Raširenost infektivne ličinke oblića Anisakis pegreffii (Nematoda, Anisakidae) u parateničnom domaćinu (Sardina pilchardus) i molekularna karakterizacija odgovora modelnog slučajnog domaćina (Rattus norvegicus)

Bušelić Garber, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:985172

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

Ivana Bušelić Garber

RAŠIRENOST INFEKTIVNE LIČINKE OBLIĆA *ANISAKIS PEGREFFII* (NEMATODA, ANISAKIDAE) U PARATENIČNOM DOMAĆINU (*SARDINA PILCHARDUS*) I MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA ODGOVORA MODELNOG SLUČAJNOG DOMAĆINA (*RATTUS NORVEGICUS*)

Doktorska disertacija

U Splitu, 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

Ivana Bušelić Garber

RAŠIRENOST INFEKTIVNE LIČINKE OBLIĆA *ANISAKIS PEGREFFII* (NEMATODA, ANISAKIDAE) U PARATENIČNOM DOMAĆINU (*SARDINA PILCHARDUS*) I MOLEKULARNA KARAKTERIZACIJA ODGOVORA MODELNOG SLUČAJNOG DOMAĆINA (*RATTUS NORVEGICUS*)

Doktorska disertacija

U Splitu, 2019.

Ova doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za akvakulturu Instituta za oceanografiju i ribarstvo, na Sveučilišnom odjelu za studije mora Sveučilišta u Splitu i u Nastambi za laboratorijske životinje Sveučilišta u Splitu. Istraživanje na parateničnom domaćinu provedeno je uz potporu projekta Europske unije FP7 PARASITE (*Parasite risk assessment with integrated tools in EU fish production value chains,* broj ugovora 312068), dok je istraživanje na modelnom slučajnom domaćinu provedeno uz potporu projekta Hrvatske zaklade za znanost, AnGEl (*Anisakis spp.: genomic epidemiology*, broj ugovora 5576).

Voditeljice rada: prof. dr. sc. Ivona Mladineo i doc. dr. sc. Željka Trumbić

Zahvale

Zahvaljujem svim koautorima znanstvenih članaka, na kojima se temelji ova doktorska disertacija, za značajan doprinos i uspješnu suradnju.

Hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Ivoni Mladineo na pruženoj potpori i prilikama da sudjelujem na brojnim međunarodnim i nacionalnim projektima, u znanstvenim radovima i na posjećenim kongresima, kao i za usmjeravanje u nova znanstvena područja. Moja su postignuća odraz Vaše produktivnosti.

Hvala mojoj mentorici i znanstvenom uzoru doc. dr. sc. Željki Trumbić na prenesenom znanju, strpljenju i prijateljstvu. Užitak je raditi s tobom.

Hvala prof. dr. sc. Liviji Puljak i prof. dr. sc. Damiru Sapunaru na vodstvu i riječima ohrabrenja.

Posebna zahvala ide svim djelatnicima Instituta za oceanografiju i ribarstvo, osobito mojim kolegama iz Laboratorija za akvakulturu, na znanstvenoj i prijateljskoj potpori tijekom posljednjih šest godina. Hvala Ivani, Tanji, Niki, Dariji, Dubi, Meliti i Sanji na toplim riječima i prenesenom znanju. Hvala Anamariji, Miši, Jeri, Ivani, Ivi i Igoru na smijehu i društvu.

Hvala i djelatnicima Sveučilišnog odjela za studije mora, Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta i Nastambe za laboratorijske životinje Sveučilišta u Splitu na gostoprimstvu i spremno pruženoj pomoći.

Hvala, Romane, na ljubavi, strpljenju i beskrajnoj potpori. Na kraju, velika hvala mojoj obitelji i prijateljima jer ste dio svega što jesam.

Sadržaj

Popis oznaka i kratica VII

1. Uvod 1

1.1 Imunoreakcija domaćina na infekciju gastrointestinalnim oblićima 2

1.1.1 Kratki uvod u imunosni sustav 2

1.1.2 Lokalizirani upalni odgovor 4

1.1.3 Integrirana dinamika urođenog i stečenog imunosnog odgovora na gastrointestinalne obliće 6

1.2 Biološke i ekološke karakteristike oblića *Anisakis* spp. 9

1.3 Čovjek kao slučajni domaćin i razvoj anisakijaze 12

1.3.1 Stanični i molekularni odgovor na *Anisakis* infekciju 15

1.4 Srdela kao gospodarski važna mala pelagična vrsta ribe i potencijalni izvor *Anisakis* spp. infekcije ljudi 18

1.5 Upotreba modelnih organizama u istraživanjima *Anisakis* spp. 21

2. Ciljevi i hipoteze 22

3. Metode i materijal 23

3.1 Analiza transkriptoma eksperimentalno inficiranih štakora oblićem *Anisakis pegreffii* 23

3.1.1 Etika u istraživanju 23

3.1.2 Prikupljanje *Anisakis pegreffii* ličinki i eksperimentalna infekcija 23

3.1.3 Priprema tkiva za polutanke preparate 24

3.1.4 Izolacija RNA i DNA 25

3.1.5 Priprema cDNA knjižnice i Illumina sekvenciranje 29

3.1.6 Obrada sirovih podataka i mapiranje 31

3.1.7 Analiza diferencijalnoga genskog izražaja 31

3.1.8 Analize funkcionalnog obogaćenja 32

3.2 Metode i materijal u istraživanju parateničnog domaćina 34

3.2.1 Uzorkovanje parateničnog domaćina (*Sardina pilchardus*) 34

3.2.1 UV-kompresijska metoda detekcije *Anisakis* spp. i identifikacija vrste ličinki..... 35

3.2.2 Statističke analize..... 37

4. Rezultati.....39

4.1 Rezultati istraživanja na modelnom slučajnom domaćinu 39

4.1.1 Vremenski tijek infekcije 39

4.1.2 Histopatologija infekcije modelnog slučajnog domaćina oblićem *Anisakis pegreffii* 40

4.1.3 Diferencijalno izraženi geni 45

4.1.4 Funkcionalna interpretacija promjena u transkriptomima štakora izazvanih *Anisakis pegreffii* infekcijom 55

4.2 Rezultati istraživanja infekcije parateničnog domaćina (*Sardina pilchardus*)..... 64

4.2.1 Epidemiološki rezultati 64

4.2.2 Pojavnost nametnika u fileima u odnosu na visceralne organe 66

4.2.3 Infekcija oblićem *Anisakis pegreffii* u odnosu na infekciju oblićem *Hysterothylacium* sp. 68

5. Rasprava.....70

5.1 Promjene u transkriptomima tkiva štakora pri eksperimentalnoj infekciji ličinkom *Anisakis pegreffii*..... 70

5.2 Prevalencija i intenzitet infekcije oblićem *Anisakis pegreffii* u parateničnom domaćinu, srdeli 77

6. Zaključak.....82

7. Kratki sažetak na engleskom jeziku (Summary) 83

8. Kratki sažetak.....84

9. Popis literature.....85

10. Dodatni materijal 110

11. Kratka biografija.....126

Popis oznaka i kratica

>>	znatno više od
3R	označava tri načela rada s laboratorijskim životinjama (prema engl. *replacement*, *reduction and refinement*)
A	prosječna abundancija (prema engl. *mean abundance*)
AD	anterio-dorzalni dio filea (prema engl. *anterio-dorsal*)
Adk-2100	adenilat-kinaza 2100 (prema engl. *adenylate kinase 2100*)
AGE-RAGE	prema engl. *advanced glycation end products (AGE)-receptor for advanced glycation end products (RAGE)*
Alas2	5'-aminolevulinat sintaza 2 (prema engl. *5'-aminolevulinate synthase 2*)
Alcam	prema engl. *activated leukocyte cell adhesion molecule*
ANCOVA	analiza varijance s kontrolom kovarijabli (prema engl. *analysis of covariance*)
Ani s (1 – 14)	glavni *Anisakis* alergeni (prema engl. *major Anisakis allergens*)
AV	anterio-ventralni dio filea (prema engl. *anterio-ventral*)
BALB/c	albino soj laboratorijskih miševa
BEB pufer	prema engl. *back extraction buffer*
bootstrap	u ovoj disertaciji pojam je korišten u smislu tehnike ponavljanja uzorka pri statističkoj obradi
BP	biološki proces (prema engl. *biological process*)
Bv	krvne žile (prema engl. *blood vessels*)
C57BL/6	soj laboratorijskih miševa
CAMs	prema engl. *cell adhesion molecules*
CC	stanična komponenta (prema engl. *cellular component*)
CCL/*Ccl*	prema engl. *C-C motif chemokine ligand*
Cd	stanični detritus (prema engl. *cellular debris*)
CD4(8)$^+$ T	limfociti s biljegom stanične diferencijacije (prema engl. *cluster of differentiation*) 4(8)
Cd6	biljeg stanične diferencijacije (prema engl. *cluster of differentiation*) 6
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kiselina (prema engl. *complementary DNA*)
Cf	kolagenska vlakna (prema engl. *collagen fibers*)
Chi3l1	prema engl. *chitinase 3-like 1*
CI	interval pouzdanosti (prema engl. *confidence interval*)
CO_2	ugljik-dioksid (prema engl. *carbon dioxide*)
cox2	citokrom c oksidaza podjedinica II (prema engl. *cytochrome c oxidase subunit II*)
CTAB	cetiltrimetilamonij bromid (prema engl. *cetyltrimethylammonium bromide*)
CTGF	faktor rasta vezivnog tkiva (prema engl. *connective tissue growth factor*)
CXCL/*Cxcl*	prema engl. *C-X-C motif chemokine ligand*
D	indeks nepodudarnosti (prema engl. *index of discrepancy*)
DC	dendritične stanice (prema engl. *dendritic cells*)
DE	značajno izraženi geni (prema engl. *differentially expressed*)
df	stupnjevi slobode (prema engl. *degrees of freedom*)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (prema engl. *deoxyribonucleic acid*)
DNaza	deoksiribonukleaza (prema engl. *deoxyribonuclease*)
dTTP	2'-deoksitimidin-5'-trifosfat (prema engl. *2'-deoxythymidine 5'-triphosphate*)

dUTP	2'-deoksiuridin-5'-trifosfat (prema engl. *2'-deoxyuridine 5'-triphosphate*)
ECM	izvanstanični matriks (prema engl. *extracellular matrix*)
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (prema engl. *ethylenediamine tetraacetic acid*)
ei	eozinofilna infiltracija (prema engl. *eosinophilic infiltration*)
ES	eksretorno-sekretorni produkti (prema engl. *excretory-secretory products*)
EU	Europska unija (prema engl. *European Union*)
FAO	Organizacija za prehranu i poljoprivredu pri Ujedinjenim narodima (prema engl. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*)
FASTQ datoteka	format datoteke koji sadrži biološku sekvencu i popratnu ocjenu kvalitete (prema engl. *FASTQ file*)
Fb	fibroblast (prema engl. *fibroblast*)
Fc	fibrocit (prema engl. *fibrocyte*)
FDR	stopa lažnih otkrića (prema engl. *false discovery rate)*
GAGE	prema engl. *Generally Applicable Gene-set Enrichment*
GI	gastrointestinalni (oblići) (prema engl. *gastrointestinal*)
GO	genska ontologija (prema engl. *gene ontology*)
GOChord graf	tip grafa generiran u paketu GOplot za R (prema engl. *GOChord plot*)
H	krvarenje (prema engl. *hemorrhage*)
HACCP	proces analize opasnosti i kritičnih kontrolnih točaka (prema engl. *hazard analysis and critical control points*)
Hba	hemoglobin alfa (prema engl. *hemoglobin alpha*)
Hbb	hemoglobin podjedinica beta (prema engl. *hemoglobin subunit beta*)
HinfI	restrikcijska endonukleaza (prema engl. *restriction endonuclease*)
HTLV-I	prema engl. *human T lymphotropic virus type 1*
I	prosječni intenzitet (prema engl. *mean intensity*)
IBD	upalna bolest crijeva (prema engl. *inflammatory bowel disease*)
IFN	interferon (prema engl. *interferon*)
Ig	protutijelo ili imunoglobulin (prema engl. *immunoglobulin*)
IL/*Il*	interleukin (prema engl. *interleukin*)
IL4Rα	prema engl. *interleukin-4 receptor subunit alpha*
ITS	prema engl. *internal transcribed spacers*
Jak-STAT	prema engl. *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription*
k	eksponent negativne binomnijalne raspodjele (prema engl. *exponent of the negative binomial*)
KEGG	Kyoto enciklopedija gena i genoma (prema engl. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome*)
L1 – L4	razvojni stadiji ličinki
Lcn2	lipokalin 2 (prema engl. *lipocalin 2*)
logCPM	normalizirani broja očitanih nukleotidnih sljedova po transkriptu (prema engl. *log2-counts-per-million*)
logFC	log2 omjer izražaja gena (prema engl. *log fold change*)
M	množinska koncentracija, mol/dm^3 (prema engl. *molarity* ili *molar concentration*)
MA	postaje uzorkovanja u srednjem Jadranu (prema engl. *middle Adriatic Sea*)
Mdm2	prema engl. *Mdm2 proto-oncogene*
Mf	mišićna vlakna (prema engl. *muscle fibers*)

MF	molekularna funkcija (prema engl. *molecular function*)
MHC	kompleks gena tkivne podudarnosti (prema engl. *Major Histocompatibility Complex*)
miRNA	mikro ribonukleinska kiselina (prema engl. *micro ribonucleic acid*)
Mm	*muscularis mucosae*, lat.
mM	milimolarna (otopina), 10^{-3} mol/dm^3 (prema engl. *millimolar*)
MMP/*Mmp*	matriks metalopeptidaza (prema engl. *matrix metallopeptidase*)
MPP^{type2}	prema engl. *multi-potent progenitor type2*
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina (prema engl. *messenger ribonucleic acid*)
MS	prosječna suma kvadrata (prema engl. *mean sum of squares*)
mtDNA	mitohondrijska deoksiribonukleinska kiselina (prema engl. *mitochondrial DNA*)
N	broj (prema engl. *number*)
NA	postaje uzorkovanja u sjevernom Jadranu (prema engl. *north Adriatic Sea*)
NF-κB	jezgrin čimbenik kappa B (prema engl. *nuclear factor kappa B*)
NLR	NOD-u sličan receptor (prema engl. *Nod-like receptor*)
NT	postaja uzorkovanja u sjevernom Tirenskom moru (prema engl. *north Tyrrhenian Sea*)
OsO_4	osmijtetroksid (prema engl. *osmium tetroxide*)
p/i	nakon infekcije (prema engl. *post-infection*)
p53	tumorski protein P53 (prema engl. *tumor protein P53*)
PBS	fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom (prema engl. *phosphate buffered saline*)
Pc	parijetalne stanice (prema engl. *parietal cells*)
PCA	analiza glavnih komponenti (prema engl. *principal component analysis*)
PCR	lančana reakcija polimeraze (prema engl. *polymerase chain reaction*)
PD	posterio-dorzalni dio filea (prema engl. *posterio-dorsal*)
Pep C-1100 i Pep C-2100	leucin-alanin peptidaze (prema engl. *leucine-alanine peptidases*)
PI3K-Akt	fosfatidilinozitol-3-kinaza i protein kinaza B (prema engl. *phosphatidylinositol-3-kinase and protein kinase B*)
Pm	perimizij (prema engl. *perimysium*)
Poly-A rep	uzastopno poredani adenini (prema engl. *poly-A tail*)
PPAR	prema engl. *peroxisome proliferator activated receptor*
PAMP	molekularni obrasci povezani s patogenima (PAMP, prema engl. *pathogen-associated molecular patterns*)
PV	posterio-ventralni dio filea (prema engl. *posterio-ventral*)
rAni s	rekombinantni Ani s (prema engl. *Ani s (1, 7, etc.) recombinant allergens*)
Rap1	prema engl. *Ras-proximate-1*
Reg3a, Reg3g, Reg3b i *Reg1a*	geni-članovi regenerativne obitelji (prema engl. *regenerative family member genes*)
RegIIIγ	antibakterijski lektin, član regenerativne obitelji (prema engl. *regenerating family member 3 gamma*)
$RegIII\gamma^{-/-}$	soj laboratorijskih miševa bez RegIIIγ gena
RELMβ	prema engl. *resistin-like molecule-β*
RFLP	polimorfizam duljine fragmenata DNA nakon upotrebe restrikcijskih endonukleaza (prema engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*)
RNA	ribonukleinska kiselina (prema engl. *ribonucleic acid*)

RNA-Seq	RNA sekvenciranje (prema engl. *RNA sequencing*)
RNaza	ribonukleaza (prema engl. *ribonuclease*)
RPMI	medij za stanične kulture (prema engl. *Roswell Park Memorial Institute (culture medium)*)
S100A8/A9, *S100a8 i S100a9*	kalprotektin, odnosno S100 proteini (prema engl. *calprotectin, S100 proteins*)
SAA	serumski amiloid A (prema engl. *serum amyloid A*)
SD	standardna devijacija (prema engl. *standard deviation*)
SRA	baza podataka o sekvencama pri Nacionalnom centru za biotehnološke informacije Sjedinjenih američkih država (prema engl. *NCBI Sequence Read Archive*)
SS	postaja uzorkovanja pokraj južne Sicilije (prema engl. *south Sicily*)
stanice NK	prema engl. *natural killer cells*
STAT3/STAT6	transkripcijski čimbenik (prema engl. *Signal transducer and activator of transcription*)
TCR	antigenski receptor limfocita T (prema engl. *T-cell receptor*)
TE pufer	pufer koji sadrži Tris (objašnjeno pod pojmom Tris-HCl) i EDTA (objašnjeno pod pojmom EDTA) (prema engl. *Tris-EDTA buffer*)
TGFβ1	transformirajući čimbenik rasta beta 1 (prema engl. *transforming growth factor-β1*)
TH/Th	pomoćnički limfociti T (Th1, Th2, Th17 itd.) (prema engl. *T helper lymphocytes*)
TL	prosječna ukupna duljina (prema engl. *mean total length*)
TLR	Toll-u sličan receptor (prema engl. *Toll-like receptors*)
TNF/*Tnf*	čimbenik tumorske nekroze (prema engl. *tumor necrosis factor*)
TREAT	prema engl. *t-tests relative to a threshold*
Treg	regulatorni limfocit T (prema engl. *regulatory T-cell*)
Tris-HCl	Tris(hidroksimetil)aminometan hidroklorid (prema engl. *tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride*)
TSLP	prema engl. *thymic stromal lymphopoietin*
v/m	omjer varijance i srednjaka (prema engl. *variance-to-mean ratio*)
WS	postaja uzorkovanja pokraj zapadne Sardinije (prema engl. *west Sardinia*)
Zc	zimogene stanice (prema engl. *zymogenic cells*)

1. Uvod

Promjene u prehrambenim navikama, s naglaskom na konzumaciji egzotične i sirove hrane, porast broja i kretanja stanovništva, globalizacija tržišta hrane i promjene u sustavima proizvodnje hrane, klimatske promjene te osviještenost javnosti i bolji dijagnostički alati smatraju se glavnim razlogom porasta zabilježenih slučajeva hranom prenosivih nametničkih bolesti posljednjih godina [1]. Nametnici iz obitelji Anisakidae nedavno su uvršteni u prvih deset hranom prenosivih nametnika terestričkog i vodenog podrijetla u odnosu na javnozdravstveno značenje u svim europskim regijama, odnosno u prvih pet za sjevernu i jugozapadnu Europu, [2]. Iz navedenih je razloga prevencija i zaštita od zoonotičnih nametnika prenosivih putem morske hrane postala prioritetnom aktivnošću [1]. Svijest javnozdravstvenih ustanova i ribarske industrije o važnosti proučavanja oblića koji pripadaju rodu *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda, Anisakidae), porasla je, ne samo zbog njihova štetnog utjecaja na ljudsko zdravlje, nego i negativnog utjecaja na komercijalnu vrijednost morske ribe dostupne na tržnicama [3].

Akvatični helminti (skupina nametnika koja obuhvaća trakavice, metilje i oblиće, prema engl. *helminths*) etiološki su agensi brojnih zoonoza prenosivih ribom, kao što su difilobotrijaza, metiljavost i anisakijaza. U usporedbi s ljudskim nametnicima gastrointestinalnog sustava, zoonoze uzrokovane ribom tek su posljednjih godina privukle veću znanstvenu i javnozdravstvenu pozornost [4]. Stoga ne iznenađuje da se dosadašnje znanje o mehanizmima patogeneze nametničkih bolesti, kao i o razvoju imunosnog odgovora potrebnog da se nametnička infekcija razriješi, temelji upravo na eksperimentalnim infekcijama na modelima glodavaca, a radi se o sljedećim gastrointestinalnim oblićima: *Trichuris muris* (Nematoda, Trichuridae), *Trichinella spiralis* (Nematoda, Trichinellidae), *Heligmosomoides polygyrus bakeri* (Nematoda, Heligmosomatidae) i *Nippostrongylus brasiliensis* (Nematoda, Nippostrongylinae). Uobičajeni je put infekcije jajima *T. muris*, infektivnim ličinačkim stadijem *T. spiralis* i *H. polygyrus bakeri* oralan, dok je za infektivne ličinke *N. brasiliensis* put infekcije kroz kožu, te migracija kroz pluća do jednjaka, gdje jednom progutane ličinke završe u crijevima [5].

Tipičan imunosni odgovor domaćina na infekciju gastrointestinalnim oblićima uključuje aktivaciju polariziranih $CD4^+$ (prema engl. *cluster of differentiation*) pomoćničkih T limfocita tipa 2 (Th2, prema engl. *T-helper lymphocytes*) koji proizvode citokine interleukin 4 (IL4), IL5 i IL13,

nakon što im antigen-prezentirajuće stanice (APCs, prema engl. *antigen-presenting cells*) predoče specifični antigen. Citokini odgovora tipa 2 promoviraju novačenje makrofaga, eozinofilnih granulocita (eozinofila), bazofilnih granulocita (bazofila) i mastocita u crijevima, povećavaju broj vrčastih stanica koje luče sluz i izazivaju mnoge fiziološke promjene koje zajedno olakšavaju izbacivanje oblića iz gastroinestinalnog sustava [5]. Komponente imunosnog odgovora tipa 2, koje sudjeluju u odgovoru na gastrointestinalne obliće, iznimno su raznovrsne, a njihovo se djelovanje u svojoj složenosti stalno otkriva novim istraživanjima, ne samo u smislu identifikacije novih tipova stanica, već i prepoznavanju povećanog preklapanja, paralelnosti i međuovisnosti između stanica i njihovih molekularnih medijatora. Da bismo razumjeli tu složenost, moramo se odmaknuti od paradigmi temeljenih na linearnim enzimskim i signalizacijskim kaskadama i vidjeti odgovor tipa 2, onako kako doživljavamo neuralnu mrežu, s razgranatim interakcijama i alternativnim putevima iz kojih aktivirane populacije stanica mogu integrirati informacije kako bi odabrale i kalibrirale svoj učinak na odgovarajući način. Bolje razumijevanje ovih mreža otvorit će put razumijevanju infekcije gastrointestinalnim oblićima i razvoja odgovora domaćina na njih, kao i kako postići učinkovitu imunost u odsutnosti patologije te, što je još važnije, kako najbolje modulirati imunosni sustav u alergiji, autoimunosti i novotvorevinama [6].

1.1 Imunoreakcija domaćina na infekciju gastrointestinalnim oblićima

1.1.1 Kratki uvod u imunosni sustav

Imunost ili otpornost sačinjava složeni sustav staničnih i humoralnih (topljivih tvari u tjelesnim tekućinama) sastavnica koje štite organizam od drugih organizama ili tvari koje mogu uzrokovati infekciju ili bolest. Temelji se na dva obrambena mehanizma koji surađuju: urođena (nespecifična ili prirođena) i stečena (specifična ili adaptivna) imunost, a oba obrambena mehanizma mogu se podijeliti na stanične i humoralne sastavnice. Urođena imunost ključna je za obranu od uzročnika bolesti u prvih nekoliko sati i dana nakon infekcije, jer se stečeni imunosni odgovor nije imao prilike razviti u tom vremenu, a vođena je mehanizmima koji su bili prisutni prije negoli je infekcija nastala i koji omogućuju trenutni odgovor [7]. Osnovne sastavnice urođene imunosti su [8]:

- fizičke i kemijske prepreke, poput epitela i antimikrobnih tvari proizvedenih na površini epitela;
- fagociti (neutrofilni granulociti /neutrofili/ i makrofagi), dendritične stanice, mastociti, stanice NK (prema engl. *natural killer*) i druge urođene limfoidne stanice;
- proteini u krvi, uključujući komponente sustava komplementa i druge medijatore upale.

Stečena ili adaptivna imunost potaknuta je izlaganjem uzročniku, a snaga i sposobnost obrane pojačava se opetovanim susretom s uzročnikom bolesti. Ova vrsta imuniteta vođena je limfocitima i njihovim produktima. Limfociti izražavaju velik broj različitih receptora koji imaju sposobnost prepoznavanja brojnih antigena, a dijele se na dvije populacije uključene u različite tipove stečene imunosti: limfociti B i limfociti T [7]. Stečena imunost pokreće se kad uzročnik generira razinu praga antigena koja dovodi do aktivacije antigen-prezentirajućih stanica. Stečeni obrambeni mehanizam imunosnog sustava čine tri glavna procesa [9]:

- prepoznavanje specifičnog antigena tijekom procesa prezentacije antigena;
- generiranje odgovora koji će učinkovito eliminirati uzročnika ili stanice inficirane uzročnikom;
- razvoj imunosne memorije generiranjem memorijskih stanica B i T.

Najvažniji je događaj s početka imunoreakcije razlikovanje vlastitog od tuđeg na temelju prepoznavanja kemijskih biljega. Specifično prepoznavanje površinskim receptorima obavljaju dva klonski organizirana sustava: klonovi limfocita T i B. Limfociti B prepoznaju antigene izvan stanica s pomoću dvovaljanih imunoglobulinskih (Ig) receptora, dok limfociti T prepoznaju tuđe peptide koji nastaju unutarstaničnom preradom antigena i vezani su za površinske molekule kompleksa gena tkivne podudarnosti (MHC, prema engl. *Major Histocompatibility Complex*). Antigeni su najčešće složene organske molekule (proteini, glikoproteini, lipoproteini, polisaharidi, lipopolisaharidi, nukleinske kiseline) koje mogu sadržavati mnogo antigenskih determinanata ili epitopa koje prepoznaju limfociti i protutijela [10].

Sazrijevanje limfocita zbiva se u dvije faze. Prvo se stvaraju zrele imunokompetentne stanice (primarna diferencijacija), a u drugoj se nakon susreta sa stranim antigenom razvijaju i diferenciraju efektorske stanice imunosnog odgovora (sekundarna diferencijacija). Tijekom

primarne diferencijacije zbiva se preuređenje gena za antigenski receptor i izražaj receptora na membrani te selekcija limfocita koji su izrazili receptor za antigen. Tijekom sekundarne diferencijacije, za učinkovit odgovor limfocita B na proteinske antigene potrebna je pomoć limfocita T. Pod utjecajem pomoćničkih limfocita T i njihovih citokina dogodi se gensko prekapčanje razreda protutijela, pa umjesto IgM, dio limfocita B sintetizira imunoglobulin drugog razreda (IgG, IgA ili IgE) [11]. Antigenski je receptor limfocita T (TCR, prema engl. *T-cell receptor*) heterodimer građen od dva različita polipeptidna lanca, a s obzirom na vrstu lanca, razlikuju se TCR-αβ i TCR-γδ. U stanice stečene imunosti spadaju pomoćnički i citotoksični limfociti T, koji izražavaju receptor αβ. Pomoćnički limfociti (Th) gotovo uvijek na membrani izražavaju i koreceptor CD4 ($CD4^+$), dok citotoksični limfociti izražavaju CD8 ($CD8^+$). Limfociti $CD4^+$ T prepoznaju tuđe antigene u sklopu molekula MHC II na membrani profesionalnih antigen-prezentirajućih stanica (primjerice dendritičnih stanica i makrofaga), a citotoksični limfociti $CD8^+$ T prepoznaju tuđe antigene u sklopu molekula MHC I na svim stanicama s jezgrom. Pomoćnički limfociti T izražavaju karakterističan fenotip TCR-$\alpha\beta^+CD3^+CD4^+CD8^-$ i nakon aktivacije proliferiraju i razviju se u jednu od funkcijskih subpopulacija (Th1, Th2, Th17 itd.). Ove subpopulacije poslije se razlikuju na temelju citokina koje luče nakon aktivacije i izražaju specifičnog unutarstaničnog transkripcijskog faktora [11].

1.1.2 Lokalizirani upalni odgovor

Upala je zaštitna reakcija živog tkiva na ozljedu (fizičkog, kemijskog ili biološkog uzroka), koja se sastoji od [12]:

- crvenila, zbog vazodilatacije arteriola u blizini ozlijeđena područja;
- otekline, zbog nakupljanja tekućine izvan krvnih žila i dijelom zbog akumulacije upalnog infiltrata;
- topline, nastale zbog povećana protoka krvi, odnosno vazodilatacije i prikupljanja tople krvi u ozlijeđenom području;
- boli, dijelom zbog oticanja tkiva i dijelom zbog kemijskih posrednika akutne upale, kao što je bradikinin;

- gubitka funkcije, dijelom zbog nemogućnosti pokretanja i otekline, a dijelom zbog svjesnog ili refleksnog ograničenja pokreta zbog boli.

Upalna reakcija počinje razaranjem ili ograđivanjem štetne tvari i vlastitih uništenih stanica, nakon čega najčešće slijedi zacjeljivanje i uspostavljanje homeostaze. Promjena hemodinamike u zahvaćenome mikrocirkulacijskom području uzrokuje većinu gore navedenih znakova upale. Nastanak lezije prati vazokonstrikcija arteriola, zatim vazodilatacija i naposljetku vazoparaliza. Agregacija eritrocita i trombocita rezultat je usporavanja protoka krvi, koje dovodi do zgrušavanja i tkivne hipoksije, marginacije (priljepljenja) leukocita uz kapilare te oštećenja kapilarnog endotela [13].

Nastanak lezije ili infekcije može rezultirati aktivacijom kaskada plazmina i kinina. Kaskada kinina proizvodi vazoaktivne peptide kalidin i bradikinin, koji djeluju na vaskularni endotel s ciljem povećanja propusnosti krvnih žila, a enzimi kaskade kinina također mogu aktivirati kaskadu komplementa. Povećanje propusnosti vaskularnog endotela na mjestu lezije i povišeni tlak u krvi dovode do prodiranja plazme u ekstravaskularno tkivo, koja je bogata proteinima komplementa. Jedan od molekularnih signala koji počinju i reguliraju lokaliziranu upalu upravo je kaskada komplementa, koja dovodi do stvaranja proteina koji se vežu na receptore stanica, kao što su neutrofili, koje se na taj način poziva na mjesto infekcije preko kemotaktičnog koncentracijskoga gradijenta, a sam proces napuštanja krvne cirkulacije i odlazak na mjesto lezije ili infekcije naziva se ekstravazacija [14].

Kaskada plazmina važna je u remodeliranju izvanstaničnoga matriksa, koje prati proces zacjeljivanja, a enzimi kaskade plazmina također mogu aktivirati kaskadu komplementa. Jednom aktivirani, proteini komplementa uzrokuju već spomenutu ekstravazaciju neutrofila, ali i drugih tipova leukocita, primjerice limfocita i monocita. I ekstravazacija i navođenje leukocita s pomoću kemotaksije regulirani su citokinima koje proizvode lokalni mastociti (aktivirani proteinima komplementa) i makrofagi (aktivirani bakterijskim produktima). Poznato je da citokini faktor tumorske nekroze α (TNFα), IL1 i IL6 reguliraju upalnu reakciju u različitim tkivima, iako važnost pojedinog citokina varira u odnosu na tkivo [14].

1.1.3 Integrirana dinamika urođenog i stečenog imunosnog odgovora na gastrointestinalne oblića

Gastrointestinalni (GI) oblići već unutar nekoliko sati nakon infekcije probavnog sustava pokušavaju uspostaviti vlastitu nišu u domaćinu. Za većinu vrsta GI oblića to uključuje visoko dinamičnu interakciju sa sluzničkim preprekama domaćina kako bi se pričvrstili na površinu crijeva ili probili intestinalna tkiva. Sluznica domaćina sadržava epitelne stanice i vrčaste stanice koje luče sluz, koje su stalno izložene oštećenjima izazvanima GI oblićem i stranim antigenima, podrijetlom od oblića i intestinalne bakterijske komenzalne flore. Epitelne stanice mogu reagirati urođenim odgovorom na izloženost patogenu i izraziti nekoliko receptora koji detektiraju nametnike, kao što su Toll-u slični receptori (TLRs, prema engl. *Toll-like receptors*) [15] i NOD-u slični receptori (NLRs, prema engl. *Nod-like receptors*) [16], koji prepoznaju molekularne obrasce povezane s patogenima (PAMP, prema engl. *pathogen-associated molecular patterns*). Nadalje, epitelne stanice sposobne su orkestrirati urođen imunosni odgovor proizvodnjom topivih medijatora, koji mogu aktivno prezentirati antigene izražajem molekula razreda MHC II (prema engl. *Major Histocompatibility Complex class II*) [17].

Istraživanja koja su koristila GI oblića u modelima glodavaca potvrdila su ulogu epitelnih stanica na površini sluznice kao ključnih organizatora urođenog i stečenog imunosnog odgovora, uglavnom zbog njihove sposobnosti da proizvode/luče citokinske medijatore nakon staničnog oštećenja i/ili izloženosti stranim antigenima nakon nastalog oštećenja. Povišen izražaj IL1β nakon *T. spiralis* infekcije pripisuje se epitelnim stanicama [18], kao i lučenje kemokina CCL2, CCL3, CCL5 i CCL20 tijekom *T. muris* infekcije, nužnih za novačenje dendritičnih stanica koje vode odgovoru tipa Th2 [19]. Intestinalne epitelne stanice, među ostalim, proizvode citokine IL25, IL33 i TSLP (prema engl. *thymic stromal lymphopoietin*) kao odgovor na ozljedu tkiva i izlaganje patogenu, što rezultira indukcijom i aktivacijom višestrukih sastavnica urođene i stečene imunosti.

IL25 (poznat i pod nazivom IL17E) potiče populaciju multi-potentnih progenitora MPP^{type2} (prema engl. *multi-potent progenitor type2*), koji se mogu dalje diferencirati u mastocite, makrofage i bazofile nakon stimulacije citokinima, a imaju i sposobnost pojačavanja poticaja na odgovor Th2. Nadalje, IL25 i/ili IL33 potiču nekoliko leukocitnih populacija koje imaju sposobnost proizvodnje citokina povezanih s Th2, uključujući IL4, IL5 i IL13. Ove stanice

nazivaju se prirodnim pomoćničkim stanicama (prema engl. *natural helper cell*), urođenim pomoćničkim stanicama 2 (prema engl. *innate helper cell 2*) i nuocitima (prema engl. *nuocyte*) te dijele mnoge fenotipske značajke. IL33 također snažno potiče eozinofiliju, glavnu značajku imunosnog odgovora na GI obliće. IL25 mogu proizvesti mnoge stanice, uključujući epitelne stanice, mastocite, eozinofile, bazofile, limfocite Th2 i limfocite $CD8^+$ T [5]. Izražaj IL25 mogu potaknuti komenzalne bakterije u crijevu i njegova uloga može biti ključna za održavanje homeostaze u crijevima i utišavanja IL23 vođene, IL17A posredovane upale [20].

Citokini, koje proizvode limfociti Th2, kao i navedene stanice urođenog imunosnog odgovora, potiču snažne fiziološke promjene u zahvaćenim tkivima i regrutiraju makrofage, eozinofile i druge limfocite na mjesto infekcije. Kako bi se tkiva domaćina zaštitila od oštećenja tijekom upalnog procesa, pokreću se regulatorni odgovori koji služe kao povratna sprega i potiskuju efektorske stanice. Tijekom infekcije GI oblićima uz efektorski odgovor događa se razvoj regulatornih T stanica (Treg), koje imaju supresivnu ulogu, a ovakav tip odgovora često se naziva „modificiranim odgovorom Th2“ [5].

Budući da IL4 i IL13 dijele IL4Rα potreban za njihovu signalizaciju, i oba citokina oslanjaju se na nizvodnu signalnu molekulu STAT6, imaju neke preklapajuće uloge u intestinalnim tkivima. IL4 i IL13 povećavaju propusnost sluznice, smanjuju apsorpciju glukoze i sekreciju klorida u epitelnom sloju, povećavaju odaziv na medijatore mastocita i izazivaju hiper-kontrakcije glatkih mišića u ovisnosti o IL4Rα/STAT6 [21], što u konačnici može rezultirati izbacivanjem GI oblića iz domaćina. IL4/IL13 signalizacija u crijevu vodi povećanom broju vrčastih stanica, koje luče mucine i RELMβ (prema engl. *resistin-like molecule-β*). Mucini i RELMβ imaju važne uloge u posredovanju izbacivanja nametnika iz organizma tako da ometaju senzorne funkcije oblića i time uspostavljanje ekološke niše. IL4/IL13 također uzrokuju bržu izmjenu stanica epitela, sprječavajući oblića da se prihvati za epitelnu prepreku. Hiperplazija mastocita ovisna o odgovoru Th2 u crijevima, uz njihovu degranulaciju i posljedično oslobađanje proteaza, vodi disrupciji epitelne prepreke, povećavajući propusnost između stanica i izmjenu tekućine u lumenu. Kod nekih GI oblića (primjerice *H. polygyrus bakeri* i *T. spiralis*), ličinački stadiji nametnika mogu se probiti u intestinalno tkivo, što može rezultirati novačenjem stanica urođenog imunosnog odgovora koje su povezane s upalom. IL4/IL13 ovisna aktivacija makrofaga može izazvati

alternativno aktiviran fenotip i sintezu arginaze. Arginazna aktivnost lišava lokalno područje od L-arginina i izaziva smanjenu vijabilnost ličinke, što olakšava uništenje nametnika [5].

Iako infekcije oblićima najčešće potiču „modificirani“ Th2/regulatorni stečeni imunosni odgovor, proupalni pomoćnički limfociti T, poput Th1 (koji proizvode citokin IFN-γ) i Th17 (koji proizvode IL17A, IL17F i IL22), mogu pridonijeti patologiji i patogenezi infekcije gastrointestinalnim oblićima. Mnogi gastrointestinalni oblići oštećuju epitelnu prepreku, što vodi izloženosti rezidentnih antigen-prezentirajućih stanica i drugih stanica s TLR izražajem produktima komenzalnih bakterija, prisutnima u velikom broju u crijevima. Uz infekciju oblićima, na ovaj način domaćin dobije snažan antigeni podražaj prisutnih mikrobnih patogena, što može voditi razvoju drugih oblika stečenog imunosnog odgovora [5].

U miševa, eksperimentalno inficiranih oblićima disrupcije Th2 odgovora, vode u promjenu regulacije imunoreakcije i poticanje proupalnog odgovora, što može uzrokovati razvoj štetne patologije. Primjerice, nedostatak jednog od ključnih Th2 ili regulatornih citokina, uključujući IL4 [22], IL10 [23], IL13 [24], kao i nedostatak sastavnica poput IL4Rα i STAT6 [25], može uzrokovati nemogućnost razvoja zaštitne imunosti i posljedičnog razvoja neprikladnog pro-upalnog odgovora, karakteriziranog proizvodnjom IFNγ i/ili IL17A. Nadalje, nedostatak regulatornog citokina IL10 u miševa inficiranih gastrointestinalnim oblićem *T. muris* [26] ili *T. spiralis* [27] vodio je razvoju bolesti koja nalikuje kolitisu, povezanoj s visokim morbiditetom i mortalitetom te ovisnoj o IFNγ [5].

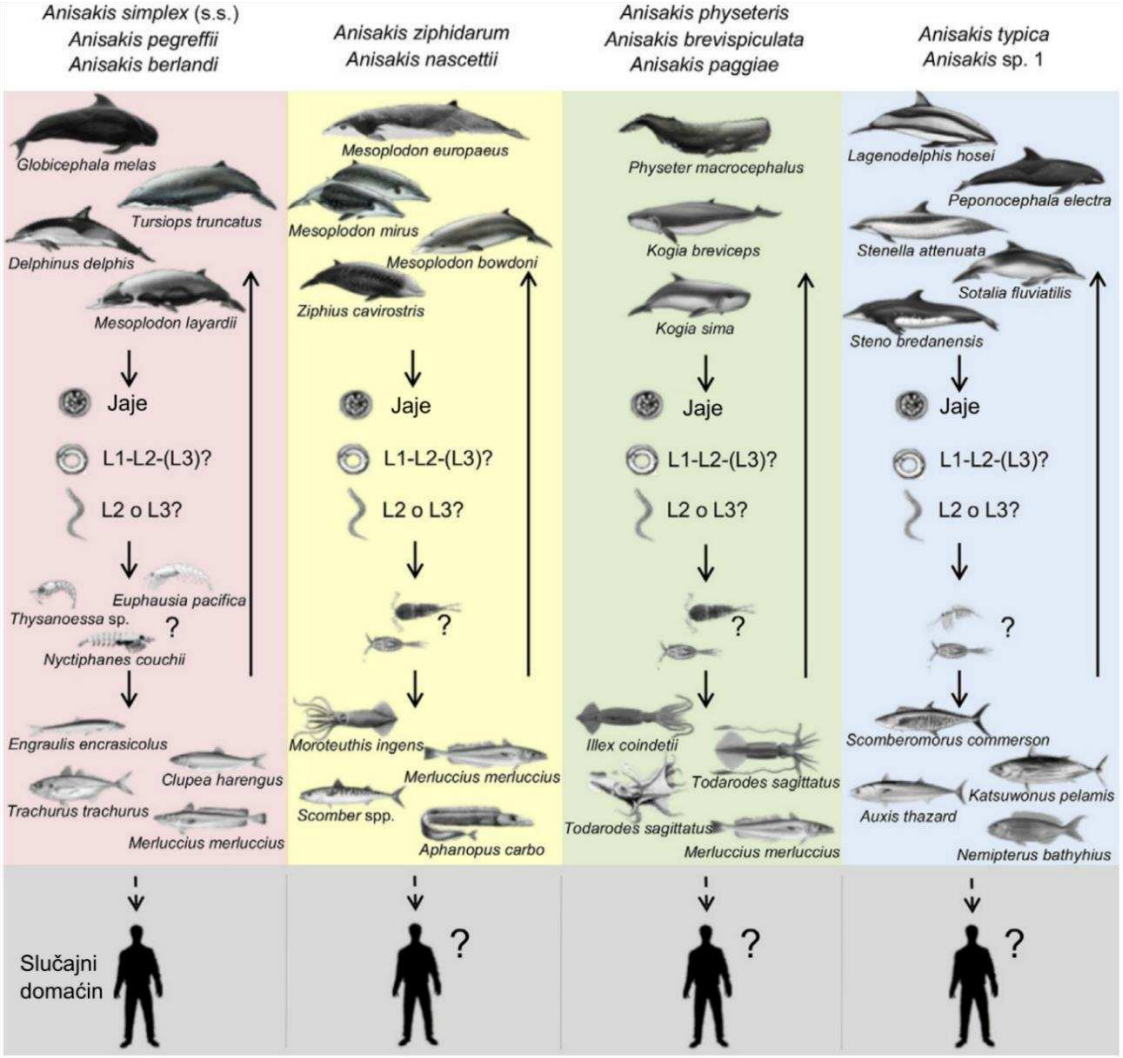
Međutim, imunosni odgovor netipičnog ili slučajnog domaćina oblića vjerojatno se neće razvijati jednako odgovoru domaćina koji su koevoluirali s nametnikom [3]. Anisakijaza je, prema tome, zanimljiv model istraživanja jer predstavlja slučajnu i prolaznu infekciju čovjeka ličinkom nametnika, gdje je potrebno istražiti stanične i molekularne mehanizme imunosnog odgovora da bi se razumio razvoj i ishod ove bolesti. U konačnici to može pomoći u razvoju učinkovite profilaktičke i terapijske strategije liječenja čovjeka. Istraživanja su pokazala da su patološke promjene koje se javljaju u gastrointestinalnom sustavu tijekom infekcije *Anisakis* ličinkom rezultat udruženog izravnog djelovanja ličinke tijekom invazije tkiva i složene interakcije između imunosnog sustava domaćina i tvari koje se oslobađaju, ili su sadržane unutar nametnika [28].

