zmiany w fenotypie limfocytów krwi obwodowej wskazują zarówno na korelację z cyklem życiowym pasożyta, jak i z rozwojem swoistej odpowiedzi immunologicznej żywiciela. Dochodzi do aktywacji czynników promujących odpowiedź Th2 w początkowej fazie inwazji, a następnie produkcji przeciwciał i wzmożonej proliferacji limfocytów cytotoksycznych, które w swoisty sposób mogą eliminować larwy włośnia.

Założenia niniejszej pracy nie obejmowały określenia fenotypu limfocytów ulegających apoptozie.

Liczba (1, 10 i 100) żywych larw obu gatunków włośnia, dodawana do badanej krwi nie miała wpływu na wysokość odsetka limfocytów apoptotycznych w oznaczanych przedziałach czasowych. U zdrowych osób liczba limfocytów średnio wynosi 4,5 tys/ $\mu$ l. W pracy inkubowano larwy pasożytów z 400  $\mu$ l krwi obwodowej i już pojedyncze żywe larwy wykazywały zdolność uruchomienia procesów apoptozy tych komórek. Dodanie 1 larwy włośnia do badanej objętości krwi odpowiada dużej inwazyjności, jaka nie jest obserwowana w warunkach naturalnych. Inne objętości krwi obwodowej z przyczyn technicznych nie były brane pod uwagę.

## **Granulocyty**

W pracy wykazano również możliwość indukcji apoptozy przez żywe larwy *Trichinella spiralis* lub *Trichinella britovi* w granulocytach krwi obwodowej. Podobnie jak w przypadku limfocytów, aktywacja tego procesu następowała w ciągu jednej godziny. Odsetek granulocytów apoptotycznych nie zmieniał się w czasie i był wyższy niż odsetek limfocytów ulegających apoptozie, aczkolwiek tych dwóch populacji nie porównywano między sobą.

Leukocytoza i eozynofilia są bardzo charakterystyczną manifestacją przebiegu zarażenia włośniem krętym, a eozynofilia może wzrastać nawet do 80% wszystkich leukocytów [98]. Oprócz eozynofilii krwi obwodowej, nacieki tych komórek obserwowane są w zarażonych mięśniach czy nabłonku jelit [62]. Dotychczasowe badania wykazały apoptozę eozynofilów podczas zarażenia *Trichinella spiralis* [34, 41], jak i innymi pasożytami jelitowymi [146]. Podobnie, jak w przypadku limfocytów, cytowane prace oparte były na innych modelach badawczych. Dodatkowo w założeniach niniejszej pracy nie różnicowano granulocytów pod kątem rodzaju ziarnistości – kwaso-, zasado- i obojętnochłonnych. We krwi zdrowych dawców eozynofile stanowią ok. 1% granulocytów. Ze względu na zaobserwowany w pracy odsetek apoptotycznych granulocytów można wnioskować, że doszło do apoptozy również, jeśli nie przede wszystkim, granulocytów obojętnochłonnych.

Granulocyty poprzez swoją właściwość produkcji czynników prozapalnych mogą działać niekorzystnie zarówno na tkanki żywiciela, jak i samego pasożyta i z tego powodu, jako jedne z pierwszych komórek układu immunologicznego są usuwane poprzez proces apoptozy [24].

Uzyskane w pracy wyniki wskazują, iż tak samo jak w przypadku limfocytów poprzez indukcję procesów programowanej śmierci, w granulocytach krwi obwodowej larwy *Trichinella spiralis* lub *Trichinella britovi* również mogą wpływać na kształtowanie odpowiedzi immunologicznej żywiciela.

Wpływ pasożytów na indukcję apoptozy granulocytów krwi obwodowej i na charakter odpowiedzi immunologicznej został poznany w niewielkim stopniu, a badania koncentrowały się głównie na populacji eozynofilów, które są charakterystycznym elementem obrazu zarażeń pasożytniczych [19, 32, 146].

Podczas zarażenia myszy *Taenia crassiceps* opisano apoptozę eozynofilów. Najwyższy odsetek komórek apoptotycznych – 67,27% zaobserwowany został 6. dnia po inwazji [146].

W niniejszej pracy wykorzystano krew zdrowych dawców, u których wśród granulocytów krwi obwodowej dominują neutrofile stanowiąc 50-70% wszystkich leukocytów (eozynofile 1-5%) [123, 138]. Neutrofile żyją 6-8 godzin, nie namnażają się na obwodzie, a ich usuwanie, m.in. przez apoptozę, jest powszechnym mechanizmem zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i podczas zarażeń [138].

Wpływ antygenów pasożyta na indukcję apoptozy neutrofilów opisano w przypadku *Cysticercus cellulosae* w warunkach *in vitro*. Ekstrakt uzyskany z zamrożonych całych pasożytów indukował apoptozę neutrofilów na poziomie 3-4% [19].

W pracy uzyskano znacznie wyższe wartości granulocytów krwi obwodowej ulegających apoptozie, inkubowanych ze świeżo pobranymi żywymi larwami włośnia. Rozbieżności te mogą wynikać zarówno z odmiennego modelu badawczego, jak i wykorzystania w cytowanej wcześniej pracy zamrożonych pasożytów. Wyniki uzyskane w badaniach własnych, wskazują na znacznie większy potencjał indukcji apoptozy przez żywe, niż utrwalone larwy pasożytów [19]. Może to wskazywać, że za indukcję apoptozy odpowiadają nie tyle antygeny obecne na powierzchni pasożyta, co antygeny ES, lub produkty metabolizmu żywych larw, być może pojawiające się tylko w kontakcie z komórkami układu odpornościowego żywiciela.

Uważa się, że wyizolowane produkty wydaliniczo-wydzielnicze pasożytów oraz ekstrakt uzyskany ze świeżych larw charakteryzują się zbliżoną antygenowością [40]. Natomiast brak jest doniesień dotyczących porównań antygenowości zamrożonych i świeżych ekstraktów z pasożytów.

W badaniu ze świeżo pobranymi żywymi larwami *Trichinella spiralis* zaobserwowano różnice pomiędzy wartościami odsetka apoptotycznych granulocytów uzyskanych po dodaniu 1 i 10 larw w stosunku do 100 dodanych larw, jednakże analiza statystyczna odsetka granulocytów ulegających apoptozie nie wykazała istotności tych zmian. Dodatkowo odsetek badanych granulocytów po dodaniu 100 świeżo pobranych żywych larw *Trichinella britovi* odpowiednio wynosił w 1. i 3. godzinie badania: 69,7% i 62% i był istotnie statystycznie wyższy niż po dodaniu 100 żywych larw *Trichinella spiralis*, który w analogicznych czasach wyniósł 20,7% i 22,4%. Warto podkreślić, że zaznaczyła się tu znacznie wyraźniej różnica między obydwoma gatunkami *Trichinella*, nieobecna w przypadku limfocytów. Mogłoby się wydawać, że inwazyjność larw *Trichinella britovi* jest większa. Jednak nie wywierają one tak niszczącego wpływu na limfocyty, a to właśnie odporność swoista decyduje o przebiegu zarażenia.

Wartości te zbliżone są do rezultatów badań przeprowadzonych na szczurach zarażonych *Trichinella spiralis*, u których wykazano antyapoptotyczny wpływ pasożyta na eozynofile krwi obwodowej: 52% apoptotycznych eozynofiliów w przypadku zwierząt zdrowych, stanowiących kontrolę badania i 23,8 % w przypadku zwierząt zarażonych [32]. Powyżej cytowana praca [32] jest punktem wyjścia do dyskusji na temat ochronnego wpływu eozynofiliów na *Trichinella spiralis*.

