

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

lek. wet. Magdalena Elżbieta Wismołek

156879

Badanie odpowiedzi immunologicznej
w przebiegu zarażenia *Dirofilaria repens* u psa
(*Canis familiaris*)

Immune response during *Dirofilaria repens* infection in dogs (*Canis familiaris*)

Praca doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska pod kierunkiem

ks. dr. hab. inż. Marcina Wiśniewskiego

Promotor pomocniczy: dr inż. Ewa Długosz

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Katedra Nauk Przedklinicznych

Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych

Warszawa, 2022

Streszczenie

Badanie odpowiedzi immunologicznej w przebiegu zarażenia *Dirofilaria repens* u psa (*Canis familiaris*)

Dirofilaria repens jest czynnikiem etiologicznym choroby pasożytniczej psów, zwanej dirofilariozą podskórną. Mimo wysokiej ekstensywności inwazji *D. repens* w Europie istnieje szczątkowa wiedza na temat jego wpływu na organizm żywiciela ostatecznego. Celem niniejszej rozprawy było zbadanie odpowiedzi immunologicznej psa w przebiegu zarażenia *D. repens*. Pierwszy załączony artykuł stanowi opis zmian morfologicznych i biochemicznych występujących u psów zarażonych *D. repens* i niewykazujących uchwytnych objawów klinicznych inwazji. Drugi załączony artykuł stanowi opis zjawiska wysokiej mikrofilareмии w kontekście współistnienia inwazji *D. repens* z innymi chorobami. Trzeci artykuł zawiera analizę odpowiedzi humoralnej w przebiegu dirofilariozy podskórnej u psów mikrofilaremicznych i amikrofilaremicznych.

Kolejnym zagadnieniem opisywanym w pracy było poznanie przebiegu komórkowej odpowiedzi immunologicznej podczas zarażenia *D. repens* oraz mechanizmu umożliwiającego pasożytom przeżycie w organizmie żywiciela. W tym celu wyizolowano jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC) od psów zarażonych i niezarażonych. Wśród izolowanych PBMC określano odsetek komórek charakteryzujących się obecnością powierzchniowego antygeny różnicowania komórkowego CD4 / CD8 / CD21. Zbadano odsetek określonych populacji o immunofenotypach limfocytów T regulatorowych. Wykorzystano linie komórkowe HEK293 transfekowane cDNA receptorów rozpoznających wzorce molekularne i zaobserwowano, że antygeny somatyczne *D. repens* indukują szlaki sygnałowe zależne od NLRC1, NLRC2 i TLR2. Użyto również komórek dendrytycznych pochodzących ze szpiku kostnego myszy, aby ocenić wpływ antygenów *D. repens* na polaryzację odpowiedzi immunologicznej. Zaobserwowano, że IL-1 β odgrywa kluczową rolę w rozwoju odpowiedzi immunologicznej przeciwko *D. repens* oraz, że inwazja *D. repens* powiązana jest ze wzrostem populacji Treg o immunofenotypie T CD4⁺Foxp3⁺. Ostatecznie, stan przewlekłego stresu, jak również korelacja pomiędzy wysoką mikrofilaremią, a obecnością chorób towarzyszących przeczą powszechnemu przekonaniu o niechorobotwórczości *D. repens*.

Słowa kluczowe: dirofilarioza podskórna; pies; limfocyty T CD4⁺Foxp3⁺; mikrofilaremia; naturalne zarażenie *Dirofilaria repens*, IL-1 β

Summary

Immune response during *Dirofilaria repens* infection in dogs (*Canis familiaris*)

Dirofilaria repens is the causative agent of the canine skin condition called subcutaneous dirofilariasis. Despite its increasing prevalence in Europe, there is a large gap in knowledge of the impact of the parasite on the canine host. The aim of this thesis was to determine if natural canine *D. repens* infection leads to biological changes in the host, with a focus on the immune response. The first attached article is a description of hematological and biochemical changes occurring in dogs infected with *D. repens* and showing no overt clinical signs of infection. The second attached article is a description of the phenomenon of high microfilaremia in the context of coexistence of *D. repens* infection and other diseases. The third article analyzes the humoral response to subcutaneous dirofilariasis in microfilaremic and occult dogs.

Next, experiments enabling a better understanding of the course of the cellular immune response in *D. repens* infection, and of the mechanisms that allow the parasites to survive have been conducted. Canine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from uninfected and infected individuals were isolated. The participation of CD4 / CD8 / CD21 expressing cells in the lymphocyte population and the presence of Treg immunophenotype populations within the canine PBMCs from *D. repens* infected individuals were studied. It has been observed, that T cells expressing CD4⁺Foxp3⁺ were more prevalent in infected animals. Finally, we used HEK293 cell lines transfected with cDNA of different pattern recognition receptors and observed that *D. repens* somatic antigens induce signaling pathways dependent on NLRC1, NLRC2 and TLR2. Bone marrow derived dendritic cells were used to evaluate the effect of *D. repens* antigens on the polarization of the immune response. It has been observed that IL-1 β plays a crucial role in the development of the immune response against *D. repens*. It has been also observed that *D. repens* infection is associated with an increase in the Treg population characterized by CD4⁺Foxp3⁺ immunophenotype. Finally, the state of chronic stress as well as the correlation between high microfilaremia and the presence of concomitant diseases contradict the common belief, as subcutaneous dirofilariasis is non-pathogenic.

Keywords: subcutaneous dirofilariasis; dog; T CD4⁺Foxp3⁺ cells; microfilaremia; natural *Dirofilaria repens* infection, IL-1 β