1.2 Biološke i ekološke karakteristike oblića *Anisakis* spp.

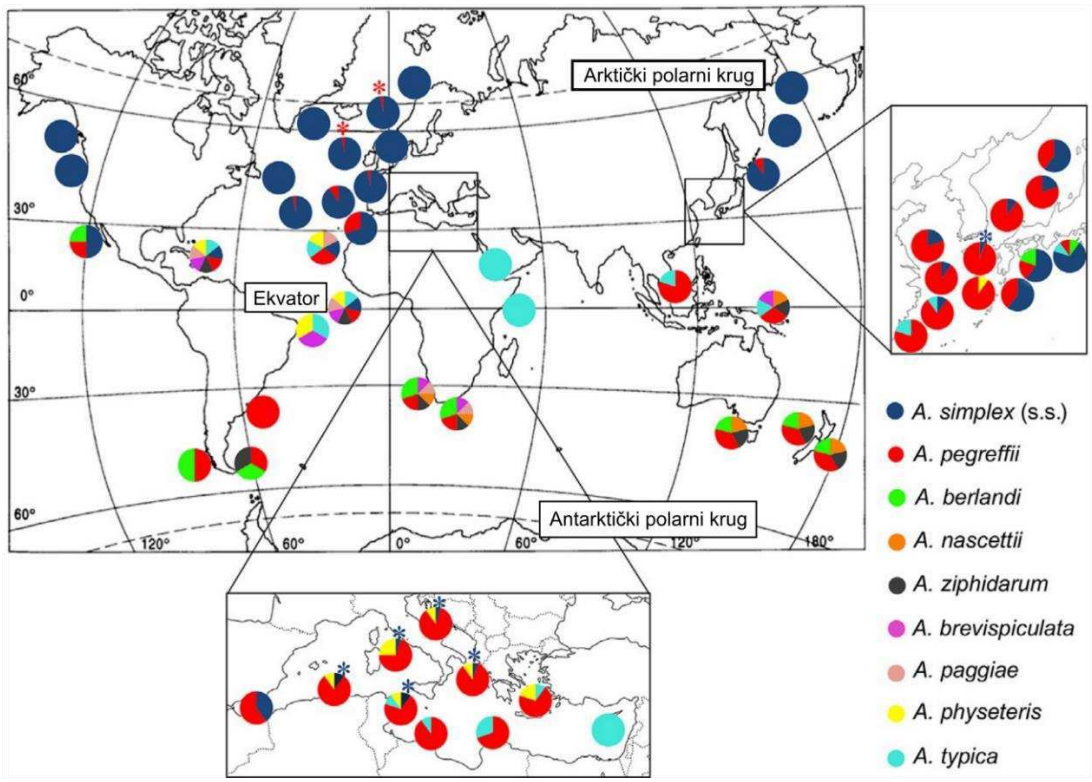
Životni ciklus *Anisakis* spp. nametnika, prikazan na **slici 1.1**, kao glavne (konačne ili krajnje) domaćine uključuje morske sisavce, najčešće kitove zubane, koji spadaju u porodice Delphinidae i Ziphiidae. U životni ciklus uključene su razne vrste morskih riba i glavonožaca kao paratenični domaćini, u kojima se ličinka ne razvija u idući stadij [29]. Dosad su oko 200 vrsta riba i 25 vrsta glavnonožaca potvrđeni kao paratenični domaćini, a smatra se da bi većina vrsta morskih riba i glavonožaca mogla postati domaćinom *Anisakis* spp. nametnika [30,31]. Sistematski, dosad zabilježeni redovi riba u kojima je pronađena *Anisakis* spp. ličinka uključuju Gadiformes, Perciformes, Clupeiformes, Pleuronectiformes, Scorpaeniformes, Zeiformes, Bericiformes, Lophiiformes, Anguilliformes i Atheriniformes, a rijeđe i u nekim hrskavičnjačama. Što se tiče glavonožaca, najčešće se radi o porodici Ommastrephidae [32]. Razni beskralješnjaci, najčešće planktonski račići svjetlonošci, koji spadaju u porodicu Euphausidae, intermedijarni su domaćini *Anisakis* spp., odnosno domaćini u kojima se zbiva jedno presvlačenje ličinki [29]. Životni ciklus počinje u glavnim domaćinima, morskim sisavcima, u kojima se odrasle jedinke *Anisakis* spp. odvojena spola razmnožavaju i oplođena jaja otpuštaju se zajedno s fecesom domaćina u morski okoliš. Iz embrioniranih jaja u morskom okolišu izvale se ličinke prvog stadija (L1), a zatim ličinke L2, koje jedu beskralješnjaci, najčešće planktonski račići. Prema Køie i suradnicima, ličinka je u jaju obavijena dvjema kutikulama, a autori smatraju da bi se već tada ličinka trebala nazivati L3 stadijem [33]. Ipak, većina autora smatra da se u planktonskim račićima ličinka presvlači još jednom i postaje ranom ličinkom trećeg stadija (L3) [34–36]. Intermedijarne domaćine zatim pojede neki od parateničnih domaćina, što može uključivati, kako je već navedeno, razne vrste riba i glavonožaca. *Anisakis* spp. ličinke L3 migriraju iz probavnih organa u visceralnu šupljinu, gdje se uglavnom spiraliziraju ispod ili unutar serozne ovojnice (peritoneuma), a ponekad migriraju i u muskulaturu [29]. Ribu ili glavonošca može izravno pojesti glavni domaćin i tada se L3 ličinka još dvaput presvlači i potom sazrijeva u odrasli oblik nametnika spreman za reprodukciju i zatvaranje životnog ciklusa oplodnjom. Život oblića *Anisakis* spp. u želucu kita može trajati od 2 do 3 mjeseca [37]. U eksperimentalnim uvjetima (medij RPMI, atmosferski zrak obogaćen s 5% CO_2, pH = 4) bilo je potrebno između 3 i 4 dana da se ličinke L3 presvuku u L4, odnosno između 30 i 42 dana za L5. Dodatkom pepsina nakon 14 dana uzgoja, bio je potreban još 51 dan nakon presvlačenja u L5 da odrasla ženka počne polagati jaja [38].

Alternativno, ribu mogu pojesti piscivorne ribe. U tome slučaju ličinke L3 ponavljaju proces migracije iz probavnih organa i spiraliziraju se u visceralnoj šupljini, odnosno organima novog domaćina. Spekulira se da se ova pojava može ponoviti nekoliko puta, ovisno o dužini životnog vijeka ličinke koji nije sa sigurnošću utvrđen, ali može uzrokovati nakupljanje *Anisakis* spp. ličinki u predatorskih vrsta riba duž trofičke mreže [29]. Ljudi su slučajni domaćini nametnika iz obitelji Anisakidae, a mogu se zaraziti unosom sirove ili nedovoljno termički obrađene morske ribe i glavonožaca, u kojima je prisutna živa ličinka L3 *Anisakis* spp. Nametnici koji pripadaju obitelji Anisakidae, a povezani su s ljudskim slučajevima infekcije, spadaju u rodove: *Anisakis*, *Pseudoterranova* i *Contracaecum* [39]. Bolest se naziva anisakijazom ako je uzročnik vrsta iz *Anisakis* roda ili anisakidozom ako je uzročnik općenito iz obitelji Anisakidae [28,40].

Do danas je u svijetu potvrđeno devet vrsta *Anisakis* roda (**slika 1.1** i **slika 1.2**): *Anisakis simplex* (sensu stricto), *A. pegreffii*, *A. berlandi*, *A. typica*, *A. ziphidarum*, *A. nascettii*, *A. physeteris*, *A. brevispiculata* i *A. paggiae* [29,39,41,42], a geografska distribucija ovih nametnika, prema nalazu u gospodarski važnim vrstama riba, prikazana je na **slici 1.2**. Dosad se ove nametnike dijelilo na dva tipa ličinki, no noviji molekularni dokazi ukazuju na četiri skupine [29]. Za zdravlje ljudi najvažnija je skupina I, koja obuhvaća vrste *A. simplex* (s. s.), *A. pegreffii* i *A. berlandi* (**slika 1.1**).



Slika 1.1 Shematski životni ciklus *Anisakis* spp., uključujući njihov zoonotski potencijal, neke od glavnih (kitovi), intermedijarnih i parateničnih domaćina (planktonski račići, glavonošci i ribe). Preuzeto iz literature [29] i prilagođeno hrvatskom jeziku uz dopuštenje izdavača.



Slika 1.2 Relativna pojavnost vrsta *Anisakis* roda, prema različitim geografskim područjima, s uvećanim prikazom Sredozemnog mora i područja Japana. Podaci potječu od epidemioloških istraživanja vrsta *Anisakis* spp. u gospodarski važnim vrstama riba, identificiranim molekularnim metodama. Zvjezdica označava da je riječ o migratornoj vrsti domaćina ribe, pa je nalaz vrste nametnika relativan u odnosu na područje izlova. Preuzeto iz literature [29] i prilagođeno hrvatskom jeziku uz dopuštenje izdavača.

1.3 Čovjek kao slučajni domaćin i razvoj anisakijaze

Anisakijaza je zoonotična bolest uzrokovana oblićem koji spada u *Anisakis* spp. rod, a ljudska populacija predstavlja slučajne domaćine koji se zaraze živom ličinkom trećeg stupnja konzumacijom sirove ili termički nedovoljno obrađene morske ribe ili glavonožaca [43]. Dosad zabilježeni uzročnici su vrste *A. simplex* (s.s.) i *A. pegreffii* (**slika 1.3**) [29]. Iako se ličinke ne mogu dalje razviti u adultni oblik u čovjeku, a presvlačenje u stadij L4 događa se jako rijetko [44], pacijenti mogu imati kliničke simptome infekcije [45], ali se ipak najčešće manifestira slabo do srednje izražena klinička slika i infekcija uglavnom završava izbacivanjem ličinke [46]. Nadalje, postoje i teži zabilježeni klinički simptomi, koji su uključivali promjene izazvane prodorom ličinke

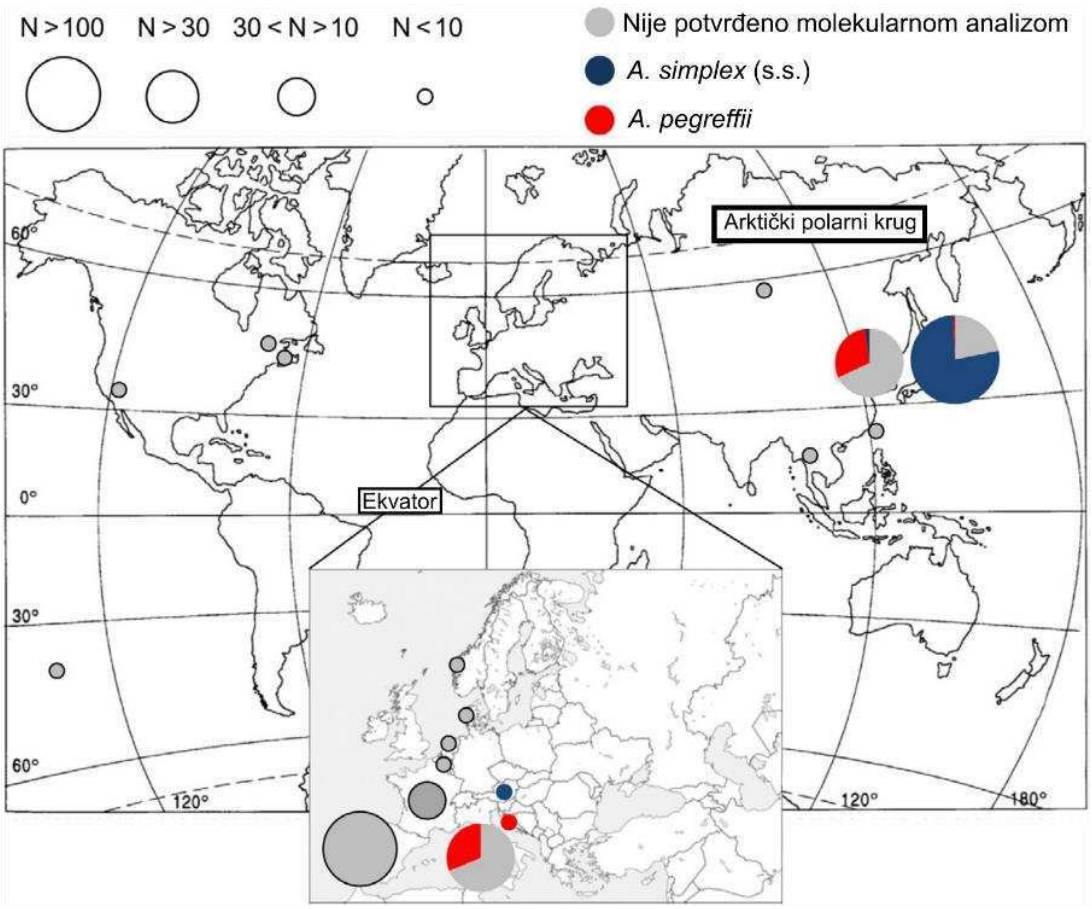
kroz sluznicu želuca, tankog i debelog crijeva, uzrokujući eozinofilni gastroenteritis, uz stvaranje eozinofilnih granuloma u sluznici [4,28,46].

Prilikom razvoja anisakijaze može doći do: (i) izbacivanja ličinke izvan organizma zajedno sa stolicom i/ili povraćanjem, bez izazvanih lezija gastrointestinalne sluznice; (ii) prihvaćanja/prodiranja/spiralizacije ličinke, najčešće u području gastrointestinalnog sustava, ili u rjeđim slučajevima, ličinka ektopično migrira u peritonealnu/pleuralnu šupljinu i spiralizira se u mezenteriju, jetri, gušterači, limfnim čvorovima, jajnicima i potkožnom tkivu [40,46,47]. S obzirom na mjesto lokalizacije žive ili uginule ličinke, simptomatska anisakijaza klasificira se kao gastrična, intestinalna, ektopična (ili izvangastrointestinalna) [40,46]. Nadalje, susret sa živom *Anisakis* L3 može dovesti do senzibilizacije imunosnog sustava čovjeka i kasnijih alergijskih reakcija pri svakom novom susretu s ličinkom. U malom broju slučajeva, osjetljivi pojedinci mogu reagirati znakovima preosjetljivosti, čak i nakon ingestije mrtvih i termički obrađenih ličinki [48]. Ovaj klinički oblik naziva se alergijskom/gastroalergijskom anisakijazom [46]. Moneo i suradnici [49] smatraju da bi se u petu vrstu anisakijaze trebali uvrstiti slučajevi senzibiliziranih asimptomatičnih osoba kod kojih nedostaje klinička slika bolesti, ali koji pokazuju povišen titar *Anisakis* spp. specifičnih IgE protutijela.

Gastrični oblik ove bolesti nastupa 1–12 sati nakon konzumacije inficirane ribe, a karakterizira ga epigastrična bol, mučnina i povraćanje [46]. Gastrointestinalni oblik može se pojaviti bez alergijske reakcije, popraćen boli i upalom, te se preporuča fizičko odstranjivanje ličinke kako bi se izbjegli kronični simptomi. Anthelmintici nisu uobičajen tretman anisakijaze, iako se albendazol u nekim slučajevima pokazao učinkovitim tretmanom [46]. U nedavno objavljenom slučaju anisakidoze u Sjedinjenim Američkim Državama osim pacijenta, profilaktički su tretirani albendazolom i članovi obitelji koji su jeli *gravlax* (jelo od sirovog lososa sa začinima) [50]. Gastroalergična anisakijaza može imati akutne alergijske simptome, od urtikarije ili angioedema do anafilakse, uz popratne blage gastrointestinalne simptome. U pravilu se ličinke povraćanjem ili proljevom izbace iz organizma, pa gastroskopija nije nužna [48,51]. Alergiju mogu izazvati somatski ili ekskretorno-sekretorni (ES) produkti *Anisakis* ličinki. Dosad je identificirano 14 *A. simplex* alergena (nazvani Ani s 1 do 14) [52], dok su istraživanja proteoma i transkriptoma *A. simplex* ličinki otkrila pregršt novih potencijalnih alergena [53,54]. Većina

prepoznatih alergena spadaju u ES produkte, a protutijela u ljudskim serumima kod pacijenata s alergijskim manifestacijama anisakijaze najčešće prepoznaju Ani s 1, Ani s 5 i Ani s 7 [55].

Intestinalni oblik pojavljuje se 5–7 dana nakon ingestije te je abdominalna bol najčešći simptom [40]. Smatra se da se pojavljuje u blagom ili težem obliku, a posljednji je vjerojatno uzrokovan ponovljenom infekcijom [56]. Teži oblik može biti popraćen alergijskom reakcijom i intestinalni zid može oteći 3–5 puta zbog edema i staničnog infiltrata. U tom su slučaju histološke promjene najizraženije oko mjesta lokalizacije ličinke, s upalnim edemom popraćenim eksudatom fibrina i hemoragičnim lezijama. Ličinke obično uginu kroz nekoliko dana u čovjeku i razgrade se kroz 8 tjedana. Na mjestu lokalizacije ličinke, nakon ugibanja, njezini ostaci okruženi su edemom, nekrozom, upalnim eozinofilnim infiltratom uz primjesu neutrofila, limfocita i monocita, te naslagama fibrina, što u konačnici rezultira stvaranjem granuloma [48]. Prema Audicana i Kennedy [28], hemoragične lezije prisutne su već nakon sat vremena, a 4 sata do 6 dana nakon infekcije *Anisakis* ličinkom u čovjeka nastaju erozivne lezije. Granulom se stvara od tjedan do dva tjedna nakon infekcije, popraćen ulceroznim lezijama. Potrebno je više od dva tjedna da ličinka ugine, a u tkivu se oko ostataka ličinke formiraju kronične ulceracije.



Slika 1.3 Pojavnost slučajeva anisakijaze u svijetu, prema objavljenoj literaturi za razdoblje od 1960. do 2017. godine. Prikazani su samo slučajevi gdje je pronađena ličinka, dok slučajevi IgE-*Anisakis* preosjetljivosti nisu uzeti u obzir. Grafovi u obliku pita prikazuju relativnu proporciju slučajeva prema vrsti uzročnika (*A. pegreffii* i *A. simplex* (s.s.), utvrđeno od 1999. do 2017.). Preuzeto iz literature [29] i prilagođeno hrvatskom jeziku uz dopuštenje izdavača.

1.3.1 Stanični i molekularni odgovor na *Anisakis* infekciju

Patološke promjene koje se događaju u gastrointestinalnom sustavu tijekom *Anisakis* spp. infekcije nastaju zbog udružena djelovanja patogenosti ličinki i interakcije imunosnog sustava domaćina s antigenima koje je otpustila. S nametnikom se prvo susreću rezidentne antigen-prezentirajuće stanice (poput dendritičnih stanica i makrofaga) u tkivima zahvaćenima prodorom *Anisakis* spp. ličinke [57]. Uz mehaničku disrupciju tkiva odvija se degradacija ekstracelularnog matriksa djelovanjem snažnih proteolitičkih enzima koje otpušta ličinka, koji pospješuju

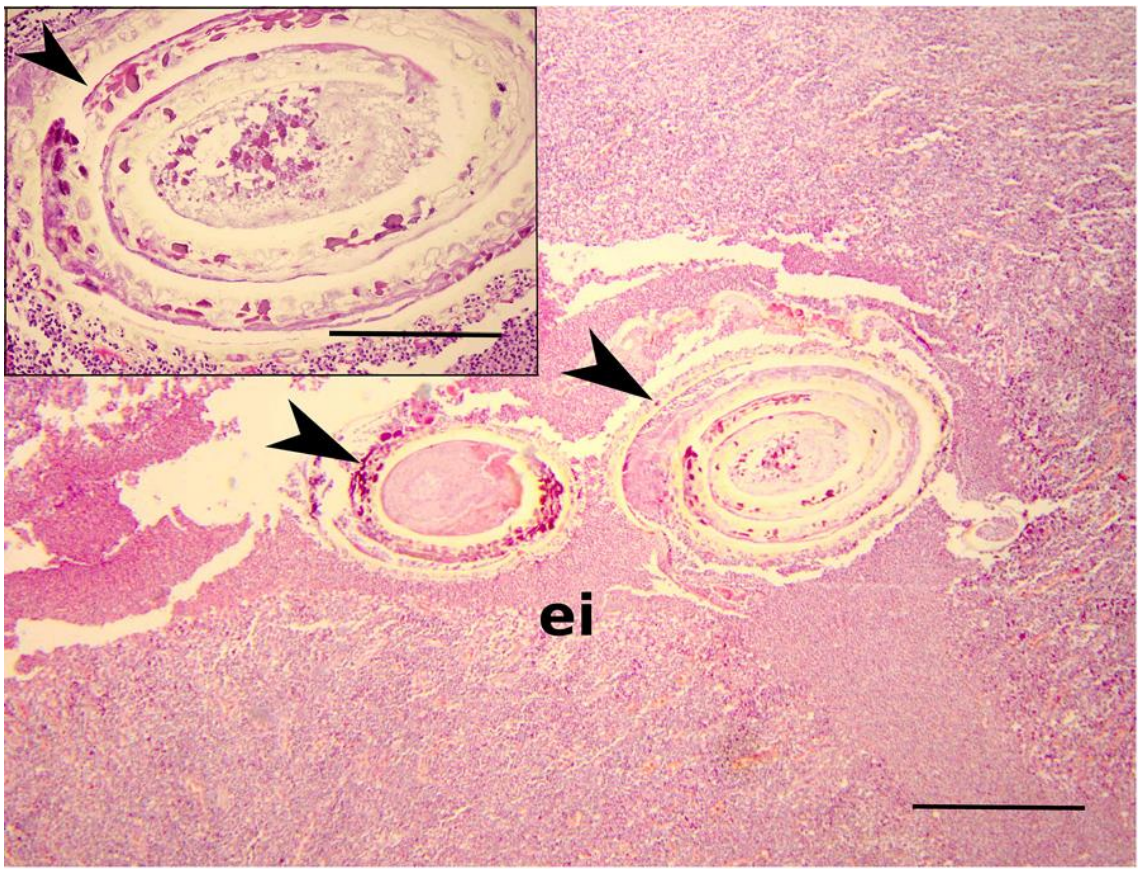
prodiranje i migraciju ličinke kroz gastrointestinalnu sluznicu i tkiva [28]. Pretpostavlja se da je ekspresija receptora TLR na epitelnim stanicama i aktiviranim dendritičnim stanicama prisutna prilikom anisakijaze [28], međutim zasad ne postoje konačni dokazi o kojim se točno receptorima radi. Većina dosad objavljenih znanstvenih radova histopatološki je opisivala prisutne lezije nastale prodorom *Anisakis* spp. ličinke [58–60] ili je analizirala alergijske reakcije [49,51,61–65], a rani odgovor domaćina prvi je put analiziran u ovom istraživanju na razini transkriptoma.

U uznapredovalom slučaju anisakijaze čovjeka, fibrozni i eozinofilni infiltrati najznačajnije su obilježje lokalnog upalnog odgovora. Eozinofili su posebno koncentrirani oko kutikule oblića (poglavito u oralnom dijelu, gdje su ES produkti lokalizirani), gdje oslobađaju citotoksične faktore, odgovorne za velik dio oštećenja tkiva domaćina na mjestu oko nametnika u akutnoj i kroničnoj fazi infekcije (**slika 1.4**). Eozinofilni granulomi opaženi su kod ljudi i životinjskih modela infekcije [28,58,59,66]. Tek u manje od 30% slučajeva anisakijaze zabilježena je i sustavna eozinofilija, za koju se smatra da je uobičajena kod gastrointestinalnih oblića [28,43]. Ostali tipovi stanica, koji se obično utvrđuju histopatološkim nalazima, uključuju mastocite, limfocite i plazme stanice [58].

Budući da je *Anisakis* vrlo specifičan nametnik u smislu raspona simptoma i oblika bolesti koje može izazvati, i preosjetljivost na njegove alergene varira s obzirom na istraživanu populaciju i najčešće izražene simptome. Istraživanje, koje je uspoređivalo prevalenciju IgE specifičnog za 5 odabranih *Anisakis* alergena među pacijentima na području Italije i Španjolske, utvrdilo je da obje populacije najčešće reagiraju na Ani s 1 alergen. Međutim, dok su svi španjolski pacijenti bili pozitivni na bar jedan od alergena, samo 76,2% talijanskih pacijenata imalo je pozitivnu reakciju. Među Talijanima je bio značajno veći broj pacijenata s gastrointestinalnim simptomima, dok su Španjolci češće imali urtikariju, angioedem ili anafilaksu. Autori smatraju da je razlog možda u češćem susretu Španjolaca s *Anisakis* ličinkom, jer je anisakijaza tu raširenija i opetovani susret s ličinkom ili njezinim ES produktima omogućava razvoj alergijske reakcije [65].

Da su razlike u kliničkim simptomima *Anisakis* senzibiliziranih pacijenata povezane s različitim Th1/Th2 odgovorom, testirano je u odnosu na ukupni proteinski ekstrakt i termostabilne proteine *A. simplex* nametnika. Istraživanje je provedeno na primarnoj staničnoj kulturi cijele krvi pacijenata senzibiliziranih na *A. simplex*, a kvantificirali su se citokini specifični za pojedini odgovor koristeći multipleks protočnu citometriju. IL4, IL5 i IL10 bili su indikatori Th2 odgovora,

a IL2, INFγ, TNFα bili su indikatori Th1 odgovora. Više koncentracije IL2, IL4 i IL5 izmjerene su nakon stimulacije ukupnim proteinskim ekstraktom i termostabilnim proteinima kod svih pacijenata, u odnosu na kontrolu. Slično kao i u prethodno opisanoj studiji [65], pacijenti s gastrointestinalnim simptomima imali su niže ukupne i specifične razine IgE u odnosu na pacijente s urtikarijom/angioedemom ili anafilaksom. Skupina s urtikarijom/angioedemom ili anafilaksom imala je visoke razine IL4 i IL5 (indikativno za Th2 odgovor) i niži izražaj INFγ u odnosu na skupinu s gastrointestinalnim simptomima. Nadalje, četiri pacijenta u skupini s gastrointestinalnim simptomima su s odmakom reagirali na test na koži (prema engl. *skin prick test*) i imali su jako nisku zabilježenu razinu IgE specifičnog za *A. simplex* i viši INFγ/IL4 omjer u odnosu na ostatak skupine s gastrointestinalnim simptomima, a cijela skupina općenito je imala značajno viši INFγ/IL4 omjer u odnosu na skupinu s urtikarijom/angioedemom ili anafilaksom [67]. Zaključno, postoje razlike u ravnoteži Th1/Th2 imunosnog odgovora kod pacijenata senzibiliziranih na *A. simplex* u odnosu na izražene simptome bolesti. Različito ponašanje citokina s obzirom na kliničku sliku pacijenata ukazuje na to da imaju važnu ulogu u patogenezi *Anisakis* infekcije. Zanimljivo je da su termostabilni antigeni izazvali isti stanični odgovor kao i ukupni proteinski ekstrakt *A. simplex* nametnika, što ukazuje na rizik prilikom konzumiranja kuhane ribe u kojoj se nalazi nametnik.



Slika 1.4 Histološki preparat tkiva pacijentice iz Šibenika s identificiranom *Anisakis pegreffii* ličinkom. Prikazan je dio zida debelog crijeva u kojem se nalazi degradirano tijelo spiraliziranog oblića *A. pegreffii* (crne strelice) i intenzivna eozinofilna infiltracija (ei). Duljina oznake = 100 μm. Gornji lijevi ugao: Obilježeno propadanje kutikule oblića (strelica). Duljina oznake = 20 μm. Hematoksilin-eozin bojanje. Preuzeto iz literature [59] uz dopuštenje izdavača.

1.4 Srdela kao gospodarski važna mala pelagična vrsta ribe i potencijalni izvor *Anisakis* spp. infekcije ljudi

Ribarska industrija u Europskoj uniji (EU) peta je po veličini u svijetu, gdje se svake godine preradi gotovo 5 milijuna tona ulovljenih divljih riba. Ribarstvo i prerada ribe osiguravaju radna mjesta za najmanje 275 000 ljudi. Štoviše, EU je među vodećim ribarskim tržištima u svijetu s uvozom ribe i ribljih proizvoda od oko 21 milijardu eura u 2014., uz tendenciju porasta, što je više od 40% vrijednosti svjetskog uvoza ribe [68,69]. Prosječna potrošnja ribljih proizvoda u zemljama

članicama EU-a u 2011. godini iznosila je 24,9 kg/osobi, iako godišnja stopa potrošnje po glavi stanovnika varira od 5,3 kg u Mađarskoj do 56,8 kg u Portugalu [68,69]. Međutim, neke od najznačajnijih vrsta riba na lovnom području europske ribarske industrije izložene su riziku infekcije nametnicima, koji na taj način preko ribarnica dospijevaju i do potrošača. Polazeći od općeprihvaćena stava da je prevencija najbolja strategija za izbjegavanje senzibilizacije ljudi putem morske hrane zaražene nametnicima roda *Anisakis* spp., potrebno je smanjiti vjerojatnost pojavnosti nametnika u ribljem mesu namijenjenom neposrednoj konzumaciji, ali i preradi. Genetička identifikacija vrste nametnika i određivanje prevalencije i intenziteta infekcije gospodarski važnih vrsta riba od ključne su važnosti za kvantitativnu procjenu i prikladne mjere smanjenja rizika.

U sredozemnoj regiji, srdela *Sardina pilchardus* gospodarski je vrijedna mala pelagična riba, koja se lovi plivaricama i pelagičnim koćama. Jako je bitna za ribarstvo na području Jadranskog mora jer je sačinjavala 41% ukupne jadranske lovine, zajedno s inćunom, u razdoblju od 1970. do 2005. godine [70]. Prema Organizaciji za prehranu i poljoprivredu pri Ujedinjenim narodima (FAO prema engl. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*), ukupna lovina srdele u Jadranskome moru u 2014. godini iznosila je 75.000 tona, dok je na cijelom Sredozemnome moru dosegla 187.171 tona [71]. Srdele se na tržnicama mogu naći svježe, zamrznute ili konzervirane. Jedu se sušene, soljene, dimljene, marinirane, pečene, pržene i kuhane. U zemljama zapadnog Sredozemlja, poput Španjolske, Portugala, Francuske ili Italije, češće se jedu svježe (marinirane, dimljene, pečene ili pržene) [72], dok u Hrvatskoj jela s dodatkom slanih ili mariniranih srdela predstavljaju čest specijalitet domaćih trpeza i restorana. Jedu se još i svježe pečene ili pržene te konzervirane.

Dosadašnja istraživanja prevalencije oblića *Anisakis* spp. u srdelama na području sredozemnih zemalja pokazala su znatnu varijabilnost [72–75], u rasponu od 0% u Ligurskome moru [75] do 28,3% na atlantskoj obali Španjolske [72]. Epidemiološko istraživanje stupnja senzibilizacije zdravog priobalnog stanovništva Dalmacije na *Anisakis* spp. antigene Ani s 1 i Ani s 7, ukazalo je na postojanje *Anisakis* infekcije u tom području, a dovedeno je u vezu s konzumacijom marinirane ili soljene ribe pripremljene u domaćinstvima [76]. Među pacijentima s alergijom koji su doživjeli anafilaktički šok u Španjolskoj, bar četiri slučaja specifično su

povezana s konzumacijom kuhanih ili konzerviranih srdela [28]. Nadalje, konzumacija mariniranih srdela navedena je u anamnezi tri slučaja akutne anisakijaze u Španjolskoj [72,77,78].

Iako Japan prednjači kao zemlja s najvećim brojem zabilježenih slučajeva anisakijaze [40,79], nekoliko slučajeva zabilježeno je u sredozemnim zemljama, osobito u Italiji i Španjolskoj [80–82]. U nekoliko istraživanja na zdravim ljudima, u Španjolskoj je opažena visoka prevalencija anti-*Anisakis* IgE protutijela (12 – 22%), što je povezano s velikom količinom ribe u svakodnevnoj prehrani španjolske populacije [83,84]. U posljednje vrijeme sve veću pozornost dobiva inćun kao potencijalni izvor *Anisakis* spp. infekcije čovjeka, što je potvrđeno u nedavno provedenoj kvantitativnoj analizi procjene rizika s obzirom na konzumaciju prethodno nezamrznutih sirovih ili mariniranih inćuna u španjolskoj populaciji. Temeljeno na prevalenciji *Anisakis* ličinki u mišićju inćuna od 13,13%, smatra se da broj slučajeva anisakijaze u španjolskoj populaciji doseže između 7700 i 8320 slučajeva godišnje [85]. Za usporedbu, procijenjena je učestalost anisakijaze u Japanu, temeljena na prijavljenim kliničkim slučajevima, oko 2000 slučajeva godišnje, u Južnoj Koreji 200 slučajeva godišnje, dok se za neke europske zemlje procjene kreću od 20 [86] do 500 slučajeva godišnje [49]. Nedavno objavljen sustavni pregled literature o epidemiologiji nematodijaza prenosivih hranom na području EU-a za razdoblje od 2000. do 2016. godine, prijavilo je ukupno 236 autohtonih kliničkih slučajeva anisakijaze. Većina navedenih slučajeva zabilježena je u Španjolskoj (158 ili 66,9%) i Italiji (67 ili 28,4%) [87]. Međutim, prema Cavallero i suradnicima [88], broj zabilježenih kliničkih slučajeva anisakijaze, na temelju otpusnih pisama iz talijanskih bolnica od 2005. do 2015. godine, bio je 370, što je znatno više od procjene obavljena sustavnog pregleda literature [87]. Suprotno tomu, u retrospektivnom istraživanju za razdoblje od 2010. do 2014. godine, identificirano je 37 kliničkih slučajeva anisakidoze u francuskim bolnicama. Drugim riječima, u Francuskoj je zabilježeno 0,62 slučaja/mjesec ili 7,4 slučaja/godinu, a najčešće su pogođene osobe prosječne dobi 42 godine (raspon 11 – 69 godina) i ženskog spola [89]. Uzme li se u obzir procjena kvantitativne analize rizika [85], trenutačne prognoze broja slučajeva na području Europe znatno podcjenjuju broj stvarnih slučajeva.

1.5 Upotreba modelnih organizama u istraživanjima *Anisakis* spp.

Dosadašnja istraživanja na eksperimentalnim modelima infekcije koristila su ribe s ciljem usporedbe patogenosti dviju vrsta oblića povezanih s ljudskim slučajevima anisakijaze, *A. pegreffii* i *A. simplex* (s.s.) [90] te određivanjem osjetljivosti ribe kao domaćina [91,92]. Zanimljiv je primjer nedavno objavljeno istraživanje o utjecaju *Anisakis simplex* ES produkata na eksperimentalno izazvanom kolitisu u zebrice [93]. Često korišten model su i miševi [94], najčešće u istraživanjima alergenosti [95–97]. Eksperimentalno zaraženi štakori kao modelni organizmi u istraživanju *Anisakis* infekcije dosad su korišteni za usporedbu patogenosti različitih *Anisakis* vrsta [98–100] ili patogenog potencijala žive ličinke u usporedbi s kuhanim i zaleđenim *Anisakis* ličinkama [101]. Prekretnicu u istraživanjima svakako je pružilo uvođenje orogastričnog puta infekcije štakora živom *Anisakis* ličinkom, koji simulira put zaraze kod čovjeka [66]. Glavnina dosad objavljenih istraživanja na štakorima bavi se alergenim potencijalom cijele ličinke ili određenih spojeva ili produkata *Anisakis* ličinki [102,103] te utjecajem prirodnih i sintetičkih kemijskih spojeva na *Anisakis* ličinke u ovome životinjskom modelu [104,105]. Modeli glodavaca za infekcije intestinalnim oblićima pokazali su se relevantnima u mapiranju stanične i molekularne osnove zaštitnih mehanizama sisavaca [106]. Osim toga, prethodna istraživanja potvrdila su da infekcija oblićem *Anisakis* spp. kod štakora dovodi do razvoja slične patologije kao kod ljudi [48]. Smatra se da su miševi prikladan *in vivo* model za istraživanje alergijskih reakcija na *Anisakis* spp., a senzibilizacija se najčešće postiže injektiranjem određenih alergena, ES produkata ili ukupnog proteinskog ekstrakta. Iako je optimizirana orogastrična intubacija jedne žive *Anisakis* ličinke u miša [94], štakorski model prikladniji je za intubaciju većeg broja ličinki po jednoj životinji [66], smanjujući na taj način potreban broj životinja u eksperimentu, u skladu s načelom „3R“ (potječe od engl. riječi: *replacement* – zamjena, *reduction* – smanjenje i *refinement* – poboljšanje).

2. Ciljevi i hipoteze

Ciljevi istraživanja na modelnom slučajnom domaćinu bili su:

- opisati histopatološke promjene u Sprague-Dawley štakora na mjestu prodora infektivne ličinke trećeg stadija oblića *Anisakis pegreffii* prilikom eksperimentalne infekcije;
- kvalitativno i kvantitativno opisati transkriptome inficiranih tkiva upotrebom RNA sekvenciranja.

Nulta hipoteza istraživanja modelnog slučajnog domaćina glasi da ne postoji razlika u izraženim genima između inficiranog tkiva i pripadajuće zdrave kontrole eksperimentalno inficiranih štakora oblićem *A. pegreffii*.

Ciljevi istraživanja na parateničnom domaćinu bili su utvrditi:

- prevalenciju, abundanciju i intenzitet infekcije ličinke trećeg stadija oblića *A. pegreffii* u srdeli (*Sardina pilchardus*) tijekom dvogodišnjeg uzorkovanja u Jadranskome moru i jednogodišnjeg uzorkovanja u zapadnom Sredozemnome moru;
- odnos abundancije nametnika i duljine ribe;
- distribuciju nametnika u fileima u odnosu na visceralne organe;
- čimbenike koji mogu utjecati na modele analize rizika za razvoj anisakijaze.

Nulta hipoteza istraživanja parateničnog domaćina, odnosno srdele *S. pilchardus*, glasi: Ne postoji razlika u prevalenciji i intenzitetu infekcije srdele oblićem *A. pegreffii* s obzirom na duljinu ribe, godinu uzorkovanja i geografsko područje.

3. Metode i materijal

3.1 Analiza transkriptoma eksperimentalno inficiranih štakora oblićem *Anisakis pegreffii*

3.1.1 Etika u istraživanju

Sve eksperimente na životinjama i primijenjene protokole odobrili su Etički odbor Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu (registracijski broj 2181-198-03-04-18-004), kao i Ured za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (registracijski broj 525-10/0255-16-7). Svi eksperimenti na štakorima provedeni su u Nastambi za laboratorijske životinje Sveučilišta u Splitu (broj dozvole HR-POK-019), gdje su uzgajani u parovima, u plastičnim kavezima sa steljom od piljevine i kukuruza. Životinje su održavane u kontroliranom okolišu, s hranom i vodom *ad libitum*, temperaturom od 22 ± 1 °C, i ciklusom od 12 sati dana i 12 sati noći. Životinje su odvojene u pojedinačne kaveze i lišene hrane 24 sata prije eksperimentalne infekcije.

3.1.2 Prikupljanje *Anisakis pegreffii* ličinki i eksperimentalna infekcija

Ličinke trećeg stadija oblića *Anisakis pegreffii* prikupljene su iz svježe ulovljene ugotice pučinke, lat. *Micromesistius poutassou*, iz ribolovne zone C1 u Jadranskome moru (FAO 37.2.1). Ugotice pučinke su u jutarnjim satima na dan infekcije isporučene na ledu u Laboratorij za akvakulturu, Institut za oceanografiju i ribarstvo u Splitu. Vidljivo aktivne ličinke odabrane su, isprane nekoliko puta u fiziološkoj otopini i provjerene pod Olympus BX 40 svjetlosnim mikroskopom, (Olympus Corp., Shinjuku, Tokyo, Japan), kako bi se potvrdilo da nije došlo do oštećenja kutikule tijekom skupljanja. Protokoli za intubaciju želuca štakora i pripremu sonde usvojeni su iz literature [66]. Odabrane ličinke (N = 10) unesene su u prethodno pripremljene želučane sonde.

Preliminarni eksperiment služio je za procjenu vremenskog tijeka infekcije *Anisakis* ličinkama, a korištena procedura bila je jednaka onoj koja je korištena u kasnijoj eksperimentalnoj infekciji, pojašnjenoj detaljnije u idućem odlomku. Preliminarno ispitivanje provedeno je na 15 ženki Sprague-Dawley štakora (prosječna masa 197 ± 13.6 g, tri životinje po vremenskoj točki), a točke uzorkovanja bile su 6, 10, 24, 48 i 72 sata nakon intubacije ličinki. Na temelju rezultata preliminarnog istraživanja, trajanje glavnog eksperimenta skraćeno je na 32 sata nakon infekcije. Smanjen je i početno planiran broj životinja u kontrolnoj skupini, jer je dizajn eksperimenta preusmjeren na endogenu (internu) kontrolu. Ista podrazumijeva uzorkovanje zdravog tkiva *Anisakis*-inficiranog štakora iz kojeg je prethodno uzet uzorak inficiranog tkiva, odnosno lezije. U glavnom eksperimentu sve su životinje bili mužjaci.

Svaka točka uzorkovanja u glavnom eksperimentu (6, 10, 18, 24 i 32 sata nakon infekcije) uključivala je sedam štakora, od toga pet inficiranih s 10 *Anisakis* ličinki te dva intubirana s 1,5 ml fiziološke otopine (N = 35, prosječna masa 207 ± 20,1 g). Životinje su prije intubacije anestezirane intraperitonealnom injekcijom mješavine anestetika i analgetika (Ketaminol, Richter Pharma AG, Wels, Austrija, 50 – 100 mg/kg; i Xylapan, Vetoquinol UK Ltd, Buckingham, Velika Britanija, 5 – 10 mg/kg) te im se injektirala dodatna doza Ketaminola (Richter Pharma AG, Wels, Austrija, 50 – 100 mg/kg) ukoliko je test refleksa štipanja nožnih prstiju bio pozitivan. Usmrćivanje životinja prethodilo je uzorkovanju tkiva, provedeno visokom dozom anestetika Ketaminola (Richter Pharma AG, Wels, Austrija, >150 mg/kg) i dekapitacijom. Uzorci tkiva štakora (**tablica 3.1**) i prikupljene *A. pegreffii* ličinke isprani su u fiziološkoj otopini i odmah pohranjeni u TriReagentu (Ambion Inc., Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) na -80 °C.