Inkubacja dużej liczby świeżo pobranych żywych larw *Trichinella spiralis* (100 sztuk) w objętości 400 µl krwi mogła doprowadzić do takiego stężenia produktów wydalniczo-wydzielniczych, którego rezultatem są powyższe obserwacje.

Analogicznie, jak w przypadku limfocytów, dodanie do 400 µl krwi pojedynczych żywych larw włośnia wystarcza do indukcji apoptozy granulocytów, bo i tak przekracza poziom występującej naturalnie ekspozycji na te larwy.

### **Indukcja apoptozy przez świeże larwy *Trichinella spiralis* lub *Trichinella britovi***

Możliwość indukcji apoptozy w granulocytach i limfocytach krwi obwodowej wykazano w pracy tylko po dodaniu świeżo pobranych żywych larw *Trichinella spiralis* lub *Trichinella britovi*. Larwy utrwalone w alkoholu i zamrożone nie wykazywały takich właściwości. Świadczy to o tym, że produkty żywych larw posiadają większy potencjał wywołujący programowaną śmierć komórki i tą drogą pasożyty mogą regulować korzystne dla siebie zmiany w komórkach żywiciela. Możliwość wpływu na indukcję apoptozy przez substancje wydalniczo-wydzielnicze (antygeny ES) sugerowały badania dotyczące formowania kompleksu komórki opiekunki w tkance mięśniowej [10, 140, 141]. Obecność produktów wydalniczo-wydzielniczych *Trichinella spiralis* wykazano zarówno w cytoplazmie, jak i w jądrze komórkowym zarażonych komórek tkanki mięśniowej [6]. Bardzo prawdopodobnym jest, poprzez analogię, że w podobny sposób antygeny ES *Trichinella spiralis* lub *Trichinella britovi* mogą oddziaływać na limfocyty i granulocyty krwi obwodowej.

Obecność procesu programowanej śmierci w komórkach żywiciela w przebiegu włośnicy została zaobserwowana po raz pierwszy w komórkach jelit i komórkach mięśniowych myszy [57]. Późniejsze badania dotyczyły głównie roli apoptozy podczas tworzenia się komórki opiekunki [6, 10, 141]. Wnikanie larw włośnia do tkanek mięśniowych powoduje uszkodzenie komórek, które w przypadku braku możliwości naprawy mogą być usuwane na drodze apoptozy [141]. W komórkach mięśniowych zaobserwowano dwie drogi indukcji apoptozy: szlak zewnętrzny poprzez receptor TNF- $\alpha$  i wewnętrzny- mitochondrialny [10, 139]. Powyższe mechanizmy umożliwiają skuteczne unikanie odpowiedzi



immunologicznej żywiciela przez *Trichinella spiralis*. Ograniczona apoptoza uszkodzonych komórek mięśniowych nie uaktywnia komórek układu immunologicznego. We wczesnej fazie tworzenia tego kompleksu nie stwierdzono lokalnego odczynu zapalnego, a miejscowy naciek jednojądrzastych komórek - głównie granulocytów pojawia się w późniejszym czasie [6].

Indukowana przez pasożyty apoptoza komórek układu immunologicznego stanowi ich element strategii przetrwania w organizmie żywiciela. Procesy te obejmują m.in. wpływ pasożytów na określony typ odpowiedzi immunologicznej poprzez eliminację drogą apoptozy wybranych grup komórek, co może promować korzystny dla pasożyta typ odpowiedzi [49]. Przykładem tego w świecie nicieni jest mikrofilaria *Brugia pahangi*, wywołująca apoptozę limfocytów CD4 [50]. Opisywano możliwość apoptozy indukowanej antygenami ES w limfocytach krwi obwodowej, oraz pochodzących ze śledziony zwierząt laboratoryjnych w przypadku zarażenia *Taenia crassiceps* i *Taenia solium* [75, 126, 146]. Uważa się, że przy wysokim stężeniu antygenów, co ma miejsce w chorobach przewlekłych i autoimmunologicznych, część populacji aktywowanych limfocytów T może być usuwana na drodze AICD (activation- induced cell death) [13].

Prawdopodobnym wydaje się, że *Trichinella spiralis* może mieć wpływ na korzystne dla tego pasożyta zmiany fenotypu limfocytów krwi obwodowej. Modulacja odpowiedzi immunologicznej żywiciela przez pasożyty może dotyczyć również oddziaływania, głównie przez antygeny ES na pozostałe komórki układu odpornościowego. Antygeny jaj *Schistosoma mansoni* indukują produkcję IL-4 i degranulację mysich i ludzkich bazoofilów, a antygeny ES *Nippostrongylus brasiliensis* hamują *in vivo* rekrutację eozynofików do płuc [45].

### ***Trichinella spiralis* a *Trichinella britovi***

Podczas inwazji *Trichinella spiralis* w tkance mięśniowej obserwowana jest wyższa liczba larw mięśniowych niż przy zarażeniu *Trichinella britovi* [26, 54]. Znajduje to odzwierciedlenie w przebiegu zarażenia – znacznie cięższy i gwałtowniejszy w wypadku *Trichinella spiralis* niż *Trichinella britovi* [107]. Jest to tłumaczone znacznie wyższą rozrodczością *Trichinella spiralis*, nie tylko w stosunku do *Trichinella britovi*, ale również innych gatunków włośni [26, 40, 54, 107]. Z drugiej strony łagodniejszy przebieg zarażeń wywołanych *Trichinella britovi* może być również związany z większą immunogennością larw tego gatunku i skuteczniejszym mechanizmem zwalczania inwazji przez układ immunologiczny żywiciela. Należałoby uwzględnić też fakt dużo częstszych zarażeń ludzi i

zwierząt *Trichinella spiralis*, co mogło spowodować odmienne mechanizmy adaptacyjne na linii pasożyt - żywiciel.

Prawdopodobnym wydaje się więc, iż uzyskane w pracy wyniki po inkubacji ze 100 świeżo pobranymi żywymi larwami *Trichinella spiralis* w odniesieniu do dodanej liczby 1 i 10 larw *Trichinella spiralis*, jak i 1, 10 lub 100 larw *Trichinella britovi*, mogą stanowić jedną ze składowych takich mechanizmów adaptacyjnych.

Nie sposób jednak wykluczyć, iż wykazana możliwość indukcji apoptozy limfocytów i granulocytów krwi obwodowej jest jedynie reakcją na odpowiedź immunologiczną żywiciela bez wpływu na kształtowanie określonego typu odpowiedzi.

Prawdopodobnie, w określonym środowisku pasożyty mogą zarówno indukować apoptozę jak i działać antyapoptotycznie na wybrane grupy komórek, stwarzając warunki do zamknięcia swojego cyklu życiowego. Wpływ na charakter odpowiedzi immunologicznej jest cechą wielu gatunków pasożytów [32, 45, 50].

W pracy wykazano wpływ larw *Trichinella spiralis* lub *Trichinella britovi* na indukcję procesów apoptozy limfocytów i granulocytów krwi obwodowej *in vitro*. Tylko świeże żywe larwy obu gatunków włośnia były zdolne do zainicjowania procesów programowanej śmierci komórek. Różne wartości odsetka granulocytów i limfocytów apoptotycznych wskazują na istotną rolę żywych larw *Trichinella spiralis* lub *Trichinella britovi* na kształtowanie odpowiedzi immunologicznej żywiciela. Wskazuje to na możliwość selektywnego wpływu larw pasożyta na określone populacje i subpopulacje komórek układu immunologicznego.

