

Antygeny powierzchniowe nicieni i ich rola w układzie pasożyt-żywiciel*)

Katedra Parazytologii i Chorób Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego SGGW, Grochowska 272, 03-849 Warszawa

Nicienie posiadają biologicznie niezwykłą okrywą ciała. Dominującą jej cechą jest obecność kutikuli – bogatej w kolageny pozakomórkowej „matrix” pełniącej funkcję szkieletu zewnętrznego. Kutikula ma grubość ok. 1 μm , zbudowana jest z 4 grup białek: warstwę najbardziej zewnętrzną tworzą białka lub glikoproteidy rozpuszczalne w buforach, słabo zasocjowane z powierzchnią kutikuli, odpowiedzialne za funkcje dynamiczne kutikuli i będące źródłem antygenów powierzchniowych. Kolejną grupę stanowią białka silnie zintegrowane z błonami, rozpuszczalne w detergentach. Dominującym składnikiem kutikuli są białka kolagenowe lub kolagenopodobne, rozpuszczalne w beta-merkaptioetanolu, tworzące włóknistą strefę złożoną z 3 warstw włókien. Czwartą, praktycznie nierozpuszczalną grupę białek, tworzy kutikulina i białka kutikulinopodobne (3, 32).

W oddziaływaniach pasożyt-żywiciel najważniejszą rolę pełnią białka grupy pierwszej, rozpuszczalne w roztworach wodnych tzw. białka powierzchniowe mimo, iż ilościowo stanowią najmniejszy odsetek protein kutikularnych. Ekspresja białek powierzchniowych może być regulowana warunkami mikrośrodowiskowymi i jest w dużym stopniu gatunkowo- oraz stadiowo swoista (6, 19, 23). Wcześniejsze badania przeprowadzone nad antygenami nicieni z grupy filarii (9, 21) wskazywały na istotność tych białek ze względu na położenie na styku pasożyt-żywiciel, ich dynamiczny charakter i immunogenność oraz sugerowały ich przydatność w immunoprewencji i diagnostyce.

Białka powierzchniowe mogą być syntetyzowane przez epidermę (hypodermę) a następnie transportowane przez matrix kutikularną na powierzchnię (15, 16) jak również mogą być syntetyzowane w gruczołach sekrecyjnych (11, 13). Powierzchnia nicieni bogata jest również w antyenzymy w postaci swoistych inhibitorów. Przykładowo, na powierzchni larw filarii obecne jest białko o masie cząsteczkowej 15 kDa i sekwencji aminokwasów przypominającej sekwencje inhibitorów proteaz z grupy cystatyn (10), którego funkcja zdaje się polegać na

regulowaniu aktywności proteinaz cysteinowych pasożyta biorących udział w procesie linienia.