3.1.3 Priprema tkiva za polutanke preparate

Za histopatološku analizu, mali komadići želuca (N = 5) i abdominalnog mišićja (N = 2) štakora koji su pokazali lezije uzrokovane prodiranjem *A. pegreffii* ličinke, skupljeni su i fiksirani u 4% paraformaldehidu u 0,1 M fiziološkoj otopini puferiranoj fosfatnim puferom (PBS) na ledu. Uzorci tkiva postfiksirani su u 1% osmijtetroksidu (OsO_4) i dehidrirani u nizu otopina acetona rastućih koncentracija te se dehidrirano tkivo proželo Durcopan smolom (Honeywell-Fluka,

Morris Plains, NJ, SAD). Blok tkiva rezao se na ultramikrotomu RMC Products MTX (Boeckeler Instruments, Inc., Tucson, AZ, SAD). Pripremljeni polutanki prerezi (500 nm) zatim su obojeni 1% otopinom toluidinskog modrila i pretraženi svjetlosnim mikroskopom Olympus BX 40 (Olympus Corp., Shinjuku, Tokyo, Japan). Polutanki prerezi fotografirani su Olympus Camedia kamerom (Olympus Corp., Shinjuku, Tokyo, Japan), te su fotografije uređene u programu Photoshop CS 5 (Adobe Systems, San Jose, CA, SAD).

3.1.4 Izolacija RNA i DNA

Ukupna RNA izolirana je korištenjem TriReagent (Ambion Inc., Invitrogen, Carlsbad, California, SAD) otopine prema uputama proizvođača. Ukratko, ručno usitnjeni uzorci tkiva želuca i mišića štakora (30 – 40 mg) potpuno su homogenizirani u 1 ml TriReagent otopine (Ambion Inc., Invitrogen, Carlsbad, California, SAD) s pomoću MagNA Lyser instrumenta (Roche Diagnostics, Basel, Švicarska), koristeći se programom homogenizacije od 2 × 5 sekunda na 6000 g. Nakon 10 minuta centrifugiranja na 4 ºC i prebacivanja supernatanta u čistu plastičnu tubicu od 1,5 ml, u svaki uzorak dodano je 300 µl kloroforma. Uzorci su nakon toga protreseni 15 sekunda na vorteks aparatu, inkubirani 10 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugirani 20 minuta na 13.000 okretaja u minuti na 4 ºC. Vodeni sloj oprezno je prebačen u čiste plastične tubice te je dodan jednak volumen izopropilnog alkohola. Uzorci su nekoliko puta okrenuti, inkubirani 10 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugirani 8 minuta na 13.000 okretaja u minuti na 4 ºC. Supernatan je pažljivo uklonjen i na precipitirani RNA talog dodano je 1000 µl 75% etilnog alkohola. Uzorci su zatim inkubirani na ledenom postolju pola sata uz povremeno okretanje tubica, kako bi se talog što bolje isprao. Nakon toga uzorci su centrifugirani 5 minuta na 13.000 okretaja u minuti na 4 ºC i sva tekućina oprezno je uklonjena, talog RNA osušen je na zraku za 3 – 5 minuta i otopljen u 20 – 40 µl vode slobodne od RNaza/DNaza (Merck Millipore, Billerica, MA, SAD).

Prema kvaliteti izolirane RNA (provjera kvalitete objašnjena u idućem poglavlju), za daljnju analizu transkriptoma odabrana su tkiva želuca i mišića štakora s vidljivim lezijama uzrokovanima prodorom ličinki nametnika, odnosno gdje su bile uočene teške upalne/hemoragijske lezije. Iz istih životinja skupljeni su uzorci za endogene kontrole (koje su

označene u tekstu kao zdrava tkiva ili kontrole), odnosno zdrava želučana i mišićna tkiva uzorkovana s mjesta bez lezije, ali komplementarna mjestu prodora ličinke. Ove kontrole korištene su u svim statističkim analizama za usporedbu sa zaraženim tkivima. Detalji o analiziranim uzorcima želučanih i mišićnih tkiva navedeni su u **tablici 3.1**. Želudac je obuhvaćao veliku krivinu (kurvaturu), fundus, piloričkі antrum i piloričkі kanal. Mišićna tkiva obuhvaćala su abdominalne, dorzalne, interkostalne mišiće i dijafragmu. U nastavku teksta prilikom korištenja izraza „želudac" i „mišić" misli se na transkriptome skupnih uzoraka. Osim navedenih, RNA je izolirana iz istih tkiva neinficiranih štakora (vanjske kontrole, nadalje ponekad nazvane i neinficirane, kako bi se izbjegla zamjena s endogenim kontrolama). Pripremljeni su skupni uzorci inficiranih i zdravih dijelova tkiva želuca (N = 8, 4 testna i 4 kontrolna) i mišića (N = 6, 3 testna i 3 kontrolna) životinja koje su bile eksperimentalno inficirane, te skupni uzorak po tkivu koji služi kao vanjska kontrola, a sadržava tkiva neinficiranih životinja iz svih vremenskih točaka.

Tablica 3.1 Detaljni opis skupnih uzoraka pripremljenih za RNA sekvenciranje. Navedeno je stanje, broj (N) bioloških replika u skupnom uzorku, uparivanje s komplementarnim kontrolnim tkivom, vrijeme uzorkovanja nakon početka eksperimenta (u satima) i opis bioloških replika. Uzorci koji potječu od štakora intubiranih s fiziološkom otopinom označeni su kao nezaraženi.

ID	Tkivo	Stanje	N replika u uzorku	Uparivanje	Uzorkovanje (h)	Opis
1_M	mišić	Zahvaćen prodorom ličinke	3	M1	6 24 32	abdominalni mišić dorzalni mišić interkostalni mišić
2_M	mišić	Zahvaćen prodorom ličinke	3	M2	18 24 32	abdominalni mišić abdominalni mišić dijafragma
3_M	mišić	Zahvaćen prodorom ličinke	3	M3	18 24 32	abdominalni mišić abdominalni mišić abdominalni mišić
1K_M	mišić	Kontrola	3	M1	6 24 32	abdominalni mišić dorzalni mišić interkostalni mišić
2K_M	mišić	Kontrola	3	M2	18 24	abdominalni mišić abdominalni mišić

					32	dijafragma
3K_M	mišić	Kontrola	3	M3	18	abdominalni mišić
					24	abdominalni mišić
					32	abdominalni mišić
K0_M	mišić	Nezaražen	9	M0	10	abdominalni mišić
					18	abdominalni mišić
					18	abdominalni mišić
					24	dorzalni mišić
					24	abdominalni mišić
					24	abdominalni mišić
					32	interkostalni mišić
					32	abdominalni mišić
					32	dijafragma
1_S	želudac	Zahvaćen prodorom ličinke	4	S1	6	velika krivina
					18	velika krivina
					24	fundus
					32	pilorički antrum
2_S	želudac	Zahvaćen prodorom ličinke	4	S2	6	pilorički kanal
					18	velika krivina
					24	fundus
					32	velika krivina
3_S	želudac	Zahvaćen prodorom ličinke	4	S3	6	fundus
					18	velika krivina
					24	velika krivina
					32	velika krivina
4_S	želudac	Zahvaćen prodorom ličinke	4	S4	6	fundus
					6	fundus
					24	velika krivina
					24	velika krivina
1K_S	želudac	Kontrola	4	S1	6	velika krivina
					18	velika krivina
					24	fundus
					32	pilorički antrum

2K_S	želudac	Kontrola	4	S2	6	pilorički kanal
					18	velika krivina
					24	fundus
					32	velika krivina
3K_S	želudac	Kontrola	4	S3	6	fundus
					18	velika krivina
					24	velika krivina
					32	velika krivina
4K_S	želudac	Kontrola	4	S4	6	fundus
					6	fundus
					24	velika krivina
					24	velika krivina
K0_S	želudac	Nezaražen	4	S0	6	pilorički antrum
					6	fundus
					24	velika krivina
					32	pilorički kanal

Kako bi se potvrdila vrsta nametnika roda *Anisakis*, korištenih u ovom eksperimentu, odabrano je 14 ličinki uzorkovanih u procesu prodiranja želuca ili mišića, kojima je izolirana DNA iz TriReagent otopine (Ambion Inc., Invitrogen, Carlsbad, California, SAD), prema uputama proizvođača. Nakon odvajanja vodene faze (prema protokolu prethodno opisanom u ovom poglavlju), uzorci su se centrifugirali 5 minuta na 13.000 okretaja u minuti na 4 ºC. Svi ostaci vodene faze pažljivo su uklonjeni da se spriječi kontaminacija uzoraka DNA putem RNA. Zatim je dodano 250 µl BEB pufera (prema engl. *back extraction buffer*) uz treskanje od 1 minute na vorteks uređaju. Nakon centrifugiranja 20 minuta na 13.000 okretaja u minuti na 4 ºC, skupljen je vodeni sloj te je na njega dodan jedan volumen izopropilnog alkohola. Uzorci su promiješani, inkubirani 5 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugirani 15 minuta na 13.000 okretaja u minuti na 4 ºC. Uklonjen je supernatant i na pelet je dodano 500 µl 70% etilnog alkohola te su uzorci nekoliko puta okrenuti i centrifugirani 10 minuta na 13.000 okretaja u minuti. Alkohol je oprezno uklonjen i uzorci su nakon sušenja otopljeni u odgovarajućem volumenu (20 – 30 µl, ovisno o količini vidljiva taloga DNA) TE pufera (0,05 M Tris-HCl, 1 mM EDTA).

Izolirana DNA korištena je za određivanje polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata (prema engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism* - RFLP) na ITS (prema engl. *internal transcribed spacers*) regiji ribosomske DNA. ITS regija umnožena je lančanom reakcijom polimeraze (PCR) prema protokolu: početna denaturacija DNA na 94 °C 10 minuta, zatim 30 ciklusa koji su uključivali denaturaciju 30 sekundi na 94 °C, 30 sekundi spajanja početnica s kalupom na 56 °C i 75 sekundi produženja lanaca na 72 °C. Završno produženje lanaca trajalo je 7 minuta. Prisutnost produkta provjerena je na 1% agaroznom gelu, te su se potom uzorci (2 µl PCR produkta) inkubirali 3 sata na 37 °C s restrikcijskim enzimom *HinfI* i vizualizirali na 2% agaroznom gelu. RFLP uzorak karakterističan za hibridni genotip *Anisakis simplex* (sensu stricto) × *A. pegreffii* (fragmenti od 620-370-300-250 parova baza) [107] uočen je za jednu ličinku, dok je RFLP uzorak karakterističan za vrstu *A. pegreffii* (fragmenti od 370-300-250 parova baza) [107] potvrđen kod ostalih ličinki.

3.1.5 Priprema cDNA knjižnice i Illumina sekvenciranje

Ukupna RNA poslana je na suhom ledu u Laboratorij za naprednu genomiku (Institut Ruđer Bošković, Zagreb), koji je pužio uslugu provjere kakvoće uzoraka i RNA sekvenciranja. Koncentracija, čistoća i cjelovitost RNA određena je uporabom Agilent 2100 Bioanalyzera (Agilent Technologies, Santa Clara, California, SAD) i Qubit 3.0 Fluorometera (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD). S obzirom na kvalitetu uzorka i mjesto lezije, napravljeno je 16 skupnih uzoraka od najmanje tri biološke replike; sedam za mišićno tkivo i devet za tkivo želuca, kako bi se dobili robusni uzorci za procjenu promjena izražaja gena u zahvaćenim, u odnosu na neoštećena tkiva (**tablica 3.1**). Zatim se pripremila cDNA knjižnica koristeći TruSeq Stranded mRNA kit (Illumina, San Diego, California, SAD) te fragmentacija i vezanje adaptora (**dodatna slika 10.1**) potrebnih za masovni paralelni proces sekvenciranja kratkih sljedova na Illumina NextSeq 500 uređaju (Illumina, San Diego, California, SAD).

Korišteni Illumina sekvencer koristi se tehnologijom sekvenciranja s pomoću sinteze (**dodatna slika 10.2**). Protočna ćelija duž cijele površine ima pričvršćene početnice u oba smjera, na koje hibridiziraju fragmeti denaturiranih, jednolančanih cDNA modificiranih s adaptorima koji

su komplementarni početnicama. Slijedi umnažanje s pomoću premošćujućeg PCR-a te se stvaraju nakupine identičnih cDNA molekula koje služe pojačavanju signala. Korištene su četiri odijeljene staze na pločici, a na svakoj stazi može nastati nekoliko milijuna nakupina, koje se mogu razlikovati između staza. U idućem koraku identične cDNA molekule u nakupinama služe kao kalup za reakciju sinteze. Osnova je ovog tipa sekvenciranja da se zabilježi fluorescentni signal koji nastane nakon ugradnje obilježenih deoksiribonukleotida. Naime, obilježeni nukleotidi imaju na 3' hidroksilnoj skupini odcjepljivi privjesak i u jednom ciklusu sekvenciranja može se ugraditi samo jedan nukleotid u polinukleotidni lanac, čiji se fluorescentni signal snimi kamerom. Odcjepljenje biljega omogućuje ugradnju novog nukleotida i idućeg ciklusa sekvenciranja [108]. U ovom istraživanju generirane su knjižnice kratkih udaljenosti između parova očitanih fragmenata (prema engl. *paired end*). Ova vrsta knjižnica se koristi kad je dio oko kojeg se sekvencira dugačak između 200 i 800 parova baza. Rezultat su dva očitana slijeda između koji se nalazi dio kojemu se ne zna slijed, ali se zna dužina [109].

RNA sekvenciranje revolucionaliziralo je istraživanje transkriptoma. Transkriptom čini ukupan skup transkripata u stanici ili tkivu za specifičan razvojni stadij ili fiziološko stanje. Razumijevanje transkriptoma nužno je za tumačenje funkcionalnih elemenata genoma i otkrivanje molekularnih konstituenata stanica i tkiva, kao i za razumijevanje razvoja bolesti. Ključni ciljevi transkriptomike su: katalogizirati sve vrste transkripata, uključujući mRNA, nekodirajuće RNA i male RNA; odrediti transkripcijsku strukturu gena, u smislu početnih kodona, 5' i 3' krajeva, obrazaca alternativnog prekrajanja (prema engl *alternative splicing*) i drugih posttranskripcijskih modifikacija; i kvantificirati promjene razine izražaja svakog transkripta tijekom razvoja i pod različitim eksperimentalnim uvjetima [110]. Svrha opisanog istraživanja na modelnom slučajnom domaćinu bila je kvalitativno i kvantitativno razlučiti promjene u transkriptomima tkiva štakora koje su uzrokovane infekcijom *A. pegreffii* ličinki, posebice promjene izražaja kodirajućih gena.

3.1.6 Obrada sirovih podataka i mapiranje

Prosječan broj uparenih sljedova generiran po jednom uzorku iznosio je 31,2 milijuna (u rasponu od 16,4 do 37,6 milijuna sljedova). FASTQC program (Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, VB) upotrijebljen je za procjenu kvalitete dobivenih sljedova i opsega potrebnog podrezivanja datoteka u svrhu uklanjanja nepouzdanih sekvenci. Procjena kvalitete sljedova potvrdila je dobru kvalitetu podataka za sve četiri korištene staze te su sljedovi spojeni u dvije uparene FASTQ datoteke po uzorku. Primjećena je veća kvaliteta nizvodnih (prema engl. *forward*) sljedova u odnosu na uzvodne (prema engl. *reverse*), kao što je općenito opisano za Illumina sekvenciranje [111]. Program Trimmomatic [112] korišten je za uklanjanje Illumina adaptora, skraćivanje sljedova korištenjem kliznog okvira čitanja (prag kvalitete 20, veličina okvira 4) i u konačnici za uklanjanje prekratkih sljedova (< 30 baza). Sljedovi s niskom kompleksnošću (prag entropije 70) i više od maksimalno 10% neimenovanih baza (N) uklonjeni su uporabom programa PRINSEQ [113]. U prosjeku, 87% uparenih sljedova preostalo je nakon ove procedure. Sljedovi su zatim mapirani na genom štakora, *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769) (v6), Ensembl izdanje 91 [114] pomoću programa STAR [115], koji je upotrijebljen i za brojenje sljedova mapiranih u području gena. Za potrebe mapiranja korišteni su računalni resursi klastera Isabella (https://www.srce.unizg.hr/isabella). Generirani podaci pohranjeni su u javne baze podataka i javno su dostupni pod pristupnim brojem SRP150499 (ID projekta PRJNA475982) preko *NCBI Sequence Read Archive* (SRA).

3.1.7 Analiza diferencijalnoga genskog izražaja

Paket edgeR [116,117] za program R (verzija 3.4.2) [118] i Bioconductor verzija 3.6 [119] korišteni su za eksploratornu analizu podataka, normalizaciju broja očitanih nukleotidnih sljedova po transkriptu (logCPM, prem engl. *log2-counts-per-million*) te su proprijetetni statistički testovi paketa edgeR korišteni za analizu diferencijalnog izražaja gena. Na temelju različite razdiobe varijabilnosti između uzoraka i diskretnoga grupiranja nakon analize glavnih komponenti (PCA, prema engl. *principal component analysis*), uzorci želučanih i mišićnih tkiva analizirani su odvojeno. Uzorci neinficiranih štakora nisu bili uključeni u statističke analize jer su bili

predstavljeni jednim skupnim uzorkom po setu podataka te su korišteni samo u svrhu eksploratorne usporedbe s glavnim uzorcima u vizualnim prikazima. Značajke koje su bile nisko izražene (s manje od jednog očitanja po milijun po uzorku i najmanje tri u bilo kojem eksperimentalnom stanju) isključene su prije analize. Podaci izražaja gena mapirani su i prikazani preko *Entrez Gene* genskih identifikatora s pomoću paketa za anotiranje štakora org.Rn.eg.db [120].

S obzirom na to da uzorci nisu neovisni, u statističkoj analizi korišten je upareni dizajn kako bi se uzela u obzir činjenica da su inficirani uzorci i njihove kontrole podrijetlom iz iste životinje. U svim testovima prihvatljiva je vjerojatnost nastanka greške tipa I iznosila 0,05, nakon korekcije za višestruko testiranje korištenjem Benjamini *et* Hochberg metode, poznate pod nazivom FDR (prema engl. *false discovery rate*). U idućem koraku korištena je metoda TREAT [121], također implementirana u paketu edgeR, kako bi se identificirali geni s najmanje dvostrukom promjenom izražaja u eksperimentalnom stanju [116,117]. TREAT je produžetak empirijske Bayezijanske moderirane t-statistike koju je predstavio Smyth [122], a postiže pouzdane p i FDR vrijednosti za pronalaženje gena s diferencijalnim izražajem koji je biološki značajan, kada se uključi prag omjera izražaja od interesa u formalnom testiranju hipoteze. Na ovaj način analiza se usredotoči na gene koji imaju snažniju promjenu izražaja. Paket ComplexHeatmap [123] korišten je za vizualizaciju obrazaca izražaja diferencijalno reguliranih gena s pomoću raspona boja.

3.1.8 Analize funkcionalnog obogaćenja

Projekt *Gene Ontology* (GO) predstavlja sistematski pokušaj razvoja ontologije za potporu biološki smislenim anotacijama gena i njihovih produkata u širokom rasponu organizama, a obuhvaća tri domene: stanične komponente (dijelove stanice ili njezino izvanstanično okružje), molekularne funkcije (elementarne aktivnosti genskog produkta na molekularnoj razini) i biološke procese (operacije ili skupove molekularnih događaja s definiranim početkom i krajem, koji se odnose na funkcioniranje integriranih životnih jedinica: stanice, tkiva, organa i organizama) [124].

Analiza obogaćenja termina genske ontologije (prema engl. *Gene Ontology Enrichment Analysis*) u skupu diferencijalno izraženih gena (FDR < 0,05, | LogFC | >> 1, prema engl *log fold change*) izrađena je korištenjem „goana“ funkcije, koja je implementirana u paketu edgeR [116,117], s pragom FDR < 0,05, te uzimajući u obzir i ispravljajući pristranost nastalu zbog činjenice da dulji geni imaju veću vjerojatnost prolaska statističkih testova kod RNA sekvenciranja [125]. Prvih deset statistički značajno obogaćenih pojmova za želudac i prvih šest za mišić, koji opisuju biološke procese, odabrani su za vizualizaciju koristeći paket GOplot [126], koji se temelji na paketu ggplot2 [127].

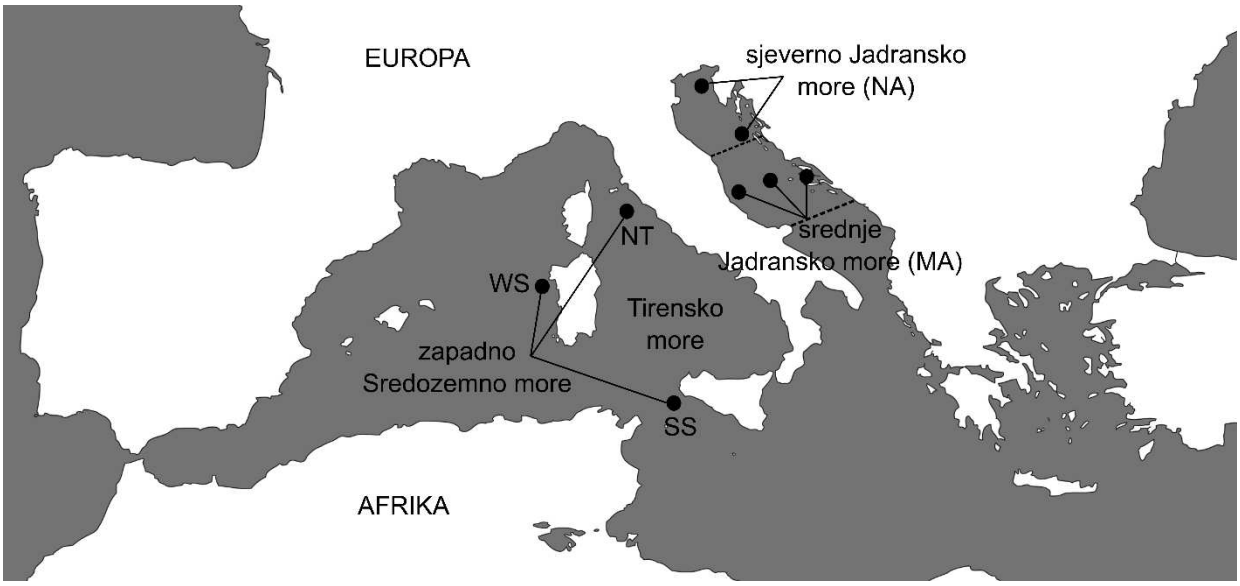
Paket gage [128] i GAGE test (prema engl. *Generally Applicable Gene-set Enrichment*) iskorišteni su za analizu obogaćenja metaboličkih mreža i puteva iz baze KEGG (prema engl. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) [129]. KEGG je sustav baza podataka koji služe za razumijevanje funkcija biološkog sustava na razini stanice, organizma i ekosustava, polazeći od informacija na genomskoj i molekularnoj razini. KEGG je organiziran u četiri kategorije: sistematske informacije, genomske informacije, kemijske informacije te zdravstvene informacije. KEGG putevi (prema engl. *pathway*) čine kolekciju ručno iscrtanih mapa koje predstavljaju sabrana znanja o metabolizmu i staničnim procesima te su molekularne interakcije i reakcije umrežene s ciljem povezivanja gena i njihovih produkata [129].

Logaritmirani (log2) omjeri izražaja, dobiveni nakon uklapanja linearnog statističkog modela u paketu edgeR [116,117], korišteni su kao obilježje gena. *T*-test izveden je kako bi se usporedile prosječne vrijednosti log omjera izražaja gena po funkcionalnom KEGG setu, za želudac i mišić odvojeno, u relativnom odnosu na prosječni log omjer izražaja svih filtriranih gena. Testovi su napravljeni za potaknute, utišane i obostrano regulirane puteve, odvojeno za metaboličke i signalne setove te setove povezane s bolestima. Prag statističke značajnosti postavljen je na zadanu graničnu *q* vrijednost od 0,1. U rezultatima su predstavljeni oni metabolički i signalni putevi s povišenom ili sniženom regulacijom, koji su zadovoljili strože kriterije statističke značajnosti (*q* vrijednost < 0,01). Paket Pathview [130] korišten je za vizualizaciju log omjera diferencijalno izraženih gena (FDR < 0,05) na mapama KEGG baze, za odabrane statistički značajne puteve za koje se smatra da predstavljaju najzanimljivije nalaze ovog eksperimenta.

3.2 Metode i materijal u istraživanju parateničnog domaćina

3.2.1 Uzorkovanje parateničnog domaćina (*Sardina pilchardus*)

Ukupno 1564 jedinke srdele uzorkovane su iz različitih geografskih područja Sredozemnog mora, u razdoblju od 2013. do 2015. godine (**slika 3.1**). Tijekom 2013. i 2014. godine prikupljeno je 908 srdela s postaja uzorkovanja u Jadranskome moru, dok je u 2015. godini skupljeno 656 srdela s postaja uzorkovanja u zapadnom Sredozemnome moru. Svi uzorci prikupljeni su tijekom toplijeg dijela godine, odnosno tijekom proljetnog i ljetnog razdoblja. Iako su sve postaje uzorkovanja u Jadranskome moru dio iste FAO (prema engl. *Food and Agriculture Organization*) europske ribolovne zone 37.2.1, uzorci su dodatno podijeljeni u dvije podregije: sjeverni (NA) i srednji (MA) Jadran, jer ih karakteriziraju jedinstvene batimetrijske, hidrografske i ekološke osobine [131]. Na temelju navedenih osobina Jadran je općenito podijeljen u tri regije: sjeverni, srednji i južni Jadran [132–134] (prikazano kao isprekidane linije na **slici 3.1**). Sjeverni Jadran najplići je i pod snažnim utjecajem priljeva rijeka sa sjevera Italije [135], što uzrokuje njegove borealne osobine i najvišu stopu organske proizvodnje u Sredozemnome moru [131]. Srednji Jadran dublji je i doseže 280 metara u Jabučkoj kotlini, a Palagruški prag (180 metara dubine) odvaja ga od južnog Jadrana [135]. Južni Jadran najdublji je dio Jadranskog mora i nalazi se pod snažnim utjecajem Jonskog mora [131]. Što se tiče postaja uzorkovanja u zapadnom Sredozemnome moru, one obuhvaćaju mnogo veće područje, koje je heterogeno u smislu abiotičkih i biotičkih obilježja. Stoga su sve tri postaje uzorkovanja u zapadnom Sredozemnome moru analizirane odvojeno. To su postaja u sjevernom Tirenskome moru (FAO 37.1.3), postaja uzorkovanja pokraj zapadne Sardinije (WS) (FAO 37.1.1) i postaja uzorkovanja pokraj južne Sicilije (SS) (FAO 37.2 .2).



Slika 3.1 Karta Sredozemnog mora na kojoj su označena uzorkovana geografska područja. Postaje uzorkovanja u zapadnom Sredozemnome moru: WS – postaja pokraj zapadne Sardinije, SS – postaja pokraj južne Sicilije, NT – sjeverno Tirensko more. Postaje uzorkovanja na Jadranu: MA – srednje Jadransko more, NA – sjeverno Jadransko more.

3.2.1 UV-kompresijska metoda detekcije *Anisakis* spp. i identifikacija vrste ličinki

Svi uzorci srdela kupljeni su na ribarnici ili su ih ribari ili pouzdani trgovci isporučili poleđene u istraživačke ustanove. Nakon mjerenja ukupne duljine do najbližih 1 mm i mase do najbližih 0,1 g, svakoj srdeli odvojeni su visceralni organi od filea i spremljeni u prozirne plastične vrećice, prešani pod hidrauličkom prešom i pohranjeni na -20 °C najmanje 24 sata. Za pregledavanje uzoraka korištena je UV-kompresijska metoda [136], koja iskorištava prirodnu pojavu fluorescencije zamrznutih ličinki *Anisakidae* obitelji. Metoda se temelji na vizualnoj inspekciji prešane riblje utrobe (visceralnih organa) i filea koji su nakon dubokog zamrzavanja pregledani pod UV svjetlom valne duljine od 366 nm. Lijevi i desni filei odvojeni su na anterio-ventralni (AV), anterio-dorzalni (AD), posterio-ventralni (PV) i posterio-dorzalni (PD) dio, te je broj nametnika zabilježen za svaki dio filea zasebno. Isto je primijenjeno na visceralnim organima, koji su razdijeljeni na jetru, gonade i želudac/piloričnе nastavke/crijevo. Nametnici su izbrojeni i identificirani do roda s pomoću svjetlosnoga mikroskopa Olympus SZX10 (Olympus Corp., Shinjuku, Tokyo, Japan), prema morfološkim dijagnostičkim ključevima [137].

Uzorak od 67 ličinki *Anisakis* tipa I identificiran je do vrste upotrebom genotipizacije preko više biljega. Prema alelima promatranima na dijagnostičkim alozimskim lokusima, tj. Adk-2100, Pep C-1100 i Pep C-2100 [138], 67 ličinki *Anisakis* tipa I iz svih točaka uzorkovanja identificirane su kao vrsta *Anisakis pegreffii*. Ukupna DNA izolirana je korištenjem CTAB metode, kako je prethodno opisano u literaturi [138]. Ukratko, komadić usitnjena tkiva oblića duljine 0,5 – 1 cm (ili 15 – 20 mg tkiva) dodan je u plastičnu tubicu od 1,5 ml s 500 µl CTAB otopine i 5 µl enzima proteinaze K (10 mg/ml). Uzorci su inkubirani uz treskanje 5 sati na 55 °C, do potpune razgradnje tkiva. Nakon razgradnje tkiva, u svaki uzorak dodano je 500 µl smjese fenol : kloroform : izoamilni alkohol u omjeru 25 : 24 : 1, saturirane s 10 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA. Uzorci su nakon toga protreseni 15 sekunda na vorteks aparatu i centrifugirani 10 minuta na 13.000 okretaja u minuti. Supernatant u vodenom sloju premješten je u čistu plastičnu tubicu od 1,5 ml i ponovljena je procedura smjesom fenol : kloroform : izoamilni alkohol. Nakon toga je ponovno supernatant prebačen u čistu plastičnu tubicu od 1,5 ml i dodano je 500 µl kloroforma. Uzorci su nakon toga protreseni 15 sekunda na vorteks aparatu, centrifugirani 10 minuta na 13.000 okretaja u minuti. Supernatant u vodenom sloju prebačen je u čistu plastičnu tubicu od 1,5 ml i dodano je 1000 µl apsolutnog etilnog alkohola i 20 µl 5M NaCl, te su uzorci stavljeni na -20 °C pola sata. Nakon toga su centrifugirani 10 minuta na 13.000 okretaja u minuti i sva tekućina oprezno je uklonjena, jer je talog DNA pričvršćen na dnu tubice. Dodano je 500 µl 70% etilnog alkohola, uzorci su nekoliko puta okrenuti i centrifugirani 10 minuta na 13.000 okretaja u minuti. Alkohol je oprezno uklonjen i uzorci su nakon sušenja otopljeni u odgovarajućem volumenu (20 – 30 µl, ovisno o količini vidljiva taloga DNA) TE pufera (0,05 M Tris-HCl, 1mM EDTA). Kvaliteta i kvantiteta DNA procijenjena je s pomoću spektrofotometra (Eppendorf, Qiagen, Ilden, Njemačka).

Dio podjedinice II mitohondrijske (mtDNA) citokrom c oksidaze (cox2) amplificiran je s pomoću početnica 211F (5'-TTTTCTAGTTATATAGATTGRTTYAT-3') i 210R (5'-CACCAACTCTTAAAATTATC-3') [139] lančanom reakcijom polimeraze (PCR) prema protokolu: početna denaturacija DNA na 94 °C 3 minute, zatim 34 ciklusa koji su se sastojali od denaturacije 30 sekunda na 94 °C te 1 minutu spajanja početnica s kalupom na 46 °C i 90 sekunda produženja lanaca na 72 °C. Završno produženje lanaca trajalo je 10 minuta. Prisutnost produkta provjerena je na 1% agaroznom gelu te je produkt nakon pročišćavanja komercijalno sekvenciran (Macrogen Europe, Amsterdam, Nizozemska). Dobivene sekvence uspoređene su s onima koje su

prethodno objavljene u GenBank bazi podataka za vrste *A. simplex* (s. s.) (DQ116426), *A. pegreffii* (JQ900761), *A. berlandi* (KC809999), *A. typica* (DQ116427), *A. ziphidarum* (DQ116430), *A. nascettii* (FJ685642), *A. physeteris* (DQ116432), *A. brevispiculata* (DQ116433) i *A. paggiae* (DQ116434). Svih 67 sekvenci mtDNA cox2 potvrdile su identifikaciju vrste *A. pegreffii* te su priložene u GenBank bazu pod pristupnim brojevima: MF960820, MF960821 i MF960822. Uz oblića *A. pegreffii*, uzorci nametnika *Hysterothylacium* sp. (Nematoda, Raphidascarididae) također su prikupljeni s visceralnih organa i identificirani prema morfološkim dijagnostičkim ključevima [137].

3.2.2 Statističke analize

Parametri koji opisuju populaciju nametnika: prevalencija, prosječni intenzitet i prosječna abundancija izračunani su u programu Quantitative Parasitology 3.0 [140]. Sterneov 95% interval pouzdanosti (ili prilagođeni Waldov za N > 1000) izračunan je za prevalenciju i *bootstrap* 95% interval pouzdanosti (2000 b*ootstrap* ponavljanja) za prosječnu abundanciju i intenzitet. Negativni binomialni model predstavljao je analizirane podatke prema metodi maksimalne vjerojatnosti [141]. Indeksi agregiranja korišteni u ovom istraživanju omjer su varijance i srednjaka te indeks nepodudarnosti D [142]. Usporedba razina infekcije oblićem *A. pegreffii* u srdele izračunana je u programu Quantitative Parasitology 3.0 [140] koristeći Fisherov egzaktni test ili egzaktni nekondicionirani test (za prevalenciju, ovisno o veličini uzorka) [143] i *bootstrap t*-test za dva uzorka (prosječna abundancija i intenzitet infekcije). Pearsonova korelacija korištena je za testiranje povezanosti abundancije nametnika i duljine ribe (SPSS Statistics, verzija 14.0, SPSS INC., Chicago, Illinois, SAD). Budući da se duljina ribe pokazala značajnim prediktorom abundancije nametnika za oba istraživana geografska područja i obje vrste istraživanih nametnika (u Jadranu za *A. pegreffii*: $\rho = 0.20$, $p < 0,01$ i za *Hysterothylacium* sp.: $\rho = 0,21$, $p < 0,01$; u zapadnom Sredozemnom moru za *A. pegreffii*: $\rho = 0,44$, $p < 0,01$ i za *Hysterothylacium* sp.: $\rho = 0,02$, $p = 0,76$ – za posljednji podatak nije zabilježena korelacija zbog niske prevalencije oblića *Hysterothylacium* sp.), u sve iduće analize duljina ribe uvedena je kao kovarijabla. Trofaktorska analiza varijance s kontrolom kovarijabli (ANCOVA) upotrijebljena je za testiranje abundancije nametnika u odnosu na lokaciju unutar ribe (visceralni organi i dijelovi filea) u Jadranskome moru

(faktori „lokacija“, „godina“ i „postaja uzorkovanja“), dok je za područje zapadnog Sredozemnog mora primijenjena dvofaktorska ANCOVA, bez faktora „godina“. Na isti način testirana je abundancija nametnika prema lokaciji unutar filea (dorzalni i trbušni dio/lijevi i desni file).

Trofaktorska ANCOVA korištena je za testiranje razlike u abundanciji nametnika s obzirom na vrstu oblića, kao i između postaja uzorkovanja i tijekom vremena za podatke iz Jadranskog mora (budući da je uzorkovanje trajalo dvije godine), dok je za zapadno Sredozemno more korištena dvofaktorska ANCOVA. Trofaktorski model uključivao je fiksne i međusobno ortogonalne faktore „vrsta nametnika“, „postaja uzorkovanja“ i „godina“. Duljina ribe smatrala se kovarijablom s već navedenim faktorima u jednome modelu, na taj način ne uzimajući u obzir varijaciju u abundanciji nametnika koja je povezana s duljiom ribe. Dvofaktorski model nije imao faktor „godina“.

Prije provođenja testa ANCOVA, pretpostavka normalne razdiobe i homogenosti varijance testirana je Kolmogorov-Smirnov i Levene testovima. Parametrijske statističke metode nisu idealno prilagođene uobičajenoj negativnoj binomijalnoj raspodjeli nametnika, ali ANCOVA testovi na netransformiranim podacima relativno su robusni kad se koriste na velikom broju uzoraka, kao što je ovdje slučaj. Budući da podaci za oba geografska područja nisu imali normalnu razdiobu, u svim analizama korišteni su netransformirani podaci. Zbog povećane vjerojatnosti pogreške tipa I [144], razina značajnosti postrožena je ($p < 0,01$). *Post-hoc* test u slučaju pronalaska značajne razlike između podataka bio je Games-Howell, jer ne pretpostavlja jednake varijance te je prikladan kad postoji razlika u veličini uzoraka [145].

4. Rezultati

4.1 Rezultati istraživanja na modelnom slučajnom domaćinu

4.1.1 Vremenski tijek infekcije

Rezultati preliminarnog eksperimenta pokazali su da je vrijeme zadržavanja *Anisakis pegreffii* ličinki kod štakora relativno kratko (odnosi se na razdoblje od intubacije infektivnih ličinki u želudac štakora do trenutka napuštanja domaćina) (**tablica 4.1**). Već šest sati nakon infekcije, ličinke napuštaju domaćina (između 80 i 90% L3 je opaženo unutar domaćina u preliminarnoj i eksperimentalnoj infekciji), a nakon 24 sata pronađeno ih je oko 30% unutar domaćina. *A. pegreffii* ličinke nisu sinkronizirano migrirale tijekom infekcije. Uočena su dva načina napuštanja domaćina tijekom preliminarne i eksperimentalne infekcije. Jedan je način pasivno izbacivanje kroz probavni sustav, potpomognuto peristaltikom, bez vidljiva oštećenja tkiva. Drugi je način penetracija želuca, tankog ili debelog crijeva, s migracijom kroz trbušnu, prsnu ili zdjeličnu šupljinu, uključujući i abdominalne mišiće. Prodiranje epidermisa zapaženo je samo u preliminarnom eksperimentu. U većini slučajeva *A. pegreffii* L3 zapažene su tijekom prodiranja na različitim mjestima sluznice želuca, potom i abdominalnih mišića, te su upravo ta tkiva odabrana za daljnje molekularne i histopatološke analize.

Tablica 4.1 Sažeti prikaz eksperimentalne infekcije Sprague-Dawley štakora s trećim stadijem *Anisakis pegreffii* ličinki (L3). Naveden je broj intubiranih životinja (N), vrijeme uzorkovanja (h), organ na kojem su ličinke pronađene tijekom razudbe i postotak pronađenih ličinki (% L3).

Istraživanje	N životinja	Uzorkovanje p/i (h)	% L3	SD (%)	Organ na kojem su pronađene L3 (%)
preliminarno	3	6	83,3	5,8	52% crijevo, 36% želudac, 12% jetra
preliminarno	3	10	55,6	41,1	35,3% želudac/crijevo (pojedinačno), 11,7% mišić, 5,9% epidermis/slezena/jetra (pojedinačno)
preliminarno	3	24	27,0	28,6	25% mišić/peritoneum/zdjelična šupljina (pojedinačno), 12,5% želudac/crijevo (pojedinačno)
preliminarno	3	48	16,7	15,3	100% želudac
preliminarno	3	72	15,0	21,2	33,3% peritoneum/slezena/crijevo (pojedinačno)
eksperimentalno	5	6	89,3	13,6	46,7% želudac, 37,8% crijevo, 6,7% peritoneum, 4,4% mišić, 2,2% jetra/trbušna šupljina (pojedinačno)
eksperimentalno	5	10	78,9	11,7	57% crijevo, 38% želudac, 5% peritoneum
eksperimentalno	5	18	38,3	33,3	70% želudac, 10% zdjelična šupljina/mišić/peritoneum (pojedinačno)
eksperimentalno	5	24	30,0	18,2	33,3% želudac, 25% mišić, 16,7% crijevo/trbušna šupljina (pojedinačno), 8,3% peritoneum
eksperimentalno	5	32	29,2	27,9	45,4% želudac, 27,3% mišić, 18,2% peritoneum, 9,1% crijevo

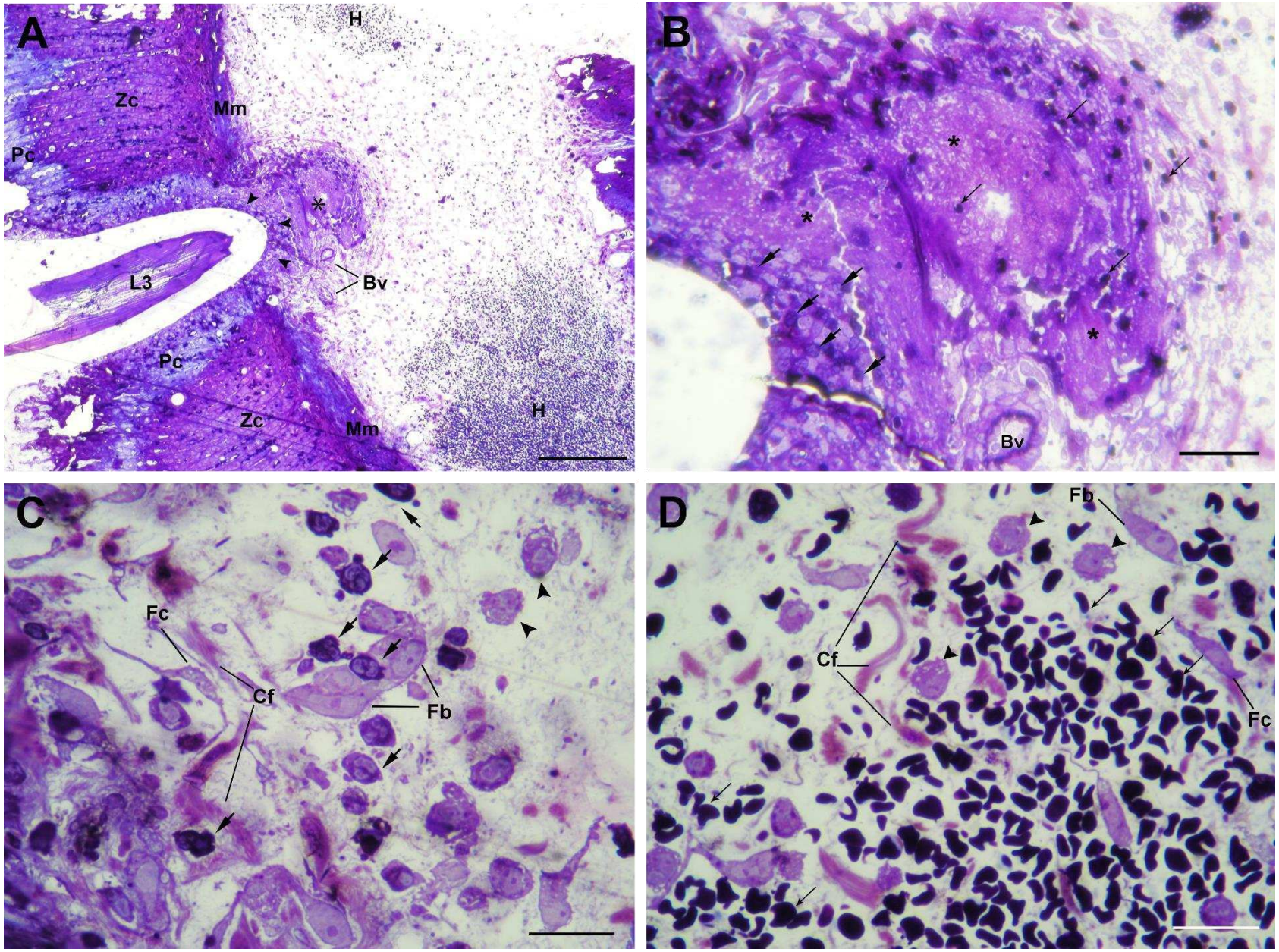
p/i – nakon infekcije, SD – standardna devijacija.