## 8. WNIOSKI

1. Świeżo pobrane żywe larwy *Trichinella spiralis* i *Trichinella britovi* indukują apoptozę limfocytów i granulocytów krwi obwodowej *in vitro*.
2. Odsetek limfocytów krwi obwodowej ulegających apoptozie w czasie inkubacji z larwami *Trichinella spiralis* lub *Trichinella britovi* był znacząco niższy od odsetka apoptotycznych granulocytów.

## 9. STRESZCZENIE

*Trichinella* spp. jest jednym z najbardziej rozpowszechnionych pasożytów powodujących zarażenie ludzi i zwierząt. Trichinelloza - choroba wywoływana przez tego pasożyta może dotyczyć kilkunastu milionów ludzi w wielu krajach świata, a do zarażenia człowieka dochodzi po spożyciu niedogotowanego lub niedosmażonego mięsa zawierającego larwy włośnia. W przypadku inwazji *Trichinella* spp. uważa się, że pasożyty te mogą mieć wpływ na procesy programowanej śmierci komórek żywiciela, co umożliwia im przeżycie, rozmnażanie i rozwój.

W pracy badano możliwość indukcji apoptozy przez larwy *Trichinella spiralis* i *Trichinella britovi* w ludzkich limfocytach i granulocytach krwi obwodowej *in vitro*. Badania przeprowadzono dodając do 400 µl krwi 1, 10 lub 100 świeżo pobranych żywych larw *Trichinella spiralis* lub *Trichinella britovi* lub 100 larw pasożytów zamrożonych bądź utrwalonych w alkoholu. Do oceny apoptozy wykorzystano metodę cytometrii przepływowej, po wcześniejszym wybarwieniu badanych komórek przy pomocy zestawu ApoFluor Green. Wykonywano pomiary apoptozy po 1 i 3 godzinach dla granulocytów krwi obwodowej, a dla limfocytów po 1, 3 i 24 godzinach, ze względu na dłuższy czas przeżycia tych komórek po wynacznieniu krwi.

Tylko świeżo pobrane żywe larwy *Trichinella spiralis* i *Trichinella britovi* wykazywały możliwość indukcji programowanej śmierci w komórkach limfocytów i granulocytów krwi obwodowej człowieka *in vitro*. Różna liczba dodawanych larw nie miała wpływu statystycznie istotnego na wysokość odsetka limfocytów i granulocytów ulegających apoptozie. Nie wykazano różnic pomiędzy gatunkiem *Trichinella spiralis* a *Trichinella britovi* w możliwości aktywacji apoptozy w limfocytach i granulocytach krwi obwodowej.

Odsetek ulegających apoptozie limfocytów krwi obwodowej w czasie inkubacji z larwami *Trichinella spiralis* lub *Trichinella britovi* był znacząco niższy od odsetka apoptotycznych granulocytów.

Zdolność larw *Trichinella spiralis* i *Trichinella britovi* do indukcji apoptozy komórek układu odpornościowego może odzwierciedlać przystosowanie pasożyta do uniknięcia pierwszych etapów odpowiedzi immunologicznej żywiciela.

## 10. ABSTRACT

*Trichinella* spp. is one of the most common human and animal parasites. Several million people in many countries around the world suffer from trichinellosis – a disease caused by this parasite. Human infections are caused mainly by eating of undercooked or not sufficiently fried meat containing *Trichinella* larvae. During the invasion *Trichinella* spp. seems to affect the programmed cell death processes of the host's cells, allowing the larvae to survive, reproduce and develop.

The study investigated the possibility of induction of apoptosis by the larvae of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* in human peripheral blood lymphocyte and granulocyte populations *in vitro*. The study was carried out by adding 1, 10 or 100 freshly collected living larvae of *Trichinella spiralis* or *Trichinella britovi* or 100 larvae frozen or preserved in alcohol to 400 µl of peripheral blood. Apoptosis was estimated on the basis of ApoFluor Green staining of the blood cells. The percentage of apoptotic granulocytes was measured by flow cytometry after 1 and 3 hours of incubation with larvae, while the percentage of apoptotic lymphocytes was measured after 1, 3 and 24 hours, due to the longer survival of these cells after extravasation of blood.

Only freshly collected living larvae of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* induced programmed cell death in human lymphocytes and granulocytes *in vitro*. The number of added larvae had no statistically significant effect on the percentage of apoptotic lymphocytes and granulocytes in examined samples. The addition of either *Trichinella spiralis* or *Trichinella britovi* larvae induced the same degree of apoptosis of the peripheral blood cells.

The percentage of apoptotic lymphocytes caused by the incubation with *Trichinella spiralis* or *Trichinella britovi* larvae was significantly lower than the percentage of apoptotic granulocytes.

The ability of parasitic nematodes *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* to induce the apoptosis in human immune cells may reflect their adaptation to avoid the early stages of host immune responses.

## 11. PIŚMIENNICTWO

1. Akkoc N., Kuruuzum Z., Akar S., Yuce A., Onen F., Yapar N., Ozgenc O., Turk M., Ozdemir D., Avci M., Guruz Y., Oral A.M., Pozio E., Izmir Trichinellosis Outbreak Study Group: A large-scale outbreak of trichinellosis caused by *Trichinella britovi* in Turkey. *Zoonoses and Public Health*, 2009; 56: 65-70
2. Andera L.: Signaling activated by the death receptors of the TNFR family. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouck, Czechoslovakia*, 2009; 153, (3): 173-180.
3. Anthony R.M., Rutitzky L.I., Urban J.F., Stadecker M.J., Gause W.C.: Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nature Reviews Immunology*, 2007; 7, (12): 975-987.
4. Arizmendi N., Yépez-Mulia L., Cedillo-Rivera R., Ortega-Pierres M.G., Muñoz O., Befus D., Enciso-Moreno J.A.: Interleukin mRNA changes in mast cells stimulated by TSL-1 antigens. *Parasite*, 2001; 8: 114-116.
5. Arizmendi-Puga N.G., Enciso J.A., Ortega-Pierres G., Zhao Z., Duszyk M., Ulanova M., Befus A.D., Yépez-Mulia L.: *Trichinella spiralis*: Histamine secretion induced by TSL-1 antigens from unsensitized mast cells. *Experimental Parasitology*, 2006; 114: 67-76.
6. Babal P., Milcheva R., Petkova S., Janega P., Hurnikova Z.: Apoptosis as the adaptation mechanism in survival of *Trichinella spiralis* in the host. *Parasitology Research* DOI 10.1007/s00436-011-2343-2 Published online: 05 April 2011.
7. Baran J.: Nowa epoka cytometrii przepływowej- przewodnik po współczesnych cytometrach i ich zastosowanie. *Postępy Biologii Komórki*, 2008; 35, (24): 3-15.
8. Boczoń K., Kostrzewa A., Paradowski S., Wandurska-Nowak E., Wiktorowicz K.: The influence of glucocorticoid on the blood lymphocytes in *Trichinella spiralis* infected mice. *Helmintologia*, 2001; 38, (4): 201-204.
9. Bolás-Fernandez F., del Corral Bezara L.: TSL-1 antigens of *Trichinella*: An overview of their potential role in parasite invasion, survival and serodiagnosis of trichinellosis. *Research in Veterinary Science*, 2006; 81: 297-303.
10. Boonmarsz T., Wu Z., Nagano I, Takahashi Y.: Expression of apoptosis-related factors in muscles infected with *Trichinella spiralis*. *Parasitology*, 2004; 128: 323-332.
11. Božić F., Marinculić A., Duraković E.: Analysis of intestinal intraepithelial lymphocyte populations in experimental *Trichinella spiralis* infection of mice. *Folia Parasitologica*, 2000; 47: 55-59.
12. Brattig N.W., Büttner D.W., Hoerauf A.: Neutrophil accumulation around *Onchocerca* worms and chemotaxis of neutrophils are dependent on *Wolbachia* endobacteria. *Microbes and Infection*, 2001; 3, (6): 439-446.