Ważnymi z weterynaryjnego punktu widzenia pasożytami są nicienie żołądkowo-jelitowe przeżuwaczy, zwłaszcza owiec. Do najczęściej spotykanych i najbardziej patogennych gatunków należą *Ostertagia (Teladorsagia) circumcincta* oraz *Haemonchus contortus*. Wyniki badań przeprowadzonych nad białkami powierzchniowymi wolnożyjących larw inwazyjnych (L3) oraz larw L4 i dorosłych nicieni pasożytujących w trawieńcu *O. circumcincta* wykazały, że białka te są bardzo zróżnicowane pod względem fizyko-chemicznym (23) i mogą być źródłem zarówno antygenów ochronnych, uodparniających żywiciela na ponowną inwazję jak i antygenów „zasłony dymnej” wzbudzających odpowiedź immunologiczną żywiciela nieszkodliwą dla pasożyta (22, 26, 28). Odpowiedź humoralna przeciwko tym antygenom okazała się być stadiowo swoista i realizowana była zarówno przez przeciwciała obwodowe klasy IgM, IgG, IgA jak i lokalną odpowiedź błon śluzowych reprezentowaną przez swoiste dla tych antygenów S-IgA oraz S-IgM. Odpowiedź immunologiczna 5 miesięcznych jagniąt na antygeny powierzchniowe L3 *O. circumcincta* wzbudzające swoiste S-IgA miała charakter protekcyjny (ochronny). U jagniąt immunizowanych przez dwukrotne podskórne podanie tych antygenów w dawce 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ masy ciała a następnie zarażonych 50 000 L3 tego nicienia rozwinęło się o 72% mniej dorosłych nicieni niż u zwierząt kontrolnych (28). Przeciwciała surowicy, żółci i śluzówki trawieńca uzyskane w 21 dniu po podaniu dawki challenge od jagniąt immunizowanych i kontrolnych reagowały odmiennie w testach Western-blottingu z białkami powierzchniowymi L3. Surowicze IgG zwierząt uodpornionych rozpoznawały mniej antygenów powierzchniowych niż IgG jagniąt nie wykazujących odporności. Większa liczba antygenów powierzchniowych rozpoznawanych przez IgG jagniąt wrażliwych na inwazję *O. circumcincta* sugeruje, że część białek powierzchniowych L3 tego nicienia pełni rolę antygenów „zasłony dymnej”. Natomiast jagnięta odporne na inwazję posiadały w żółci przeciwciała S-IgA rozpoznające polipeptydy 23 i 56 kDa (ryc. 1). Antygeny te nie były glikozylowane (23, 27, 28). Obserwo-

*) Badania antygenów powierzchniowych *U. stenocephala* i *A. ceylanicum* finansowane były częściowo z grantu KBN: 5 P06K 025 08



Ryc. 1. Immunofluorescencja przedniego odcinka larwy L3 *Ostertagia circumcincta* po inkubacji w roztworze przeciwciał S-IgA z żółci jagniąt odpornych na inwazję tego nicienia

wano, że przeciwciała te mogą hamować penetrację larw inwazyjnych do gruczołów żołądkowych. Przeciwciała S-IgA z trawieńca odpornych owiec blokowały również enzymy niezbędne do odżywiania nicienia oraz hamowały wzrost i przeobrażenia tego pasożyta. W badaniach *in vitro* obserwowano hamowanie ruchliwości nicieni przez lokalnie produkowane przeciwciała jak również uszkodzenia organów wewnętrznych i kutikuli dorosłych nicieni.

Badania antygenów powierzchniowych larw L4 i dorosłych nicieni (26) wykazały, że w czasie immunizacji podskórnej tymi antygenami wzbudzana jest wysoka odpowiedź w klasie IgG. Znacząca odpowiedź przeciwciał klasy IgA pojawiła się u immunizowanych owiec dopiero po zarażeniu. Badania metodą Western blottingu, przy użyciu biotynowanych powierzchniowo larw i surowic jagniąt immunizowanych antygenami powierzchniowymi tych larw wykazały, że 8 polipeptydów powierzchniowych L4 było uwalniane do środowiska. Analiza wykonana z użyciem podobnie znakowanych dorosłych nicieni oraz surowic od jagniąt immunizowanych antygenami powierzchniowymi tego stadium rozwojowego wykazała, że tylko jeden antygen powierzchniowy (63 kDa), rozpoznawany przez surowice immunizowanych zwierząt, jest zrzucany do środowiska (27).

Do głównych sposobów wykorzystywanych przez nicienie do unikania efektów reakcji obronnej żywiciela należą: wytwarzanie i uwalnianie do organizmu żywiciela stadiowo-swoistych immunodominujących antygenów powierzchniowych, szybka wymiana i odnowa głównych antygenów powierzchniowych oraz ekspresja antygenów indukujących odpowiedź immunologiczną żywiciela mało szkodliwą dla pasożyta. Z przytoczonych danych wynika, że przeważająca część antygenów powierzchniowych *O. circumcincta* jest wykorzystywana do czynnej ochrony pasożyta przed reakcją obronną żywiciela zaś jedynie niektóre są na tyle istotne dla