4.1.2 Histopatologija infekcije modelnog slučajnog domaćina oblićem *Anisakis pegreffii*

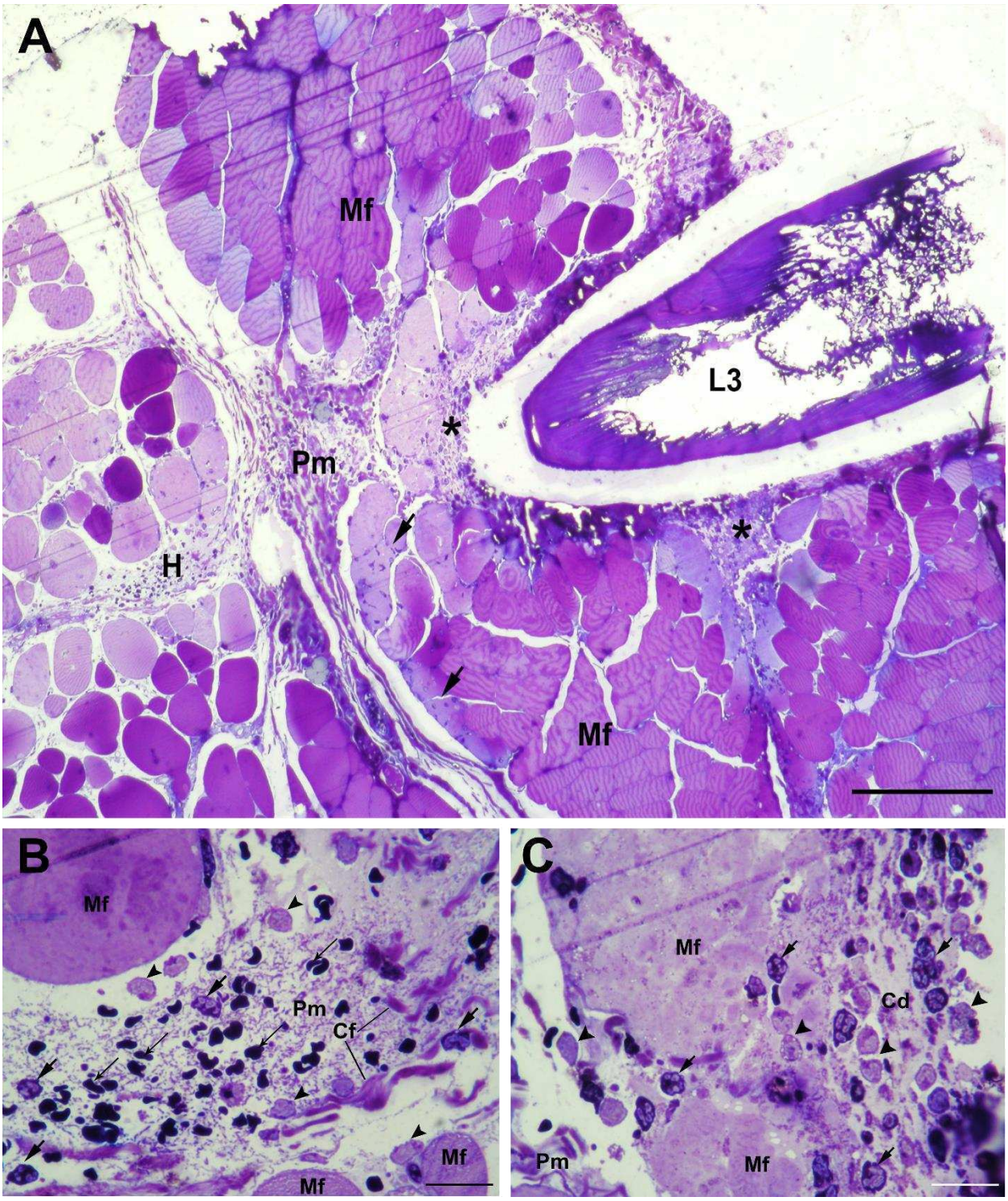
Unutar želuca *A. pegreffii* ličinke pronađene su u ranoj fazi migracije kroz želučani zid, uzrokujući kompresiju i nekrozu okolnih parijetalnih i zimogenih stanica sluznice (**slika 4.1 A**). Na mjestu penetracije uočen je infiltrat polimorfonuklearnih leukocita (pretežno neutrofili i

povremeno eozinofili), dok su makrofagi uočeni u manjem broju. Na rezovima tkiva vidljivo je da stanice nisu u izravnom dodiru s kutikulom ličinke, vjerojatno zbog sažimanja tkiva zbog pripreme uzoraka. Na mjestu migracije ličinke vidljiva je ruptura bazalne membrane i *muscularis mucosae*. U blizini dviju susjednih arterija u submukozi primijećeno je veliko nekrotično područje pomiješano s manjim upalnim infiltratom i blago krvarenje (**slika 4.1 A** i **B**, zvjezdica). Obilna krvarenja koja su opažena prilikom razudbe životinja također su vidljiva u submukoznom sloju. Submukoza je pretežno infiltrirana polimorfonuklearnim leukocitima (pretežno neutrofilima) i makrofagima, koji su prisutni između vlakana vezivnoga tkiva, fibroblasta i fibrocita. Polimorfonuklearni leukociti koncentrirani su oko nekrotičnog područja pokraj susjednih krvnih žila i migrirajuće *A. pegreffii* ličinke (**slika 4.1 C**). Makrofagi su vidljivi u dubljim slojevima submukoze, bliže velikom submukoznom krvarenju (**slika 4.1 D**).

U abdominalnoj muskulaturi, *A. pegreffii* ličinka uzrokovala je fragmentaciju tkiva i nekrozu duž migracijskog puta (**slika 4.2 A**). U perimizijalnom vezivu prisutan je izvanstanični edem i umjereno krvarenje s upalnim infiltratom sačinjenim od polimorfonuklearnih leukocita (pretežno neutrofila) i makrofaga (**slika 4.2 B**). Nekoliko polimorfonuklearnih leukocita također je bilo vidljivo u endomiziju i između miocita na mjestu penetracije ličinke. Pri povećanju 1000 puta otkriveno je strukturno raspadanje i nekroza mišićnih vlakana koja okružuju ličinku, s nakupljanjem obilnog staničnog detritusa, pomiješanog s brojnim polimorfonuklearnim leukocitima i makrofagima (**slika 4.2 C**).


A
H
Zc
Mm
Pc
L3
Bv
Pc
Zc
Mm
H
B
Bv
C
Fc
Cf
Fb
D
Fb
Cf
Fc

Slika 4.1 Histopatološki nalazi u želucu nakon penetracije *A. pegreffii* L3 ličinke. (**A**) Rana faza migracije *A. pegreffii* L3 ličinke kroz sluznicu želučane stijenke te uzrokovana kompresija i nekroza okolnih parijetalnih (Pc) i zimogenih stanica (Zc). Migracija ličinke uzrokovala je rupturu bazalne membrane i *muscularis mucosae* (Mm). Veliko nekrotično područje (zvjezdice) može se vidjeti pored dviju krvnih žila (Bv), odmah ispod glatkih mišićnih vlakana. Nekoliko tipova upalnih stanica, (vrhovi strelica), može se vidjeti na mjestu penetracije ličinke. Na periferiji se može vidjeti veliko krvarenje (H) sa zrelim eritrocitima u submukozi. Duljina oznake = 200 μm. (**B**) Detalj velikog nekrotičnog područja (zvjezdice) pored krvne žile na mjestu penetracije ličinke, pomiješan s nekolicinom eritrocita (tanke strelice). Na dnu lezije, mogu se vidjeti neutrofili (strelice) koji su okružili mjesto penetracije ličinke. Duljina oznake = 50 μm. (**C**) Upalni infiltrat pri velikom povećanju, bliže mjestu prodiranja ličinke i veliko nekrotično područje s brojnim neutrofilima (strelice) i nekolicinom makrofaga (vrhovi strelica) raspršenima između kolagenskih vlakana (Cf), fibroblasta (Fb) i fibrocita (Fc). Duljina oznake = 20 μm. (**D**) Opsežno submukozno krvarenje pri velikom povećanju, s brojnim zrelim eritrocitima (tanke strelice) i nekoliko makrofaga (vrhovi strelica) između kolagenskih vlakana (Cf), te u manjoj mjeri fibroblasta (Fb) i fibrocita (Fc). Duljina oznake = 20 μm (1% otopina toluidinskog modrila).

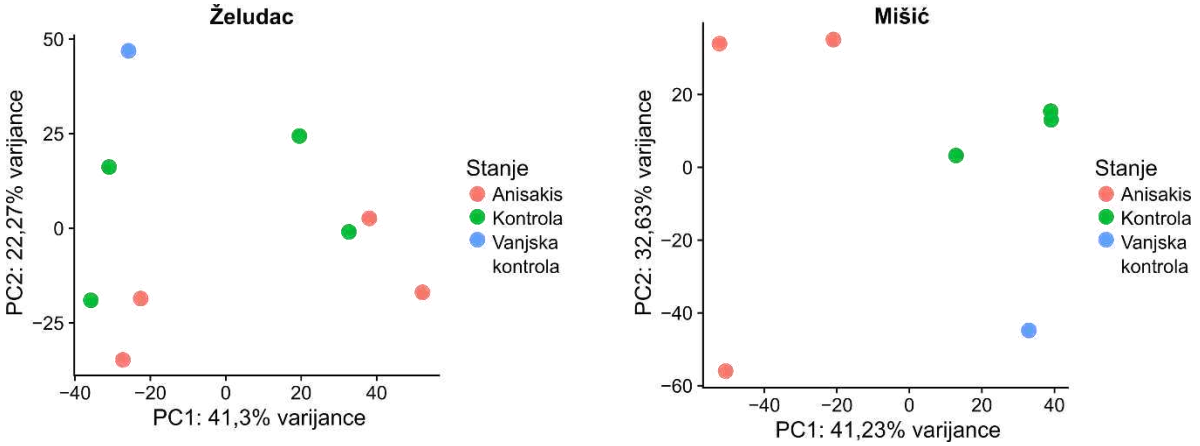


Slika 4.2 Histopatološki nalazi u abdominalnome mišiću nakon penetracije *A. pegreffii* L3 ličinke. (**A**) Zbog migracije *A. pegreffii* L3 ličinke kroz perimizijalno vezivno tkivo, nastala je nekroza tkiva i pucanje mišićnih vlakana (Mf) duž migracijskog puta. Mogu se vidjeti velike površine ispunjene staničnim detritusom, pomiješane s obilnim upalnim infiltratom (zvjezdice). Umjereno krvarenje (H) u perimiziju (Pm), zajedno s umjerenim upalnim infiltratom, može se vidjeti u

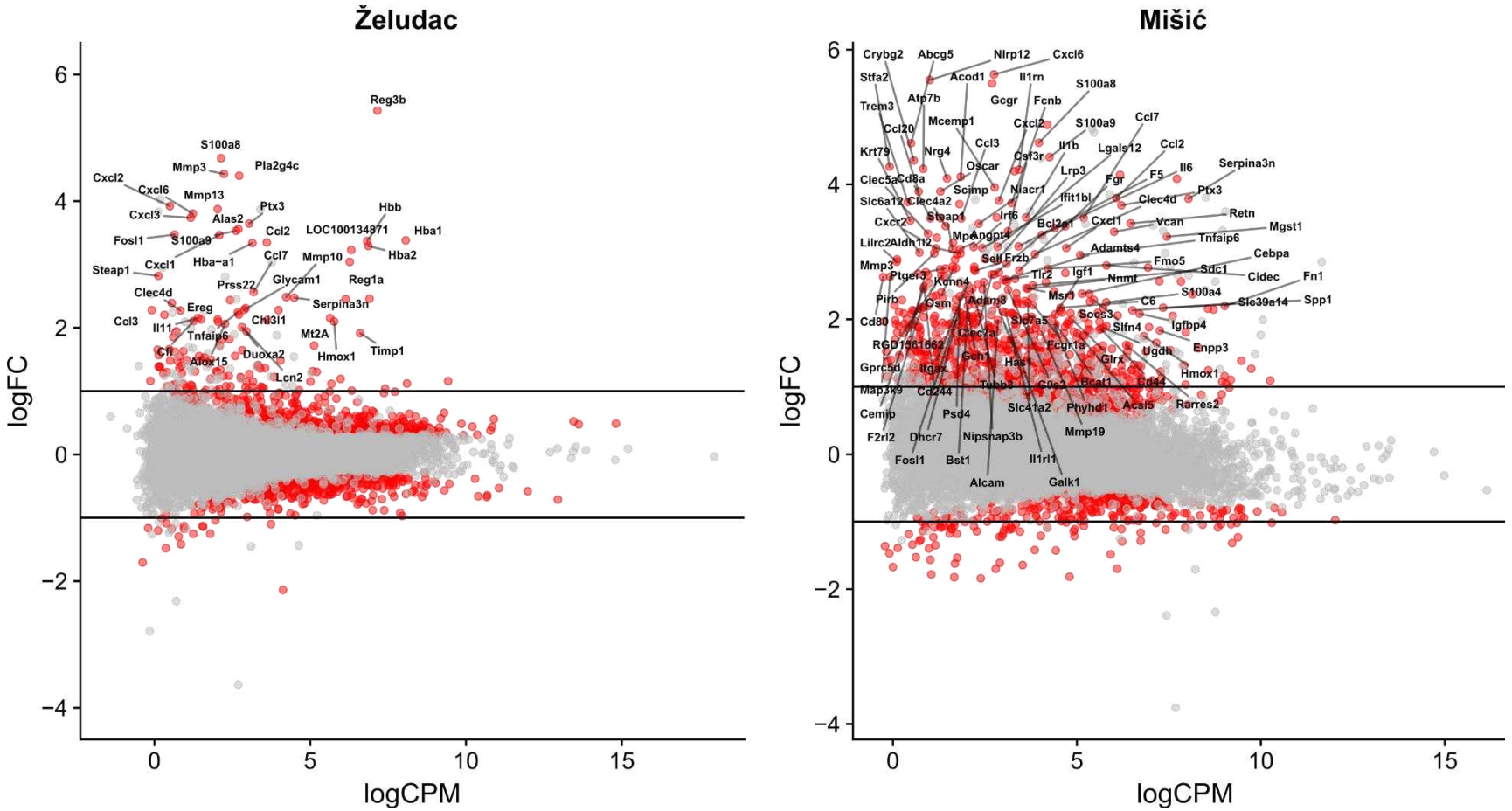
neposrednoj blizini ličinke. Nekolicina polimorfonuklearnih leukocita može se vidjeti u endomiziju i u migraciji preko mišićnih vlakana (Mf) prema mjestu prodora ličinke (strelice). Duljina oznake = 200 µm. (**B**) Perimizijalno krvarenje pri velikom povećanju (H) sa zrelim eritrocitima (tanke strelice) i upalnim infiltratom sastavljenim uglavnom od neutrofila (strelice) i malim brojem makrofaga (vrhovi strelica) raspršenih između vlakana vezivnog tkiva. Duljina oznake = 20 µm. (**C**) Nekrotično područje pri velikom povećanju, koje pokazuje pucanje zahvaćenih mišićnih vlakana (Mf) i obilni stanični detritus (Cd), pomiješan s brojnim neutrofilima (strelice) i makrofagima (vrhovi strelica) blizu ličinke u perimiziju (Pm) (1% toluidinsko modrilo). Duljina oznake = 20 µm.

4.1.3 Diferencijalno izraženi geni

L3 ličinke vrste *A. pegreffii* migrirale su nesinkronizirano i nisu pokazale preferenciju za mjesto prodiranja unutar pregledanih tkiva. Sukladno tomu, opažena je nešto veća varijabilnost između uzoraka unutar eksperimentalnih skupina korištenjem PCA analize (**slika 4.3**). Ipak, statistička analiza otkrila je zajedničke uzorke regulacije gena povezanih s *A. pegreffii* infekcijom u želučanim i mišićnim tkivima. Ukupno je bilo 1372 (855 povišenog izražaja i 517 sniženog izražaja) diferencijalno izraženih (DE, prema engl. *differentially expressed*) gena (FDR < 0,05) u tkivima želuca zahvaćenima prodorom ličinke *A. pegreffii* i 1633 (1230 povišenog izražaja i 403 sniženog izražaja) DE gena u mišićnim tkivima štakora zahvaćenima prodorom ličinke *A. pegreffii* (**slika 4.4**), u usporedbi s odgovarajućim kontrolama. Potpuni popis gena javno je dostupan među dodatnim materijalima objavljenog znanstvenog članka na sljedećoj poveznici: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.02055/full#supplementary-material.
Samo dio DE gena povišenog izražaja prošao je TREAT test i pokazao snažne i značajne promjene u odnosu na kontrolu (LogFC >> 1): 41 gen u želučanim (**tablica 4.2**) i 111 gena u mišićnim tkivima (**tablica 4.3**).



Slika 4.3 Vizualizacija prvih dviju komponenti proizašlih iz analize glavnih komponenti (prema engl. *principal component analysis*, PCA) izvršenih na logCPM (prema engl. *log2 counts per million*) normaliziranim vrijednostima izražaja gena u tkivima domaćina (želudac i mišić) koja su bila zahvaćena prodorom ličinki (*Anisakis*), susjednih zdravih tkiva eksperimentalno zaraženih Sprague-Dawley štakora (Kontrola) i istih tkiva neinficiranih štakora (Vanjska kontrola).



Slika 4.4 Vizualizacija odnosa između logaritma omjera izražaja gena u tkivima štakora zahvaćenima prodorom *A. pegreffii* ličinke u odnosu na kontrolna tkiva i prosječne jačine izražaja gena preko svih eksperimentalnih skupina. Statistički značajno (FDR < 0,05) diferencijalno izraženi geni su prikazani u crvenoj boji, dok su diferencijalno izraženi geni koji su prošli TREAT test (| logFC | >> 1) označeni simbolima gena. Puni nazivi gena prema engleskom jeziku su navedeni u **tablici 4.2** i **tablici 4.3**.

Tablica 4.2 Popis diferencijalno izraženih gena (FDR < 0,05) u želucima štakora inficiranih s oblićem *A. pegreffii*, nakon TREAT testa, složeni prema rastućim FDR vrijednostima. Navedeni su opisi (prema engleskom nazivu) i simboli gena, log2 omjera izražaja gena (logFC), p vrijednosti i FDR. Veće vrijednosti omjera izražaja istaknute su tamnijim nijansama plave boje.

	Opis gena	Simbol gena	logFC	p vrijednost	FDR
1	*regenerating family member 3 gamma*	*Reg3g*	6,253	1,24E-178	1,53E-174
2	*regenerating islet-derived 3 alpha*	*Reg3a*	6,449	1,05E-39	6,49E-36
3	*S100 calcium binding protein A8*	*S100a8*	4,678	5,52E-30	2,26E-26
4	*C-C motif chemokine ligand 2*	*Ccl2*	3,347	1,32E-29	4,07E-26
5	*regenerating family member 3 beta*	*Reg3b*	5,43	1,28E-21	3,16E-18
6	*matrix metallopeptidase 13*	*Mmp13*	3,874	2,24E-19	4,59E-16
7	*S100 calcium binding protein A9*	*S100a9*	3,532	9,49E-19	1,67E-15
8	*C-X-C motif chemokine ligand 1*	*Cxcl1*	3,463	1,28E-17	1,97E-14
9	*matrix metallopeptidase 3*	*Mmp3*	4,431	1,05E-16	1,43E-13
10	*C-X-C motif chemokine ligand 6*	*Cxcl6*	3,802	1,00E-15	1,23E-12
11	*regenerating family member 1 alpha*	*Reg1a*	3,041	8,71E-14	9,34E-11
12	*C-C motif chemokine ligand 7*	*Ccl7*	2,566	9,10E-14	9,34E-11
13	*5'-aminolevulinate synthase 2*	*Alas2*	3,56	2,59E-13	2,45E-10
14	*glycosylation dependent cell adhesion molecule 1*	*Glycam1*	2,283	2,24E-11	1,97E-08
15	*chitinase 3 like 1*	*Chi3l1*	2,31	2,42E-11	1,99E-08
16	*pentraxin 3*	*Ptx3*	3,645	1,96E-10	1,51E-07
17	*chemokine (C-X-C motif) ligand 3*	*Cxcl3*	3,738	4,05E-10	2,94E-07
18	*hemoglobin subunit beta*	*Hbb*	3,369	2,66E-09	1,82E-06
19	*C-X-C motif chemokine ligand 2*	*Cxcl2*	3,921	2,81E-09	1,82E-06
20	*hemoglobin, alpha 2*	*Hba2*	3,291	3,36E-09	2,07E-06
21	*hemoglobin, alpha 1*	*Hba1*	3,381	1,51E-08	8,82E-06
22	*FOS like 1, AP-1 transcription factor subunit*	*Fosl1*	3,471	6,46E-08	3,61E-05
23	*TIMP metallopeptidase inhibitor 1*	*Timp1*	1,915	1,06E-07	5,69E-05
24	*dual oxidase maturation factor 2*	*Duoxa2*	2,01	3,14E-07	0,000161218
25	*lipocalin 2*	*Lcn2*	1,943	5,49E-07	0,000270176
26	*STEAP family member 1*	*Steap1*	2,82	1,18E-06	0,000557445
27	*heme oxygenase 1*	*Hmox1*	2,099	1,52E-06	0,00069466
28	*phospholipase A2 group IVC*	*Pla2g4c*	4,402	2,01E-06	0,00088506

29	*beta globin minor gene*	*LOC100134871*	3,229	2,31E-06	0,000978512
30	*hemoglobin alpha, adult chain 1*	*Hba-a1*	3,338	7,43E-06	0,003047367
31	*arachidonate 15-lipoxygenase*	*Alox15*	2,06	7,84E-06	0,003114085
32	*protease, serine, 22*	*Prss22*	2,439	4,02E-05	0,015450787
33	*metallothionein 2A*	*Mt2A*	2,154	4,52E-05	0,016867502
34	*interleukin 11*	*Il11*	2,155	6,60E-05	0,023880457
35	*serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3N*	*Serpina3n*	2,476	7,36E-05	0,025869244
36	*TNF alpha induced protein 6*	*Tnfaip6*	2,242	0,000105925	0,036220297
37	*epiregulin*	*Ereg*	2,133	0,000109574	0,036455565
38	*matrix metallopeptidase 10*	*Mmp10*	2,485	0,000118703	0,038453685
39	*C-C motif chemokine ligand 3*	*Ccl3*	2,279	0,000148223	0,046785114
40	*complement factor I*	*Cfi*	2,106	0,000154753	0,047572957
41	*C-type lectin domain family 4, member D*	*Clec4d*	2,273	0,000158448	0,047572957

Tablica 4.3 Popis diferencijalno izraženih gena (FDR < 0,05) u mišićima štakora inficiranih oblićem *A. pegreffii*, nakon TREAT testa, složeni prema rastućim FDR vrijednostima. Navedeni su opisi (prema engleskom nazivu) i simboli gena, log2 omjera izražaja gena (logFC), p vrijednosti i FDR. Veće vrijednosti omjera izražaja istaknute su tamnijim nijansama plave boje.

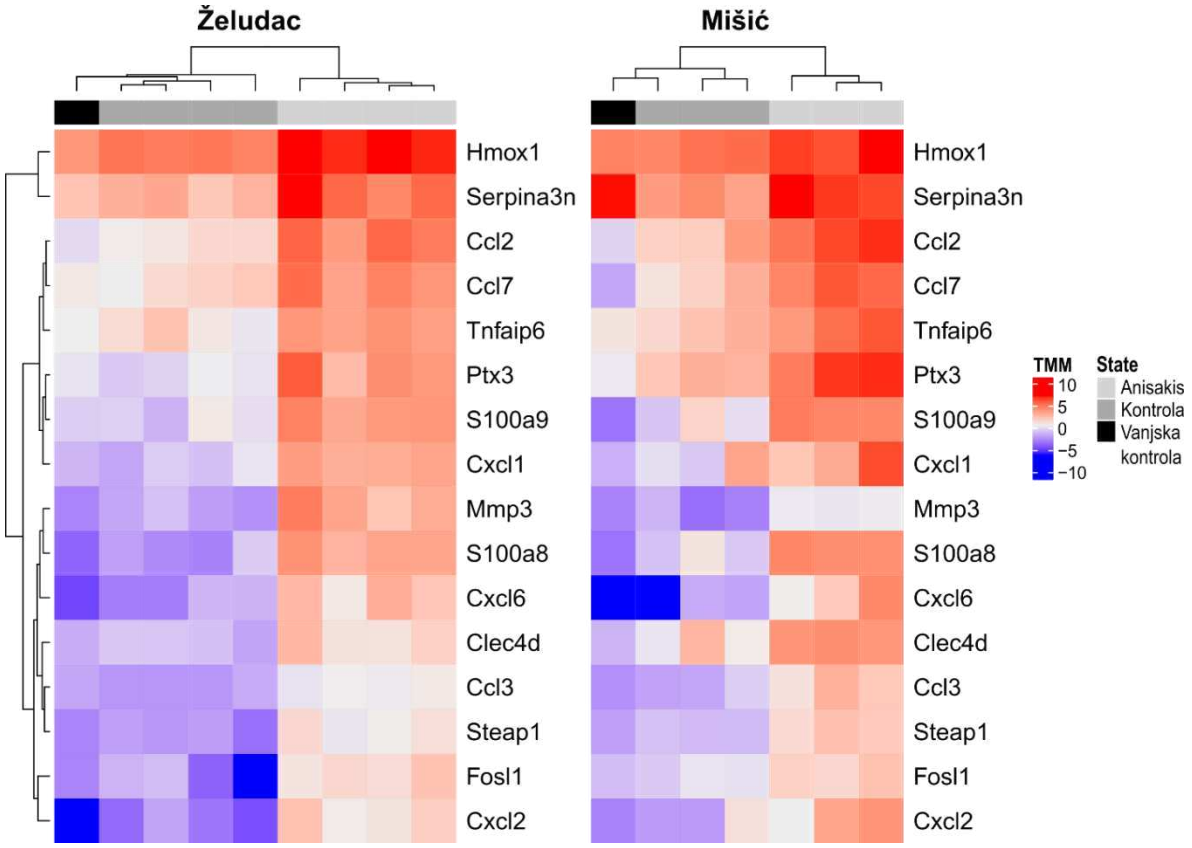
	Opis gena	**Simbol gena**	**logFC**	**p vrijednost**	**FDR**
1	*C-X-C motif chemokine ligand 1*	*Cxcl1*	3,059	2,18E-20	2,53E-16
2	*S100 calcium binding protein A8*	*S100a8*	4,619	2,41E-18	1,40E-14
3	*C-C motif chemokine ligand 2*	*Ccl2*	3,799	1,02E-12	2,82E-09
4	*S100 calcium binding protein A9*	*S100a9*	4,405	1,16E-12	2,82E-09
5	*NLR family, pyrin domain containing 12*	*Nlrp12*	5,55	1,21E-12	2,82E-09
6	*interferon regulatory factor 6*	*Irf6*	3,072	5,43E-10	1,05E-06
7	*angiopoietin 4*	*Angpt4*	3,042	7,48E-10	1,24E-06
8	*interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1B-like*	*Ifit1bl*	3,059	9,24E-10	1,34E-06
9	*STEAP family member 1*	*Steap1*	3,041	1,94E-09	2,51E-06
10	*stefin A2*	*Stfa2*	4,265	2,18E-09	2,53E-06
11	*triggering receptor expressed on myeloid cells 3*	*Trem3*	3,741	5,09E-09	5,38E-06
12	*interleukin 1 receptor antagonist*	*Il1rn*	4,221	8,97E-09	8,70E-06
13	*insulin-like growth factor binding protein 4*	*Igfbp4*	2,083	1,06E-08	9,45E-06
14	*nipsnap homolog 3B*	*Nipsnap3b*	2,552	1,77E-08	1,47E-05
15	*CD8a molecule*	*Cd8a*	3,497	2,47E-08	1,92E-05
16	*glucagon receptor*	*Gcgr*	5,5	4,07E-08	2,96E-05
17	*C-X-C motif chemokine receptor 2*	*Cxcr2*	3,052	1,09E-07	7,45E-05
18	*insulin-like growth factor 1*	*Igf1*	2,073	1,18E-07	7,62E-05
19	*myeloperoxidase*	*Mpo*	3,136	2,53E-07	0,00015474
20	*selectin L*	*Sell*	2,779	4,05E-07	0,000235412
21	*C-C motif chemokine ligand 20*	*Ccl20*	3,896	4,28E-07	0,000237022
22	*solute carrier family 41 member 2*	*Slc41a2*	2,243	4,91E-07	0,000259573
23	*serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3N*	*Serpina3n*	3,788	5,41E-07	0,000273616
24	*C-type lectin domain containing 5A*	*Clec5a*	3,27	5,72E-07	0,000277163
25	*C-C motif chemokine ligand 3*	*Ccl3*	3,495	6,29E-07	0,000292993
26	*colony stimulating factor 3 receptor*	*Csf3r*	3,305	6,61E-07	0,00029573
27	*prostaglandin E receptor 3*	*Ptger3*	2,755	9,67E-07	0,000406771
28	*mast cell-expressed membrane protein 1*	*Mcemp1*	3,957	9,79E-07	0,000406771
29	*ATP binding cassette subfamily G member 5*	*Abcg5*	4,613	1,16E-06	0,000467424
30	*cell death-inducing DFFA-like effector c*	*Cidec*	2,799	1,34E-06	0,000515101
31	*GTP cyclohydrolase 1*	*Gch1*	2,377	1,37E-06	0,000515101

32	*G protein-coupled receptor, class C, group 5, member D*	*Gprc5d*	2,649	1,75E-06	0,000623899
33	*crystallin beta-gamma domain containing 2*	*Crybg2*	4,356	1,77E-06	0,000623899
34	*ATPase copper transporting beta*	*Atp7b*	4,232	2,07E-06	0,000708271
35	*SLP adaptor and CSK interacting membrane protein*	*Scimp*	3,708	2,29E-06	0,00076037
36	*galectin 12*	*Lgals12*	3,078	2,51E-06	0,000812243
37	*G0/G1switch 2*	*G0s2*	2,44	3,30E-06	0,001030448
38	*versican*	*Vcan*	3,298	3,37E-06	0,001030448
39	*C-X-C motif chemokine ligand 2*	*Cxcl2*	3,761	4,35E-06	0,001297336
40	*neuregulin 4*	*Nrg4*	4,09	4,62E-06	0,001337521
41	*syndecan 1*	*Sdc1*	2,506	4,75E-06	0,001337521
42	*glutaredoxin*	*Glrx*	1,995	4,85E-06	0,001337521
43	*aldehyde dehydrogenase 1 family, member L2*	*Aldh1l2*	2,976	5,03E-06	0,001337521
44	*paired Ig-like receptor B*	*Pirb*	2,979	5,06E-06	0,001337521
45	*niacin receptor 1*	*Niacr1*	3,416	5,55E-06	0,001434919
46	*complement C6*	*C6*	2,17	5,95E-06	0,001503894
47	*fibronectin 1*	*Fn1*	2,199	7,33E-06	0,001814979
48	*tubulin, beta 3 class III*	*Tubb3*	2,455	7,50E-06	0,001819213
49	*cell migration-inducing hyaluronan binding protein*	*Cemip*	2,455	8,16E-06	0,001937298
50	*coagulation factor V*	*F5*	3,083	9,75E-06	0,00227009
51	*FGR proto-oncogene, Src family tyrosine kinase*	*Fgr*	2,726	1,02E-05	0,002327038
52	*C-C motif chemokine ligand 7*	*Ccl7*	3,503	1,25E-05	0,002797185
53	*hyaluronan synthase 1*	*Has1*	2,23	1,36E-05	0,002982018
54	*aconitate decarboxylase 1*	*Acod1*	4,114	1,50E-05	0,003221686
55	*CCAAT/enhancer binding protein alpha*	*Cebpa*	2,381	1,58E-05	0,003348953
56	*UDP-glucose 6-dehydrogenase*	*Ugdh*	1,872	1,63E-05	0,003382712
57	*ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 4*	*Adamts4*	2,583	1,79E-05	0,003658945
58	*activated leukocyte cell adhesion molecule*	*Alcam*	1,987	2,30E-05	0,004608345
59	*S100 calcium-binding protein A4*	*S100a4*	2,253	2,67E-05	0,005243165
60	*bone marrow stromal cell antigen 1*	*Bst1*	2,2	2,73E-05	0,005243165
61	*solute carrier family 7 member 5*	*Slc7a5*	2,272	2,75E-05	0,005243165
62	*similar to AI661453 protein*	*RGD1561662*	2,701	3,25E-05	0,006092824
63	*microsomal glutathione S-transferase 1*	*Mgst1*	3,226	3,33E-05	0,006144272
64	*leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily C, member 2*	*Lilrc2*	2,855	3,68E-05	0,006684128
65	*secreted phosphoprotein 1*	*Spp1*	2,173	4,20E-05	0,007527339
66	*TNF alpha induced protein 6*	*Tnfaip6*	2,954	4,35E-05	0,007663159
67	*pentraxin 3*	*Ptx3*	3,691	4,50E-05	0,007815724

68	*resistin*	*Retn*	3,423	4,60E-05	0,00786691
69	*7-dehydrocholesterol reductase*	*Dhcr7*	2,094	4,80E-05	0,008096706
70	*phytanoyl-CoA dioxygenase domain containing 1*	*Phyhd1*	1,916	4,87E-05	0,008098693
71	*interleukin 1 receptor-like 1*	*Il1rl1*	2,099	5,07E-05	0,00831626
72	*CD44 molecule (Indian blood group)*	*Cd44*	1,857	6,50E-05	0,010501206
73	*mitogen-activated protein kinase kinase kinase 9*	*Map3k9*	2,633	6,70E-05	0,010687243
74	*solute carrier family 6 member 12*	*Slc6a12*	2,99	7,31E-05	0,011491689
75	*nicotinamide N-methyltransferase*	*Nnmt*	2,453	8,04E-05	0,012470128
76	*matrix metallopeptidase 3*	*Mmp3*	2,89	8,27E-05	0,012669067
77	prema engl. *heme oxygenase 1*	*Hmox1*	1,751	9,41E-05	0,014227133
78	*CD244 molecule*	*Cd244*	2,486	0,000104159	0,015538437
79	*toll-like receptor 2*	*Tlr2*	2,591	0,000110199	0,016231324
80	*schlafen 4*	*Slfn4*	2,29	0,000119611	0,017397439
81	*ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3*	*Enpp3*	1,833	0,00012173	0,017487082
82	*matrix metallopeptidase 19*	*Mmp19*	1,822	0,000124385	0,017650554
83	*pleckstrin and Sec7 domain containing 4*	*Psd4*	2,342	0,000127574	0,01788495
84	*flavin containing monooxygenase 5*	*Fmo5*	2,751	0,00014935	0,020688508
85	*solute carrier family 39 member 14*	*Slc39a14*	2,134	0,000153456	0,021007193
86	*interleukin 6*	*Il6*	3,251	0,000172221	0,023301843
87	*Fc fragment of IgG receptor Ia*	*Fcgr1a*	2,212	0,000174646	0,023358438
88	*oncostatin M*	*Osm*	2,735	0,000186411	0,024648577
89	*C-type lectin domain family 4, member A2*	*Clec4a2*	3,383	0,000207574	0,026710903
90	*suppressor of cytokine signaling 3*	*Socs3*	2,099	0,000208187	0,026710903
91	*osteoclast associated, immunoglobulin-like receptor*	*Oscar*	3,896	0,000208894	0,026710903
92	*macrophage scavenger receptor 1*	*Msr1*	2,464	0,000222491	0,028140265
93	*ADAM metallopeptidase domain 8*	*Adam8*	2,501	0,00022875	0,02862081
94	*interleukin 1 beta*	*Il1b*	3,512	0,000232893	0,028829134
95	*frizzled-related protein*	*Frzb*	2,72	0,000240779	0,029474181
96	*branched chain amino acid transaminase 1*	*Bcat1*	1,929	0,00024317	0,029474181
97	*BCL2-related protein A1*	*Bcl2a1*	2,667	0,000286859	0,03441121
98	*Cd80 molecule*	*Cd80*	2,629	0,000305213	0,036239344
99	*coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2*	*F2rl2*	2,181	0,000332462	0,039038815
100	*retinoic acid receptor responder 2*	*Rarres2*	1,619	0,0003355	0,039038815
101	*C-X-C motif chemokine ligand 6*	*Cxcl6*	5,632	0,00037234	0,042896489
102	*galactokinase 1*	*Galk1*	1,716	0,000379196	0,043098315
103	*FOS like 1, AP-1 transcription factor subunit*	*Fosl1*	1,988	0,000381499	0,043098315

104	*C-type lectin domain containing 7A*	*Clec7a*	2,666	0,000389087	0,04320085
105	*acyl-CoA synthetase long-chain family member 5*	*Acsl5*	1,793	0,000389832	0,04320085
106	*keratin 79*	*Krt79*	3,463	0,000398417	0,043735676
107	*ficolin B*	*Fcnb*	3,723	0,000408671	0,044442021
108	*potassium calcium-activated channel subfamily N member 4*	*Kcnn4*	2,74	0,000413364	0,044536169
109	*C-type lectin domain family 4, member D*	*Clec4d*	2,965	0,000420054	0,044841749
110	*integrin subunit alpha X*	*Itgax*	2,481	0,000423964	0,044847678
111	*LDL receptor related protein 3*	*Lrp3*	2,869	0,000461637	0,048392879

Među genima s najvećim log omjerom izražaja, 16 je bilo zajedničkih želučanim i mišićnim tkivima zahvaćenima prodorom ličinke *A. pegreffii* (**slika 4.5**). Profili genskog izražaja neinficiranih uzoraka (vanjske kontrole) za oba seta podataka bili su u skladu s kontrolnim uzorcima (**slika 4.5**). Među genima koji su bili zajednički želučanim i mišićnim tkivima su S100 proteini, odnosno *S100a8* (4,68 logFC u želucu i 4,62 u mišiću) i *S100a9* (3,53 logFC u želucu i 4,41 u mišiću). S100A8 je protein koji veže kalcij i cink i ima važnu ulogu u regulaciji upalnih procesa i imunosnog odgovora te je također bitan za kemotaksiju i adheziju neutrofila. Kompleks S100A8/A9 poznat je kao kalprotektin (prema engl. *calprotectin*), koji ima mnoštvo unutar i izvanstaničnih funkcija. Luči se za vrijeme upalnog procesa, jedan je od glavnih topljivih proteina koji se nalaze u citosolu neutrofila, a zbog sposobnosti kelacije metalnih iona ima antimikrobna svojstva. Proupalno S100A8/A9 djeluje poticanjem produkcije citokina i kemokina, što je u ovom istraživanju podržano nizom diferencijalno izraženih kemokina potporodice *Cc* (*Ccl2, Ccl3* i *Ccl7*) i *Cxc* (*Cxcl1, Cxcl2* i *Cxcl6*) u tkivima zahvaćenima prodorom ličinke *A. pegreffii*. Još jedan visoko izraženi gen u tkivima želuca i mišića bila je matriks metalopeptidaza 3 (prema engl. *matrix metallopeptidase 3*) (*Mmp3*, 4,43 logFC u želucu i 2.89 u mišiću), uključena u degradaciju fibronektina, laminina, kolagena i proteoglikana hrskavice te aktivaciju prokolagenaze.



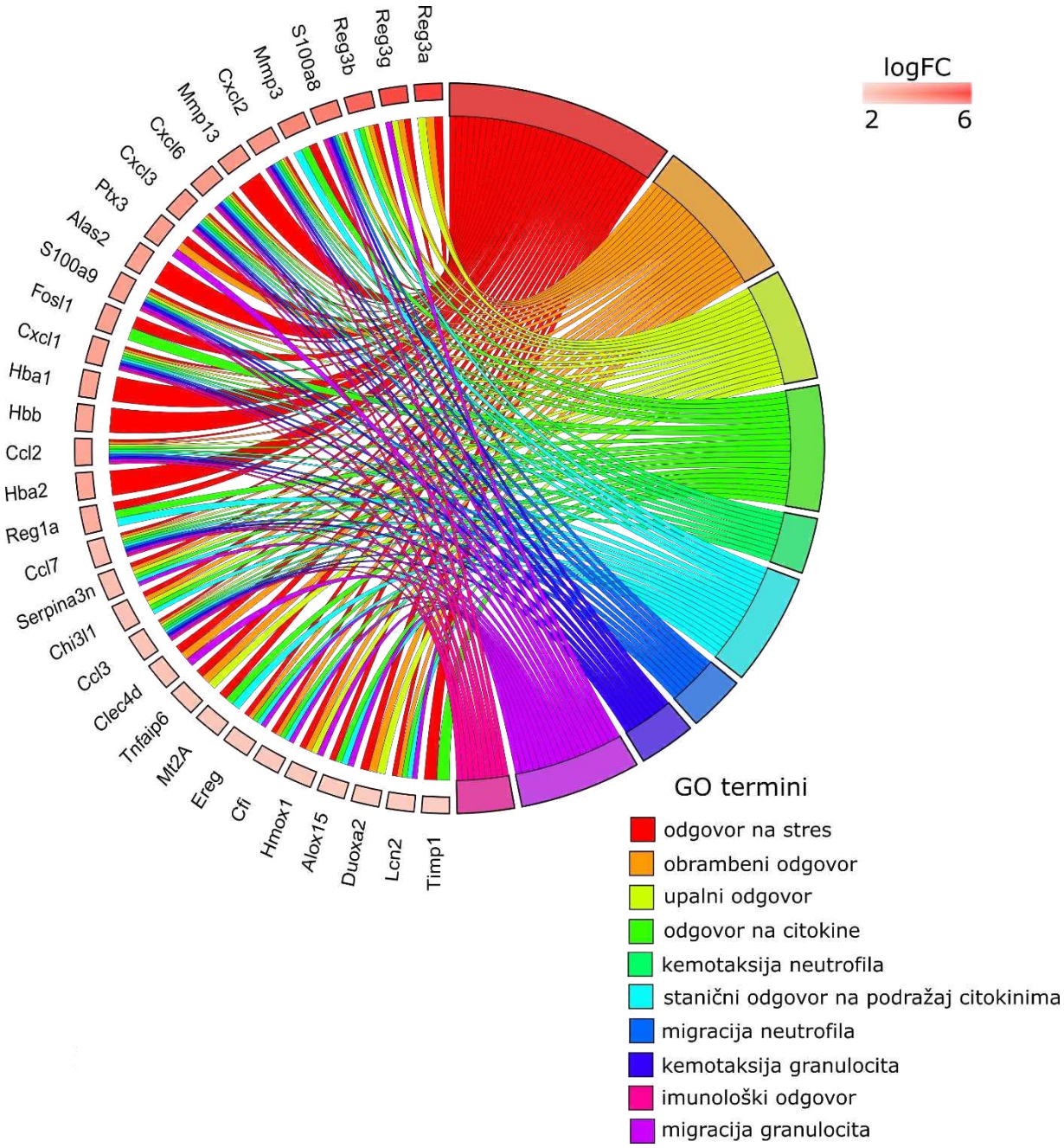
Slika 4.5 Dvodimenzionalno hijerarhijsko grupiranje gena i prikaz normaliziranih vrijednosti diferencijalno izraženih gena (logCPM) zajedničkih (N = 16) želučanim i mišićnim tkivima. Prikazane su pripadajuće vrijednosti za tkiva kroz koja su prodirale *A. pegreffii* ličinke, zdrava tkiva eksperimentalno inficiranih Sprague-Dawley štakora (Kontrola) i ista tkiva neinficiranih štakora (Vanjska kontrola). Geni su grupirani prema profilima uočenima u želucu, a raspon boja od plave do crvene predstavlja razine povišenog izražaja gena. Puni nazivi gena prema engleskom jeziku navedeni su u **tablici 4.2** i **tablici 4.3**.