13. Brenner D., Krammer P.H., Arnold R.: Concepts of activated T cell death. *Critical Reviews in Oncology/ Hematology*, 2008; 66: 52-66.
14. Bruschi F., Korenaga M., Watanabe N.: Eosinophils and *Trichinella* infection: toxic for the parasite and the host? *Trends in Parasitology*, 2008; 24, (10): 462-467.
15. Bruschi F., Marucci G., Pozio E., Masetti M.: Evaluation of inflammatory responses against muscle larvae of different *Trichinella* species by an image analysis system. *Veterinary Parasitology*, 2009; 159, (3-4): 258-262.
16. Buczek A.: Atlas pasożytów człowieka. Koliber Lublin, 2005.
17. Cademan E.T., Lawrence R.A.: Granulocytes: effector cells or immunomodulators in the immune response to helminth infection? *Parasite Immunology*, 2010; 32, (1): 1-19.
18. Capo V., Despommier D.D.: Clinical Aspects of Infection with *Trichinella* spp. *Clinical Microbiology Reviews*, 1996; 9, (1): 47-54.
19. Chaible L.M., Alba-Loureiro T.C., Maia A.A.M., Pugine S.M.P., Valle C.R., Pithon-Curi T.C., Curi R., De Melo M.P.: Effect of *Cysticercus cellulosae* on neutrophil function and death. *Veterinary Parasitology*, 2005; 127: 121-129.
20. Chapman G. V.: Instrumentation for flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 2000; 243, (1): 3- 12.
21. Darzynkiewicz Z., Gorczyca W., Ardel B., Halicka D., Juan G., Traganos F.: Cytometria apoptozy i martwicy. *Central European Journal of Immunology*, 1996; 21: 156- 170.
22. Donnelly S., Stack C.M., O'Neill S.M., Sayed A.A., Williams D.L., Dalton J.P.: Helminth 2-Cys peroxidase drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2008; 22, (11): 4022-4032.
23. Donskow-Schmelter K., Doligalska M.: Apoptoza jako mechanizm ochrony dla patogenów i ich żywicieli. *Wiadomości Parazytologiczne* 2005; 51, (4): 271-280
24. Donskow-Schmelter K., Józwicka K., Doligalska M.: Nematode infection in mice- an experimental model of immunoregulation. *Wiadomości Parazytologiczne*, 2009; 55, (2): 157-166.
25. Dupouy-Camet J.: Trichinellosis: a worldwide zoonosis. *Veterinary Parasitology*, 2000; 93, (3-4): 191-200.
26. Dvorožňáková E., Hurníková Z., Kołodziej-Sobocińska M.: Development of cellular immune response of mice to infection with low doses of *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi* and *Trichinella pseudospiralis* larvae. *Parasitology Research*, 2011; 108: 169-176.
27. Dvorožňáková E., Hurníková Z., Kołodziej-Sobocińska M.: Kinetics of specific humoral immune response of mice infected with low doses of *Trichinella spiralis*, *T. britovi*, and *T. pseudospiralis* larvae. *Helminthologia*, 2010; 47, (3): 152-157.

28. Dzik J.M., Gołos B., Jagielska E., Zieliński Z., Wałajtys-Rode E.: A non-classical type of alveolar macrophage response to *Trichinella spiralis* infection. *Parasite Immunology*, 2004; 26, (4): 197–205.
29. van Eaden S. F., Klut M. E., Walker B. A., Hogg J. C.: The use of flow cytometry to measure neutrophil function. *Journal of Immunological Methods*, 1999; 232: 23–43.
30. Erster S., Moll U.M.: Stres-induced p53 runs a transcription-independent death program. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005; 331: 843-850.
31. Everts B., Smits H.H., Hokke C.H., Yazdanbakhsh M.: Helminths and dendritic cells: Sensing and regulating via pattern recognition receptors, Th2 and Treg responses. *European Journal of Immunology*, 2010; 40: 1525-1537.
32. Fabre V., Beiting D.P., Bliss S.K., Gebreselassie N.G., Gagliardo L.F., Lee N.A., Lee J.J., Appleton J.A.: Eosinophil deficiency compromises parasite survival in chronic nematode infection. *The Journal of Immunology*, 2009; 182: 1577-1583.
33. Finkelman F.D., Shea-Donohue T., Morris S.C., Gildea L., Madden K.B., Schopf L., Urban Jr J.F.: Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunological Reviews*, 2004; 201: 139-155.
34. Friend D.S., Gurish M., Austen K.F., Hunt J., Stevens R.L.: Senescent Jejunal Mast Cells and Eosinophils in the Mouse Preferentially Translocate to the Spleen and Draining Lymph Node, Respectively, During the Recovery Phase of Helminth Infection. *The Journal of Immunology*, 2000; 165: 344-352.
35. Gamble H.R., Bessonov A.S., Cuperlovic K., Gajadhar A.A., van Knapen F., Noeckler K., Schenone H., Zhu X.: Międzynarodowa Komisja Włośnicowa: zalety metody diagnozowania włośnicy u zwierząt domowych i wolno żyjących ważnych ze względów konsumpcyjnych dla człowieka. [www.med.unipi.it/ict](http://www.med.unipi.it/ict) (27.07.2011).
36. Gari-Toussaint M., Tieulié N., Baldin J.L., Dupouy-Camet J., Delaunay P., Fuzibet J.G., Le Fichoux Y., Pozio E., Marty P.: Human trichinellosis due to *Trichinella britovi* in southern France after consumption of frozen wild boar meat. *Eurosurveillance*, 2005; 10, (6): 117-118.
37. Gołąb E., Sadkowska-Todys M.: Włośnica w Polsce w 2007 roku. *Przegląd Epidemiologiczny*, 2009; 63: 263-266.
38. Gołąb E., Sadkowska-Todys M.: Współczesne problemy epidemiologii i diagnostyki włośnicy w krajach Unii Europejskiej i w Polsce. *Przegląd Epidemiologiczny*, 2003; 57: 561- 570.
39. Gołąb J., Jakóbsiak M., Lasek W., Stokłosa T. (red.): *Immunologia*. Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa, 2009
40. Gomez Morales M.A., Mele R., Sanchez M., Sacchini D., De Giacomo M., Pozio E.: Increased CD8<sup>+</sup>-T-cell expression and a type 2 cytokine pattern during the muscular phase of *Trichinella* infection in humans. *Infection and Immunity*, 2002; 70, (1): 233-239.