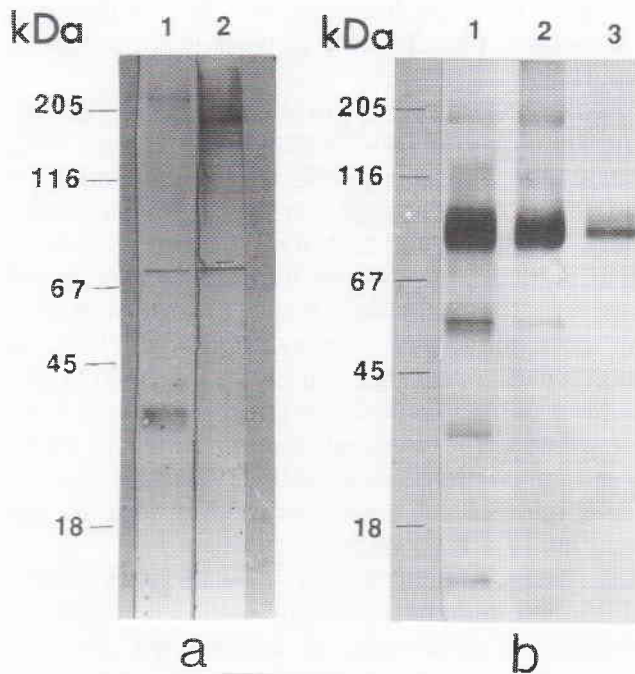
fizjologii i rozwoju nicienia, że ich zablokowanie przez swoiste przeciwciała powoduje ograniczenie inwazji.

Również badania przeprowadzone nad antygenami powierzchniowymi larw inwazyjnych *H. contortus* wykazały, że białka te pełnią wielorakie funkcje w układzie pasożyt-żywiciel. Antygeny powierzchniowe larw inwazyjnych i dorosłych nicieni wzbudzają bardzo wyraźną odpowiedź humoralną zarażonych owiec (18, 20). Ashman i wsp. (1) obserwował *in vitro* zrzucanie białek powierzchniowych larw inwazyjnych *H. contortus* o c.cząst. 90-70 kDa pod wpływem swoistych przeciwciał żywiciela. Z kolei Jacobs i wsp. (7) wykazał, że immunizacja owiec antygenami powierzchniowymi L3 *H. contortus* może spowodować ich częściową odporność na ponowną inwazję tego nicienia.

Inną grupę nicieni ważną z weterynaryjnego i medycznego punktu widzenia stanowią tęgoryjce (*Ancylostoma duodenale*, *A. ceylanicum*, *A. caninum*, *Necator americanus* oraz *Uncinaria stenocephala*). Z badań nad antygenami powierzchniowymi tęgoryjców pasożytujących u ludzi (*Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*) wynika, że białka te odgrywają kluczową rolę w mechanizmach umożliwiających chroniczne inwazje tych nicieni (17). *Uncinaria stenocephala* jest krwiopijnym nicieniem szeroko rozpowszechnionym u psów w Polsce (5, 14). Larwy L3 tego nicienia mogą czynnie penetrować skórę żywiciela bądź dostają się bezpośrednio do jelita wraz z pokarmem. Inwazje *U. stenocephala* wywołują anemię, eozynofilię, a w przypadku powtórnych zarażeń miejscowe zmiany skórne o charakterze uczuleniowym. Mimo powszechności występowania, brak było informacji na temat antygenów powierzchniowych tego nicienia. Badania przeprowadzone ostatnio w ramach grantu KBN (5 PO6K 025 08) pozwalają na częściową charakterystykę roli antygenów powierzchniowych larw inwazyjnych tego nicienia. Metodami Western blottingu i immunofluorescencji ustaliliśmy, że białka powierzchni-



Ryc. 2. Immunofluorescencja powierzchni L3 *Uncinaria stenocephala* po inkubacji w roztworze przeciwciał IgG z surowicy psów eksperymentalnie zarażonych tym pasożytem