4.1.4 Funkcionalna interpretacija promjena u transkriptomima štakora izazvanih *Anisakis pegreffii* infekcijom

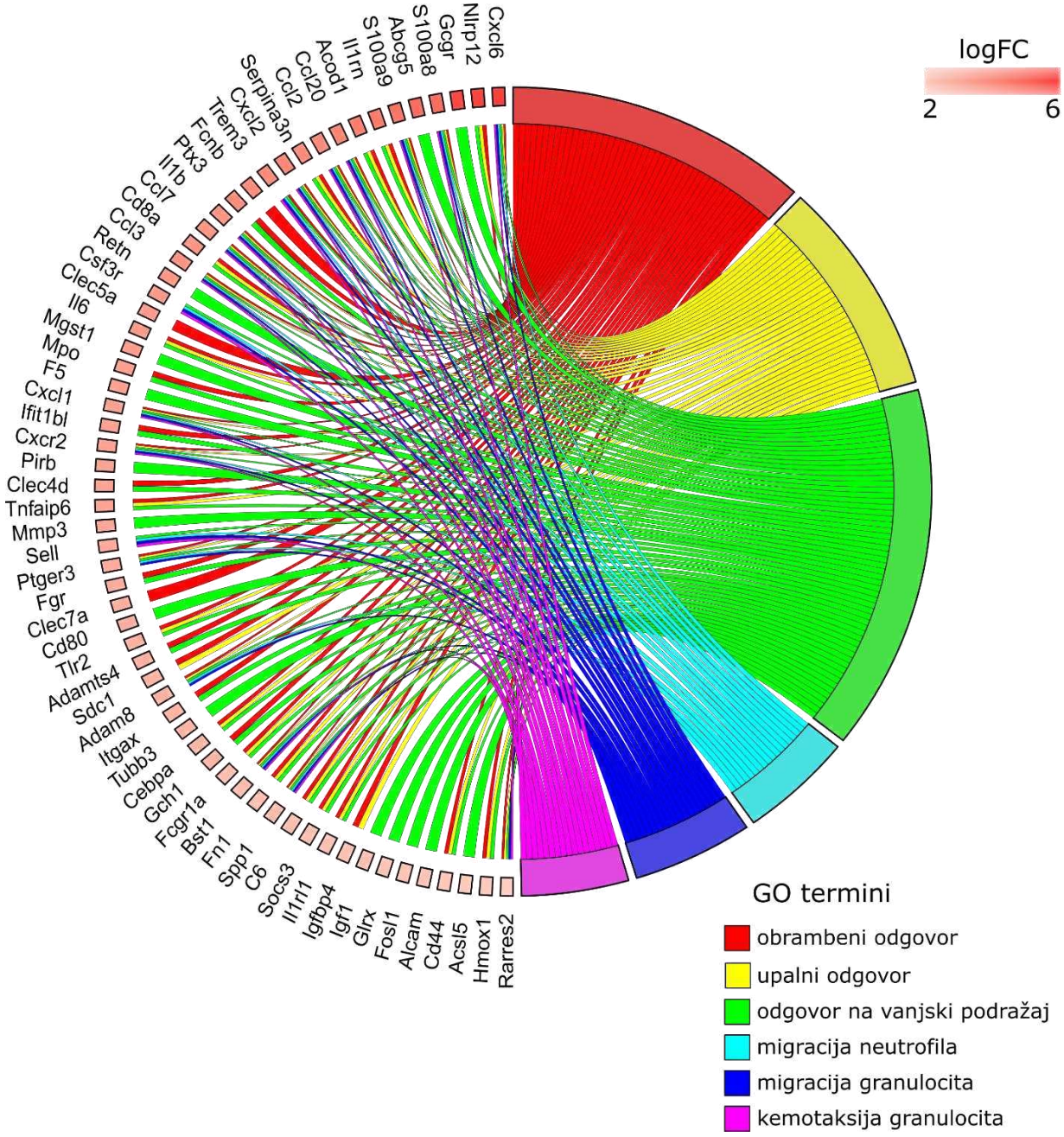
Od 259 značajno obogaćenih termina genske ontologije (FDR < 0,05) povezanih s 41 diferencijalno izraženim genom u želučanim tkivima štakora zahvaćenih prodorom ličinke oblića *A. pegreffii*, pet najviše rangiranih koji su povezani s biološkim procesima bili su: odgovor na stres, obrambeni odgovor, upalni odgovor, odgovor na citokine te kemotaksija neutrofila (**slika 4.6** i **dodatna tablica 10.1**). Prisutnost gena povezanih sa sintezom hemoglobina (hemoglobin alfa 1 (*Hba1*), 2 (*Hba2*), hemoglobin podjedinica beta-1 (*Hbb*) i 5'-aminolevulinat sintaza 2 (*Alas2*))

izravno je povezana s odgovorom na stres. Nekoliko gena koji su članovi regenerativne obitelji (*Reg3a, Reg3g, Reg3b* i *Reg1a*), s izrazito izraženom povišenom regulacijom u tkivima želuca (**slika 4.6** i **tablica 4.2**), povezani su s pojmovima vezanim uz upalu, imunosnim i obrambenim odgovorom. Ostali termini genske ontologije, među pet najzastupljenijih, imali su mnogo zajedničkih gena. Pored *S100a8/S100a9* i *Cc/Cxc* kemokina, zanimljivi transkripti obuhvaćali su lipokalin 2 (*Lcn2*), gen koji je uključen u više procesa kao što su apoptoza i urođena imunost, i gen *Chi3l1* (prema engl. *chitinase 3-like 1*), koji ima ulogu u Th2 upalnom odgovoru i upali induciranoj citokinom IL13.

Pet najviše rangiranih obogaćenih termina genske ontologije povezanih s diferencijalno izraženim genima u mišićnim tkivima štakora, zahvaćenih prodorom ličinke oblića *A. pegreffii*, od ukupno 494 značajnih (FDR < 0,05), bili su jako slični onima iz tkiva želuca: obrambeni odgovor, upalni odgovor, odgovor na vanjski podražaj, migracija granulocita i migracija neutrofila (**slika 4.7** i **dodatna tablica 10.2**). Odgovor na stres također je pronađen među značajno obogaćenim GO terminima za mišićna tkiva, iako je rangiran 21. prema vrijednosti FDR (**dodatna tablica 10.2**). Najveći skup DE gena pronađen je u odgovoru na vanjski podražaj, nakon čega slijedi obrambeni odgovor (**slika 4.7**). Neki od gena povezani su samo s odgovorom na vanjski podražaj, kao što je gen *Alcam* (prema engl. *activated leukocyte cell adhesion molecule*), koji potiče aktivaciju limfocita T i njihovu proliferaciju putem interakcija s Cd6. Međutim, većina gena dijelila je prvih pet obogaćenih termina genske ontologije. Pored sveprisutnih *Cc* i *Cxc* kemokina i *S100a8/S100a9*, vrijedi spomenuti dva citokina koji snažno potiču upalu; interleukin 1β (*Il1β*) i *Il6*; potonji je poznat kao začetnik akutne faze imunosnog odgovora.

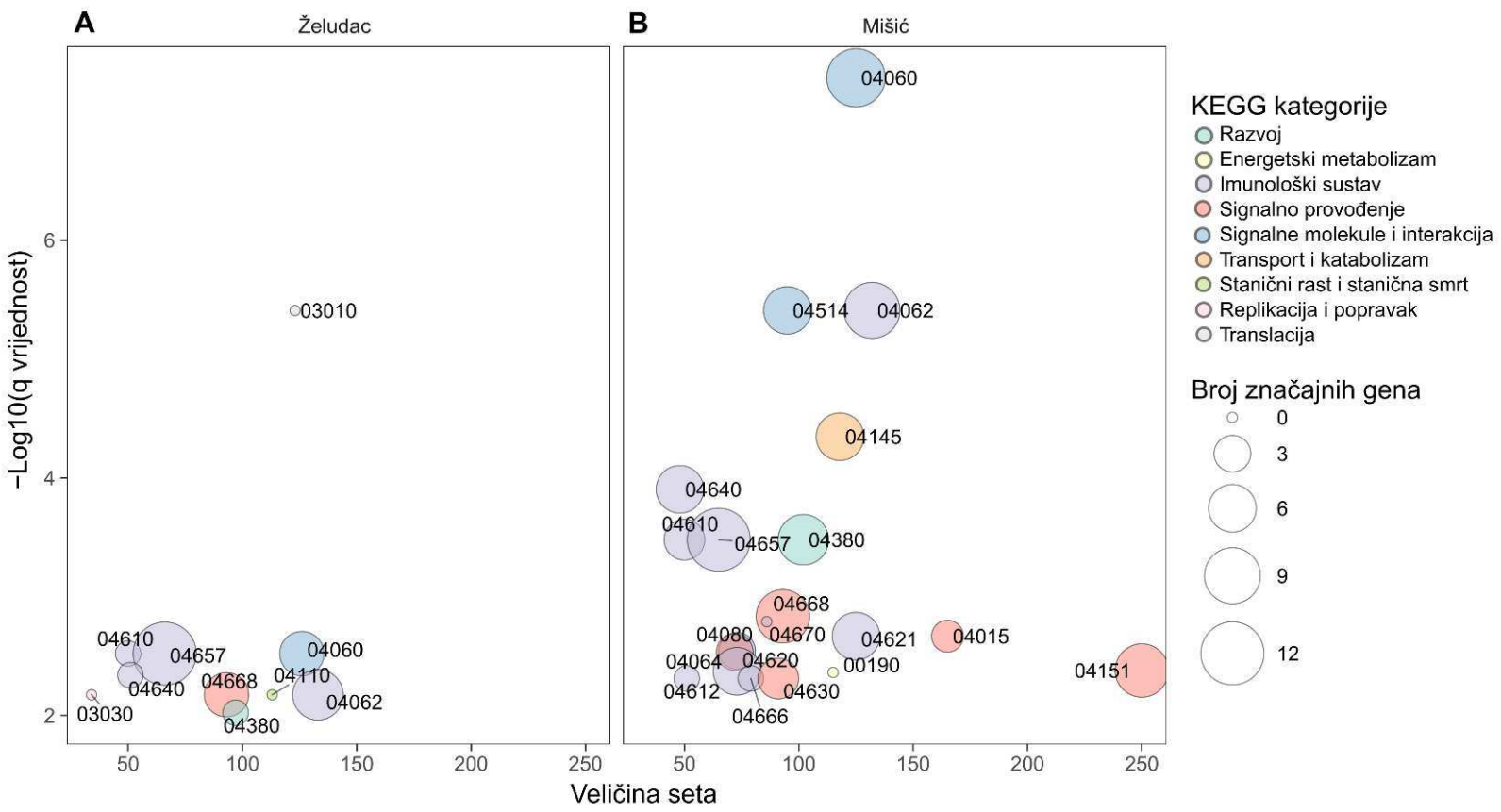


Slika 4.6 *GOChord* graf s prvih deset značajno obogaćenih termina genske ontologije, prema FDR vrijednosti, koji opisuju biološke procese za tkiva štakorskih želudaca zahvaćenih prodorom *A. pegreffii* ličinke. Geni su povezani s njihovim dodijeljenim terminima preko obojenih vrpci, a poredani su prema log omjeru izražaja (logFC), koji je prikazan silaznim intenzitetom crvenih kvadrata koji se nalaze pored odabranih gena. Puni nazivi gena prema engleskom jeziku navedeni su u **tablici 4.2**.



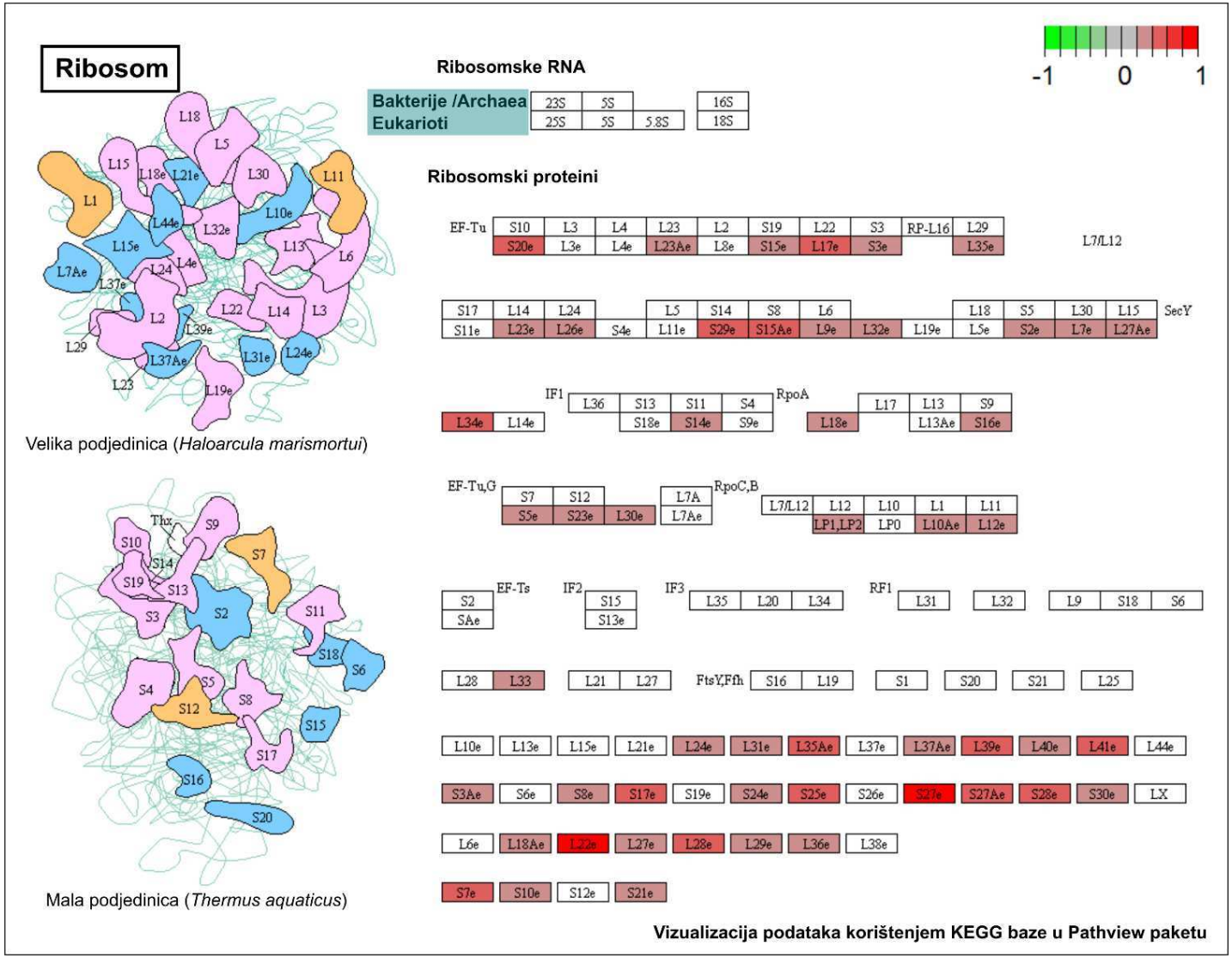
Slika 4.7 *GOChord* graf s prvih šest značajno obogaćenih termina genske ontologije, prema FDR vrijednosti, koji opisuju biološke procese za tkiva štakorskih mišića zahvaćenih prodorom *A. pegreffii* ličinke. Geni su povezani s njihovim dodijeljenim terminima preko obojenih vrpci, a poredani su prema log omjeru izražaja (logFC), koji je prikazan silaznim intenzitetom crvenih kvadrata koji se nalaze pored odabranih gena. Puni nazivi gena prema engleskom jeziku navedeni su u **tablici 4.3**.

Potpuni rezultati analize KEGG signalnih puteva prikazani su u **dodatnoj tablici 10.3** i **dodatnoj tablici 10.4**, uključujući metaboličke i signalne puteve te puteve povezane s bolestima, za transkriptome želučanih i mišićnih tkiva zahvaćenih prodorom ličinke oblića *A. pegreffii*. Na **slici 4.8** prikazani su metabolički i signalni putevi s povišenom ili sniženom regulacijom koji su zadovoljili strože kriterije statističke značajnosti (q vrijednost < 0,01). Pet najznačajnijih KEGG metaboličkih i signalnih puteva koji su regulirani u transkriptomima tkiva želuca štakora uključuju: 03010 Ribosom, 04610 Komplement i koagulacijske kaskade, 04060 Interakciju citokina i citokinskih receptora, 04657 IL17 signalni put i 04640 Hematopoetsku liniju stanica (**slika 4.8** i **dodatna tablica 10.3**). Osim 03010 Ribosoma (**slika 4.9**), ostali metabolički i signalni putevi koji su na popisu u prvih pet su također nađeni u transkriptomima mišićnih tkiva, iako se nisu svi rangirali u prvih pet rezultata (**dodatna tablica 10.4**). Uz 04060 Interakciju citokina i citokinskih receptora i 04640 Hematopoetsku staničnu liniju, prvih pet KEGG puteva s povišenom regulacijom za mišićna tkiva štakora uključivali su 04062 Kemokinski signalni put, 04514 CAMs (prema engl. *Cell adhesion molecules*) i 04145 Fagosom (**slika 4.8** i **dodatna tablica 10.4**). Jedini signalni put snižene regulacije u mišićnim tkivima štakora bio je 00190 Oksidativna fosforilacija. Prema funkcionalnim KEGG kategorijama, najveći broj diferencijalno izraženih puteva pripada imunosnom sustavu, praćen prenošenjem signala i signalnim molekulama i interakcijama (**slika 4.8**). 04657 IL17 signalni put (**slika 4.8**, **slika 4.10** i **slika 4.11**) imao je najveći broj DE gena (N = 12 za oba seta podataka pojedinačno) u transkriptomima želučanih i mišićnih tkiva, a nakon toga slijedi 04060 Interakcija citokina i citokinskih receptora (N = 10) za mišićna tkiva.

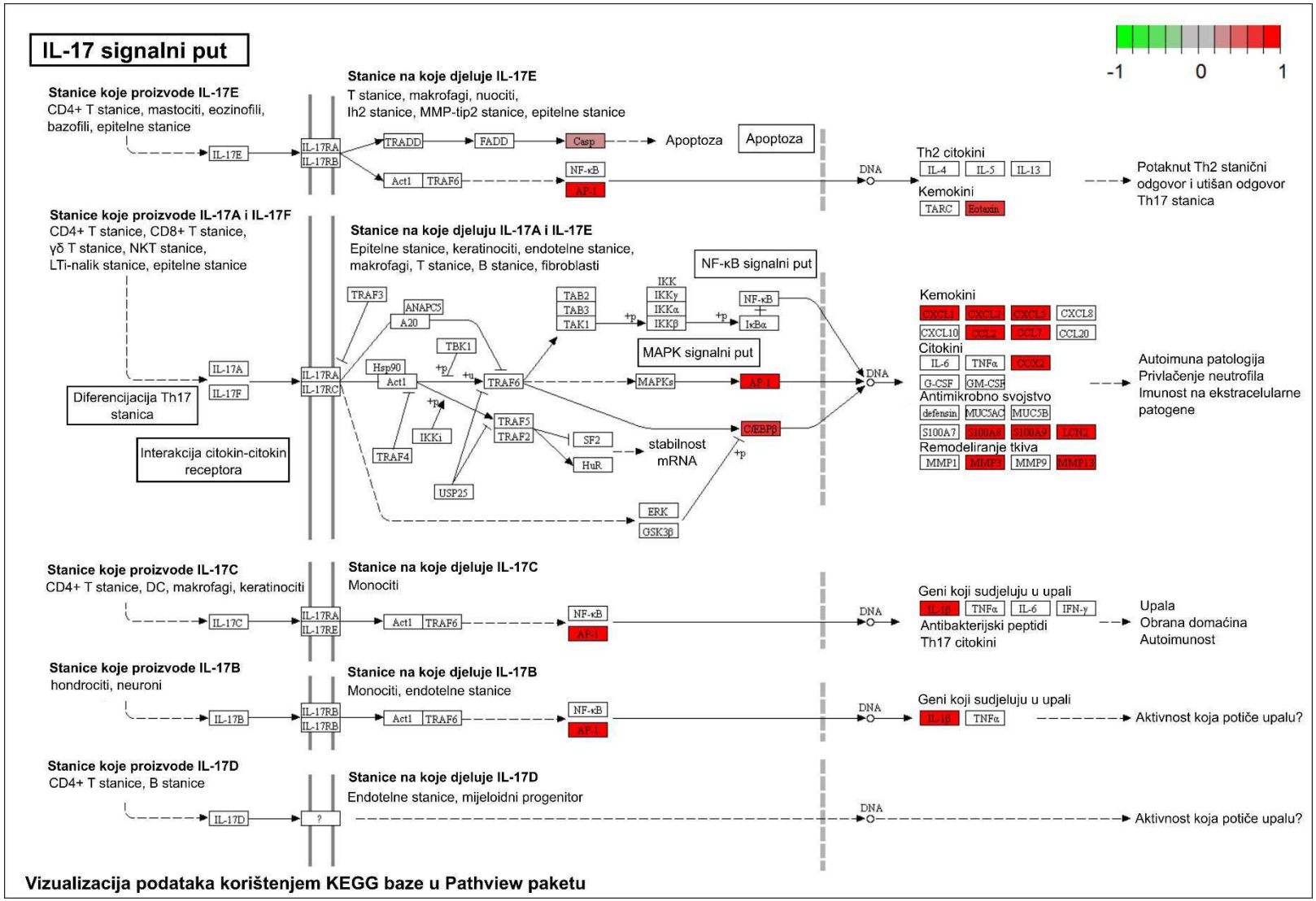


Slika 4.8 Značajno regulirani KEGG metabolički i signalni putevi u tkivima želuca (A) i mišića (B) štakora kroz koje je prodirala ličinka oblića *A. pegreffii.* Veličina seta prikazana je u odnosu na log10 *q* vrijednost i veličina kruga odgovara broju DE gena po svakom signalnom putu.

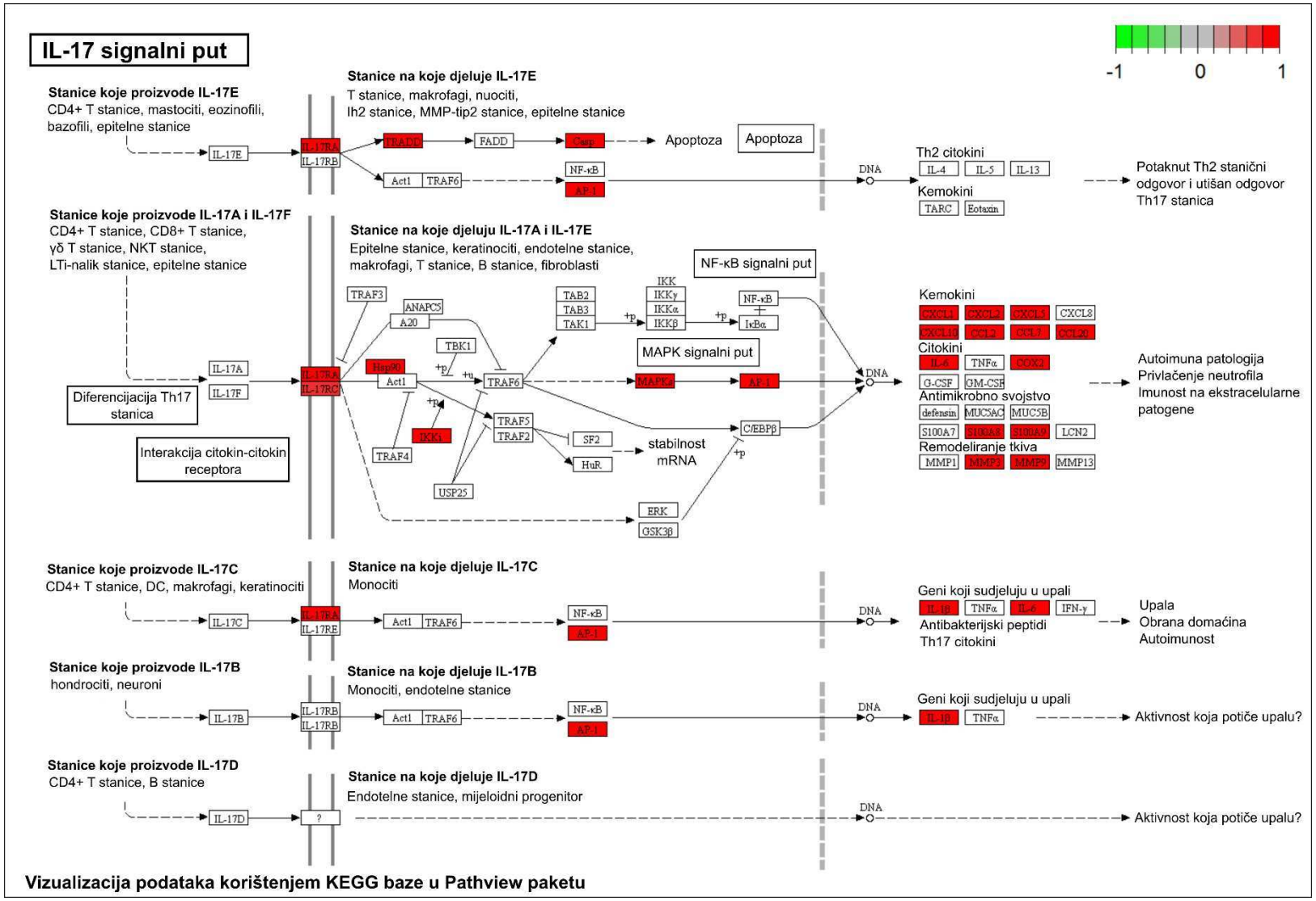
04060 Interakcija citokina i citokinskih receptora, 04062 Kemokinski signalni put, 04514 CAMs (prema engl. *Cell adhesion molecules*), 04145 Fagosom, 04640 Hematopoetska stanična linija, 04610 Komplement i koagulacijske kaskade, 04657 IL17 signalni put, 04380 Diferencijacija osteoklasta, 04668 TNF signalni put, 04670 Migracija leukocita između endotela, 04015 Rap1 signalni put, 04621 NLR (prema engl. *Nod-like receptor*) signalni put, 04080 Interakcija neuroaktivnog liganda i receptora, 04064 NF-κB signalni put, 04151 PI3K-Akt signalni put, 04620 TLR (prema engl. *Toll-like receptor*) signalni put, 04666 Fc gamma R-posredovana fagocitoza, 04612 Procesiranje i prezentacija antigena, 04630 Jak-STAT signalni put, 00190 Oksidativna fosforilacija, 03010 Ribosom, 03030 Replikacija DNA, 04110 Stanični ciklus.



Slika 4.9 Vizualizacija značajno izraženih gena (FDR < 0,05) u transkriptomima tkiva želuca štakora inficiranih ličinkom *A. pegreffii* u KEGG putu specifičnom za Ribosom, iscrtanih s pomoću paketa Pathview za R/Bioconductor.



Slika 4.10 Vizualizacija značajno izraženih gena (FDR < 0,05) u transkriptomima tkiva želuca štakora inficiranih ličinkom *A. pegreffii* u KEGG IL17 signalnom putu, iscrtanih s pomoću paketa Pathview za R/Bioconductor.



Slika 4.11 Vizualizacija značajno izraženih gena (FDR < 0,05) u transkriptomima tkiva mišića štakora inficiranih ličinkom *A. pegreffii* u KEGG IL17 signalnom putu, iscrtanih s pomoću paketa Pathview za R/Bioconductor.

4.2 Rezultati istraživanja infekcije parateničnog domaćina (*Sardina pilchardus*)

4.2.1 Epidemiološki rezultati

Ukupna prevalencija oblića *A. pegreffii* u srdelama uzorkovanima od 2013. do 2015. godine u Sredozemnom i Jadranskome moru iznosila je 12,2% (95% CI 10,7 – 13,9, raspon 0 – 44,9%), a prosječni intenzitet infekcije 1,8 (*bootstrap* 95% CI 1.6 – 2.0) (**tablica 4.4**). Nadalje, ukupna prevalencija u fileima bila je 1,5% (95% CI 1,0 – 2,3). Daleko najviša zabilježena prevalencija bila je u srdelama koje su ulovljene u području oko zapadne Sardinije (WS), a iznosila je 44,9% (95% CI 39,7 – 50,2). Kako je veličina domaćina važan prediktor abundancije nametnika, važno je istaknuti da su srdele iz postaje WS također bile najveće u ovom istraživanju (prosječna ukupna duljina (TL) 173,2 mm ± 11,6 mm SD), prosječno > 2 cm veće od ostalih uzoraka. Najmanje srdele uhvaćene su na postaji u sjevernom Tirenskome moru (NT) (prosječna TL 129,7 mm ± 6,0 mm SD), a u njima nije zabilježena prisutnost *A. pegreffii* ličinki. Gotovo 30 puta manja prevalencija od one zabilježene na postaji WS bila je na postaji u blizini južne Sicilije (SS) (1,5%, 95% CI 0,4 – 4,4)). Između sve tri postaje uzorkovanja na području zapadnog Sredozemnog mora (WS, NT i SS) utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0,001$) u prevalenciji, a posljedično i prosječnoj abundanciji nametnika *A. pegreffii.* U Jadranskome moru, gdje je dvogodišnje uzorkovanje omogućilo testiranje vremenskih razlika između srednje i sjeverne podregije (MA i NA), zapaženo je značajno smanjenje prevalencije od 2013. do 2014. godine u sjevernome Jadranu (sa 6,0 na 1,0%) (**tablica 4.4** i **tablica 4.5**). Za razliku od prevalencije, prosječni intenzitet infekcije nije pokazao promjene u trendovima u obje podregije Jadranskog mora. Međutim, kad se usporedi ukupna prevalencija u fileima između Jadranskog i zapadnog Sredozemnog mora, značajno niže vrijednosti zabilježene su u uzorcima srdela iz Jadranskog mora ($p < 0,01$).

Tablica 4.4 Srednja ukupna duljina domaćina (TL) sa standardnom devijacijom (SD), ukupna prosječna prevalencija (%) sa Sternovim točnim (ili prilagođenim Waldovim za N > 1000) 95% intervalom pouzdanosti (CI), prosječnim intenzitetom (I), prosječnom abundancijom (A) s *bootstrap* 95% CI, omjerom varijance i srednjaka (v/m), indeksom nepodudarnosti (D) i eksponentom negativne binomnijalne raspodjele (k) nametnika *Anisakis pegreffii* za svaku postaju uzorkovanja, odnosno podregiju Jadranskog mora i ukupni uzorak srdele *Sardina pilchardus* iz Sredozemnog mora, u razdoblju od 2013. do 2015. godine.

Varijabla	Prosječna TL ± SD (mm)	Prevalencija (%) (95% CI)	Prosječni I (95% CI)	Prosječna A (95% CI)	v/m	D	k
MA 2013 (N = 234)	133,66 ± 6,97	1,7 (0,6 – 4,4)	2,3 (1,0 – 2,8)	0,04 (0,01 – 0,09)	2,53	0,982	/
MA 2014 (N = 453)	134,62 ± 6,05	3,5 (2,2 – 5,7)	2,3 (1,4 – 4,1)	0,08 (0,04 – 0,16)	5,04	0,978	0,025
MA ukupno (N = 687)	134,29 ± 6,39	2,9 (1,9 – 4,5)	2,3 (1,6 – 3,8)	0,07 (0,04 – 0,12)	4,54	0,982	0,021
NA 2013 (N = 117)	150,61 ± 6,67	6,0 (2,9 – 11,9)	1,1 (1,0 – 1,3)	0,07 (0,03 – 0,12)	1,19	0,939	/
NA 2014 (N = 104)	138,85 ± 6,47	1,0 (0,1 – 5,1)	1,0	0,01 (0,00 – 0,03)	1,00	0,981	/
NA ukupno (N = 221)	145,05 ± 8,82	3,6 (1,7 – 7,0)	1,1 (1,0 – 1,4)	0,04 (0,01 – 0,07)	1,19	0,963	/
Ukupni Jadranski uzorak (N = 908)	136,91 ± 8,43	3,1 (2,1 – 4,4)	1,9 (1,4 – 3,1)	0,06 (0,04 – 0,10)	3,98	0,980	0,027
Ukupni Jadranski uzorak filea (N = 908)	136,91 ± 8,43	0,8 (0,4 – 1,6)	1,1 (1,0 – 1,4)	0,01 (0,00 – 0,02)	1,24	0,992	/
NT 2015 (N = 100)	129,70 ± 5,98	0	/	/	/	/	/
SS 2015 (N = 200)	140,30 ± 8,40	1,5 (0,4 – 4,4)	1,7 (1,0 – 2,3)	0,03 (0,00 – 0,08)	2,19	0,984	/
WS 2015 (N = 356)	173,17 ± 11,62	44,9 (39,7 – 50,2)	1,7 (1,6 – 1,9)	0,78 (0,67 – 0,90)	1,61	0,679	1,197
Ukupni Sredozemni uzorak (N = 656)	156,52 ± 21,00	24,8 (21,6 – 28,3)	1,7 (1,6 – 1,9)	0,43 (0,37 – 0,51)	1,96	0,822	0,380
Ukupni Sredozemni uzorak filea (N = 656)	156,52 ± 21,00	2,6 (1,6 – 4,1)	1,1 (1,0 – 1,3)	0,03 (0,02 – 0,04)	1,18	0,975	/
Ukupni uzorak srdela (N = 1564)	145,16 ± 17,90	12,2 (10,7 – 13,9)	1,8 (1,6 – 2,0)	0,22 (0,19 – 0,25)	2,44	0,915	0,140
Ukupni uzorak filea srdela (N = 1564)	145,16 ± 17,90	1,5 (1,0 – 2,3)	1,1 (1,0 – 1,3)	0,02 (0,01 – 0,02)	1,21	0,986	/

Uzorak iz Jadrana: MA – srednji Jadran, NA – sjeverni Jadran, Uzorak iz zapadnog Sredozemnog mora: NT – sjeverno Tirensko more, SS – južna Sicilija, WS – zapadna Sardinija. Eksponent negativne binomijalne raspodjele (k) nije pokazao statistički značajnu razliku između zabilježenih i očekivanih frekvencija, $p < 0,05$.

Tablica 4.5 Usporedba prevalencije, prosječnog intenziteta i prosječne abundancije (Varijabla II) oblića *Anisakis pegreffii* u srdeli *Sardina pilchardus* između godina na istoj postaji uzorkovanja, između postaja uzorkovanja te između ukupnog jadranskog uzorka i uzorka iz zapadnog Sredozemnog mora i pripadajućih filea (Varijabla I).

Varijabla I	**Varijabla II**	**Test**	***p* vrijednost**
MA 2013. u odnosu na MA 2014.	prevalencija	Fisherov egzaktni test	0,23
	prosječni intenzitet	*Bootstrap t*-test na 2 uzorka	1,00
	prosječna abundancija	*Bootstrap t*-test na 2 uzorka	0,28
NA 2013. u odnosu na NA 2014.	prevalencija	Exact unconditional test	0,05*
	prosječni intenzitet	*Bootstrap t*-test na 2 uzorka	1,00
	prosječna abundancija	*Bootstrap t*-test na 2 uzorka	0,07
MA ukupno u odnosu na NA ukupno	prevalencija	Fisherov egzaktni test	0,65
	prosječni intenzitet	*Bootstrap t*-test na 2 uzorka	0,15
	prosječna abundancija	*Bootstrap t*-test na 2 uzorka	0,33
NT 2015. u odnosu na SS 2015.	prevalencija	Exact unconditional test	0,40
	prosječni intenzitet	*Bootstrap t*-test na 2 uzorka	1,00
	prosječna abundancija	*Bootstrap t*-test na 2 uzorka	0,25
NT 2015. u odnosu na WS 2015.	prevalencija	Exact unconditional test	< 0,001**
	prosječni intenzitet	*Bootstrap t*-test na 2 uzorka	1,00
	prosječna abundancija	*Bootstrap t*-test na 2 uzorka	< 0,001**
SS 2015. u odnosu na WS 2015.	prevalencija	Fisherov egzaktni test	< 0,001**
	prosječni intenzitet	*Bootstrap t*-test na 2 uzorka	0,72
	prosječna abundancija	*Bootstrap t*-test na 2 uzorka	< 0,001**
Ukupni jadranski uzorak u odnosu na ukupni sredozemni uzorak	prevalencija	Fisherov egzaktni test	< 0,001**
	prosječni intenzitet	*Bootstrap t*-test na 2 uzorka	0,66
	prosječna abundancija	*Bootstrap t*-test na 2 uzorka	< 0,001**
Ukupni jadranski uzorak filea u odnosu na ukupni sredozemni uzorak filea	prevalencija	Fisherov egzaktni test	0,006*
	prosječni intenzitet	*Bootstrap t*-test na 2 uzorka	0,87
	prosječna abundancija	*Bootstrap t*-test na 2 uzorka	0,01*

*statistički značajna razlika na $p < 0,05$, ** statistički značajna razlika na $p < 0,001$.

4.2.2 Pojavnost nametnika u fileima u odnosu na visceralne organe

Detaljnija analiza varijacije *A. pegreffii* infekcije s obzirom na lokaciju unutar ribljeg domaćina provedena je kako bi se utvrdilo razlikuju li se visceralni organi (jetra, gonade, crijeva) jedni od drugih. Nadalje, detaljnija analiza poslužila je za usporedbu visceralnih organa s dijelovima filea, odnosno usporedbom dijelova filea međusobno. Jedno od pitanja na koji ovakva analiza pruža odgovor jest može li se očekivati veća infekcija u dijelovima filea koji su bliži

visceralnim organima. Rezultati ove analize, uzimajući u obzir i prostorno-vremenski učinak i duljinu srdela kao kovarijablu, prikazani su u **tablici 4.6** za oba istraživana geografska područja. Čak i kad se izuzme varijabilnost u abundanciji oblića *A. pegreffii* koja je nastala zbog razlika u duljini srdela, ovom analizom dokazano je da lokacija parazitiranja unutar srdela ima značajan učinak. Naknadnom analizom parova utvrđeno je da su razlike uvijek i samo između želuca/piloričnih nastavaka/crijeva i svih ostalih dijelova - jetre, gonada i svih dijelova filea. U Jadranu su utvrđene razlike bile postojane tijekom godina i značajne na razini $p < 0,05$. Na području zapadnog Sredozemlja, postaje uzorkovanja različito su utjecale na određivanje značajnosti varijabilnosti infekcije nametnika prema lokaciji unutar ribe. Razlike između lokacija unutar ribe nisu utvrđene značajnima za SS postaju uzorkovanja, jer je infekcija na ovoj postaji bila općenito vrlo niska. Naspram tome, na WS postaji potvrđen je tipičan uzorak jako inficiranog želuca/piloričnih nastavaka/crijeva u odnosu na bilo koji drugi dio srdela s visokom razinom značajnosti ($p < 0,001$) za sve *post-hoc* usporedbe. Razlike između dva filea ili njihovih AV, AD, PV i PD anatomskih dijelova nisu pronađene ni u jednoj kombinaciji prostorne i vremenske analize za istraživana geografska područja. Za potvrdu ovih nalaza provedene su dodatne analize na ventralnim (AV i PV) i dorzalnim (AD i PD) dijelovima filea, koji su analizirani odvojeno od visceralni organa, te su analize ponovljene na lijevom i desnom fileu. Rezultati tih analiza dostupni su u dodatnim materijalima (**dodatna tablica 10.5** i **dodatna tablica 10.6**), jer je potvrđeno nepostojanje razlike.

Tablica 4.6 Sažeti rezultati trofaktorijalne (Jadransko more) i dvofaktorijalne (zapadno Sredozemno more) ANCOVA analize varijabilnosti infekcije oblićem *Anisakis pegreffii* prema lokaciji unutar domaćina (*Sardina pilchardus*), uzimajući u obzir prostorno-vremenski učinak i duljinu tijela domaćina kao kovarijablu.

Izvor varijacije	Jadransko more			zapadno Sredozemno more		
	df	MS	F	df	MS	F
Duljina tijela ribe	1	1,41	73,07*	1	1,69	23,84*
Lokacija unutar ribe	9	0,10	5,16*	9	3,16	44,61*
Godina	1	0,12	6,15	/	/	/
Postaja uzorkovanja	1	0,58	30,09*	2	0,28	3,95
Lokacija × godina	9	0,01	0,07	/	/	/
Lokacija × postaja uzorkovanja	9	0,06	0,32	18	4,09	57,72*
Godina × postaja uzorkovanja	1	0,04	2,03	/	/	/
Lokacija × godina × postaja uzorkovanja	9	0,03	1,29	/	/	/
Ostatak	9039			6529		

df – stupnjevi slobode, MS – prosječna suma kvadrata, F – F vrijednost, *statistički značajna razlika na razini $p < 0,01$.

4.2.3 Infekcija oblićem *Anisakis pegreffii* u odnosu na infekciju oblićem *Hysterothylacium* sp.

Infekcija srdele oblićem *Hysterothylacium* sp. bila je gotovo dvostruko viša od infekcije oblićem *A. pegreffii* (ukupna prevalencija 20,1%, 95% CI 18,2 – 22,2). Međutim, koinfekcija ovih nametnika zabilježena je u 13 jedinki srdela, što predstavlja samo 0,8% ukupnog uzorka. Parametri koji opisuju infekciju *Hysterothylacium* sp. Prikazani su u dodatnom materijalu (**dodatna tablica 10.7**); **tablica 4.7** sadržava rezultate analize razlika u abundanciji dviju vrsta nametnika (*A. pegreffii* i *Hysterothylacium* sp.), uzimajući u obzir prostorno-vremensku varijabilnost i duljinu ribe kao kovarijablu. Ove dvije vrste nametnika pokazale su značajno različite trendove abundancije u dvije jadranske podregije, sjevernom i srednjem dijelu Jadranskog mora, tijekom dvogodišnjeg istraživanja, što se očituje značajnim interakcijama varijabli „vrsta nametnika × godina × postaja uzorkovanja“.