41. Gon S., Saito S., Takeda Y., Miyata H., Takatsu K., Sendo F.: Apoptosis and in vivo distribution and clearance of eosinophils in normal and *Trichinella spiralis*-infected rats. *Journal of Leukocyte Biology*, 1997; 62: 309-317.
42. Gottstein B., Pozio E., Nöckler K.: Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control of Trichinellosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 2009; 22, (1): 127-145.
43. Gruden-Movsesijan A., Ilic N., Sofronic-Milosavljevic L.: Lectin-blot analyses of *Trichinella spiralis* muscle larvae excretory-secretory components. *Parasitology Research*, 2002; 88: 1004-1007.
44. Gurish M.F., Bryce P.J., Tao H., Kisselgof A.B., Thornton E.M., Miller H.R., Friend D.S., Oettgen H.C.: IgE Enhances Parasite Clearance and Regulates Mast Cell Responses in Mice Infected with *Trichinella spiralis*. *The Journal of Immunology*, 2004; 172, (2): 1139-1145.
45. Hewitson J.P., Grainger J.R., Maizels R.M.: Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2009; 167: 1-11.
46. Hordyjewska A., Pasternak K.: Apoptotyczna śmierć komórki. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 2005; 14, (3): 545-554.
47. Ilic N., Colic M., Gruden-Movsesijan A., Majstrovic I., Vasilev S., Sofronic-Milosavljevic L.J.: Characterization of rat bone marrow dendritic cells initially primed by *Trichinella spiralis* antigens. *Parasite Immunology*, 2008; 30, (9): 491-495.
48. Inoue N., Matsuda F., Goto Y., Manabe N.: Role of cell-death ligand-receptor system of granulosa cell in selective follicular atresia in porcine ovary. *Journal of Reproduction and Development*, 2011; 57, (2): 169-175.
49. James E.R., Green D.R.: Manipulation of apoptosis in the host-parasite interaction *Trends in Parasitology*, 2004; 20, (6): 280-287.
50. Jenson J.S., O'Connor R., Osborne J., Devaney E.: Infection with *Brugia microfilariae* induces apoptosis of CD4(+) T lymphocytes: a mechanism of immune unresponsiveness in filariasis. *European Journal of Immunology*, 2002; 32, (3): 858-867.
51. Kaczmarek A., Osawa T., Leporowska E., Mackiewicz A.: Rola i miejsce cytometrii przepływowej w diagnostyce klinicznej. *Współczesna Onkologia*, 2002; 6, (6): 366-373.
52. Kadłubowski R., Kurnatowska A. (red.): *Zarys parazytologii lekarskiej*. PZWL Warszawa, 1999; wydanie VII.
53. Kantorski J.: Podstawy cytometrii przepływowej. *Central European Journal of Immunology*, 1996; 21: 87-93.
54. Kapel C.M.O., Gamble H.R.: Infectivity, persistence, and antibody response to domestic and sylvatic *Trichinella* spp. In experimentally infected pigs. *International Journal for Parasitology*, 2000; 30: 215-221.

55. Kapsenberg M.L.: Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature Reviews Immunology*, 2003; 3, (12): 984-993.
56. Karasuyama H., Wada T., Yoshikawa S., Obata K.: Emerging roles of basophils in protective immunity against parasites. *Trends in Immunology*, 2011; 32, (3): 125-130.
57. Karmańska K., Houszka M., Piekarska J.: Zjawisko apoptozy w przebiegu doświadczalnej włośnicy u myszy. *Wiadomości Parazytologiczne*, 2000; 46: 111-115.
58. Kawiak J.: Rola i miejsce cytometrii przepływowej w badaniach klinicznych. *Central European Journal of Immunology*, 1996; 21: 94– 98.
59. Khan W.I., Richard M., Akiho H., Blennerhasset P.A., Humphreys N.E., Grecis R.K., Van Snick J., Collins S.M.: Modulation of intestinal muscle contraction by interleukin-9 (IL-9) or IL-9 neutralization: correlation with worm expulsion in murine nematode infections. *Infection and Immunity*, 2003; 71, (5): 2430-2438.
60. Klion A.D., Nutman T.B.: The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2004; 113, (1): 30-37.
61. Knight P.A., Wright S.H., Lawrence C.E., Paterson Y.Y.W., Miller H.R.P.: Delayed Expulsion of the Nematode *Trichinella spiralis* in Mice Lacking the Mucosal Mast Cell-specific Granule Chymase, Mouse Mast Cell Protease-1. *The Journal of Experimental Medicine*, 2000; 192, (12): 1849-1856.
62. Kocięcka W.: Włosień kręty i włośnica. Kompendium. Volumed Wrocław, 1996
63. Kocięcka W.: Udział wybranych inwazji pasożytniczych w patologii mięśni. *Alergia Astma Immunologia*, 1999; 4, (1): 45-50.
64. Kocięcka W.: Trichinellosis: human disease, diagnosis and treatment. *Veterinary Parasitology*, 2000; 93, (3-4): 365-383.
65. Kołodziej-Sobocińska M., Dvorožňáková E., Dziemian E.: *Trichinella spiralis*: Macrophage activity and antibody response in chronic murine infection. *Experimental Parasitology*, 2006; 112: 52-62.
66. Kopaczewski B., Kopaczewska M.: Apoptoza-podstawy molekularne patogenezy guzów mózgu. *Neuroskop*, 2004; 6: 132-135.
67. Korn C., Scholz S.R., Gimadutdinow O., Lurz R., Pingout A., Meiss G.: Interaction of DNA Fragmentation Factor (DFF) with DNA Reveals an Unprecedented Mechanism for Nuclease Inhibition and Suggests That DFF Can Be Activated in a DNA-bound State. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005; 280, (7): 6005-6015.
68. Korzeniewska-Dyl I.: Kaspazy-struktura i funkcja. *Polski Mercuriusz Lekarski*, 2007; 23, (138): 403-407.
69. Kreider T., Anthony R.M., Urban Jr.J.F., Gause W.C.: Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Current Opinion in Immunology*, 2007; 19: 448- 453.

70. Langelaar M., Aranzamendi C., Franssen F., van der Giessen J., Rutten V., van der Ley P., Pinelli E.: Suppression of dendritic cell maturation by *Trichinella spiralis* excretory/ secretory products. *Parasite Immunology*, 2009; 31, (10): 641-645.
71. Lawrence C.E., Paterson Y.Y.W., Wright S.H., Knight P.A., Miller H.R.P.: Mouse Mast Cell Protease-1 Is Required for the Enteropathy Induced by Gastrointestinal Helminth Infection in the Mouse. *Gastroenterology*, 2004; 127: 155-165.
72. Lehmann A. K., Sornes S., Halstensen A.: Phagocytosis: measurement by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 2000; 243: 229– 242.
73. Lisiecka U., Kostro K., Jarosz Ł.: Cytometria przepływowa jako nowoczesna metoda w diagnostyce i prognozowaniu chorób. *Medycyna Weterynaryjna*, 2006; 62, (9): 998-1001.
74. Liu Y-J., Soumelis V., Watanabe N., Ito T., Wang Y-H., de Waal Malefyt R., Omori M., Zhou B., Ziegler S.F.: TSLP: An epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annual Review of Immunology*, 2007; Vol. 25: 193-219.
75. López-Briones S., Sciutto E., Ventura J.L., Zentella A., Fraquoso G.: CD4+ and CD19+ splenocytes undergo apoptosis during an experimental murine infection with *Taenia crassiceps*. *Parasitology Research*, 2003; 90, (2): 157-163.
76. Löscher T., Saathoff E.: Eosinophilia during intestinal infection. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 2008; 22, (3): 511-536.
77. Łabędzka K., Grzanka A., Izdebska M.: Mitochondrium a śmierć komórki. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* (online), 2006; 60: 439-446.
78. Łapiński T.W.: Znaczenie apoptozy w pasożytach. *Medycyna Weterynaryjna*, 2007; 63, (1): 47-50.
79. Malakauskas A., Kapel C.M., Webster P.: Infectivity, persistence and serological response of nine *Trichinella* genotypes in rats. *Parasite*, 2001; 8: 216-222.
80. Male D., Brostoff J., Roth D.B., Roitt I. (red. polskiego wydania Żeromski J.); *Immunologia*; Elsevier Urban & Partner Wrocław, 2008.
81. Mandy F. F., Bergeron M., Minkus T.: *Principles of Flow Cytometry*. *Transfusion Science*, 1995; 16, (4): 303– 314.
82. Marchenko N.D., Zaika A., Moll U.M.: Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000; 275, (21): 16202-16212.
83. Martin P., Leibovich S.J.: Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends in Cell Biology*, 2005; 15, (11): 599-607.