Ryc. 3. Wyniki analizy białek powierzchniowych L3

U. stenocephala metodą Western blottingu; a – polipeptydy powierzchniowe rozpoznawane przez surowice psów eksperymentalnie zarażonych (ścieżka 1) oraz psów nie zarażonych (ścieżka 2); b – polipeptydy powierzchniowe znakowane biotyną uzyskiwane z larw bezpośrednio po znakowaniu (ścieżka 1); oraz po 24 godzinnej inkubacji w wodzie destylowanej (ścieżka 2) lub rozcieńczonej 500x surowicy psów eksperymentalnie zarażonych

we larw inwazyjnych wzbudzają odpowiedź humoralną psów zarażonych tym nicieniem (ryc. 2 i 3a) przy czym kilka polipeptydów powierzchniowych było rozpoznawanych przez IgG z surowic psów nie wydalających jaj tego nicienia. W badaniach *in vitro* stwierdziliśmy, że większość białek powierzchniowych L3 *U. stenocephala* jest uwalniana do środowiska (ryc. 3b). Proces ten zachodził intensywniej gdy larwy umieszczono w roztworach zawierających surowicę psów eksperymentalnie zarażonych *U. stenocephala*. Zrzucanie białek powierzchniowych zanikało w obecności inhibitora oddychania komórkowego (azydek sodu) co sugeruje, że wymiana antygenów powierzchniowych jest aktywnym procesem metabolicznym. Z dużą dozą prawdopodobieństwa można wnioskować, że uwalnianie antygenów powierzchniowych jest sposobem na unikanie skutków odpowiedzi immunologicznej żywiciela poprzez zrzucanie kompleksów antygen–przeciwciała. Zaobserwowano, że cukry obecne w glikoproteinach powierzchniowych nicieni ułatwiają im zrzucanie z antygenów powierzchniowych (1). Wyniki uzyskane po znakowaniu powierzchni larw inwazyjnych *U. stenocephala* hydrazydkiem biotyny (reagującym wybiórczo z resztami węglowodanowymi), sugerowały, że wiele białek powierzchniowych L3 jest glikozylowanych. Dalsze badania tych glikoproteinów przy użyciu znakowanych fluoresceiną lektyn wykazały, że z białkami związane są reszty galaktosylowe, N-actylo-D-glukozyminy jak również mannozy

(31). Dynamiczny charakter białek powierzchniowych *U. stenocephala* stwierdziliśmy również *in vivo* izolując larwy tego nicienia z tkanek żywiciela w odstępach 24 godz. i porównując skład polipeptydów powierzchniowych. Zaobserwowaliśmy, że w trakcie penetracji tkanek żywiciela larwy *U. stenocephala* zmieniają ekspresję białek powierzchniowych w ciągu kilkudziesięciu godzin po inwazji. Zanikają wtedy częściowo antygeny typowe dla larw L3 wolnożyjących a pojawiają się nowe. W czasie migracji przez skórę najsilniej ekspozowane były na powierzchni pasożytniczych L3 *U. stenocephala* białka o masie cząst. 166, 124, 68, 48 i 19 kDa. Podobne wyniki uzyskano badając białka powierzchniowe larw inwazyjnych (L3) *A. ceylanicum*. Migrujące przez skórę larwy L3 tego nicienia również ekspozowały na powierzchni 7-8 nowych polipeptydów, zanikała zaś ekspresja części białek charakterystycznych dla L3 wolnożyjących (25).

Należy podkreślić, że w trakcie realizacji cyklu życiowego larwy tęgoryjców (pasożytnicze L3) spędzają dłuższy lub krótszy czas w tkankach żywiciela jako larwy drzemiące. Dotychczas nie wiadomo w jaki sposób larwy drzemiące unikają zniszczenia przez odpowiedź immunologiczną żywiciela. Jednym z możliwych mechanizmów *in vivo* mogłaby być zmiana w ekspresji antygenów powierzchniowych zaś drugim zrzucanie kompleksów antygen–przeciwciała. Wstępne badania *in vitro* wskazują, że larwy L3 tęgoryjców są atakowane przez eozynofile zarażonych żywicieli przy czym reakcja tych komórek pochodzących od żywicieli odpornych jest znacznie silniejsza (2). Szybkie zrzucanie antygenów powierzchniowych przez larwy może powodować usuwanie eozynofiliów z powierzchni pasożyta a w konsekwencji uniemożliwiać pasożytoobójcze działanie tych komórek.