Post-hoc analizom parova utvrđeno je da je abundancija *Hysterothylacium* sp. bila znatno veća ($p < 0,001$) od abundancije nametnika *A. pegreffii* za sjeverni Jadran u 2013. godini i za srednji Jadran u 2014. godini (**tablica 4.4** i **dodatna tablica 10.7**). Naspram tome, obje vrste nametnika pokazale su slične srednje vrijednosti u 2013. godini za srednji Jadran i 2014. za sjeverni Jadran. Vremenski trend za obje vrste pokazao je porast u abundanciji za područje srednjeg Jadrana, dok su se na sjeveru Jadrana prosječne abundancije smanjile u razdoblju od 2013. do 2014. Međutim, za vrstu *A. pegreffii*, zabilježeno godišnje povećanje ili smanjenje na srednjem (MA) ili sjevernom Jadranu (NA) nije značajno. S druge strane, trend koji je prisutan za *Hysterothylacium* sp., bio je mnogo izraženiji i značajan na razini $p < 0,01$. Slično kao i na jadranskom poručju, na zapadnom Sredozemlju također je zabilježena značajna interakcija „vrsta nametnika × postaja uzorkovanja“. *Post-hoc* analizom parova utvrdila se značajna razlika između abundancije dviju vrsta samo za WS postaju uzorkovanja ($p < 0,01$), gdje je vrsta *A. pegreffii* imala izuzetno veću abundanciju od *Hysterothylacium* sp. Na SS postaji uzorkovanja abundancija vrste *A. pegreffii* bila je niska i nije se jako razlikovala od nezabilježene prisutnosti *Hysterothylacium*

sp., dok na NT postaji uzorkovanja nijedna od istraživanih vrsta nametnika nije bila zabilježena u ukupnom uzorku.

Tablica 4.7 Sažeti rezultati trofaktorijalne (Jadransko more) i dvofaktorijalne (zapadno Sredozemno more) ANCOVA analize razlika u abundanciji nametnika s obzirom na vrstu oblića (*Anisakis pegreffii* i *Hysterothylacium* sp.), uzimajući u obzir prostorno-vremenski učinak i duljinu tijela domaćina kao kovarijablu.

Izvor varijacije	**Jadransko more**			**zapadno Sredozemno more**		
	df	**MS**	**F**	**df**	**MS**	**F**
Duljina tijela ribe	1	166,14	118,15*	1	8,30	23,98*
Vrsta nametnika	1	85,35	60,69*	1	18,23	52,66*
Godina	1	28,95	20,59*	/	/	/
Postaja uzorkovanja	1	80,56	57,28*	2	1,44	4,17
Vrsta nametnika × godina	1	2,25	1,60	/	/	/
Vrsta nametnika × postaja uzorkovanja	1	1,92	1,36	2	23,78	68,68*
Godina × postaja uzorkovanja	1	29,94	21,29*	/	/	/
Vrsta nametnika × godina × postaja uzorkovanja	1	87,49	62,22*	/	/	/
Ostatak	1807			1305		

df – stupnjevi slobode, MS – prosječna suma kvadrata, F – F vrijednost, *statistički značajna razlika na razini $p < 0,01$.

5. Rasprava

5.1 Promjene u transkriptomima tkiva štakora pri eksperimentalnoj infekciji ličinkom *Anisakis pegreffii*

U okviru ove doktorske disertacije prvi je put analiziran transkriptom tkiva štakora eksperimentalno zaraženih infektivnim ličinkama oblića *Anisakis pegreffii*. Sprague-Dawley štakori odabrani su kao model domaćina u kojem je simuliran tijek i patogeneza slučajne infekcije ljudi. Metoda RNA sekvenciranja prethodno je uspješno primijenjena u identifikaciji i karakterizaciji potencijalnih novih *Anisakis* sp. alergena [54] i u otkrivanju patogenih mehanizama vrsta *A. simplex* (s.s.) i *A. pegreffii* [146,147], odnosno njhovih hibrida [146], ali je imunosni odgovor slučajnog domaćina na razini transkriptoma prvi put opisan u ovom doktorskom radu. Nadalje, molekularnom identifikacijom potvrđeno je da je u ovom istraživanju uzročnik bolesti bila vrsta *A. pegreffii*, što je važno uzeti u obzir, jer je ta vrsta najčešći uzročnik anisakijaze u Sredozemlju [58,59,80,81]. Prethodno istraživanje, koje je provedeno *in vivo* i *in vitro,* na istom životinjskom modelu koji je korišten u ovom doktorskom radu, potvrdilo je patogeni potencijal vrste *A. pegreffii,* te je pokazalo da *A. pegreffii* ličinke imaju sklonost zadržavanju u želucu štakora puno duže nego ličinke vrste *Anisakis simplex* (sensu stricto) (s.s.) [98]. Sukladno rezultatima ovog doktorskog rada, autori su zaključili da migratorno ponašanje L3 ličinki nije sinkronizirano, kao i da L3 ličinke ne pokazuju predispoziciju prema određenome mjestu prodiranja u tkiva domaćina. Međutim, autori nisu zabilježili prodiranje kroz mišićje, vjerojatno zbog kraćeg vremenskog trajanja eksperimenta (24 sata) [98].

Anisakidi nisu koevolucijski razvili nametnički odnos s ljudima kao terestričkim domaćinima, jer ne obitavaju u istom okolišu i tek slučajno mogu doći u dodir s čovjekom, za razliku od ostalih prirodnih ljudskih nametnika [3]. Neovisno o tome, humani slučajevi i modeli glodavaca u kontekstu *Anisakis* infekcije uglavnom su karakterizirani Th1, Th2 ili Th1/Th2 tipovima imunosnih odgovora, jednako kao i kod humanih parazitoza. Na ovo upućuju rezultati različitih seroloških studija usmjerenih k razlučivanju kinetike alergijske reakcije prema ovom obliću, zabilježene nakon različitih postupaka senzibilizacije [48,67,97]. Međutim, u ovoj je studiji, u štakorima eksperimentalno zaraženima L3 ličinkom *A. pegreffii*, koji prethodno nisu bili

u dodiru s patogenom, identificiran akutni proupalni odgovor, pretežno karakteriziran aktivacijom Th17 linije efektorskih pomoćničkih limfocita T. Th17 limfociti poznati su po proizvodnji IL17 [148], citokina koji inducira lučenje kemokina i antimikrobnih peptida u različitim tkivima i tipovima stanica (fibroblastima, epitelnim stanicama, keratinocitima i makrofagima), što dovodi do novačenja neutrofila i pojačane upalne reakcije [149]. Ovo se poklapa s histopatološkim nalazima lezija štakora u želucu i mišiću, koje obiluju neutrofilima i makrofagima pomiješanima s nekrotičnim stanicama i staničnim detritusom. Nekroza može dodatno stimulirati upalu zbog propuštanja unutarstaničnih komponenata u okolno tkivo [150]. Ovo može biti izraženije u tkivima s visokom metaboličkom aktivnošću, kao što je epitel želuca, koji je bogat parijetalnim i zimogenim žljezdanim stanicama koje proizvode kloridnu kiselinu i različite probavne enzime [151]. Nekroza i eozinofili obično su prisutni u središtu granuloma koji obuhvaćaju ostatke *Anisakis* ličinke, zajedno s gigantskim stanicama i vezivnim tkivom. Nakon toga, stanični infiltrat, ponajprije sastavljen od limfocita, nakuplja se na mjestu granuloma, što otežava prepoznavanje nametnika kao uzrok njegova stvaranja. Tijekom prve infekcije domaćina stvaraju se memorijske stanice T i B, te se kod prethodno senzibiliziranih domaćina može pojaviti alergijska reakcija prilikom ponovnog izlaganja *Anisakis* infektivnim ličinkama [48].

U alergijskom modelu *Anisakis* infekcije u C57BL/6 miševima, nakon subkroničnog intranazalnog izlaganja (7 puta tijekom 15 dana) rekombinantnom Ani s 1 (rAni s 1) alergenu, zabilježeno je značajno povećanje proizvodnje citokina IL6 i IL17A, povezanih s odgovorom tipa Th17 [96]. *In vivo* rezultati ove studije dodatno su potvrđeni *in vitro* eksperimentom na splenocitima tretiranima alergenima rAni s 1 ili rAni s 9, koji su nakon aktivacije započeli s lučenjem IL6 i IL17A, ukazavši da IL17 može igrati ključnu ulogu u alergijskoj reakciji izazvanoj oblićem *Anisakis* roda [96]. Međutim, u drugom istraživanju provedenom na Wistar štakorima oralnim putem, izloženima svježim i smrznutim *Anisakis* ličinkama (tretirani dvaput tijekom 7 dana i uzorkovani nakon 21 dan), zabilježena je znatno povišena razina citokina IL17 u plazmi, dok intraperitonealna injekcija ukupnog proteinskog ekstrakta ličinki nije imala isti učinak [152]. Moguće je da žive *Anisakis* ličinke različito potiču imunosno prepoznavanje i aktivacijske puteve u odnosu na ukupni proteinski ekstrakt ili čak ekskretorno-sekretorne produkte *Anisakis* ličinki [153]. Ovo dodatno podupire nedavno istraživanje u kojem je proučavana sekrecija citokina i kemokina dendritičnih stanica (DC) izloženih živim *A. pegreffii* ličinkama ili ukupnom

proteinskom ekstraktu [57]. Zanimljivo, nakon interakcije s dendritičnim stanicama koje su bile izložene gore navedenome, stimulirane autologne stanice $CD4^+$ T nisu, suprotno očekivanome, uspjele proizvesti IL4, IL17 i IL10. Budući da proizvodnja IL17 nije potaknuta živom ličinkom niti ukupnim proteinskim ekstraktom, autori su zaključili da DC mogu pridonijeti uspostavi lokalizirane upale u najranijoj fazi infekcije, ali njihova uloga u polarizaciji Th2/Th17 ili regulatornog T (Treg) odgovora ostaje nepoznatom. Sukladno tomu, rezultati ove doktorske disertacije potvrđuju postojanje naizgled snažno induciranih signalnih puteva Th17 i IL17, ali bez zabilježene regulacije gena *Il17*.

Naspram navedenom, poznato je da stanice Th17 proizvode citokine specijalizirane za poticanje imunosne reakcije u prvom redu na ekstracelularne bakterije i gljivice [154], iako je odgovor tipa Th17 zabilježen i kod nekih višestaničnih nametnika. Primjerice, terestrički zoonotični oblić *Trichinella spiralis* može izazvati imunosnu reakciju tipičnu za Th2 i/ili Th17 odgovor tijekom svoje intestinalne faze, nakon prvog tjedna infekcije [155]. Infekcija *T. spiralis* u ljudi započinje konzumiranjem mesa inficiranog ličinkama prvog stupnja koje su incistirane u preobraženim mišićnim stanicama, tzv. „njegovateljicama“ (prema engl. *nurse cell*). Nakon oslobađanja ličinki iz cista tijekom probavljanja mesa i njihove penetracije kroz epitelne stanice tankog crijeva, u čovjeka započinje intestinalna faza, gdje se ličinka presvlači, raste i kao odrasla jedinka reproducira. U ovoj fazi imunosni odgovor tipa Th2, potpomognut Th17, ima ključnu ulogu u zaštiti domaćina i konačnom izbacivanju odraslih jedinki [156]. Međutim, novonastale ličinke prije toga obično započinju migratornu fazu kroz cirkulacijski sustav i inficiraju periferno mišićno tkivo, gdje započinje transformacija miocita u njegovateljski kompleks nužan za preživljavanje ličinki. U ranoj fazi nastajanja stanica „njegovateljica“ (otprilike tjedan dana nakon infekcije), odgovori Th2 i Th17 inhibirani su novačenjem stanica Treg iz perifernih limfnih čvorova u neposrednoj blizini mjesta parazitiranja ličinki zaštićenih stanicama, što odgovara vremenu od oko dva tjedna nakon infekcije [155]. Ovo pokazuje da limfociti Th2 i Th17 imaju presudnu ulogu u pokretanju upalnog odgovora na infekciju oblićima, što je opaženo i u ovoj disertaciji.

Ovaj se odgovor kasnije može razviti u drugom smjeru kad infekcija postane kronična. Kronična upala je proces koji nastane ako akutna upala nije razriješena ili je ozljeda tkiva

produljena te obično uključuje novačenje i aktiviranje monocita i limfocita. Područja kronične upale često su podvrgnuta remodeliranju tkiva, s angiogenezom i fibrozom. Iako urođeni imunosni podražaji mogu pridonijeti razvoju kronične upale, stečeni imunosni sustav također može biti uključen, zbog citokina koje luče limfociti Th1 i Th17, a snažni su induktori upale [157]. Zanimljiv rezultat ove disertacije, vezan za funkcionalnu interpretaciju transkriptoma zaraženih želuca i mišića, značajna je regulacija KEGG puteva povezanih s bolestima koje izazivaju snažan upalni odgovor, kao što su 05323 Reumatoidni artritis i 05321 Upalna bolest crijeva (**dodatna tablica 10.3** i **dodatna tablica 10.4**), podržavajući opaženi Th17 odgovor u eksperimentalnoj *Anisakis* infekciji. Budući da su Th17 stanice snažni pokretači upale tkiva, također su povezani s patogenezom mnogih autoimunih bolesti i upalnih stanja kod ljudi. U životinjskim modelima, stanice Th17 odgovorne su za autoimuni encefalitis, eksperimentalno izazvani artritis induciran kolagenom, kolitis i psorijazu [158–160]. Štoviše, brojne bolesti povezane s bakterijama, koje su uočene značajno regulirane u želucu i mišiću štakora, kao što je 05150 Infekcija bakterijom *Staphylococcus aureus* i 05132 Infekcija bakterijom *Salmonella* (**dodatna tablica 10.3** i **dodatna tablica 10.4**), najvjerojatnije su rezultat opsežno provedenih istraživanja Th17 odgovora na bakterijske infekcije, koja su pridonijela popunjavanju KEGG baze podataka.

Česta pojava imunosnih odgovora vezanih uz bakterije u okviru KEGG regulacijskih puteva u ovim rezultatima može se i dodatno objasniti. Naime, imunosni sustav sluznica, a naročito probavnog sustava domaćina, jedinstveno je okruženje koje mora obuzdati imunosne reakcije usmjerene protiv komenzalnih mikroba i antigena u prehrani, a istodobno štititi tkivo sluznice tijekom infekcije drugim uzročnicima bolesti, kao što su oblići [161]. Smatra se da su komenzalni mikroorganizmi fizički odvojeni od crijevne površine te je ta prepreka ključna za ograničavanje imunosne aktivacije, održavanje homeostaze u probavilu i mutualističke veze između domaćina i mikroorganizama [162]. Poremećeni prostorni odnosi između mikroorganizama i domaćina u odnosu su s bolesnim stanjima poput upalne bolesti crijeva [163]. RegIIIγ, identificiran u ovom istraživanju kao DE gen s najvišim log omjerom izražaja u tkivima želuca štakora (logFC 6,25), izlučeni je antibakterijski lektin koji ima ključnu ulogu u održavanju sluzničke prepreke probavila (oko 50 μm razmaka), odnosno između mikroorganizama i epitela tankog crijeva [164]. Štoviše, nestanak odvojenosti domaćina i bakterija kod RegIIIγ$^{-/-}$ miševa rezultiralo je povećanom bakterijskom kolonizacijom crijevnog epitela i aktivacijom crijevnih stečenih imunosnih odgovora

na mikroorganizme [164]. Izgledno je da je mehaničko oštećenje tkiva uzrokovano prodorom *A. pegreffii* ličinke kroz sluznicu želuca poremetilo ravnotežu odnosa domaćina i mikroorganizama, što je moglo rezultirati imunosnim odgovorom domaćina usmjerenim prema bakterijama inače prisutnima na granici sa sluznicom, odnosno bakterijama autohtonog podrijetla ili onima unesenima preko *A. pegreffii* ličinki.

Važan put, povezan s upalom koji je bio povišeno reguliran, u ovoj disertaciji je KEGG 04657 IL17 signalni put, u koji je uključeno 12 DE gena iz želučanih i mišićnih tkiva štakora pojedinačno (**slika 4.8**, **slika 4.10** i **slika 4.11**). Iako IL17A i IL17F nisu bili među DE genima, čine dio IL17 signalnog puta i imaju zaštitne uloge u obrambenom mehanizmu sluznice domaćina protiv određenih patogena. Iako uglavnom povezani s bakterijskim infekcijama [165], poznato je da su povezani i s infekcijama filarijalnim [166], i drugim oblićima [167]. U tkivima želuca i mišića štakora pojavili su se drugi bitno povišeno geni koji su tijesno povezani s IL17 signalnim putem: S100 proteini (*S100a8* i *S100a9*), matriks metalopeptidaze (*Mmp3* i *Mmp13*), *Cxc* i *Cc* kemokini (*Cxcl1, Cxcl2, Ccl2, Ccl7* i *Ccl20*). *Il6* bio je prisutan samo u mišićnim tkivima, a lipokalin 2 (*Lcn2*) bio je prisutan samo u želučanom tkivu. Upalne funkcije S100A8/A9 očituju se kroz novačenje leukocita, povećanu proizvodnju citokina i kemokina te regulaciju leukocitne adhezije i migracije [168]. Novačenje neutrofila, kao tipično kod infekcije oblićima, nastaje kao odgovor na visoke razine izražaja proteina S100A8 i S100A9. Tako je primjerice, novačenje neutrofila bilo značajno u prolaznom upalnom odgovoru pluća uzrokovanog migratornom filarijalnom ličinkom *Litomosoides sigmodontis* (Nematoda, Onchocercidae) u BALB/c miševima [169]. Unutarstanične i izvanstanične funkcije *S100a8/a9* u želucu i mišiću štakora ogledaju se i u obogaćenim terminima genske ontologije, poput kemotaksije i migracije neutrofila/leukocita, proizvodnje citokina i kemokina, povišene regulacije TLR i NF-kB signalnih puteva [168], podupirući izražen upalni početak imunosne reakcije 32 sata nakon eksperimentalne infekcije ličinkama *Anisakis* u štakora.

Zanimljiv je nedostatak procesa aktivnog zacjeljivanja rana u transkriptomima želučanih i mišićnih tkiva. Međutim, moguće je da među brojnim matriks metalopeptidazama, koje se pojavljuju u popisima gena za želučana i mišićna tkiva (neke od značajnih su *Mmp3, Mmp10, Mmp13 i Mmp19*), neke imaju ulogu u preoblikovanju i popravku tkiva kao odgovor na nastalu

leziju [170]. Obzirom na njihovu učestalost i specifičnost uloga u pojedinim okruženjima u kojima se izlučuju, teško je izvući opću pretpostavku o točnim ulogama ovih enzima u ovom istraživanju. Tako npr. MMP, koju luči jedan tip stanice, poput makrofaga, vjerojatno obavlja drukčiju funkciju od istog enzima proizvedenog drugim tipom stanice, kao što je epitelna stanica [171]. Dodatno, MMP enzimi imaju ulogu u upali i imunosti, djelujući na upalne citokine, kemokine i druge proteine [171]. Višenamjenska uloga ovih enzima očituje se i u činjenici da MMP13 sudjeluje u zacjeljivanju rana putem mehanizma koji vjerojatno uključuje aktivaciju transformirajućeg faktora rasta beta 1 (TGFβ1) i degradaciju faktora rasta vezivnog tkiva (CTGF), kao i u migraciji keratinocita tijekom zarastanja rana [168]. Međutim, u ovom istraživanju moguće je da su hemoragijske lezije i aktivnost IL1β i IL6 mogli utjecati na odgađanje procesa zacjeljivanja rana [172] ili je prikupljanje uzoraka tkiva nastupilo prerano da bi se proces zacjeljivanja rana uhvatio kao signal u transkriptomima. Manji broj eozinofila zabilježen u usporedbi s neutrofilima može biti rezultat uzorkovanja u perakutnoj fazi koja se pojavljuje prije tipične eozinofilne infiltracije tkiva oko nametnika i formiranja odgovora Th2. Prema literaturi, eozinofilija se obično razvija nekoliko dana nakon pojave kliničkih simptoma anisakijaze [173].

Nadalje, intenzivna infiltracija neutrofila i makrofaga u oštećena tkiva u ovom istraživanju mogla je imati dvojake posljedice. U početku je njihovo djelovanje korisno u svrhu uklanjanja uzročnika i detritusa te u poticanju čimbenika koji promiču zacjeljivanje rana. Međutim, tijekom procesa ozdravljenja, kontrola upale može biti ključna za učinkovito zacjeljivanje tkiva [174], s makrofagima koji imaju važnu ulogu u razrješavanju oštećenja tkiva, kao što je uočeno tijekom virusne infekcije [175]. Općenito se smatra da rana aktivacija neutrofila s pomoću citokina IL17 pokreće događaje koji vode u razvoj odgovora tipa 2, koji onda povratno kontrolira pretjeranu neutrofiliju. Ukoliko odgovor tipa 2 ne uspije suprimirati odgovor IL17 ili ga dalje potiče, rezultat može biti patologija zbog pretjeranog odgovora tipa 2. Složena interakcija između citokina IL17, neutrofila i odgovora tipa 2 još uvijek nije u potpunosti razjašnjena i čini se da dinamika ovisi o raznim čimbenicima, među ostalim i o specifičnim tipovima stanica koji su uključeni [176,177]. Dok je uloga neutrofila u akutnoj upali prilično dobro razjašnjena, kompleksnost njihove uloge u kroničnim bolestima, lezijama tkiva i zacjeljivanju tek se počinje otkrivati [178].

IL6 bi mogao biti važan čimbenik u patogenezi uzrokovanoj ličinkom oblića *Anisakis* [96], a pojavio se u nekoliko različitih signalnih puteva zastupljenih u ovom istraživanju. Uz njegovu ulogu u aktivaciji i diferencijaciji makrofaga, limfocita i terminalnoj diferencijaciji limfocita B u plazma stanice, IL6 također regulira akutnu i kroničnu upalu [179]. Istraživanja na glodavcima identificirala su TGFβ i IL6 kao ključne citokine koji potiču Th17 diferencijaciju iz naivnih limfocita $CD4^+$ T [180,181]. Učinkovitost Th17 diferencijacije mogu povećati proupalni citokini kao što su IL1β i TNFα [182]. *Il6* i *Il1β* bili su među DE genima u tkivima štakora inficiranima *A. pegreffii* ličinkama. IL6 također može djelovati kao protuupalni miokin. Naime, iz miocita se pri povišenoj razini IL6 izlučuje u krvotok kao odgovor na kontrakciju mišića prilikom vježbanja [183], te bi njegovu ulogu u mišićnom tkivu štakora trebalo tumačiti s oprezom. Hiperaktivacija IL6/STAT3 signala u mišićima može stimulirati sintezu i sustavno oslobađanje proteina koji imaju ulogu u imunosnom odgovoru akutne faze, kao što su serumski amiloid A (SAA) i fibrinogen. Oni mogu pojačati kataboličke signale u mišiću, pretvarajući mišiće u ključne elemente u urođenoj imunosti, što je dokazano u eksperimentalno induciranom modelu raka s učinkom propadanja mišića i indirektnim promicanjem atrofije kod miševa [184]. Moguće proupalno ili protuupalno djelovanje IL6 pri infekciji mišićja ličinkom oblića *A. pegreffii* treba razjasniti u budućim istraživanjima.

Uz izražen upalni odgovor temeljen na signalnim putevima Th17 i IL17, kao i DE genima uključenima u ove puteve, u rezultatima ovog istraživanja zabilježen je i odgovor na stres. Najzastupljeniji pojam genske ontologije u tkivima želuca štakora bio je odgovor na stres, dok najviša *q* vrijednost u istom tkivu neočekivano pripada KEGG 03010 Ribosomskom putu. Iako ni jedan od ribosomskih gena u ovom istraživanju nije pokazao velike razlike u izražaju u odnosu na kontrolu, radi se o dosljedno povišenoj regulaciji (FDR < 0,05) velikog broja gena. Vizualizacija KEGG Ribosomskog puta, koji je značajno zastupljen u inficiranim tkivima želuca štakora, prikazana je na **slici 4.9**. Značajna zastupljenost ovog signalnog puta upućuje na to da je infekcija oblićem *A. pegreffii* mogla potaknuti razvoj ribosomskog stresa tijekom prodiranja sluznice želuca. Odnedavno se smatra da većina ribosomskih proteina ima ulogu i u imunoreakcijama domaćina, pojačavanjem imunosnog signaliziranja ili olakšavanjem proliferacije patogena u različitim okolnostima [185]. U okviru odnosa domaćina i nametnika, transkripti funkcionalno vezani uz biogenezu ribosoma i translaciju, pronađeni su u studiji RNA sekvenciranja nametnika i stanica

epitela jejunuma svinje IPEC-J2, prilikom infekcije merozoitima vrste *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) (rani aseksualni stadiji). Geni koji kodiraju ribosomske funkcije bili su izraženo obogaćeni u transkriptomu domaćina i nametnika, s prevagom u nametniku, međutim nisu bili diferencijalno izraženi u inficiranim intestinalnim stanicama svinje zaraženima *C. parvum* [186]. Zanimljivo je da među DE genima u transkriptomu intestinalnih stanica nisu pronađeni ni geni vezani uz stres i apoptozu, kao što je tumorski protein P53 (prema engl. *tumor protein P53*) ili gen *Mdm2* (prema engl. *Mdm2 proto-oncogene*), te su autori kao moguća objašnjenja naveli da je signal možda bio ispod detekcije provedenog *in vitro* eksperimenta ili je nametnik bio manje virulentan, intenzitet infekcije nije bio dovoljno visok ili se radi o specifičnosti upotrijebljene stanične linije. S obzirom na broj DE ribosomskih gena u inficiranim tkivima želuca štakora i sukladno nedavno otkrivenim ulogama ribosomskih proteina u imunosignalizaciji, kao što su aktivacija [187,188] ili inhibicija [189,190] jezgrinog čimbenika kappa B (prema engl. *nuclear factor kappa B*, NF-κB), promicanje [191,192] ili inhibiranje virusne produkcije [193], moguće je da ličinke oblića *A. pegreffii* induciraju ribosomski stres u ranoj fazi infekcije u određenim tkivima. Budućim ciljanim istraživanjima bit će potrebno potvrditi ovu hipotezu te utvrditi kinetiku i dinamiku nastanka ribosomskog stresa pri infekciji ličinkom *Anisakis*.

5.2 Prevalencija i intenzitet infekcije oblićem *Anisakis pegreffii* u parateničnom domaćinu, srdeli

Najvažniji nalaz analiziranih 1564 jedinki srdela, vrste *Sardina pilchardus*, predstavlja pojava infektivne ličinke oblića *A. pegreffii* u gotovo svakoj drugoj analiziranoj srdeli ulovljenoj pored zapadne Sardinije (WS), što daleko nadmašuje sve ostale postaje uzorkovanja s prevalencijom od najviše 6%. Uzrok tomu dijelom je u veličini jedinki srdele, koje su iz WS postaje uzorkovanja bile u prosjeku > 2 cm veće od ostalih. Ipak, važno je napomenuti da ovo nije prvi nalaz visoke prevalencije oblića *A. pegreffii* na ovom području. Piras i suradnici [194] utvrdili su prevalenciju oblića *A. pegreffii* od 13,1% u tjelesnoj šupljini i 2,8% u fileima srdela ulovljenih u blizini sjeverne Sardinije, u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Najveća zabilježena vrijednost prevalencije u literaturi prijavljena je za atlantsko ribolovno područje (ICES IXa), od

gotovo 62% u visceralnim organima srdele i 17% u mišićju [69]. Ipak, čak i u slučajevima izražene prevalencije, u ovom istraživanju, kao i u drugoj raspoloživoj literaturi, prosječni intenzitet infekcije u srdelama obično je nizak, od jedne do dviju ličinki oblića [72–74,194]. Za razliku od nalaza na postaji uzorkovanja WS, najmanje srdele iz sjevernog Tirenskog mora (NT) nisu bile inficirane *A. pegreffii* ličinkama. Veća prevalencija u uzorku veće ribe može se objasniti akumulacijom nametnika tijekom duljeg životnog vijeka putem hrane u kojoj se nalaze ličinke *Anisakis* spp. [195]. Zorica i suradnici [196] proveli su istraživanje na srdelama iz Jadranskog mora i utvrdili da je sastav prehrane srdele, koji pretežno uključuje kopepodne račiće, ličinačke stadije dekapodnih rakova i jaja, jednak u svim veličinskim kategorijama srdele. Istraživanje provedeno u Sjevernome moru potvrdilo je kopepodne račiće kao posredničke domaćine oblića *Anisakis simplex* [197] te se može pretpostaviti da su oni jedan od glavnih izvora infekcije oblićem u srdelama tijekom života.

S obzirom na javnozdravstveni problem infekcije čovjeka putem konzumacije srdele, značajan rezultat ovog istraživanja utvrđena je ukupna prevalencija u fileima od 1,5%. Budući da su svi uzorci kupljeni ili isporučeni svježi, broj sati od ulova ribe do dostave u istraživačke institucije usporediv je s vremenom isporuke svakom domaćinstvu. Iako se ne može sa sigurnošću tvrditi, postoji mogućnost da *Anisakis* ličinke migriraju u file čak i tijekom života parateničnog domaćina. Slični zaključci izvedeni su u istraživanju provedenom na inćunu *Engraulis encrasicolus* na području Sredozemnog mora [198]. Dodatna olakšavajuća okolnost za migraciju *Anisakis* ličinke u područje mišićja mala je udaljenost od visceralnih organa do filea, kao u slučaju male plave ribe, poput inćuna i srdele. U eksperimentalnim istraživanjima utvrđeno je da su temperatura i vrijeme trajanja skladištenja ribe najvažnije varijable koje određuju aktivnost i pokretljivost *Anisakis* ličinki u konzumnoj ribi [198,199]. Nadalje, mjesto parazitiranja unutar ribe ima značajan učinak, čak i kada se izuzme varijabilnost abundancije oblića *A. pegreffii* uzrokovane veličinom parateničnog domaćina. Naime, najveća je vjerojatnost da će zaraženi dio srdele uključivati želudac/piloričke nastavke/crijevo, što je važno znati ako postoji praksa da se ribi zbog male veličine ne odstranjuje utroba prije konzumacije. Budući da se srdele u sredozemnim zemljama uobičajeno konzumiraju termički neobrađene (npr. soljene ili marinirane), a da se pritom ne vadi utroba zbog veličine ribe, čimbenici rizika nisu zanemarivi. Iako su restorani obvezni po zakonu zamrzavati ribu prije pripreme, mnoga kućanstva pripremaju navedena jela sa svježim,

prethodno nezamrznutim srdelama, a *Anisakis* ličinke mogu preživjeti proces soljenja ili mariniranja [200].

Važan je nalaz ovog istraživanja pojava *Hysterothylacium* sp. s ukupnom prevalencijom od 20,1%. Prisutnost *Hysterothylacium* sp. Prethodno je zabilježena u srdeli i drugim vrstama riba iz Jadranskog [73] i zapadnog Sredozemnog mora [201,202], iako s različitim prevalencijama za svako istraživano područje. Rello i suradnici [202] zamijetili su *Hysterothylacium aduncum* kao jedinog nametnika prisutnog u srdelama s južne i istočne obale Španjolske s ukupnom prevalencijom od 11,85% (TL raspon 12,2 – 21,0 cm). Cavallero i suradnici objavili su jednu od najviših zabilježenih prevalencija nametnika *Hysterothylacium* sp. (42,4%) u velikom uzorku srdela tijekom 2011. i 2012. godine (N = 3300) na području sjevernog Jadrana [73]. Čak i u tako velikom uzorku s vrlo visokom prevalencijom *Hysterothylacium* sp., prevalencija *Anisakis* spp bila je vrlo niska (0,2%). Navedeni su rezultati dijelom slični nalazima u ovom istraživanju za sjeverno Jadransko more 2013. godine (*Hysterothylacium* sp. prevalencija 42,7% i *A. pegreffii* prevalencija 6,0%) (**tablica 4.4** i **dodatna tablica 10.7**). Međutim, u 2014. godini prevalencija obaju nametnika smanjila se u analiziranim uzorcima, osobito za *Hysterothylacium* sp. (prevalencija 1%). Trend je bio suprotan u srednjem Jadranu; od 1,3% u 2013. godini, do najviše zabilježene prevalencije *Hysterothylacium* sp. od 57,4% u 2014. godini. Isti trend bio je prisutan, iako manje naglašen, u oblića *A. pegreffii* (od 1,7 do 3,5%). Razlog ove promjene u abundanciji nametnika u srdelama može biti u oceanografskim događanjima u Jadranskome moru, a samim time i dostupnosti plijena koji ima ulogu intermedijarnog domaćina. Ovo se jedino može istražiti analizom sadržaja želuca i praćenjem oceanografskih uvjeta na mjestu uzorkovanja, uz napomenu da bi uzorkovanje trebalo obuhvatiti dulje vremensko razdoblje (> 2 godine) kako bi se mogli izvesti zaključci o povezanosti klimatskih promjena i populacija nametnika.

Nedavno otkriće prisutnosti ličinki oblića *Anisakis* spp. u brojnim mezozooplanktonskim organizmima sugerira da su putevi prijenosa širi nego što se pretpostavljalo [35,197], dok su različiti organizmi, kao što su kalanoidni kopepodi, mnogočetinaši i gamaridni amfipodi poznati kao intermedijarni domaćini oblića *Hysterothylacium* sp. [203]. Međutim, nalazi iz Jadranskog mora uvelike premašuju prevalenciju oblića *Hysterothylacium* sp. na području zapadnog Sredozemnog mora, uglavnom jer na dvije postaje uzorkovanja nametnik nije otkriven (postaja u

sjevernom Tirenskom moru i pokraj južne Sicilije). Iako se *Hysterothylacium* sp. općenito smatra nepatogenim za ljude, njegova prisutnost može imati ekonomske implikacije [202] zbog odbojnog izgleda utrobe ribe u kojoj su vidljivi nametnici.

Ispitivanje koje je provedeno anketiranjem španjolskih potrošača ribe uputilo je na percepciju i stavove potrošača u odnosu na prisutnost ličinki *Anisakis* roda u ribi [204]. Rezultati su ukazali na zabrinutost većine potrošača, ali koji bi bili spremni platiti do 10% veću cijenu ribe (6.60€/kg u usporedbi s cijenom od 6€/kg), ako bi im se jamčilo da je proizvod nezaražen. UV-kompresijska metoda, korištena u ovom istraživanju, jako je učinkovita u otkrivanju nametnika, međutim proces zamrzavanja trenutačno zahtjeva previše vremena da bi se koristila na ribarskim brodovima i prikladnija je za riboprerađivačke pogone [205]. Dodatno, nakon UV-kompresijske metode uzorak je uništen te se ne može staviti na tržište, a postoji ograničenje i kod korištenja na jako velikim uzorcima ribe. Poboljšanje i razvoj tehnologije, trenutačno dostupne na tržištu za pregledavanje i sprječavanje pojave *Anisakis* ličinke u proizvodima ribarstva i riboprerađivačke industrije, omogućila bi bolju ekonomsku održivost ove industrije i pritom ostvarila dobrobit za javno zdravstvo [204]. Nadalje, spriječilo bi se odbijanje izvoznih morskih proizvoda na granici [206], što se događa prilikom izvoza inćuna za Italiju i Španjolsku, zbog infekcije nametnikom *Anisakis* [207].

Više od 25% anketiranih španjolskih potrošača izjavilo je da su u prošlosti izbjegavali kupiti ili jesti morsku ribu zbog prisutnosti *Anisakis* ličinke, a gotovo dvije trećine potrošača izjavilo je da su spremni prestati kupovati ili jesti morsku ribu zbog prisutnosti *Anisakis* ličinke. Posebno je zanimljiv rezultat, u odnosu na rezultate ovog istraživanja, taj da su španjolski potrošači svjesni zaraženosti *Anisakis* ličinkom određenih vrsta morskih riba, poput oslića (19% ispitanika označilo je da su izbjegavali oslića u prošlosti), dok je jako malo ispitanika bilo svjesno rizika konzumacije male plave ribe (samo 1% ispitanika označio je izbjegavanje srdele u prošlosti i 4% ispitanika izbjegavalo je inćun). 40% ispitanika odgovorilo je da konzumiraju sirovu ili slabije kuhanu ribu, a 10% ispitanika potvrdilo je korištenje svježe, prethodno nezamrznute ribe, za pripremu sirove ili lagano kuhane ribu u domaćinstvima. Među ispitanicima koju su potvrdili konzumiranje sirove svježe ribe u kući, 22% navelo je izbjegavanje inćuna, a 2% srdele [204].

Srdele se općenito smatraju niskim ili vrlo niskim izvorom infekcije ljudi ličinkama *Anisakis* s obzirom na prevalenciju u mišićju, pogotovo u usporedbi s velikim predatorskim vrstama riba, kao što je oslić. Zanimljivo je da se inćun ipak smatra visoko rizičnim za ljude, iako razina rizika ovisi o geografskom području [69]. Nedavno objavljeno istraživanje o pojavnosti *Anisakis* ličinki u blago prerađenim proizvodima inćuna (soljeni, u ulju i marinirani inćuni), prikupljenih s talijanskih tržnica, umjetnom digestijom otkrilo je iznimno velik broj ličinki [208]. Ukupno 1283 mrtve ličinke prikupljene su u 107 analiziranih proizvoda, bar jedna ličinka pronađena je u 54,2% proizvoda, a prednjačili su soljeni proizvodi koji su svi bili zaraženi, s 1 – 105 ličinki po proizvodu. Poduzorak oblića (N = 122) molekularno je identificiran kao vrsta *A. pegreffii* (N = 92) i *A. simplex* (N = 30). Iako je rizik za anisakijazu bio zanemariv, jer se radilo o mrtvim ličinkama, pojavnost potencijalnih alergijskih reakcija senzibiliziranih pojedinaca, međutim, nije isključena. Također, odbojan izgled proizvoda kod potrošača bio je izražen [208]. Činjenicu da u sredozemnim zemljama komercijalno važna mala plava riba nije zanemariv izvor infekcije ljudi potvrdila je i nedavno objavljena retrospektivna analiza literature o slučajevima anisakijaze u Italiji, s posebnim naglaskom na izvoru zaraze [209]. Kriterij uključenja bila je prisutnost ličinke i njezina identifikacija, a analizirali su se epidemiološki podaci i klinička slika 73 slučaja koji su zadovoljili kriterije. Kod većine pacijenata izvor zaraze bio je sirov ili lagano kuhan inćun (65,7%), inćun ili srdela (15,1%), općenito sirova morska hrana (15,1%) i srdele (1,4%).

Ovo istraživanje potvrdilo je da je prisutnost oblića *A. pegreffii* u srdelama iz Sredozemnog mora pod snažnim utjecajem geografske varijacije i varijacije u veličini domaćina. Navedene varijable, zajedno s podacima o prevalenciji i intenzitetu *A. pegreffii* infekcije (posebno za file srdela), mogu se izravno uključiti u buduće procjene izloženosti hrvatske populacije ovom riziku, koristeći i podatke iz upitnika o prehrambenim navikama stanovništva (detaljna metodologija prikazana u literaturi [85]). Dodana je vrijednost ovog istraživanja pružanje osnove potrebne za izradu kvantitativne procjene rizika za srdelu i razvoj HACCP (prema engl. *hazard analysis and critical control points*) protokola za proizvode riboprerađivačke industrije.

6. Zaključak

Istraživanje u okviru ove doktorske disertacije predstavlja napredak u razumijevanju mehanizama rane infekcije ličinkom oblića *Anisakis pegreffii* u modelu slučajnog domaćina jer prvi put primjenjuje metodologiju visokoprotočnog sekvenciranja u ispitivanju patogeneze anisakijaze. Molekularni rezultati pokazali su snažan lokaliziran upalni odgovor, većim dijelom temeljen na aktivaciji signalnog puta IL17 i razvoj odgovora Th17, uz moguću pojavu ribosomskog stresa. Isto je dodatno potkrijepljeno nalazima na staničnoj razini, koji su pokazali teške upalne/hemoragične lezije u tkivima želuca i abdominalnih mišića. Mjesto prodora ličinke oblića *A. pegreffii* u prva 32 sata infekcije infiltrirano je polimorfonuklearnim leukocitima (pretežno neutrofilima) te u manjoj mjeri makrofagima. Bolje razumijevanje efektorskih mehanizama postavlja temelje za buduća istraživanja fokusirana na mehanizme interakcija nametnika koji nisu koevolucijski razvili nametnički odnos s ljudima.

Opsežno uzorkovanje srdela na području Jadranskog mora i zapadnog Sredozemnog mora, kao i primjena specifične metode pregledavanja ribljeg mesa i utrobe upotrijebljenih u ovom istraživanju, pružaju ključne podatke za krajnjeg potrošača, riboprerađivačku industriju, ali i javnozdravstvene stručnjake i liječnike. Istraživanje je potvrdilo da se prisutnost infektivne ličinke oblića *A. pegreffii* u srdelama na području Jadranskog i zapadnog Sredozemnog mora značajno mijenja ovisno o geografskom području i veličini domaćina. Navedene varijable, zajedno s podacima o prevalenciji i intenzitetu infekcije oblićem vrste *A. pegreffii* (poglavito u fileima srdele), mogu se iskoristiti kao osnova za izradu kvantitativne procjene rizika infekcije ljudi te za razvoj HACCP protokola unutar riboprerađivačke industrije.

7. Kratki sažetak na engleskom jeziku (Summary)

Prevalence of infectious nematode larvae *Anisakis pegreffii* (Nematoda, Anisakidae) in paratenic host (*Sardina pilchardus*) and molecular characterization of model accidental host response (*Rattus norvegicus*)

Aims of the research performed on model accidental host infected with *Anisakis pegreffii* larvae were to: histopathologically describe severe inflammatory/hemorrhagic lesions at the infection site and explore the transcriptomes of affected tissues using RNA-Seq. Elicited strong local proinflammatory reaction seems to favor the activation of the interleukin 17 signaling pathway and the development of the T helper 17-type response. The lesion sites showed infiltration by polymorphonuclear leukocytes and macrophages. Understanding the cellular and molecular mechanisms underlying host responses to *Anisakis* infection is important to elucidate many aspects of the onset of anisakiasis, a disease of growing public-health concern.

The study of European pilchards from different Adriatic and Mediterranean regions aimed to assess prevalence and intensity of *A. pegreffii* infection during a three-year period. The overall prevalence in pilchards was 12.2% (range 0–44.9% for different sampling points) and mean intensity 1.8, while an overall larval prevalence in fillets was 1.5%. This study demonstrates that the presence of *A. pegreffii* in European pilchards from the Adriatic and Mediterranean Sea is highly influenced by geographic and host size variation. Results suggest the need to implement these variables in future planning of risk management measures, to mitigate potential effects on the public health.

8. Kratki sažetak

Ciljevi istraživanja provedenog na modelu slučajnog domaćina inficiranog ličinkama oblića *Anisakis pegreffii* bili su: histopatološki opisati teške upalne/hemoragijske lezije na mjestu infekcije i istražiti transkriptome zahvaćenih tkiva s pomoću RNA sekvenciranja. Snažna lokalna upalna reakcija temelji se na aktivaciji signalnog puta interleukina 17 i razvoju odgovora limfocita Th17, a područja lezija infiltrirana su polimorfonuklearnim leukocitima i makrofagima. Razumijevanje staničnih i molekularnih mehanizama odgovora domaćina na infekciju oblićem *Anisakis* važno je za shvaćanje mnogih osobitosti nastanka anisakijaze, sve važnije bolesti javnozdravstvenog interesa.