- 84.** Massacand J.C., Stettler R.C., Meller R., Humphreys N.E., Grecnis R.K., Marsland B.J., Harris N.: Helminth products bypass the need for TSLP in Th2 immune responses by directly modulating dendritic cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009; 106, (33): 13968-13973.
- 85.** McDermott J.R., Bartram R.E., Knight P.A., Miller H.R.P., Garrod D.R., Grecnis R.K.: Mast cells disrupt epithelial barrier function during enteric nematode infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003; 100, (13): 7761-7766.
- 86.** McDermott J.R., Humphreys N.E., Forman S.P., Donaldson D.D., Grecnis R.K.: Intraepithelial NK cell-derived IL-13 induces intestinal pathology associated with nematode infection. *The Journal of Immunology*, 2005; 175: 3207-3213.
- 87.** Michels C.E., Scales H.E., Saunders K.A., McGowan S., Brombracher F., Alexander J., Lawrence C.E.: Neither interleukin-4 receptor  $\alpha$  expression on CD4<sup>+</sup> T cells, or macrophages and neutrophils is required for protective immunity to *Trichinella spiralis*. *Immunology*, 2008; 128: 385-394.
- 88.** Mihara M., Erster S., Zaika A., Petrenko O., Chittenden T., Pancoska P., Moll U.M.: p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Molecular Cell*, 2003; 11: 577-590.
- 89.** Min B., Prout M., Hu-Li J., Zhu J., Jankovic D., Morgan E.S., Urban Jr J.F., Dvorak A.M., Finkelman F.D., LeGros G., Paul W.E.: Basophils Produce IL-4 and Accumulate in Tissues after Infection with a Th2-inducing Parasite. *The Journal of Experimental Medicine*, 2004; 200, (4): 507-517.
- 90.** Mitre E., Nutman T.B.: Lack of basophilia in human parasitic infections. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2003; 69: 87-91.
- 91.** Niborski V., Vallée I., Fonseca-Liñán R., Boireau P., Enciso A., Ortega-Pierres G., Yépez-Mulia L.: *Trichinella spiralis*: Stimulation of mast cells by TSL-1 antigens trigger cytokine mRNA expression and release of IL-4 and TNF through an Ig-independent pathway. *Experimental Parasitology*, 2004; 108: 101-108.
- 92.** Niewiadomska K., Pojmańska T., Machnicka B., Czubał A. (red.): *Zarys parazytologii ogólnej*. Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa, 2001.
- 93.** Norberg E., Orrenius S., Zhivitivsky B.: Mitochondrial regulation of cell death: Processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010; 396: 95-100.
- 94.** Opiela J., Kątska-Książkiewicz L.: Rola białek rodziny Bcl-2 w kontroli apoptozy w pęcherzykach jajnikowych. *Biotechnologia*, 2006; 1, (72): 90-96.
- 95.** Ormerod M.G.: *Flow cytometry: A practical approach*. Irpress, Oxford Univ. Press, 1990.
- 96.** van Panhyus N., Prout M., Forbes E., Min B., Paul W.E., Le Gros G.: Basophils are the major producers of IL-4 during primary helminth infection. *The Journal of Immunology*, 2011; 185: 2719-2728.

97. Patel N., Kreider T., Urban Jr. J.F., Gause W.C.: Characterisation of effector mechanisms at the host: parasite interface during the immune response to tissue-dwelling intestinal nematode parasites. *International Journal for Parasitology*, 2009; 39: 13-21.
98. Pawłowski Z.S., Stefaniak J. (red.): *Parazytologia kliniczna w ujęciu wielodyscyplinarnym*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL Warszawa, 2004.
99. Pesce J., Kaviratne M., Ramalingam T.R., Thompson R.W., Urban J.F., Cheever A.W., Young D.A., Collins M., Grusby M.J., Wynn T.A.: The IL-21 receptor augments Th2 effector function and alternative macrophage activation. *The Journal of Clinical Investigation*, 2006; 116: 2044-2055.
100. Pesce J.T., Liu Z., Hamed H., Alem F., Whitmire J., Lin H., Liu Q., Urban Jr J.F., Gause W.C.: Neutrophils clear bacteria associated with parasitic nematodes augmenting the development of an effective Th2-type response. *The Journal of Immunology*, 2008; 180: 464-474.
101. Piekarska J., Michalski A., Szczypka M., Obmińska-Mrukowicz B.: *Trichinella spiralis*: Effect of thymus factor X on apoptosis and necrosis in mice. *Experimental Parasitology*, 2009; 123: 128-133.
102. Piekarska J., Szczypka M., Michalski A., Obmińska-Mrukowicz B., Gorczykowski M.: The effect of immunomodulating drugs on the percentage of apoptotic and necrotic lymphocytes in inflammatory infiltrations in the muscle tissue of mice infected with *Trichinella spiralis*. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2010; 13: 233-240.
103. Piekarska J., Szczypka M., Obmińska-Mrukowicz B., Gorczykowski M.: Effect of phytohaemagglutinin- P on apoptosis and necrosis in *Trichinella spiralis* infected mice. *Veterinary Parasitology*, 2009; 159: 240-244.
104. Pleass R.J., Behnke J.: B-cells get the T-cells but antibodies get the worms. *Trends in Parasitology*, 2009; 25, (10): 443-446.
105. Pozio E.: World distribution of *Trichinella* spp. Infections in animals and humans, *Veterinary Parasitology*, 2007; 149, (1-2): 3-21.
106. Pozio E., Hoberg E., La Rosa G., Zarlenga D.S.: Molecular taxonomy, phylogeny and biogeography of nematodes belonging to the *Trichinella* genus; *Infection, Genetics and Evolution*, 2009; 9: 606-616.
107. Pozio E., Varese P., Gomez Morales M.A., Croppo G.P., Pelliccia D., Bruschi F.: Comparison of human trichinellosis caused by *Trichinella spiralis* and by *Trichinella britovi*; *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1993; 48: 568-575.
108. Pozio E., Zarlenga D.S.: Recent advances on the taxonomy, systematics and epidemiology of *Trichinella*. *International Journal for Parasitology*, 2005; 35: 1191–1204.