Do nicieni posiadających stadium larwy drzemiącej należą również glisty, pasożytujące u ptaków i ssaków. Najbardziej szczegółowo poznane zostały białka i antygeny powierzchniowe larw glisty psiej, *Toxocara canis*. Okazało się, że białka powierzchniowe i kutikularne tych larw mogą podlegać bardzo szybkim zmianom. Maizels i wsp. (12) na podstawie badań *in vitro* obliczyli, że w ciągu godziny wymienianych jest ponad 25% białek powierzchniowych larw *T. canis*. Białka powierzchniowe tych larw są silnie immunogenne dla żywiciela lecz przeciwciała związane z powierzchnią larw są gwałtownie zrzucane. Podobnie jak w przypadku larw *U. stenocephala*, białka powierzchniowe glisty psiej są silnie glikozylowane a proces zrzucania antygenów powierzchniowych jest hamowany przez inhibitory oddychania komórkowego. Larwy tego nicienia uwalniają się również od eozynofiliów żywiciela (11).

Podsumowując można stwierdzić, że antygeny powierzchniowe, stanowiące bardzo niewielki odsetek białek nicieni, pełnią kluczową rolę w oddziaływa-

niach żywiciel-pasożyt. Są silnymi immunogenami, pobudzającymi organizm żywiciela do lokalnej i systemowej odpowiedzi humoralnej i komórkowej. Jednakże jedynie nieliczne z nich wzbudzają odporność zabezpieczającą żywiciela przed ponowną inwazją. Są to w większości antygeny „zasłony dynamicznej” pozwalające nicieniowi uniknąć uszkodzeń przez mechanizmy efektorowe odpowiedzi immunologicznej żywiciela.