Cilj istraživanja na srdelama (*Sardina pilchardus*) iz različitih jadranskih i zapadnosredozemnih regija bio je procijeniti prevalenciju i intenzitet infekcije ličinkom oblića *A. pegreffii* kroz trogodišnje razdoblje uzorkovanja. Ukupna prevalencija iznosila je 12,2% (raspon 0 – 44,9% za različite postaje uzorkovanja) i prosječni intenzitet 1,8, dok je ukupna prevalencija ličinki u fileima bila 1,5%. Ovim istraživanjem potvrđeno je da se prisutnost infektivne ličinke oblića *A. pegreffii* u srdelama na području Jadranskog i zapadnog Sredozemnog mora značajno mijenja ovisno o geografskom području i veličini domaćina. Rezultati upućuju na potrebu uključivanja ovih varijabli u buduće mjere upravljanja rizikom kako bi se smanjio potencijalni utjecaj na zdravlje ljudske populacije.

9. Popis literature

[1] Broglia A, Kapel C. Changing dietary habits in a changing world: Emerging drivers for the transmission of foodborne parasitic zoonoses. Vet Parasitol 2011;182:2–13. doi:10.1016/j.vetpar.2011.07.011.

[2] Bouwknegt M, Devleesschauwe B, Graham H, Robertson LJ, van der Giessen J. Prioritization of foodborne parasites in Europe. Euro Surveill 2018;23:17-00161. doi:https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.9.17-00161.

[3] EFSA. Scientific opinion of the Panel on Biological Hazards on risk assessment of parasites in fishery products. EFSA J 2010;8:10–43. doi:10.2903/j.efsa.2010.1543.

[4] Chai J-Y, Darwin Murrell K, Lymbery AJ. Fish-borne parasitic zoonoses: Status and issues. Int J Parasitol 2005;35:1233–54. doi:10.1016/j.ijpara.2005.07.013.

[5] Hepworth M, Grencis RK, Artis D. Regulation of immunity and inflammation following intestinal helminth infection. In: Kennedy MW, Harnett W, editors. Parasit. Nematodes. Mol. Biol. Biochem. Immunol. 2nd ed., 2013, p. 106–22.

[6] Allen JE, Maizels RM. Diversity and dialogue in immunity to helminths. Nat Rev Immunol 2011;11:375–88. doi:10.1038/nri2992.

[7] Yates KE, Lyczak JB. Overview of immunity. In: Pier G, Lyczak J, Wetzle L, editors. Immunol. Infect. Immun., Washington, DC: ASM Press; 2004, p. 3–27.

[8] Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Properties and overview of immune responses. Cell. Mol. Immunol. 9th Ed., Philadelphia: Elsevier; 2018, p. 1–13.

[9] Murphy K, Weaver C. Basic concepts in immunology. Janeway's Immunobiol. 9th ed., 2017, p. 1–36.

[10] Taradi M. Pregled imunosti. In: Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M, et al., editors. Imunologija. 7th ed., Zagreb: Medicinska naklada; 2010, p. 2–17.

[11] Čulo F, Batinić D. Stanice, tkiva i organi imunosnog sustava. In: Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M, et al., editors. Imunologija. 7th ed., Zagreb: Medicinska naklada; 2010, p. 18–57.

[12] Xiao TS. Innate immunity and inflammation. Cell Mol Immunol 2017;14:1–3. doi:10.1038/cmi.2016.45.

[13] Taradi M. Nespecifična imunost. In: Andreis I, Batinić D, Čulo F, Grčević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M, et al., editors. Imunologija. 7th ed., Zagreb: Medicinska naklada; 2010, p. 156–71.

[14] Lyczak JB. Innate immunity. In: Pier G, Lyczak J, Wetzler L, editors. Immunol. Infect. Immun., Washington DC: ASM Press; 2004, p. 29–46.

[15] Vijay-Kumar M, Gewirtz AT. Guardians of the gut: newly appreciated role of epithelial Toll-like receptors in protecting the intestine. Gastroenterology 2008;135:351–354.

[16] Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. Nat Immunol 2006;7:1250–1257.

[17] Fritz JH, Le Bourhis L, Magalhaes JG, Philpott DJ. Innate immune recognition at the epithelial barrier drives adaptive immunity: APCs take the back seat. Trends Immunol 2008;29:41–49.

[18] Stadnyk AW, Kearsey JA. Pattern of proinflammatory cytokine mRNA expression during *Trichinella spiralis* infection of the rat. Infect Immun 1996;64:5138–5143.

[19] Cruickshank, S.M., DeSchoolmeester, M.L., Svensson M, Howell G, Bazakou A, Logunova

L, Little MC, English N, et al. Rapid dendritic cell mobilization to the large intestinal epithelium is associated with resistance to *Trichuris muris* infection. J Immunol 2009;182:3055–3062.

[20] Zaph C, Troy AE, Taylor BC, Berman-Booty, L.D., Guild KJ, Du Y, Yost EA, et al. Epithelial-cell-intrinsic IKK-beta expression regulates intestinal immune homeostasis. Nature 2007;446:552–556.

[21] Madden KB, Whitman L, Sullivan C, Gause WC, Urban JFJ, Katona IM, et al. Role of STAT6 and mast cells in IL-4- and IL-13-induced alterations in murine intestinal epithelial cell function. J Immunol 2002;169:4417–4422.

[22] Bancroft AJ, McKenzie ANJ, Grencis RK. A critical role for IL-13 in resistance to intestinal nematode infection. J Immunol 1998;160:3453–3461.

[23] Wilson, M.S., Ramalingam, T.R., Rivollier A, Shenderov K, Mentink-Kane, M.M., Madala SK, Cheever AW, Artis D, Kelsall BL, et al. Colitis and intestinal inflammation in IL10-/- mice results from IL-13Ralpha2-mediated attenuation of IL-13 activity. Gastroenterology 2010;140:254–264.

[24] McKenzie GJ, Fallon PG, Emson CL, Grencis RK, McKenzie AN. Simultaneous disruption of interleukin (IL)-4 and IL-13 defines individual roles in T helper cell type 2-mediated responses. J Exp Med 1999;189:1565–1572.

[25] Urban JFJ, Noben-Trauth, N., Donaldson DD, Madden KB, Morris SC, Collins M, Finkelman FD. IL-13, IL-4Ralpha, and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. Immunity 1988;8:255–264.

[26] Schopf LR, Hoffmann KF, Cheever AW, Urban JFJ, Wynn TA. IL-10 is critical for host resistance and survival during gastrointestinal helminth infection. J Immunol 2002;168:2383–2392.

[27] Bliss SK, Alcaraz A, Appleton JA. IL-10 prevents liver necrosis during murine infection with *Trichinella spiralis*. J Immunol 2003;171:3142–3147.

[28] Audicana MT, Kennedy MW. *Anisakis simplex*: From obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. Clin Microbiol Rev 2008;21:360–79. doi:10.1128/CMR.00012-07.

[29] Mattiucci S, Cipriani P, Levsen A, Paoletti M, Nascetti G. Molecular epidemiology of *Anisakis* and anisakiasis: An ecological and evolutionary road map. Adv Parasitol 2018;99:1–171. doi:10.1016/bs.apar.2017.12.001.

[30] Abollo E, Gestal C, Pascual S. *Anisakis* infestation in marine fish and cephalopods from Galician waters: An updated perspective. Parasitol Res 2001;87:492–9. doi:10.1007/s004360100389.

[31] Pozio E. Integrating animal health surveillance and food safety: the example of *Anisakis*. Rev Sci Tech Off Int Epiz 2013;32:487–96.

[32] Mattiucci S, D'Amelio S. Anisakiasis. In: Bruschi F, editor. Helminth Infect. Their Impact Glob. Public Heal., Springer-Verlag Wien; 2014, p. 325–66. doi:10.1093/cid/ciu891.

[33] Køie M, Berland B, Burt M. Development to third-stage larva occurs in eggs *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). Can J Fish Aquat Sci 1995;52:134–9.

[34] Hays R, Measures LN, Huot J. Euphausiids as intermediate hosts of *Anisakis simplex* in the St. Lawrence estuary. Can J Zool 1998;76:1226–35. doi:10.1139/cjz-76-7-1226.

[35] Gregori M, Roura Á, Abollo E, González ÁF, Pascual S. *Anisakis simplex* complex (Nematoda: Anisakidae) in zooplankton communities from temperate NE Atlantic waters. J Nat Hist 2015;49:755–73. doi:10.1080/00222933.2014.979260.

[36] Gómez-Gutiérrez J, Robinson CJ, Kawaguchi S, Nicol S. Parasite diversity of *Nyctiphanes simplex* and *Nematoscelis difficilis* (Crustacea: Euphausiacea) along the northwestern coast of Mexico. Dis Aquat Organ 2010;88:249–66. doi:10.3354/dao02155.

[37] Berland B. Musings on nematode parasites (*Fisken oghavet*). Havforskningsinstituttet, Bergen. 2006.

[38] Iglesias L, Valero A, Benítez R, Adroher FJ. In vitro cultivation of *Anisakis simplex*: Pepsin increases survival and moulting from fourth larval to adult stage. Parasitology 2001;123:285–91. doi:10.1017/S0031182001008423.

[39] Mattiucci S, Nascetti G. Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. Adv Parasitol 2008;66:47–148. doi:10.1016/S0065-308X(08)00202-9.

[40] Ishikura H, Kikuchi K, Nagasawa K, Ooiwa T, Takamiya H, Sato N, et al. Anisakidae and anisakidosis. In: Sun T, editor. Prog. Clin. Parasitol., New York: Springer-Verlag; 1993, p. 43–102.

[41] Valentini A, Mattiucci S, Bondanelli P, Webb SC, Mignucci-Giannone A a, Colom-Llavina MM, et al. Genetic relationships among *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) inferred from mitochondrial *cox2* sequences, and comparison with allozyme data. J Parasitol 2006;92:156–66. doi:10.1645/GE-3504.1.

[42] Mattiucci S, Acerra V, Paoletti M, Cipriani P, Levsen A, Webb SC, et al. No more time to stay 'single' in the detection of *Anisakis pegreffii*, *A. simplex* (s. s.) and hybridization events between them: a multi-marker nuclear genotyping approach. Parasitology 2016:1–14. doi:10.1017/S0031182016000330.

[43] Ishikura H, Kikuchi K. Intestinal anisakiasis in Japan: Infected fish, sero-immunological diagnosis, and prevention. Tokyo: Springer-Verlag; 1990.

[44] Rosales MJ, Mascaró C, Fernandez C, Luque F, Moreno MS, Parras L, et al. Acute intestinal anisakiasis in Spain: A fourth-stage *Anisakis simplex* larva. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999;94:823–6. doi:10.1590/S0074-02761999000600020.

[45] Baptista-Fernandes T, Rodrigues M, Castro I, Paixão P, Pinto-Marques P, Roque L, et al. Human gastric hyperinfection by *Anisakis simplex*: A severe and unusual presentation and a brief review. Int J Infect Dis 2017;64:38–41. doi:10.1016/j.ijid.2017.08.012.

[46] Hochberg NS, Hamer DH. Anisakidosis: Perils of the deep. Clin Infect Dis 2010;51:806–12. doi:10.1086/656238.

[47] Mattiucci S, Paoletti M, Colantoni A, Carbone A, Gaeta R, Proietti A, et al. Invasive anisakiasis by the parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae): diagnosis by real-time PCR hydrolysis probe system and immunoblotting assay. BMC Infect Dis 2017;17:530. doi:10.1186/s12879-017-2633-0.

[48] Nieuwenhuizen NE. *Anisakis* – immunology of a foodborne parasitosis. Parasite Immunol 2016;38:548–57. doi:10.1111/pim.12349.

[49] Moneo I, Carballeda-Sangiao N, González-Muñoz M. New perspectives on the diagnosis of allergy to *Anisakis* spp. Curr Allergy Asthma Rep 2017;17:27. doi:10.1007/s11882-017-0698-x.

[50] Carlin AF, Abeles S, Chin NA, Lin GY, Young M, Vinetz JM. Case report: A common source outbreak of anisakidosis in the United States and postexposure prophylaxis of family collaterals. Am J Trop Med Hyg 2018;99:1219–21. doi:10.4269/ajtmh.18-0586.

[51] Daschner A, Alonso-Gómez A, Cabañas R, Suarez-de-Parga J-M, López-Serrano M-C. Gastroallergic anisakiasis: Borderline between food allergy and parasitic disease—Clinical and allergologic evaluation of 20 patients with confirmed acute parasitism by *Anisakis simplex*. J Allergy Clin Immunol 2000;105:176–81. doi:10.1016/S0091-6749(00)90194-5.

[52] Baird FJ, Gasser RB, Jabbar A, Lopata AL. Foodborne anisakiasis and allergy. Mol Cell Probes 2014;28:167–74. doi:10.1016/j.mcp.2014.02.003.

[53] Fæste CK, Jonscher KR, Dooper MMWB, Egge-Jacobsen W, Moen A, Daschner A, et al. Characterisation of potential novel allergens in the fish parasite *Anisakis simplex*. EuPA Open Proteomics 2014;4:140–55. doi:10.1016/j.euprot.2014.06.006.

[54] Baird FJ, Su X, Aibinu I, Nolan MJ, Sugiyama H, Otranto D, et al. The *Anisakis* transcriptome provides a resource for fundamental and applied studies on allergy-causing parasites. PLoS Negl Trop Dis 2016;10:e0004845. doi:10.1371/journal.pntd.0004845.

[55] Anadón AM, Romarís F, Escalante M, Rodríguez E, Gárate T, Cuéllar C, et al. The *Anisakis simplex* Ani s 7 major allergen as an indicator of true *Anisakis* infections. Clin Exp Immunol 2009;156:471–8. doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03919.x.

[56] Kikuchi Y, Ishikura H, Kikuchi K. Pathology of intestinal anisakiasis. In: Ishikura H, Kikuchi K, editors. Intest. anisakiasis Japan, Tokyo: Springer; 1990, p. 129–43.

[57] Napoletano C, Mattiucci S, Colantoni A, Battisti F, Zizzari IG, Rahimi H, et al. *Anisakis pegreffii* impacts differentiation and function of human dendritic cells. Parasite Immunol 2018:e12527. doi:10.1111/pim.12527.

[58] Mattiucci S, Paoletti M, Borrini F, Palumbo M, Palmieri RM, Gomes V, et al. First molecular identification of the zoonotic parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in a paraffin-embedded granuloma taken from a case of human intestinal anisakiasis in Italy. BMC Infect Dis 2011;11:82. doi:10.1186/1471-2334-11-82.

[59] Mladineo I, Popović M, Drmić-Hofman I, Poljak V. A case report of a *Anisakis pegreffii* (Nematoda, Anisakidae) identified from archival paraffin sections of a Croatian patient. BMC Infect Dis 2015;16:42. doi:10.1186/s12879-016-1401-x.

[60] Zanelli M, Ragazzi M, Fiorino S, Foroni M, Cecinato P, del Mar Jordana Sanchez M, et al.

An Italian case of intestinal anisakiasis with a presurgical diagnosis: Could this parasite represent an emerging disease? Pathol Res Pract 2017;213:558–64. doi:10.1016/j.prp.2017.01.027.

[61] Nieuwenhuizen N, Lopata AL, Jeebhay MF, Herbert DR, Robins TG, Brombacher F. Exposure to the fish parasite *Anisakis* causes allergic airway hyperreactivity and dermatitis. J Allergy Clin Immunol 2006;117:1098–105. doi:10.1016/j.jaci.2005.12.1357.

[62] Sánchez-Velasco P, Mendizábal L, Antón EM, Ocejo-Vinyals G, Jerez J, Leyva-Cobián F. Association of hypersensitivity to the nematode *Anisakis simplex* with HLA class II DRB1∗1502-DQB1∗0601 haplotype. Hum Immunol 2000;61:314–9. doi:10.1016/S0198-8859(99)00167-6.

[63] Heffler E, Sberna ME, Sichili S, Intravaia R, Nicolosi G, Porto M, et al. High prevalence of *Anisakis simplex* hypersensitivity and allergy in Sicily, Italy. Ann Allergy, Asthma Immunol 2016;116:146–50. doi:10.1016/j.anai.2015.12.014.

[64] Arilla MC, Ibarrola I, Martínez A, Monteseirín J, Conde J, Asturias J a. An antibody-based ELISA for quantification of Ani s 1, a major allergen from *Anisakis simplex*. Parasitology 2008;135:735–40. doi:10.1017/S0031182008004332.

[65] Caballero ML, Asero R, Antonicelli L, Kamberi E, Colangelo C, Fazii P, et al. *Anisakis* allergy component-resolved diagnosis: Clinical and immunologic differences between patients from Italy and Spain. Int Arch Allergy Immunol 2013;162:39–44. doi:10.1159/000351056.

[66] Zuloaga J, Rodríguez-Bobada C, Corcuera MT, Gómez-Aguado F, González P, Rodríguez-Perez R, et al. A rat model of intragastric infection with *Anisakis* spp. live larvae: Histopathological study. Parasitol Res 2013;112:2409–11. doi:10.1007/s00436-013-3359-6.

[67] Gonzalez-Muñoz M, Rodriguez-Mahillo AI, Moneo I. Different Th1/Th2 responses to

Anisakis simplex are related to distinct clinical manifestations in sensitized patients. Parasite Immunol 2010;32:67–73. doi:10.1111/j.1365-3024.2009.01162.x.

[68] Europska komisija. Činjenice i slikovni prikazi o politici usuglašenih mjera EU-a namijenjenih opstanku i održivosti europske ribarstvene industrije. Osnovni statistički podaci. 2016.

[69] Levsen A, Svanevik CS, Cipriani P, Mattiucci S, Gay M, Hastie LC, et al. A survey of zoonotic nematodes of commercial key fish species from major European fishing grounds—Introducing the FP7 PARASITE exposure assessment study. Fish Res 2018;202:4–21. doi:10.1016/j.fishres.2017.09.009.

[70] Morello EB, Arneri E. Anchovy and sardine in the Adriatic Sea - an ecological review. In: Gibson RN, Atkinson RJA, Gordon JDM, editors. Ocean Mar Biol. 47th ed., 2009, p. 209–56.

[71] GFCM-FAO (prema engl. *General Fisheries Commission for the Mediterranean, Food and Agriculture Organization*). Statistika o ribarstvu i akvakulturi. GFCM produkcija ulova za razdoblje 1970. – 2014. (FishstatJ), 2016.

[72] Molina-Fernández D, Malagón D, Gómez-Mateos M, Benítez R, Martín-Sánchez J, Adroher FJ. Fishing area and fish size as risk factors of *Anisakis* infection in sardines (*Sardina pilchardus*) from Iberian waters, southwestern Europe. Int J Food Microbiol 2015;203:27–34. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.024.

[73] Cavallero S, Magnabosco C, Civettini M, Boffo L, Mingarelli G, Buratti P, et al. Survey of *Anisakis* sp. and *Hysterothylacium* sp. in sardines and anchovies from the North Adriatic Sea. Int J Food Microbiol 2015;200:18–21. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.017.

[74] Mladineo I, Poljak V. Ecology and genetic structure of zoonotic *Anisakis* spp. from Adriatic commercial fish species. Appl Environ Microbiol 2014;80:1281–90. doi:10.1128/AEM.03561-13.

[75] Serracca L, Battistini R, Rossini I, Carducci A, Verani M, Prearo M, et al. Food safety considerations in relation to *Anisakis pegreffii* in anchovies (*Engraulis encrasicolus*) and sardines (*Sardina pilchardus*) fished off the Ligurian Coast (Cinque Terre National Park, NW Mediterranean). Int J Food Microbiol 2014;190:79–83. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.025.

[76] Mladineo I, Poljak V, Martínez-Sernández V, Ubeira FM. Anti-*Anisakis* IgE seroprevalence in the healthy Croatian coastal population and associated risk factors. PLoS Negl Trop Dis 2014;8:e2673. doi:10.1371/journal.pntd.0002673.

[77] Barros C, Manzarbeitia F, López-Vélez R, Oñate JM. Anisakiasis humana en España por consumo de sardinas crudas. Alimentaria 1992:57–61.

[78] López-Vélez R, García A, Barros C, Manzarbeitia F, Oñate JM. Anisakiasis en España. Enferm Infecc Microbiol Clin 1992;10:158–161.

[79] Kim SH, Park CW, Kim SK, Won S, Park WK, Kim HR, et al. A case of anisakiasis invading the stomach and the colon at the same time after eating anchovies. Clin Endosc 2013;46:293–296.

[80] Fumarola L, Monno R, Ierardi E, Rizzo G, Giannelli G, Lalle M, et al. *Anisakis pegreffii* etiological agent of gastric infections in two Italian women. Foodborne Pathog Dis 2009;6:1157–9. doi:10.1089/fpd.2009.0325.

[81] Mattiucci S, Fazii P, Rosa A De, Paoletti M, Megna AS, Glielmo A, et al. Anisakiasis and gastroallergic reactions associated with *Anisakis pegreffii* infection, Italy. Emerg Infect Dis 2013;19:496–9.

[82] Valle J, Lopera E, Sánchez ME, Lerma R, Ruiz JL. Spontaneous splenic rupture and *Anisakis* appendicitis presenting as abdominal pain: A case report. J Med Case Rep 2012;6:114. doi:10.1186/1752-1947-6-114.

[83] Del Rey Moreno A, Valero A, Mayorga C, Gómez B, Torres MJ, Hernández J, et al. Sensitization to *Anisakis simplex s.l.* in a healthy population. Acta Trop 2006;97:265–9. doi:10.1016/j.actatropica.2005.11.007.

[84] Puente P, Anadón AM, Rodero M, Romarís F, Ubeira FM, Cuéllar C. *Anisakis simplex*: The high prevalence in Madrid (Spain) and its relation with fish consumption. Exp Parasitol 2008;118:271–4. doi:10.1016/j.exppara.2007.07.002.

[85] Bao M, Pierce GJ, Pascual S, González-Muñoz M, Mattiucci S, Mladineo I, et al. Assessing the risk of an emerging zoonosis of worldwide concern: anisakiasis. Sci Rep 2017;7:43699. doi:10.1038/srep43699.

[86] D'amico P, Malandra R, Costanzo F, Castigliego L, Guidi A, Gianfaldoni D, et al. Evolution of the *Anisakis* risk management in the European and Italian context. Food Res Int 2014;64:348–62. doi:10.1016/j.foodres.2014.06.038.

[87] Serrano-Moliner M, Morales-Suarez-Varela M, Valero MA. Epidemiology and management of foodborne nematodiasis in the European Union, systematic review 2000–2016. Pathog Glob Health 2018;112:249–58. doi:10.1080/20477724.2018.1487663.

[88] Cavallero S, Martini A, Migliara G, Vito C De, Iavicoli S, Amelio SD. Anisakiasis in Italy : Analysis of hospital discharge records in the years 2005-2015. PLoS One 2018;13:e0208772.

[89] Yera H, Fréalle É, Dutoit E, Dupouy-Camet J. A national retrospective survey of anisakidosis in France (2010-2014): decreasing incidence, female predominance, and emerging allergic potential. Parasite 2018;25:23. doi:10.1051/parasite/2018016.

[90] Quiazon KMA, Yoshinaga T, Ogawa K. Experimental challenge of *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in rainbow trout and olive flounder. Parasitol Int 2011;60:126–31. doi:10.1016/j.parint.2010.11.007.

[91] Macrì F, Lanteri G, Rapisarda G, Costa A, Marino F. *Anisakis pegreffii* experimental challenge in *Dicentrarchus labrax*: An endoscopic study. Aquaculture 2012;338–341:297–9. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.01.015.

[92] Marino F, Lanteri G, Passantino A, De Stefano C, Costa A, Gaglio G, et al. Experimental susceptibility of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, via challenge with *Anisakis pegreffii* larvae. Biomed Res Int 2013;2013. doi:10.1155/2013/701828.

[93] Haarder S, Kania PW, Holm TL, Louise von Gersdorff Jørgensen KB. Effect of ES-products from *Anisakis* (Nematoda: Anisakidae) on experimentally induced colitis in adult zebrafish. Parasite Immunol 2017;39:e12456. doi:10.1111/pim.12456.

[94] Figueiredo I, Cardoso L, Teixeira G, Lopes L, São Clemente SC, Vericimo MA. A technique for the intra-gastric administration of live larvae of *Anisakis simplex* in mice. Exp Parasitol 2012;130:285–7. doi:10.1016/j.exppara.2012.01.004.

[95] Park SK, Cho MK, Park H-K, Lee KH, Lee SJ, Choi SH, et al. Macrophage migration inhibitory factor homologs of *Anisakis simplex* suppress Th2 response in allergic airway inflammation model via CD4+CD25+Foxp3+ T cell recruitment. J Immunol 2009;182:6907–14. doi:10.4049/jimmunol.0803533.

[96] Cho MK, Park MK, Kang SA, Caballero ML, Perez-Pinar T, Rodriguez-Perez R, et al. Allergenicity of two *Anisakis simplex* allergens evaluated *in vivo* using an experimental mouse model. Exp Parasitol 2014;146:71–7. doi:10.1016/j.exppara.2014.09.008.

[97] Baeza ML, Conejero L, Higaki Y, Martín E, Pérez C, Infante S, et al. *Anisakis simplex* allergy: A murine model of anaphylaxis induced by parasitic proteins displays a mixed Th1/Th2 pattern. Clin Exp Immunol 2005;142:433–40. doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02952.x.

[98] Jeon C, Kim J. Pathogenic potential of two sibling species, *Anisakis simplex* (s.s.) and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae): *In vitro* and *in vivo* studies. Biomed Res Int

2015;2015:1–9. doi:10.1155/2015/983656.

[99] Romero MC, Valero A, Navarro-Moll MC, Martín-Sánchez J. Experimental comparison of pathogenic potential of two sibling species *Anisakis simplex* s.s. and *Anisakis pegreffii* in Wistar rat. Trop Med Int Heal 2013;18:979–84. doi:10.1111/tmi.12131.

[100] Romero MC, Valero A, Navarro MC, Hierro I, Barón SD, Martín-Sánchez J. Experimental demonstration of pathogenic potential of *Anisakis physeteris* and *Anisakis paggiae* in Wistar rats. Parasitol Res 2014;113:4377–86. doi:10.1007/s00436-014-4113-4.

[101] Morsy K, Badr AM, Abdel-Ghaffar F, El Deeb S, Ebead S. Pathogenic potential of fresh, frozen, and thermally treated *Anisakis* spp. type II (L3) (Nematoda: Anisakidae) after oral inoculation into Wistar rats: A histopathological study. J Nematol 2017;49:427–36.

[102] Abe N, Teramoto I. *Anisakis* haemoglobin is a main antigen inducing strong and prolonged immunoreactions in rats. Parasitol Res 2017;116:2035–9. doi:10.1007/s00436-017-5475-1.

[103] Abe N, Teramoto I. Oral inoculation of live or dead third-stage larvae of *Anisakis simplex* in rats suggests that only live larvae induce production of antibody specific to *A. simplex*. Acta Parasitol 2014;59:184–8. doi:10.2478/s11686-014-0216-4.

[104] Romero MC, Navarro MC, Martín-Sánchez J, Valero A. Peppermint (*Mentha piperita*) and albendazole against anisakiasis in an animal model. Trop Med Int Heal 2014;19:1430–6. doi:10.1111/tmi.12399.

[105] Romero MC, Valero A, Martín-Sánchez J, Navarro-Moll MC. Activity of *Matricaria chamomilla* essential oil against anisakiasis. Phytomedicine 2012;19:520–3. doi:10.1016/j.phymed.2012.02.005.

[106] Gause WC, Urban JF, Stadecker MJ. The immune response to parasitic helminths: Insights from murine models. Trends Immunol 2003;24:269–77. doi:10.1016/S1471-4906(03)00101-7.

[107] D'Amelio S, Mathiopoulos KD, Santos CP, Pugachev ON, Webb SC, Picanço M, et al. Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: Ascaridoidea) defined by polymerase-chain-reaction-based restriction fragment length polymorphism. Int J Parasitol 2000;30:223–6. doi:10.1016/S0020-7519(99)00178-2.

[108] Voelkerding K V., Dames SA, Durtschi JD. Next-generation sequencing: From basic research to diagnostics. Clin Chem 2009;55:641–58. doi:10.1373/clinchem.2008.112789.

[109] Habulin D. Računalna analiza knjižnica dobivenih metodama sekvenciranja sintezom prema kalupu i sekvenciranja nanoporama 2016.

[110] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nat Rev Genet 2009;10:57–63. doi:10.1038/nrg2484.

[111] Bennett S. Solexa Ltd. Pharmacogenomics 2004;5:433–8. doi:10.1517/14622416.5.4.433.

[112] Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics 2014:1–7. doi:10.1093/bioinformatics/btu170.

[113] Schmieder R, Edwards R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. Bioinformatics 2011;27:863–4. doi:10.1093/bioinformatics/btr026.

[114] Zerbino DR, Achuthan P, Akanni W, Amode MR, Barrell D, Bhai J, et al. Ensembl 2018. Nucleic Acids Res 2018;46:D754–61. doi:10.1093/nar/gkx1098.

[115] Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. Bioinformatics 2013;29:15–21. doi:10.1093/bioinformatics/bts635.

[116] Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics 2010;26:139–40.

doi:10.1093/bioinformatics/btp616.

[117] McCarthy DJ, Chen Y, Smyth GK. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. Nucleic Acids Res 2012;40:4288–97. doi:10.1093/nar/gks042.

[118] R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing 2017.

[119] Huber W, Carey VJ, Gentleman R, Anders S, Carlson M, Carvalho BS, et al. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. Nat Methods 2015;12:115–21. doi:10.1038/nmeth.3252.

[120] Carlson M, Carlson M. org.Rn.eg.db: Genome wide annotation for rat 2017.

[121] McCarthy DJ, Smyth GK. Testing significance relative to a fold-change threshold is a TREAT. Bioinformatics 2009;25:765–71. doi:10.1093/bioinformatics/btp053.

[122] Smyth GK. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. Stat Appl Genet Mol Biol 2004;3:1–25. doi:10.2202/1544-6115.1027.

[123] Gu Z, Eils R, Schlesner M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. Bioinformatics 2016;32:2847–9. doi:10.1093/bioinformatics/btw313.

[124] The Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology project in 2008. Nucleic Acids Res 2008;36:D440–4. doi:10.1093/nar/gkm883.

[125] Oshlack A, Wakefield MJ. Transcript length bias in RNA-seq data confounds systems biology. Biol Direct 2009;4:14. doi:10.1186/1745-6150-4-14.

[126] Walter W, Sánchez-Cabo F, Ricote M. GOplot: an R package for visually combining

expression data with functional analysis. Bioinformatics 2015;31:2912–4. doi:10.1093/bioinformatics/btv300.

[127] Wickham H. ggplot2 - elegant graphics for data analysis. Use R! New York: Springer; 2009.

[128] Luo W, Friedman MS, Shedden K, Hankenson KD, Woolf PJ. GAGE: generally applicable gene set enrichment for pathway analysis. BMC Bioinformatics 2009;10:161. doi:10.1186/1471-2105-10-161.

[129] Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. Nucleic Acids Res 2017;45:D353–61. doi:10.1093/nar/gkw1092.

[130] Luo W, Brouwer C. Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. Bioinformatics 2013;29:1830–1. doi:10.1093/bioinformatics/btt285.

[131] Jardas I. Jadranska ihtiofauna. Zagreb: Školska knjiga; 1996.

[132] Artegiani A, Bregant D, Paschini E, Pinardi N, Raicich F, Russo A. The Adriatic Sea General Circulation. Part I: Air–Sea Interactions and Water Mass Structure. J Phys Oceanogr 1997;27:1492–514. doi:10.1175/1520-0485(1997)027<1492:TASGCP>2.0.CO;2.

[133] Brambati A. Origin and evolution of the Adriatic Sea. In: Colombo G, Ferrari I, Ceccherelli VU, Rossi R, editors. Mar. Eutrophication Popul. Dyn. XXV Eur. Mar. Biol. Symp., 1992, p. 327–46.

[134] Gačić M, Poulain P-M, Zore-Armanda M, Barale V. Overview. In: Cushman-Roisin B, Gačić M, Poulain P-M, editors. Phys. Oceanogr. Adriat. Sea, Dordrecht: Academic Publishers; 2001, p. 1–44.

[135] Lipej L, Dulčić J. The current status of Adriatic fish biodiversity. In: Griffiths HI, Kryštufek B, Reed JM, editors. Balk. Biodivers., Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 2004, p. 291–306.

[136] Karl H, Leinemann M. A fast and quantitative detection method for nematodes in fish fillets and fishery products. Arch Lebensmittelhyg 1993;44:105–28.

[137] Berland B. Nematodes from some Norwegian marine fishes. Sarsia 1961;2:1–50.

[138] Mattiucci S, Cipriani P, Webb SC, Paoletti M, Marcer F, Bellisario B, et al. Genetic and morphological approaches distinguish the three sibling species of the *Anisakis simplex* species complex, with a species designation as *Anisakis berlandi* n. sp. for *A. simplex* sp. C (Nematoda: Anisakidae). J Parasitol 2014;100:199–214. doi:10.1645/12-120.1.

[139] Nadler SA, Hudspeth DS. Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) based on three genes and morphology: hypotheses of structural and sequence evolution. J Parasitol 2000;86:380–93. doi:10.1645/0022-3395(2000)086[0380:POTANA]2.0.CO;2.

[140] Reiczigel J, Rózsa L. Quantitative parasitology 2005.

[141] Bliss CI, Fisher RA. Fitting the negative binomial distribution to biological data. Biometrics 1953;9:176–200. doi:10.2307/3001850.

[142] Poulin R. The disparity between observed and uniform distributions: A new look at parasite aggregation. Int J Parasitol 1993;23:937–44. doi:10.1016/0020-7519(93)90060-C.

[143] Reiczigel J, Abonyi-Tóth Z, Singer J. An exact confidence set for two binomial proportions and exact unconditional confidence intervals for the difference and ratio of proportions. Comput Stat Data Anal 2008;52:5046–53. doi:10.1016/j.csda.2008.04.032.

[144] Underwood. Experiments in ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance. Cambridge University Press; 1997.

[145] Field A. Discovering statistics using SPSS for Windows: Advanced techniques for the beginner. Sage Publications; 2000.

[146] Llorens C, Arcos SC, Robertson L, Ramos R, Futami R, Soriano B, et al. Functional insights into the infective larval stage of *Anisakis simplex s.s.*, *Anisakis pegreffii* and their hybrids based on gene expression patterns. BMC Genomics 2018;19:592. doi:10.1186/s12864-018-4970-9.

[147] Cavallero S, Lombardo F, Su X, Salvemini M, Cantacessi C, D'Amelio S. Tissue-specific transcriptomes of *Anisakis simplex* (*sensu stricto*) and *Anisakis pegreffii* reveal potential molecular mechanisms involved in pathogenicity. Parasit Vectors 2018;11:31. doi:10.1186/s13071-017-2585-7.

[148] Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang Y-H, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. Nat Immunol 2005;6:1133–41. doi:10.1038/ni1261.

[149] Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. Annu Rev Immunol 2007;25:821–52. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141557.

[150] Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. Necrosis: A specific form of programmed cell death? Exp Cell Res 2003;283:1–16. doi:10.1016/S0014-4827(02)00027-7.

[151] Junqueira LC, Carneiro J. Basic histology: Text & atlas. McGraw-Hill, Medical Pub. Division; 2005.

[152] Abdel-Ghaffar F, Badr AM, Morsy K, Ebead S, El Deeb S, Al Quraishy S, et al. Cytokine signature and antibody-mediated response against fresh and attenuated *Anisakis simplex* (L3) administration into Wistar rats: implication for anti-allergic reaction. Parasitol Res 2015;114:2975–84. doi:10.1007/s00436-015-4500-5.

[153] Messina CM, Pizzo F, Santulli A, Bušelić I, Boban M, Orhanović S, et al. *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) products modulate oxidative stress and apoptosis-related biomarkers in human cell lines. Parasit Vectors 2016;9:607. doi:10.1186/s13071-016-1895-5.

[154] Murphy K, Weaver C. Janeway's Immunobiology. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC; 2017.

[155] Kang SA, Cho MK, Park M-K, Kim D-H, Hong YC, Lee YS, et al. Alteration of helper T-cell related cytokine production in splenocytes during *Trichinella spiralis* infection. Vet Parasitol 2012;186:319–27. doi:10.1016/J.VETPAR.2011.12.002.

[156] Katz M, Despommier DD, Gwadz R. Parasitic diseases. New York: Springer-Verlag; 1989.

[157] Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Innate immunity. Cell. Mol. Immunol. 9th Ed., Philadelphia: Elsevier; 2018, p. 57–97.

[158] Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. J Exp Med 2003;198:1951–7. doi:10.1084/jem.20030896.

[159] Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, Mckenzie B, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. J Clin Invest 2006;116:1310–6. doi:10.1172/JCI21404.

[160] Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, Kasman I, Eastham-Anderson J, Wu J, et al. Interleukin-22, a Th17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. Nature 2007;445:648–51. doi:10.1038/nature05505.

[161] Patel N, Kreider T, Urban JF, Gause WC. Characterisation of effector mechanisms at the host:parasite interface during the immune response to tissue-dwelling intestinal nematode parasites. Int J Parasitol 2009;39:13–21. doi:10.1016/j.ijpara.2008.08.003.

[162] Johansson ME V, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC, et al. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105:15064–9. doi:10.1073/pnas.0803124105.

[163] Swidsinski A, Weber J, Loening-baucke V, Hale LP, Lochs H. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. J Clin Microbiol 2005;43:3380–9. doi:10.1128/JCM.43.7.3380.

[164] Vaishnava S, Yamamoto M, Severson KM, Ruhn KA, Yu X, Koren O, et al. The antibacterial lectin RegIIIγ promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. Science (80-) 2011;334:255–8. doi:10.1126/science.1209791.

[165] Jin W, Dong C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. Emerg Microbes Infect 2013;2:e60–e60. doi:10.1038/emi.2013.58.

[166] Pathak M, Verma M, Srivastava M, Misra-Bhattacharya S. *Wolbachia* endosymbiont of *Brugia malayi* elicits a T helper type 17-mediated pro-inflammatory immune response through *Wolbachia* surface protein. Immunology 2015;144:231–44. doi:10.1111/imm.12364.

[167] Anuradha R, Munisankar S, Dolla C, Kumaran P, Nutman TB, Babu S. Parasite antigen-specific regulation of Th1, Th2, and Th17 responses in *Strongyloides stercoralis* infection. J Immunol 2015;195:2241–50. doi:10.4049/jimmunol.1500745.

[168] Bateman A, Martin MJ, O'Donovan C, Magrane M, Alpi E, Antunes R, et al. UniProt: the universal protein knowledgebase. Nucleic Acids Res 2017;45:D158–69. doi:10.1093/nar/gkw1099.

[169] Karadjian G, Fercoq F, Pionnier N, Vallarino-Lhermitte N, Lefoulon E, Nieguitsila A, et al. Migratory phase of *Litomosoides sigmodontis* filarial infective larvae is associated with pathology and transient increase of S100A9 expressing neutrophils in the lung. PLoS Negl Trop Dis 2017;11:e0005596. doi:10.1371/journal.pntd.0005596.

[170] Page-McCaw A. Remodeling the model organism: Matrix metalloproteinase functions in invertebrates. Semin Cell Dev Biol 2008;19:14–23. doi:10.1016/j.semcdb.2007.06.004.

[171] Parks WC, Parks WC, Wilson CL, Wilson CL, López-Boado YS, López-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. Nat Rev Immunol 2004;4:617–29. doi:10.1038/nri1418.

[172] Angele MK, Knöferl MW, Ayala A, Albina JE, Cioffi WG, Bland KI, et al. Trauma-hemorrhage delays wound healing potentially by increasing pro- inflammatory cytokines at the wound site. Surgery 1999;126:279–85. doi:10.1016/S0039-6060(99)70166-2.

[173] O'Connell EM, Nutman TB. Eosinophilia in infectious diseases. Immunol Allergy Clin North Am 2015;35:493–522. doi:10.1016/j.iac.2015.05.003.

[174] Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: The good, the bad and the ugly. Trends Cell Biol 2005;15:599–607. doi:10.1016/j.tcb.2005.09.002.

[175] Shirey KA, Pletneva LM, Puche AC, Keegan AD, Gregory A, Blanco JCG, et al. Control of RSV-induced lung injury by alternatively activated macrophages is IL-4Rα-, TLR4-, and IFN-β-dependent. Mucosal Immunol 2010;3:291–300. doi:10.1038/mi.2010.6.Control.

[176] Kinyanjui MW, Shan J, Nakada EM, Qureshi ST, Fixman ED. Dose-dependent effects of IL-17 on IL-13-induced airway inflammatory responses and airway hyperresponsiveness. J Immunol 2013;190:3859–68. doi:10.4049/jimmunol.1200506.

[177] Allen JE, Sutherland TE, Rückerl D. IL-17 and neutrophils: unexpected players in the type 2 immune response. Curr Opin Immunol 2015;34:99–106. doi:10.1016/J.COI.2015.03.001.

[178] Kruger P, Saffarzadeh M, Weber ANR, Rieber N, Radsak M, Von Bernuth H, et al. Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. PLoS Pathog 2015;11:e1004651. doi:10.1371/journal.ppat.1004651.

[179] Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. Arthritis Res 2002;4:S233. doi:10.1186/ar565.

[180] Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, et al. Transforming growth factor-β induces development of the Th17 lineage. Nature 2006;441:231–4. doi:10.1038/nature04754.

[181] Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFβ in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. Immunity 2006;24:179–89. doi:10.1016/J.IMMUNI.2006.01.001.

[182] Cho M-L, Kang J-W, Moon Y-M, Nam H-J, Jhun J-Y, Heo S-B, et al. STAT3 and NF-κB signal pathway is required for IL-23-mediated IL-17 production in spontaneous arthritis animal model IL-1 receptor antagonist-deficient mice. J Immunol 2006;176:5652–61. doi:10.4049/jimmunol.176.9.5652.

[183] Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ. Physiol Rev 2008;88:1379–406. doi:10.1152/physrev.90100.2007.

[184] Muñoz-Cánoves P, Scheele C, Pedersen BK, Serrano AL. Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: A double-edged sword? FEBS J 2013;280:4131–48. doi:10.1111/febs.12338.

[185] Zhou X, Liao WJ, Liao JM, Liao P, Lu H. Ribosomal proteins: Functions beyond the ribosome. J Mol Cell Biol 2015;7:92–104. doi:10.1093/jmcb/mjv014.

[186] Mirhashemi ME, Noubary F, Chapman-Bonofiglio S, Tzipori S, Huggins GS, Widmer G. Transcriptome analysis of pig intestinal cell monolayers infected with *Cryptosporidium parvum* asexual stages. Parasit Vectors 2018;11:176. doi:10.1186/s13071-018-2754-3.

[187] Zhang H-X, Liu Z-X, Sun Y-P, Zhu J, Lu S-Y, Liu X-S, et al. Rig-I regulates NF-κB activity through binding to *Nf-κb1* 3'-UTR mRNA. Proc Natl Acad Sci 2013;110:6459–64.

doi:10.1073/pnas.1304432110.