- 109.** Rao R.V., Poksay K.S., Castro-Obregon S., Schilling B., Row R.H., del Rio G., Gibson B.W., Ellerbys H.M., Bredesen D.E.: Molecular Components of a Cell Death Pathway Activated by Endoplasmic Reticulum Stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004; 279, (1): 177-187.
- 110.** van Riet E., Hartgers F.C., Yazdanbakhsh M.: Chronic helminth infections induce immunomodulation: Consequences and mechanisms. *Immunobiology*, 2007; 212: 475-490.
- 111.** Robinson M.W., Gare D.C., Connolly B.: Profiling excretory/secretory proteins of *Trichinella spiralis* muscle larvae by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Veterinary Parasitology*, 2005; 132: 37-41.
- 112.** Romaris F., North S.J., Gagliardo L.F., Butcher B.A., Ghosh K., Beiting D.P., Panico M., Arasu P., Dell A., Morris H.R., Appleton J.A.: A putative serine protease among the excretory-secretory glycoproteins of L1 *Trichinella spiralis*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 2002; 122: 149-160.
- 113.** Saenz S.A., Noti M., Artis D.: Innate immune cell populations function as initiators and effectors in Th2 cytokine responses. *Trends in Immunology*, 2010; 31, (11): 407-413.
- 114.** Saenz S.A., Taylor B.C., Artis D.: Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. *Immunological Reviews*, 2008; 226: 172-190.
- 115.** Sakthianandeswaren A., Elso C.M., Simpson K., Curtis J.M., Kumar B., Speed T.P., Handman E., Foote S.J.: The wound repair response controls outcome to cutaneous leishmaniasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005; 102, (43): 15551-15556.
- 116.** Scales H.E., Ierna M.X., Lawrence C.E.: The role of IL-4, IL-13 and IL-4R $\alpha$  in the development of protective and pathological responses to *Trichinella spiralis*. *Parasite Immunology*, 2007; 29, (2): 81-91.
- 117.** de Schoolmeester M.L., Little M.C., Rollins B.J., Else K.J.: Absence of CC chemokine ligand 2 results in an altered Th1/Th2 cytokine balance and failure to expel *Trichuris muris* infection. *The Journal of Immunology*, 2003; 170: 4693-4700.
- 118.** Shamri R., Xenakis J.J., Spencer L.A.: Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell and Tissue Research*, 2011; 343: 57-83.
- 119.** Shin K., Watts G.F.M., Oettgen H.C., Friend D.S., Pemberton A.D., Gurish M.F., Lee D.M.: Mouse Mast Cell Tryptase mMCP-6 Is a Critical Link between Adaptive and Innate Immunity in the Chronic Phase of *Trichinella spiralis* Infection. *The Journal of Immunology*, 2008; 180, (7): 4885-4891.
- 120.** Smolewski P., Grzybowska O.: Regulacja procesu apoptozy komórek w celach terapeutycznych – dotychczasowe doświadczenia i perspektywy rozwoju. *Acta Haematologica Polonica*, 2002; 33, (4): 393-401.

121. Stadnyk A.W., Dollard C.D., Issekutz A.C.: Neutrophil migration stimulates rat intestinal epithelial cell cytokine expression during helminth infection. *Journal of Leukocyte Biology*, 2000; 68: 821-827.
122. Stępień A., Izdebska M., Grzanka A.: Rodzaje śmierci komórki; *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* (online), 2007; 61: 420-428.
123. Summers C., Rankin S.M., Condliffe A.M., Singh N., Peters A.M., Chilvers E.R.: Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in Immunology*, 2010; 31: 318-324.
124. Suzuki T., Sasaki T., Takagi H., Sato K., Ueda K.: The effectors responsible for gastrointestinal nematode parasites, *Trichinella spiralis*, expulsion in rats. *Parasitology Research*, 2008; 103, (6): 1289-1295.
125. Tacchini-Cottier F., Zweifel C., Belkaid Y., Mukankundiye C., Vasei M., Launois P., Milon G., Louis J.A.: An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4<sup>+</sup> Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *The Journal of Immunology*, 2000; 165: 2628-2636.
126. Tato P., Fernandez A.M., Solano S., Borgonoi V., Garrido E., Sepulveda J., Molinari J.L.: A cysteine protease from *Taenia solium* metacestodes induce apoptosis in human CD4<sup>+</sup> T- cells. *Parasitology Research*, 2004; 92: 197-204.
127. Taylor B.C., Zaph C., Troy A.E., Du Y., Guild K.J., Comeau M.R., Artis D.: TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. *The Journal of Experimental Medicine*, 2009; 206, (16): 655-667.
128. Terrazas C.A., Terrazas L.I., Gómez-García L.: Modulation of dendritic cell responses by parasites: A common strategy to survive. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010; article ID 357106.
129. Urban J.F.Jr, Schopf L., Morris S.C., Orekhova T., Madden K.B., Betts C.J., Gamble H.R., Byrd C., Donaldson D., Else K., Finkelman F.D.: Stat6 signaling promotes protective immunity against *Trichinella spiralis* through a mast cell- and T cell-dependent mechanism. *The Journal of Immunology*, 2000; 164: 2064-2052.
130. Valet G.: Past and present concepts in flow cytometry: a european perspective. *Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents*, 2003; 17: 213-222.
131. Venugopal P.G., Nutman T.B., Semnani R.T.: Activation and regulation of Toll-Like Receptors (TLRs) by helminth parasites. *Immunology Research*, 2009; 43: 252-263.
132. Viau M., Zouali M.: B-lymphocytes, innate immunity, and autoimmunity. *Clinical Immunology*, 2005; 114, (1): 17-28.
133. Voehringer D.: The role of basophils in helminth infection. *Trends in Parasitology*, 2009; 25, (12): 551-556.
134. Wang Z.-B., Liu Y.-Q., Cui Y.-F.: Pathways to caspase activation. *Cell Biology International*, 2005; 29: 489-496.

- 135.** Watanabe K., Noda K., Hamano S., Koga M., Kishihara K., Nomoto K., Tada I.: The crucial role of granulocytes in the early host defense against *Strongyloides ratti* infection in mice. *Parasitology Research*, 2000; 86: 188-193.
- 136.** Watanabe N., Bruschi F., Korenaga M.: IgE: a question of protective immunity in *Trichinella spiralis* infection. *Trends in Parasitology*, 2005; 21, (4): 175-178.
- 137.** Wędrychowicz H.: Sposoby unikania skutków odpowiedzi immunologicznej żywiciela wykorzystywane przez pasożyty. *Kosmos. Problemy Nauk Biologicznych*, 2005; 54, (1): 39-48.
- 138.** Witko-Sarsat V., Pederzoli-Ribeil M., Hirsh E., Sozzani S., Cassatella M.A.: Regulating neutrophil apoptosis: new players enter the game. *Trends in Immunology*, 2011; 32, (3): 117-124.
- 139.** Wu Z., Nagano I., Boonmars T., Takahashi Y.: Tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis in *Trichinella spiralis*-infected muscle cells. *Parasitology*, 2005; 131: 373-381.
- 140.** Wu Z., Nagano I., Nakada T., Takahashi Y.: Expression of excretory and secretory protein genes of *Trichinella* at muscle stage differs before and after cyst formation. *Parasitology International*, 2002; 51: 155-161.
- 141.** Wu Z., Sofronic-Milosavljevic L., Nagano I., Takahashi Y.: *Trichinella spiralis*: nurse cell formation with emphasis on analogy to muscle cell repair. *Parasites & Vectors*, 2008; 1, (27): 1-14.
- 142.** Yépez-Mulia L., Hernández-Bello R., Arizmendi-Puga N., Fonseca-Liñán R., Ortega-Pierres G.: Contributions to the study of *Trichinella spiralis* TSL-1 antigens in host immunity. *Parasite Immunology*, 2007; 29, (12): 661-670.
- 143.** Yépez-Mulia L., Montaña- Escalona C., Fonseca-Liñán R., Muñoz-Cruz S., Arizmendi-Puga N., Boireau P., Ortega-Pierres G.: Differential activation of mast cells by antigens from *Trichinella spiralis* muscle larvae, adults, and newborn larvae. *Veterinary Parasitology*, 2009; 159: 253-257.
- 144.** Yeretssian G., Labbé K., Saleh M.: Molecular regulation of inflammation and cell death. *Cytokine*, 2008; 43: 380-390.
- 145.** Zacccone P., Burton O.T., Cooke A.: Interplay of parasite-driven immune responses and autoimmunity. *Trends in Parasitology*, 2008; 24, (1): 35-42.
- 146.** Zepeda N., Solano S., Copitin N., Fernandez A.M., Hernandez L., Tato P., Molinari J.L.: Decrease of peritoneal inflammatory CD4+, CD8+, CD19+ lymphocytes and apoptosis of eosinophils in a murine *Taenia crassiceps* infection. *Parasitology Research*, 2010; 107: 1129-1135.
- 147.** Ziegler S.F., Artis D.: Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity. *Nature Immunology*, 2010; 11: 289-293.



