

pt.: „*Trichinella britovi* jako potencjalny czynnik zachorowań ludzi na włośnicę- porównanie profili białkowych stadiów rozwojowych *T. britovi* z wykorzystaniem technik z zakresu proteomiki oraz wskazanie białek o potencjale immunodiagnostycznym”

STRESZCZENIE

1. Cel prowadzonych badań

Włośnica jest pasożytniczą chorobą odzwierzęcą powodowaną przez nicienie z rodzaju *Trichinella*. Zараżenie człowieka następuje przez spożycie niedogotowanego lub półsurowego mięsa wieprzowego lub koniny, a także półsurowych przetworów z dzika zawierających inwazyjne larwy mięśniowe. *T. spiralis* jest gatunkiem najbardziej patogennym dla człowieka i głównym czynnikiem etiologicznym większości przypadków włośnicy u ludzi. Dane epidemiologiczne potwierdzają w ostatnich latach wzrost zachorowań powodowanych gatunkiem *T. britovi* lub inwazji mieszanych.

Pomimo występowania różnic w objawach klinicznych u pacjentów zarażonych różnymi gatunkami włośni, nie jest jednak możliwe przypisanie ich do konkretnego gatunku nicieni. Dobór odpowiedniego leczenia pacjentów u których stwierdzono włośnicę jest niezwykle trudny. Dlatego też takie czynniki jak określenie gatunku *Trichinella*, intensywności inwazji, czas (długość) jej trwania, odpowiedź immunologiczna ze strony gospodarza są niezwykle ważne w ustaleniu właściwego leczenia.

Ze względu na wykazującą tendencje wzrostową zarażenia populacji dzików w Polsce włośniami z gatunku *T. britovi* i występowanie inwazji o niskiej intensywności zarażenia, które tradycyjnymi metodami stają się trudniej wykrywalne istnieje konieczność podjęcia badań nad nową, skuteczną metodą diagnostyczną. Projekt skierowanych będzie na poznanie i scharakteryzowanie białek wytwarzanych przez trzy stadia rozwojowe *T. britovi*, na które działanie organizm żywicielski jest narażony.

W cyklu rozwojowym *T. britovi* wyróżniamy postacie dojrzałe samce i samice, oraz postacie larwalne wśród których należy wymienić larwę nowo urodzoną oraz larwę otorbioną. Wszystkie stadia rozwojowe *T. britovi* rozwijają się w ciele jednego żywiciela. Każde z wymienionych stadiów produkuje immunogenne białka/antygeny, które zapoczątkowują łańcuch zjawisk prowadzących do rozwoju odpowiedzi immunologicznej ze strony gospodarza. Powszechnie uważa się że każde ze stadiów rozwojowych nicienia wytwarza charakterystyczny zestaw immunogennych białek określanych jako specyficzne dla stadium.

Dlatego też poznanie ich profili białkowych oraz właściwości immunoreaktywnych białek jest kluczowe do zrozumienia relacji panujących w skomplikowanym układzie pasożyt-żywiciel na różnych etapach cyklu rozwojowego. Ponadto, uzyskanie białek immunoreaktywnych w formie

rekombinowanej przyczyni się do ich zastosowania jako potencjalnych antygenów do wykrywania włośnicy u zwierząt i ludzi.

Cel badań:

- porównanie profili białkowych trzech stadiów rozwojowych *T. britovi* tj. larwy mięśniowej, form dorosłych oraz nowo urodzonych larw,
- wyselekcjonowanie immunoreaktywnych białek, uzyskanie tych białek w formie rekombinowanej i określenie ich przydatności w teście ELISA do wykrywania przeciwciał przeciw *T. britovi* w surowicach zarażonych zwierząt i ludzi.
- ocena właściwości immunogennych uzyskanych białek względem układu immunologicznego potencjalnego żywiciela,
- ocena przydatności immunoprotekcyjnej badanych białek w ograniczaniu rozwoju fazy jelitowej i mięśniowej włośnicy.

Zastosowana metoda badawcza/metodyka

Metody proteomiki-żelowej: SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), 2-DE (two-dimensional gel electrophoresis), 2D DIGE (two-dimensional difference gel electrophoresis) zostaną zastosowane aby osiągnąć wyznaczony cel. 2-DE Western Blot zostanie wprowadzona celem selekcji i identyfikacji białek immunoreaktywnych. Spoty o właściwościach immunoreaktywnych wyszukane na analogicznych wybarwionych srebrem 2-DE żelach zostaną wycięte i poddane analizie przy użyciu metody LC-MS/MS (liquid chromatography-tandem mass spectrometry).

W wyniku analizy LC-MS/MS uzyskane masy peptydów i ich fragmentów zostaną porównane z bazą danych sekwencji białkowych w celu zidentyfikowania i ustalenia listy białek. Metody biologii molekularnej, klonowanie i ekspresja białek w systemie bakteryjnym BL21 *E. coli* lub drożdżowym *Pichia pastoris* będą stosowane w celu otrzymania białek w formie rekombinowanej.