Piśmiennictwo

- Ashman K., Mather J., Wiltshire C., Jacobs H. J., Meeusen E.: *Mol. Biochem. Parasitol.*, 70, 175, 1995.
- Bambara O. D.: *Mat. X Kongr. PTNW, Wrocław* 2, 254, 1996.
- Blaxter M. L.: *J. Biol. Chem.* 268, 6600, 1993.
- Boisvenue R. J., Stiff M. I., Tonkinson L. V., Cox G. N.: *Parasite Immunol.* 13, 227, 1991.
- Górski P., Badowska M., Wędrychowicz H.: *Wiad. Parazyt.* 42, 221, 1996.
- Górski P., Wędrychowicz H., Krawiec M., Behnke J. M.: *Mat. BSP Spring Meeting, Edynburg* 1995, s. 66.
- Jacobs H. J., Ashman K., Meeusen E.: *Vet. Immunol. Immunopathol.* 48, 323, 1995.
- Keith K. A., Duncan M. C., Murray M., Bairden K., Tait A.: *Int. J. Parasitol.* 20, 1037, 1990.
- Lustigman S., Huima T., Brotman B., Miller K., Prince A.: *Exp. Parasit.* 71, 489, 1990.
- Lustigman S.: *Parasitol. Today* 9, 294, 1993.
- Maizels R. M., Page A. P.: *Acta Tropica* 47, 355, 1992.
- Maizels R. M., Savigny D., Ogilvie B. M.: *Parasite Immunol.* 6, 23, 1984.
- McLaren D. J., Ortega-Pierres G., Parkhouse R. M. E.: *Parasitology* 94, 101, 1987.
- Okulewicz A., Złotorzycka J., Czulowska A.: *Wiad. Parazyt.* 40, 293, 1994.
- Page A. P., Blaxter M. L., Rudin W., Maizels R. M.: *Exp. Parasitol.* 75, 72, 1992a.
- Page A. P., Hamilton A. J., Maizels R. M.: *Exp. Parasitol.* 75, 65, 1992b.
- Pritchard D. I.: *Parasitol. Today* 11, 255, 1995.
- Raleigh J. M., Brandon M. R., Meeusen E.: *Parasite Immunol.* 18, 125, 1996.
- Rhoads M. L., Fetterer R. H.: *J. Parasitol.* 80, 756, 1994.
- Schallig H., Bączkowska A., Wędrychowicz H.: *Acta parasitol.* 40, 217, 1995.
- Selkirk M. E., Gregory W. F., Yazdanbakhsh M., Jenkins R. E., Maizels R. M.: *Mol. Biochem. Parasitol.* 42, 31, 1990.
- Wędrychowicz H., Tait A., Bairden K., Holmes P. H.: *Parasite Immunol.* 14, 249, 1992.
- Wędrychowicz H.: *Acta Parasitol.* 39, 46, 1994.
- Wędrychowicz H., Badowska M., Górski P., Behnke J. M.: *Mat. ICOPA VIII, Izmir* 1994, s. 169.
- Wędrychowicz H., Górski P., Behnke J. M.: *Mat. BSP Spring Meet., Bath, UK*, 1994.
- Wędrychowicz H., Holmes P. H., Bairden K., Tait A.: *Vet. Parasitol.* 53, 117, 1994.
- Wędrychowicz H., Holmes P. H., Tait A.: *Acta Parasitol.* 39, 162, 1994.
- Wędrychowicz H., Bairden K., Dunlop E., Holmes P. H., Tait A.: *Int. J. Parasit.* 25, 1111, 1995.
- Wędrychowicz H., Kofta W., Górski P., Behnke J. M.: *Mat. BSP Spring Meet., Bangor*, 1996, s. 56.
- Wędrychowicz H., Orzeł A., Romanik I., Behnke J. M.: *Acta Parasitol.* 41, 43, 1996.
- Wędrychowicz H., Górski P., Behnke J. M.: *Int. J. Parasit.* (w druku).
- Wright K. A.: *J. Parasitol.* 73, 1077, 1987.

Adres autora: prof. dr hab. Halina Wędrychowicz, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

TADEUSZ FRYMUS

artykuł przeglądowy

Epizootiologia i możliwości zwalczania zakaźnego zapalenia otrzewnej kotów (FIP)

Katedra Epizootologii z Kliniką Chorób Zakaźnych Wydziału Weterynaryjnego SGGW, ul. Grochowska 272, 03-849 Warszawa

Infekcja koronawirusem kotów jest jednym z ważniejszych problemów zakaźnych tego gatunku zwierząt. Zarazek jest bardzo rozpowszechniony w populacji kotów domowych, o czym świadczą przeciwciała przeciw niemu obecne u kilkudziesięciu procent osobników. Infekcja ta występuje również w Polsce (6, 7, 11), stanowiąc z jednej strony bardzo trudny problem dla lekarzy weterynarii i właścicieli zwierząt, a z drugiej – fascynujące i pod wieloma względami nietypowe zjawisko biologiczne. Zakażenie dotyczy początkowo przewodu pokarmowego, może jednak doprowadzić do ciężkiej, nieuleczalnej choroby obejmującej wiele układów i narządów. Jedną z takich postaci jest zakaźne zapalenie otrzewnej (feline infectious peritonitis – FIP) znane od lat pięćdziesiątych naszego stulecia. Zachorowalność nie jest bardzo duża, jednak choroba ta niechybnie

proceeds to death. It is estimated that among adult domestic cats living individually or in pairs, one case of FIP occurs for every 5000 animals, but in larger groupings of animals the mortality rate can reach up to 5% (12). In such outbreaks FIP runs enzootically, that is, it is characterized by a long period of latency without new infections. Although in natural outbreaks FIP is very contagious, in natural outbreaks it rarely leads to an epidemic. It is difficult to explain this fact, and it is also interesting that FIP also occurs in cats kept in strict isolation. Epidemiological studies have confirmed that FIP occurs frequently in objects in which it never occurred before, just as in those known in the past.