- 148.** de Veer M.J., Kemp J.M., Meeusen E.N.T.: The innate host defence against nematode parasites. *Parasite Immunology*, 2006; 29, (1): 1-9.
- 149.** Żeromski J., Dworacki G.: Ocena immunofenotypu komórek limfoidalnych przy pomocy cystometrii przepływowej- uwagi praktyczne i zastosowania kliniczne. *Central European Journal of Immunology*, 1996; 21: 99-106.
- 150.** Żolnierczyk J.D., Kiliańska Z.M.: Main pro-apoptotic member of Bcl-2 family proteins- Bax. *Folia Biologica et Oecologia*, 2010; 6: 5-32.

## **12. ANEKS**

Aneks zawiera tabele z danymi uzyskanymi podczas badania z podziałem na gatunek włośnia krętego i rodzaj badanych komórek. Tabele zawierają dane z uwzględnieniem czasu inkubacji, liczby dodanych larw pasożyta, uzyskanych wartości średnich, minimum, maksimum, mediany i odchylenia standardowego.

Tabela 5

<i>Trichinella spiralis</i>									
Komórki	Sposób utrwalenia larw	Liczba larw pasożytów	Czas	Liczba prób	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Odch.stand.
Limfocyty apoptotyczne	Świeże	0	1h	26	0,8	0,6	0,0	3,2	0,8
			3h	26	0,6	0,5	0,0	2,7	0,7
			24h	5	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
		1	1h	6	2,6	2,3	0,6	6,0	1,9
			3h	6	3,8	2,5	0,4	10,0	3,5
			24h	6	3,6	2,7	1,7	8,6	2,6
		10	1h	6	3,0	2,3	0,2	6,7	2,4
			3h	6	4,6	3,9	0,6	11,6	4,1
			24h	5	2,5	2,6	1,6	3,4	0,7
		100	1h	26	3,0	3,0	0,6	5,9	1,4
			3h	26	3,3	2,8	0,5	7,0	1,7
			24h	5	5,9	3,3	2,8	11,3	4,0
	Zamrożone	0	1h	31	1,0	0,6	0,0	3,9	1,0
			3h	31	1,1	0,6	0,0	5,3	1,3
		100	1h	35	1,5	1,1	0,0	7,5	1,7
			3h	35	1,7	1,3	0,1	7,1	1,5
	Alkohol	0	1h	30	1,0	0,9	0,0	3,9	1,0
			3h	30	1,2	0,6	0,0	5,3	1,4
		100	1h	34	1,2	0,8	0,0	4,5	1,2
			3h	34	1,9	0,8	0,0	9,2	2,2

Tabela 6

<i>Trichinella spiralis</i>										
Komórki	Sposób utrwalenia larw	Liczba pasożytów	Czas	Liczba prób	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Odch.stand.	
Granulocyty apoptotyczne	Świeże	0	1h	26	9,1	8,1	0,0	35,6	8,5	
			3h	26	6,1	6,0	0,0	23,0	5,4	
		1	1h	5	57,0	61,6	24,5	84,8	23,1	
			3h	5	53,5	50,6	31,5	71,7	15,8	
		10	1h	5	64,3	70,3	36,0	89,1	22,0	
			3h	5	56,3	58,8	16,1	79,4	24,8	
		100	1h	25	20,7	16,1	1,1	75,6	18,6	
			3h	25	22,4	13,7	0,9	84,9	21,4	
		Zamrożone	0	1h	26	21,4	10,5	0,1	65,9	23,0
				3h	26	14,3	9,4	0,3	46,9	14,0
			100	1h	35	15,4	8,5	0,0	66,1	18,0
				3h	35	13,6	9,6	0,6	37,3	10,8
	Alkohol	0	1h	33	22,9	12,0	0,1	65,9	24,4	
			3h	33	14,1	10,1	0,1	46,9	13,3	
		100	1h	34	19,8	14,0	0,5	73,2	21,7	
			3h	34	12,1	10,8	0,7	28,5	8,4	

Tabela 7

<i>Trichinella britovi</i>									
Komórki	Sposób utrwalenia larw	Liczba pasożytów	Czas	Liczba prób	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Odch.stand.
Limfocyty apoptotyczne	Świeże	0	1h	8	1,2	0	0	6,4	2,4
			3h	8	0,7	0	0	4,2	1,5
			24h	5	0	0	0	0,1	0
		1	1h	8	5,3	3,6	0,3	12,9	4,5
			3h	8	5,3	5,9	0,2	10,8	3,2
			24h	6	3,9	3,1	1,7	10,0	3,1
		10	1h	8	6,2	5,4	0,2	13,1	4,9
			3h	8	5,4	4,3	1,1	11,7	3,9
			24h	5	2,7	2,3	0,8	4,5	1,4
		100	1h	8	6,1	4,3	0,1	14,9	5,5
			3h	8	4,2	4,3	0	7,5	2,1
			24h	5	5,7	5,7	2,2	10,9	3,5
	Zamrożone	0	1h	23	1,2	1	0,1	3,9	1,1
			3h	23	1,3	0,5	0	5,3	1,5
		100	1h	27	1,4	1,3	0	4,9	1,3
			3h	27	2,3	1,1	0	10,4	2,8
	Alkohol	0	1h	10	1,9	1,8	0,1	3,9	1,2
			3h	10	1,9	1,8	0	5,3	1,8
		100	1h	14	1,6	1,4	0	3,9	1,4
			3h	14	2,5	1,3	0,1	8,0	2,8

Tabela 8

<i>Trichinella britovi</i>										
Komórki	Sposób utrwalenia larw	Liczba pasożytów	Czas	Liczba prób	Średnia	Mediana	Minimum	Maksimum	Odch.stand.	
Granulocyty apoptotyczne	Świeże	0	1h	6	0,1	0,0	0,0	0,2	0,1	
			3h	6	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	
		1	1h	7	69,0	77,3	34,3	85,0	18,6	
			3h	7	60,7	57,5	43,9	81,3	15,0	
		10	1h	7	71,5	77,3	48,0	81,6	12,5	
			3h	7	58,9	59,4	20,8	90,0	22,7	
		100	1h	7	69,7	77,3	24,8	90,8	22,4	
			3h	7	62,0	58,0	37,0	90,4	17,6	
		Zamrożone	0	1h	24	24,1	14,6	0,2	65,9	22,4
				3h	24	16,1	11,6	0,1	46,9	13,5
			100	1h	27	20,8	17,2	0,5	63,3	20,8
				3h	27	21,0	20,2	1,0	50,7	13,6
	Alkohol	0	1h	11	31,1	29,8	1,9	62,9	18,6	
			3h	11	25,3	27,3	10,1	46,9	11,6	
		100	1h	14	26,7	26,5	0,9	63,3	22,4	
			3h	14	22,9	22,6	12,4	37,3	7,8	