[188] Wan F, Weaver A, Gao X, Bern M, Hardwidge PR, Lenardo MJ. IKKβ 2 phosphorylation regulates RPS3 nuclear translocation and NF-κB function during infection with *Escherichia coli* strain O157:H7. Nat Immunol 2011;12:335–44. doi:10.1038/ni.2007.

[189] Lv J, Huang XR, Klug J, Ohlich SF, Lacher P, Xu A, et al. Ribosomal protein S19 is a novel therapeutic agent in inflammatory kidney disease. Clin Sci 2013;124:627–37. doi:10.1042/CS20120526.

[190] Filip AM, Klug J, Cayli S, Fröhlich S, Henke T, Lacher P, et al. Ribosomal protein S19 interacts with macrophage migration inhibitory factor and attenuates its pro-inflammatory function. J Biol Chem 2009;284:7977–85. doi:10.1074/jbc.M808620200.

[191] Beyer AR, Bann D V., Rice B, Pultz IS, Kane M, Goff SP, et al. Nucleolar trafficking of the mouse mammary tumor virus Gag protein induced by interaction with ribosomal protein L9. J Virol 2013;87:1069–82. doi:10.1128/JVI.02463-12.

[192] Huang JY, Su WC, Jeng KS, Chang TH, Lai MMC. Attenuation of 40S ribosomal subunit abundance differentially affects host and HCV translation and suppresses HCV replication. PLoS Pathog 2012;8. doi:10.1371/journal.ppat.1002766.

[193] Green L, Houck-Loomis B, Yueh A, Goff SP. Large ribosomal protein 4 increases efficiency of viral recoding sequences. J Virol 2012;86:8949–58. doi:10.1128/JVI.01053-12.

[194] Piras MC, Tedde T, Garippa G, Virgilio S, Sanna D, Farjallah S, et al. Molecular and epidemiological data on *Anisakis* spp. (Nematoda: Anisakidae) in commercial fish caught off northern Sardinia (western Mediterranean Sea). Vet Parasitol 2014;203:237–40. doi:10.1016/j.vetpar.2014.02.003.

[195] Valero A, Martín-Sánchez J, Reyes-Muelas E, Adroher FJ. Larval anisakids parasitizing the

blue whiting, *Micromesistius poutassou*, from Motril Bay in the Mediterranean region of southern Spain. J Helminthol 2000;74:361–4. doi:10.1017/S0022149X00000536.

[196] Zorica B, Čikeš Keč V, Vidjak O, Mladineo I, Ezgeta Balić D. Feeding habits and helminth parasites of sardine (*S. pilchardus*) and anchovy (*E. encrasicolus*) in the Adriatic Sea. Mediterr Mar Sci 2016;17:216–29.

[197] Klimpel S, Palm HW, Rückert S, Piatkowski U. The life cycle of *Anisakis simplex* in the Norwegian Deep (northern North Sea). Parasitol Res 2004;94:1–9. doi:10.1007/s00436-004-1154-0.

[198] Cipriani P, Acerra V, Bellisario B, Sbaraglia GL, Cheleschi R, Nascetti G, et al. Larval migration of the zoonotic parasite *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in European anchovy, *Engraulis encrasicolus*: Implications to seafood safety. Food Control 2016;59:148–57. doi:10.1016/j.foodcont.2015.04.043.

[199] Šimat V, Miletić J, Bogdanović T, Poljak V, Mladineo I. Role of biogenic amines in the post-mortem migration of *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae Dujardin, 1845) larvae into fish fillets. Int J Food Microbiol 2015;214:179–86. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.008.

[200] Sánchez-Monsalvez I, De Armas-Serra C, Martínez J, Dorado M, Sánchez A, Rodríguez-Caabeiro F. A new procedure for marinating fresh anchovies and ensuring the rapid destruction of *Anisakis* larvae. J Food Prot 2005;68:1066–72.

[201] Angelucci G, Meloni M, Merella P, Sardu F, Madeddu S, Marrosu R, et al. Prevalence of *Anisakis* spp. and *Hysterothylacium* spp. larvae in teleosts and cephalopods sampled from waters off Sardinia. J Food Prot 2011;74:1769–75. doi:10.4315/0362-028X.JFP-10-482.

[202] Rello FJ, Adroher FJ, Valero A. *Hysterothylacium aduncum*, the only anisakid parasite of sardines (*Sardina pilchardus*) from the southern and eastern coasts of Spain. Parasitol Res 2008;104:117–21. doi:10.1007/s00436-008-1168-0.

[203] González L, Carvajal J. New host records of larval *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae) in fauna associated with salmonid sea farms in Chile. Res Rev Parasit 1995;55:247– 253.

[204] Bao M, Pierce GJ, Strachan NJC, Martínez C, Fernández R, Theodossiou I. Consumers' attitudes and willingness to pay for *Anisakis*-free fish in Spain. Fish Res 2018;202:149–60. doi:10.1016/j.fishres.2017.06.018.

[205] Gómez-Morales MA, Castro CM, Lalle M, Fernández R, Pezzotti P, Abollo E, et al. UV-press method versus artificial digestion method to detect Anisakidae L3 in fish fillets: Comparative study and suitability for the industry. Fish Res 2018;202:22–8. doi:10.1016/j.fishres.2016.12.011.

[206] EC RASFF. The Rapid Alert System for Food and Feed—Annual Report. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg. 2010. doi:10.2772/59932.

[207] Mladineo I, Šimat V, Miletić J, Beck R, Poljak V. Molecular identification and population dynamic of *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae Dujardin, 1845) isolated from the European anchovy (*Engraulis encrasicolus* L.) in the Adriatic Sea. Int J Food Microbiol 2012;157:224–9. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.005.

[208] Guardone L, Nucera D, Lodola LB, Tinacci L, Acutis PL, Guidi A, et al. *Anisakis* spp. larvae in different kinds of ready to eat products made of anchovies (*Engraulis encrasicolus*) sold in Italian supermarkets. Int J Food Microbiol 2018;268:10–8. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.030.

[209] Guardone L, Armani A, Nucera D, Costanzo F, Mattiucci S, Bruschi F. Human anisakiasis in Italy: a retrospective epidemiological study over two decades. Parasite 2018;25:41. doi:10.1051/parasite/2018034.

[210] Voelkerding K V., Dames SA, Durtschi JD. Next-generation sequencing:from basic research to diagnostics. Clin Chem 2009;55:641–58. doi:10.1373/clinchem.2008.112789.

10. Dodatni materijal

Dodatna tablica 10.1 Prvih 50 značajno obogaćenih (FDR < 0,05) termina genske ontologije (GO) povezanih s diferencijalno izraženim genima u tkivima želuca štakora inficiranih ličinkama oblića *A. pegreffii.* Za svaki GO pojam prikazana je domena (biološki proces (BP), stanične komponente (CC) ili molekularna funkcija (MF)), broj gena koji su uključeni u GO pojam, broj gena povišene regulacije u ovoj disertaciji koji su uključeni u GO pojam, *p* vrijednost i FDR.

	Termini genske ontologije (GO)	Domena	Broj gena u GO terminu	Broj gena povišene regulacije	*p* vrijednost	FDR
1	odgovor na stres	BP	2568	33	4,68E-16	8,85E-12
2	obrambeni odgovor	BP	826	22	8,49E-16	8,85E-12
3	upalni odgovor	BP	417	17	5,30E-15	3,69E-11
4	odgovor na citokine	BP	670	19	5,89E-14	3,07E-10
5	kemotaksija neutrofila	BP	61	9	3,02E-13	1,11E-09
6	kompleks hemoglobina	CC	5	5	3,18E-13	1,11E-09
7	aktivnost kemokina	MF	24	7	8,80E-13	2,36E-09
8	stanični odgovor na podražaj citokinima	BP	571	17	9,05E-13	2,36E-09
9	migracija neutrofila	BP	73	9	1,64E-12	3,80E-09
10	aktivnost citokina	MF	75	9	2,11E-12	4,41E-09
11	kemotaksija granulocita	BP	76	9	2,39E-12	4,53E-09
12	vezanje kemokinskog receptora	MF	32	7	8,39E-12	1,44E-08
13	imunosni odgovor	BP	772	18	9,54E-12	1,44E-08
14	receptor-ligand aktivnost	MF	179	11	9,77E-12	1,44E-08
15	migracija granulocita	BP	89	9	1,03E-11	1,44E-08
16	aktivnost nosača kisika	MF	8	5	1,77E-11	2,17E-08
17	prijenos kisika	BP	8	5	1,77E-11	2,17E-08
18	odgovor na bakterije	BP	402	14	1,98E-11	2,26E-08
19	signalni put posredovan kemokinima	BP	36	7	2,06E-11	2,26E-08
20	odgovor na vanjski podražaj	BP	1537	23	3,02E-11	3,14E-08
21	aktivnost regulatora receptora	MF	206	11	4,49E-11	4,46E-08
22	izvanstanična regija	CC	2769	29	6,22E-11	5,74E-08

23	reakcija na spoj koji sadrži kisik	BP	1430	22	6,33E-11	5,74E-08
24	proces imunosnog sustava	BP	1462	22	9,81E-11	8,52E-08
25	proces višestrukih organizama	BP	1352	21	1,90E-10	1,58E-07
26	migracija mijeloidnih leukocita	BP	126	9	2,46E-10	1,91E-07
27	transport plina	BP	12	5	2,48E-10	1,91E-07
28	odgovor na drugi organizam	BP	597	15	3,18E-10	2,34E-07
29	odgovor na vanjski biotički podražaj	BP	598	15	3,26E-10	2,34E-07
30	regulacija aktivnosti receptora	BP	258	11	5,02E-10	3,49E-07
31	odgovor na biotički podražaj	BP	621	15	5,51E-10	3,62E-07
32	kemotaksija leukocita	BP	138	9	5,56E-10	3,62E-07
33	zacjeljivanje rana	BP	338	12	5,84E-10	3,69E-07
34	stanični odgovor na interleukin-1	BP	93	8	6,09E-10	3,71E-07
35	vezanje kisika	MF	14	5	6,24E-10	3,71E-07
36	aktivnost molekularnog nosača	MF	15	5	9,33E-10	5,40E-07
37	pozitivna regulacija kemotaksije leukocita	BP	68	7	2,22E-09	1,25E-06
38	urođeni imunosni odgovor	BP	382	12	2,35E-09	1,28E-06
39	odgovor na lipopolisaharid	BP	299	11	2,39E-09	1,28E-06
40	odgovor na molekule bakterijskog podrijetla	BP	314	11	3,99E-09	2,08E-06
41	odgovor na interleukin-1	BP	118	8	4,12E-09	2,09E-06
42	odgovor na organsku tvar	BP	2366	25	4,56E-09	2,27E-06
43	dio izvanstanične regije	CC	2636	26	7,42E-09	3,60E-06
44	kemotaksija stanica	BP	187	9	8,19E-09	3,88E-06
45	regulacija kemotaksije leukocita	BP	83	7	9,15E-09	4,24E-06
46	pozitivna regulacija odgovora na vanjske podražaje	BP	195	9	1,18E-08	5,35E-06
47	odgovor na kemikalije	BP	2945	27	1,44E-08	6,38E-06
48	odgovor na ranjavanje	BP	453	12	1,60E-08	6,93E-06
49	izvanstanični prostor	CC	2514	25	1,67E-08	7,11E-06
50	vezanje citokinskog receptora	MF	147	8	2,34E-08	9,75E-06

Dodatna tablica 10.2 Prvih 50 značajno obogaćenih (FDR < 0,05) termina genske ontologije (GO) povezanih s diferencijalno izraženim genima u mišićnim tkivima štakora inficiranih ličinkama oblića *A. pegreffii*. Za svaki GO pojam prikazana je domena [biološki proces (BP), stanične komponente (CC) ili molekularna funkcija (MF)], broj gena koji su uključeni u GO pojam, broj gena povišene regulacije u ovoj disertaciji koji su uključeni u GO pojam, *p* vrijednost i FDR.

	Termini genske ontologije	Domena	Broj gena u GO terminu	Broj gena povišene regulacije	*p* vrijednost	FDR
1	obrambeni odgovor	BP	798	46	4,02E-25	8,25E-21
2	upalni odgovor	BP	404	34	2,01E-23	2,06E-19
3	odgovor na vanjski podražaj	BP	1494	57	8,99E-23	6,15E-19
4	migracija neutrofila	BP	72	18	2,89E-21	1,22E-17
5	migracija granulocita	BP	86	19	2,98E-21	1,22E-17
6	kemotaksija granulocita	BP	75	17	2,53E-19	8,59E-16
7	kemotaksija neutrofila	BP	62	16	2,93E-19	8,59E-16
8	odgovor na bakterije	BP	402	30	3,91E-19	1,00E-15
9	proces imunosnog sustava	BP	1426	51	9,50E-19	2,16E-15
10	migracija mijeloidnih leukocita	BP	123	19	3,88E-18	7,65E-15
11	odgovor na vanjski biotički podražaj	BP	596	34	4,48E-18	7,65E-15
12	odgovor na drugi organizam	BP	596	34	4,48E-18	7,65E-15
13	odgovor na biotički podražaj	BP	618	34	1,35E-17	2,13E-14
14	imunosni odgovor	BP	757	36	1,28E-16	1,88E-13
15	pozitivna regulacija procesa imunosnog sustava	BP	568	31	6,37E-16	8,34E-13
16	odgovor na lipopolisaharid	BP	303	24	6,54E-16	8,34E-13
17	kemotaksija leukocita	BP	138	18	7,29E-16	8,34E-13
18	migracija leukocita	BP	213	21	7,32E-16	8,34E-13
19	pozitivna regulacija odgovora na vanjske podražaje	BP	191	20	1,15E-15	1,25E-12
20	odgovor na molekule bakterijskog podrijetla	BP	316	24	1,64E-15	1,68E-12
21	odgovor na stres	BP	2460	61	3,91E-15	3,82E-12
22	regulacija odgovora na vanjski podražaj	BP	479	27	3,45E-14	3,21E-11
23	kemotaksija stanica	BP	185	18	1,20E-13	1,07E-10

24	odgovor na podražaj	BP	5072	86	2,26E-13	1,93E-10
25	regulacija procesa imunosnog sustava	BP	813	33	3,00E-13	2,46E-10
26	pozitivna regulacija migracije leukocita	BP	97	14	3,65E-13	2,88E-10
27	odgovor na lipid	BP	851	33	1,15E-12	8,76E-10
28	regulacija migracije leukocita	BP	131	15	1,57E-12	1,15E-09
29	migracija stanica	BP	919	34	1,71E-12	1,21E-09
30	aktivnost citokina	MF	72	12	3,14E-12	2,14E-09
31	regulacija migracije neutrofila	BP	33	9	3,57E-12	2,36E-09
32	pozitivna regulacija stanične migracije	BP	368	22	4,00E-12	2,56E-09
33	pozitivna regulacija odgovora na podražaj	BP	1377	41	4,43E-12	2,75E-09
34	kemotaksije	BP	334	21	4,98E-12	3,01E-09
35	taksije	BP	336	21	5,54E-12	3,25E-09
36	pozitivna regulacija pokretljivosti stanica	BP	376	22	6,07E-12	3,46E-09
37	regulacija upalnog odgovora	BP	204	17	6,75E-12	3,74E-09
38	regulacija obrambenog odgovora	BP	385	22	7,92E-12	4,28E-09
39	pokretljivost stanica	BP	974	34	8,68E-12	4,45E-09
40	lokalizacija stanica	BP	974	34	8,68E-12	4,45E-09
41	kretanje	BP	1094	36	9,79E-12	4,90E-09
42	pozitivna regulacija kretanja stanične komponente	BP	387	22	1,09E-11	5,31E-09
43	reakcija na spoj koji sadrži kisik	BP	1363	40	1,57E-11	7,39E-09
44	proces višestrukih organizama	BP	1298	39	1,58E-11	7,39E-09
45	pozitivna regulacija kretanja	BP	397	22	1,76E-11	8,02E-09
46	akutni upalni odgovor	BP	84	12	1,84E-11	8,19E-09
47	regulacija izlučivanja	BP	497	24	3,08E-11	1,34E-08
48	regulacija kemotaksije granulocita	BP	37	9	3,72E-11	1,59E-08
49	regulacija lokalizacije	BP	1889	47	4,10E-11	1,72E-08
50	pozitivna regulacija migracije neutrofila	BP	27	8	1,02E-10	4,20E-08

Dodatna tablica 10.3 Značajno regulirani KEGG metabolički i signalni putevi te putevi povezani s bolestima u tkivima želuca inficiranim ličinkama oblića *A. pegreffii*, prema rezultatima GAGE analize ($q < 0,1$). Putevi koji nisu u suvišku (nisu pokazali veliko preklapanje u popisu efektivnih gena) prikazani su podebljanim slovima. Za svaki signalni put naveden je tip, tkivo, smjer regulacije, identifikacija (ID), statistička srednja vrijednost i *q* vrijednost.

Tip puteva	Tkivo	Smjer regulacije	ID puteva	Stat. srednjak	*q* vrijednost
Signalni i metabolički putevi	**Želudac**	**Povišena**	**rno03010 Ribosom**	5,774	3,90E-06
			rno04610 Komplement i koagulacijske kaskade	4,121	0,003
			rno04060 Interakcija citokina i citokinskih receptora	3,989	0,003
			rno04657 IL17 signalni put	4,085	0,003
			rno04640 Hematopoetska stanična linija	3,865	0,005
			rno03030 Replikacija DNA	3,738	0,007
			rno04062 Kemokinski signalni put	3,567	0,007
			rno04110 Stanični ciklus	3,524	0,007
			rno04668 TNF signalni put	3,547	0,007
			rno04380 Diferencijacija osteoklasta	3,390	0,009
			fno04145 Fagosom	3,068	0,024
			rno03050 Proteasom	3,053	0,032
			rno04115 p53 signalni put	2,955	0,032
			rno04064 NF-κB signalni put	2,813	0,045
			rno00590 Metabolizam arahidonske kiseline	2,729	0,061
			rno04621 NLR (prema engl. *Nod-like receptor*) signalni put	2,639	0,062
Signalni i metabolički putevi	**Želudac**	**Povišena i snižena**	**rno04060 Interakcija citokina i citokinskih receptora**	4,171	0,005
			rno04610 Komplement i koagulacijske kaskade	3,752	0,017
			rno04657 IL17 signalni put	3,662	0,017
			rno04640 Hematopoetska stanična linija	3,334	0,034
			rno04080 Interakcija neuroaktivnog liganda i receptora	3,016	0,064
Putevi povezani s bolestima	**Želudac**	**Povišena**	**rno05150 Infekcija bakterijom *Staphylococcus aureus***	4,814	0,000
			rno05152 Tuberkuloza	3,623	0,007
			rno05144 Malarija	3,666	0,008

			rno05140 Lišmanioza	3,459	0,008
			Rno05132 Infekcija bakterijom *Salmonella*	3,057	0,019
			rno05322 Sistemski eritemski lupus	3,082	0,019
			rno05143 Afrička tripanosomijaza	3,120	0,023
			rno05323 Reumatoidni artritis	2,886	0,024
			rno05133 Pertusis	2,796	0,026
			rno05167 Infekcija *Herpes* virusom povezana s Kaposijevim sarkomom	2,679	0,028
			rno05134 Legioneloza	2,746	0,028
			rno05321 Upalna bolest crijeva (IBD)	2,610	0,035
			rno05164 Virus gripe A	2,397	0,050
			rno05142 Chagasova bolest (američka tripanosomijaza)	2,358	0,051
			rno05166 HTLV-I infekcija	2,331	0,051
			rno05168 Infekcija virusom *Herpes simplex*	2,196	0,068
			rno05169 Infekcija virusom Epstein-Barr	2,144	0,072
			rno05332 Bolest odbacivanja transplantata	2,151	0,078
			rno05145 Toksoplazmoza	2,037	0,085
Putevi povezani s bolestima	**Želudac**	**Povišena i snižena**	**rno05150 Infekcija bakterijom *Staphylococcus aureus***	3,539	0,024
			rno05144 Malarija	3,508	0,024
			rno05323 Reumatoidni artritis	2,860	0,070
			rno05143 Afrička tripanosomijaza	2,815	0,087

Dodatna tablica 10.4 Značajno regulirani KEGG metabolički i signalni putevi te putevi povezani s bolestima u mišićnim tkivima inficiranim ličinkama oblića *A. pegreffii*, prema rezultatima GAGE analize ($q < 0,1$). Putevi koji nisu u suvišku (nisu pokazali veliko preklapanje u popisu efektivnih gena) prikazani su podebljanim slovima. Za svaki signalni put naveden je tip, tkivo, smjer regulacije, identifikacija (ID), statistička srednja vrijednost i *q* vrijednost.

Tip puteva	Tkivo	Smjer regulacije	ID puteva	Stat. srednjak	*q* vrijednost
Signalni i metabolički putevi	**Mišić**	**Povišena**	**rno04060 Interakcija citokina i citokinskih receptora**	6,570	4,29E-08
			rno04062 Kemokinski signalni put	5,521	3,89E-06
			rno04514 CAMs (prema engl. *Cell adhesion molecules*)	5,541	3,89E-06
			fno04145 Fagosom	4,923	4,51E-05
			rno04640 Hematopoetska stanična linija	4,849	1,25E-04
			rno04610 Komplement i koagulacijske kaskade	4,583	3,32E-04
			rno04657 IL17 signalni put	4,484	3,32E-04
			rno04380 Diferencijacija osteoklasta	4,334	3,32E-04
			rno04668 TNF signalni put	3,945	0,001
			rno04670 Migracija leukocita između endotela	3,880	0,002
			rno04015 Rap1 signalni put	3,719	0,002
			rno04621 NLR (prema engl. *Nod-like receptor*) signalni put	3,740	0,002
			rno04080 Interakcija neuroaktivnog liganda i receptora	3,689	0,003
			rno04064 NF-κB signalni put	3,651	0,003
			rno04151 PI3K-Akt signalni put	3,465	0,004
			rno04620 TLR (prema engl. *Toll-like receptor*) signalni put	3,507	0,004
			rno04666 Fc gamma R-posredovana fagocitoza	3,403	0,005
			rno04612 Procesiranje i prezentacija antigena	3,439	0,005
			rno04630 Jak-STAT signalni put	3,394	0,005
			rno04650 Citotoksičnost posredovana stanicama NK (prema engl. *Natural killer*)	3,001	0,018
			rno04810 Regulacija aktinskog citoskeleta	2,884	0,022
			rno00100 Biosinteza steroida	2,921	0,034
			rno00260 Metabolizam glicina, serina i treonina	2,745	0,039
			rno00140 Biosinteza steroidnih hormona	2,732	0,049
			rno04512 Interakcija ECM i receptora	2,565	0,051

			rno04974 Probava i apsorpcija proteina	2,544	0,051
			rno00790 Biosinteza folata	2,633	0,051
			rno04672 Intestinalna imunosna mreža za proizvodnju IgA	2,518	0,062
			rno04510 Fokalna adhezija	2,335	0,075
			rno04978 Mineralna apsorpcija	2,360	0,077
			rno04662 Signalni put receptora stanica B	2,243	0,093
			rno00830 Metabolizam retinola	2,300	0,093
			rno04611 Aktivacija trombocita	2,200	0,096
Signalni i metabolički putevi	**Mišić**	**Snižena**	**rno00190 Oksidativna fosforilacija**	-4,230	0,004
			rno04120 Proteoliza posredovana ubikvitinom	-3,656	0,018
Signalni i metabolički putevi	**Mišić**	**Povišena i snižena**	**rno04060 Interakcija citokina i citokinskih receptora**	5,914	0,000
			rno04610 Komplement i koagulacijske kaskade	4,832	0,000
			rno04062 Kemokinski signalni put	4,574	0,000
			rno04514 CAMs (prema engl. *Cell adhesion molecules*)	4,507	0,000
			rno04657 IL17 signalni put	4,349	0,001
			rno04380 Diferencijacija osteoklasta	4,081	0,001
			fno04145 Fagosom	3,743	0,004
			rno04640 Hematopoetska stanična linija	3,739	0,005
			rno04080 Interakcija neuroaktivnog liganda i receptora	3,597	0,006
			rno04621 NLR (prema engl. *Nod-like receptor*) signalni put	3,475	0,007
			rno04668 TNF signalni put	3,392	0,009
			rno04670 Migracija leukocita između endotela	3,195	0,015
			rno04620 TLR (prema engl. *Toll-like receptor*) signalni put	2,876	0,040
			rno04650 Citotoksičnost posredovana stanicama NK (prema engl. *Natural killer*)	2,825	0,043
			rno04151 PI3K-Akt signalni put	2,752	0,044
			rno04064 NF-κB signalni put	2,753	0,046
			rno04015 Rap1 signalni put	2,702	0,046
			rno04611 Aktivacija trombocita	2,674	0,049
			rno03320 PPAR signalni put	2,610	0,058
			rno04630 Jak-STAT signalni put	2,578	0,058
			rno01230 Biosinteza aminokiselina	2,584	0,058

			rno00260 Metabolizam glicina, serina i treonina	2,553	0,068
			rno04923 Regulacija lipolize u adipocitima	2,494	0,069
			rno04974 Probava i apsorpcija proteina	2,467	0,069
			rno04672 Intestinalna imunosna mreža za proizvodnju IgA	2,432	0,086
			rno04666 Fc gama R-posredovana fagocitoza	2,334	0,087
			rno04020 Signalni put kalcija	2,283	0,090
			rno00100 Biosinteza steroida	2,405	0,090
			rno04659 Diferencijacija stanica Th17	2,280	0,090
Putevi povezani s bolestima	**Mišić**	**Povišena**	**rno05150 Infekcija bakterijom *Staphylococcus aureus***	6,255	0,000
			rno05144 Malarija	5,464	0,000
			rno05152 Tuberkuloza	4,661	0,000
			rno05133 Pertusis	4,337	0,000
			rno05140 Lišmanioza	4,143	0,001
			rno05323 Reumatoidni artritis	4,139	0,001
			rno05167 Infekcija *Herpes* virusom povezana s Kaposijevim sarkomom	3,904	0,001
			rno05332 Bolest odbacivanja transplantata	3,830	0,002
			rno05320 Autoimuna bolest štitnjače	3,670	0,002
			rno05330 Odbacivanje transplantata	3,672	0,002
			rno05164 Virus gripe A	3,432	0,002
			rno05143 Afrička tripanosomijaza	3,476	0,004
			rno05142 Chagasova bolest (američka tripanosomijaza)	3,169	0,005
			rno04940 Dijabetes tip I	3,269	0,005
			Rno05132 Infekcija bakterijom *Salmonella*	3,169	0,005
			rno05168 Infekcija virusom *Herpes simplex*	2,965	0,008
			rno05146 Amebijaza	2,945	0,008
			rno05321 Upalna bolest crijeva (IBD)	2,993	0,008
			rno05134 Legioneloza	2,972	0,008
			rno05418 Razvoj ateroskleroze	2,853	0,009
			rno05162 Ospice	2,680	0,014
			rno04933 AGE-RAGE signalni put u dijabetičkim komplikacijama	2,629	0,016
			rno05310 Astma	2,827	0,017

			rno05416 Virusni miokarditis	2,574	0,018
			rno05322 Sistemski eritemski lupus	2,550	0,019
			rno05145 Toksoplazmoza	2,443	0,022
			rno05340 Primarna imunodeficijencija	2,553	0,022
			rno05202 Transkripcijske pogreške regulacije u raku	2,241	0,034
			rno05200 Putevi u raku	2,212	0,035
			rno05204 Kemijska karcinogeneza	2,123	0,047
			rno05205 Proteoglikani u raku	1,762	0,094
			rno05160 Hepatitis C	1,754	0,094
			Rno01523 Otpornost na antifolate	1,748	0,099
			rno05166 HTLV-I infekcija	1,697	0,099
Putevi povezani s bolestima	**Mišić**	**Snižena**	**rno05012 Parkinsonova bolest**	-3,444	0,026
			rno05016 Huntingtonova bolest	-2,954	0,063
Putevi povezani s bolestima	**Mišić**	**Povišena i snižena**	**rno05150 Infekcija bakterijom *Staphylococcus aureus***	5,362	0,000
			rno05144 Malarija	5,223	0,000
			rno05152 Tuberkuloza	3,786	0,002
			rno05323 Reumatoidni artritis	3,881	0,002
			rno05140 Lišmanioza	3,850	0,002
			rno05133 Pertusis	3,620	0,003
			rno05143 Afrička tripanosomijaza	3,408	0,009
			rno05146 Amebijaza	3,168	0,009
			rno05416 Virusni miokarditis	3,025	0,013
			rno05167 Infekcija *Herpes* virusom povezana s Kaposijevim sarkomom	2,887	0,015
			rno05321 Upalna bolest crijeva (IBD)	2,955	0,015
			rno05134 Legioneloza	2,898	0,016
			Rno05132 Infekcija bakterijom *Salmonella*	2,818	0,016
			rno05202 Transkripcijske pogreške regulacije u raku	2,592	0,024
			rno05332 Bolest odbacivanja transplantata	2,703	0,024
			rno05142 Chagasova bolest (američka tripanosomijaza)	2,595	0,024
			rno05164 Virus gripe A	2,569	0,024
			rno04933 AGE-RAGE signalni put u dijabetičkim komplikacijama	2,463	0,030

rno05418 Razvoj ateroskleroze	2,419	0,032
rno05032 Ovisnost o morfiju	2,384	0,035
rno05320 Autoimuna bolest štitnjače	2,384	0,037
rno05330 Odbacivanje transplantata	2,253	0,049
rno05340 Primarna imunodeficijencija	2,256	0,052
rno04940 Dijabetes tip I	2,185	0,052
rno05322 Sistemski eritemski lupus	2,077	0,061
rno05205 Proteoglikani u raku	2,026	0,062
rno05162 Ospice	1,985	0,066
rno04931 Inzulinska rezistencija	1,977	0,066
rno05200 Putevi u raku	1,931	0,067
rno05310 Astma	2,064	0,067
rno05145 Toksoplazmoza	1,886	0,071
rno05204 Kemijska karcinogeneza	1,908	0,071
rno05168 Infekcija virusom *Herpes simplex*	1,793	0,083

Dodatna tablica 10.5 Sažeti rezultati trofaktorijalne (Jadransko more) i dvofaktorijalne (zapadno Sredozemno more) ANCOVA analize varijabilnosti infekcije oblićem *Anisakis pegreffii* prema lokalizaciji u fileima (dorzalni i ventralni dijelovi) domaćina (*Sardina pilchardus*), uzimajući u obzir prostorno-vremenski učinak i duljinu tijela domaćina kao kovarijablu.

Izvor varijacije	**Jadransko more**			**zapadno Sredozemno more**		
	df	**MS**	F	**df**	**MS**	F
Duljina tijela ribe	1	0,043	31,212*	1	0,002	0,456
Lokalizacija unutar ribe	1	0,002	1,379	1	0,012	3,475
Godina	1	0,003	2,052	/	/	/
Postaja uzorkovanja	1	0,020	14,605*	2	0,014	3,926
Dorzalni_ventralni d. × godina	1	0,001	0,820	/	/	/
Dorzalni_ventralni d. × postaja uzorkovanja	1	0,000025	0,018	2	0,018	5,038*
Godina × postaja uzorkovanja	1	0,002	1,424	/	/	/
Dorzalni_ventralni d. × godina × postaja uzorkovanja	1	0,000025	0,018	/	/	/
Ostatak	7263			5247		

df – stupnjevi slobode, MS – prosječna suma kvadrata, F – F vrijednost, *statistički značajna razlika na razini $p < 0,01$.

Dodatna tablica 10.6 Sažeti rezultati trofaktorijalne (Jadransko more) i dvofaktorijalne (zapadno Sredozemno more) ANCOVA analize varijabilnosti infekcije oblićem *Anisakis pegreffii* prema lokalizaciji u fileima (lijevi i desni file) domaćina (*Sardina pilchardus*), uzimajući u obzir prostorno-vremenski učinak i duljinu tijela domaćina kao kovarijablu.

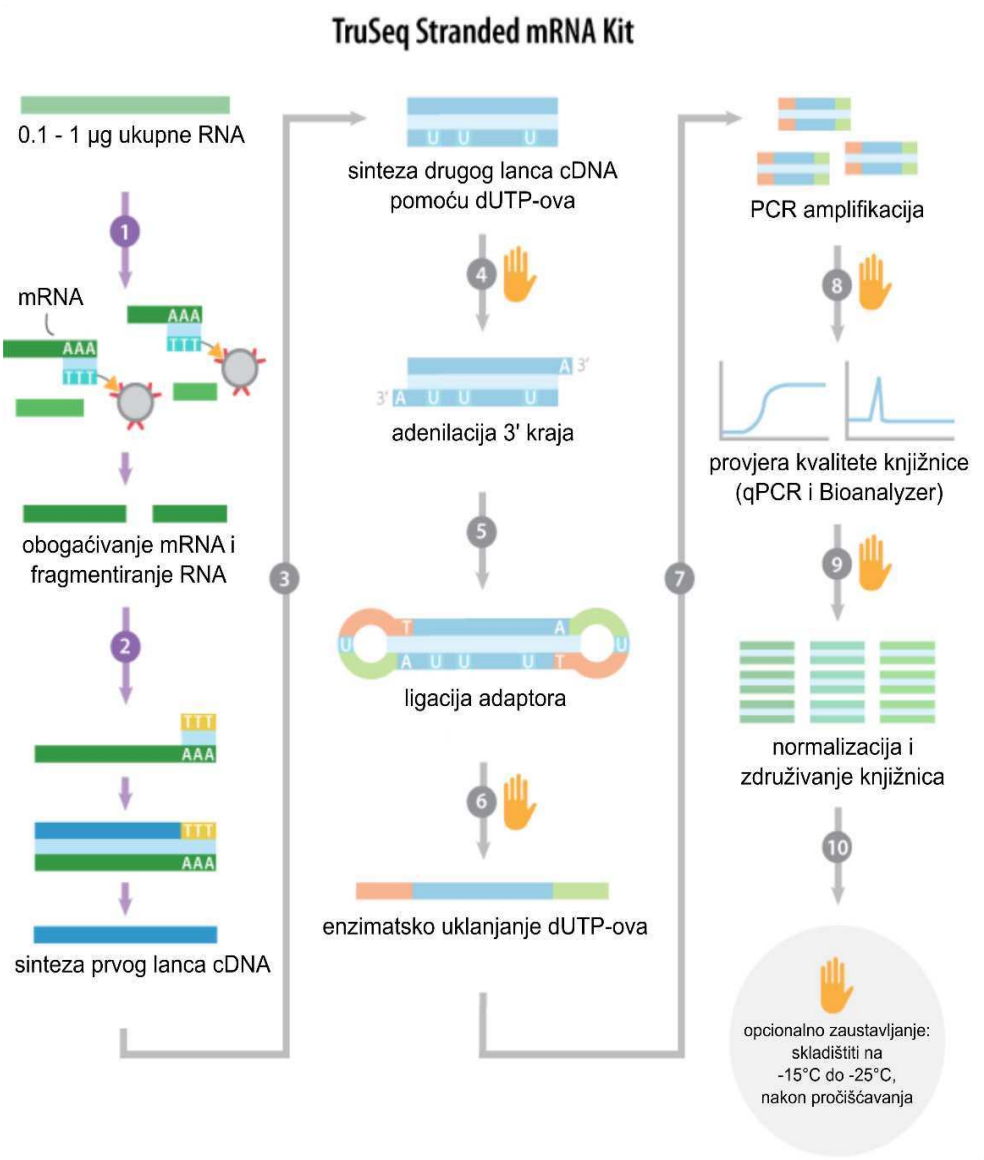
Izvor varijacije	**Jadransko more**			**zapadno Sredozemno more**		
	df	**MS**	**F**	**df**	**MS**	**F**
Duljina tijela ribe	1	0,043	31,212*	1	0,002	0,454
Lokalizacija unutar ribe	1	0,002	1,379	1	0,003	0,754
Godina	1	0,003	2,052	/	/	/
Postaja uzorkovanja	1	0,020	14,605*	2	0,014	3,913
Lijevi_Desni f. × godina	1	0,001	0,820	/	/	/
Lijevi_Desni f. × postaja uzorkovanja	1	0,000025	0,018	2	0,004	1,094
Godina × postaja uzorkovanja	1	0,002	1,424	/	/	/
Lijevi_Desni f. × godina × postaja uzorkovanja	1	0,000025	0,018	/	/	/
Ostatak	7263					

df – stupnjevi slobode, MS – prosječna suma kvadrata, F – F vrijednost, *statistički značajna razlika na razini $p < 0,01$.

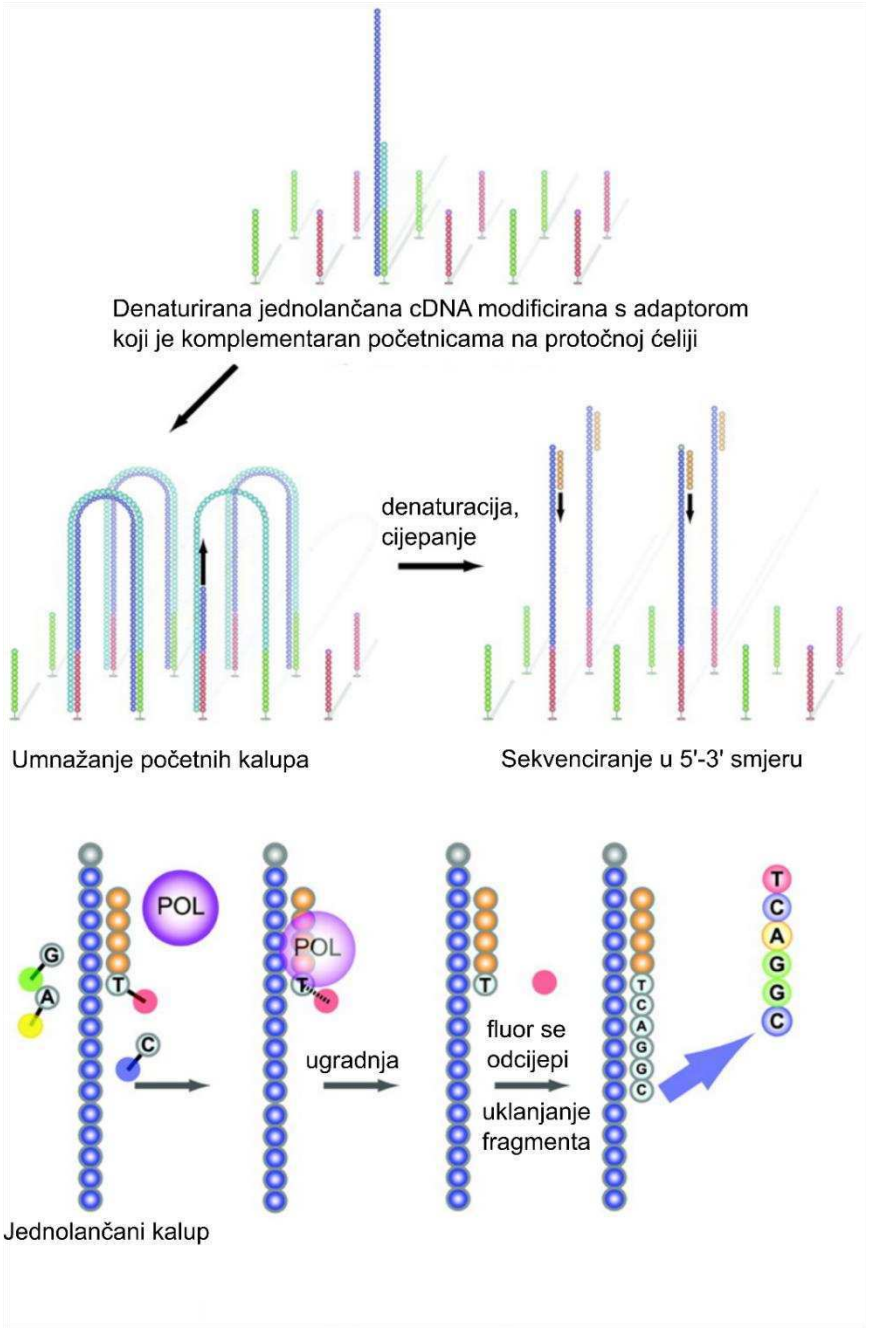
Dodatna tablica 10.7 Srednja ukupna duljina domaćina (TL) sa standardnom devijacijom (SD), ukupna prosječna prevalencija (%) sa Sternovim točnim (ili prilagođenim Waldovim za N > 1000) 95% intervalom pouzdanosti (CI), prosječni intenzitet (I), prosječna abundancija (A) s *bootstrap* 95% CI, omjerom varijance i srednjaka (v/m), indeksom nepodudarnosti (D) i eksponentom negativne binomnijalne raspodjele (k) nametnika *Hysterothylacium* sp. za svaku postaju uzorkovanja, odnosno podregiju za Jadransko more i ukupnog uzorka srdele *Sardina pilchardus* iz Sredozemnog mora, u razdoblju od 2013. do 2015. godine.

Varijabla	**Prosječna TL ± SD (mm)**	**Prevalencija (%) (95% CI)**	**Prosječni I (95% CI)**	**Prosječna A (95% CI)**	**v/m**	**D**	**k**
MA 2013 (N = 234)	133,66 ± 6,97	1,3 (0,4 – 3,8)	2,0 (1,0 – 2,7)	0,03 (0,00 – 0,07)	2,32	0,986	/
MA 2014 (N = 453)	134,62 ± 6,05	57,4 (52,8 – 61,9)	2,2 (2,0 – 2,6)	1,27 (1,10 – 1,51)	3,85	0,650	0,916
MA ukupno (N = 687)	134,29 ± 6,39	38,3 (34,7 – 42,0)	2,2 (2,0 – 2,6)	0,85 (0,73 – 1,01)	4,24	0,766	0,444
NA 2013 (N = 117)	150,61 ± 6,67	42,7 (33,8 – 52,1)	2,2 (1,8 – 2,7)	0,94 (0,69 – 1,24)	2,44	0,711	0,614
NA 2014 (N = 104)	138,85 ± 6,47	1,0 (0,1 – 5,1)	1,0	0,01 (0,00 – 0,03)	1,00	0,981	/
NA ukupno (N = 221)	145,05 ± 8,82	23,1 (17,8 – 29,2)	2,2 (1,8 – 2,7)	0,50 (0,35 – 0,67)	2,85	0,844	0,230
Ukupni Jadranski uzorak (N = 908)	136,91 ± 8,43	34,6 (31,6 – 37,8)	2,2 (2,0 – 2,5)	0,76 (0,67 – 0,88)	4,04	0,786	0,386
NT 2015 (N = 100)	129,70 ± 5,98	0	/	/	/	/	/
SS 2015 (N = 200)	140,30 ± 8,40	0	/	/	/	/	/
WS 2015 (N = 356)	173,17 ± 11,62	0,3 (0,0 – 1,6)	1,0	0,00 (0,00 – 0,01)	1,00	0,994	/
Ukupni Sredozemni uzorak (N = 656)	156,52 ± 21,00	0,2 (0,0 – 0,9)	1,0	0,00	1,00	0,997	/
Ukupni uzorak srdela (N = 1564)	145,16 ± 17,90	20,10 (18,2 – 22,2)	2,2 (2,0 – 2,6)	0,44 (0,39 – 0,52)	4,36	0,875	0,183*

Uzorak iz Jadrana: MA – srednji Jadran, NA – sjeverni Jadran, Uzorak iz zapadnog Sredozemnog mora: NT – sjeverno Tirensko more, SS – južna Sicilija, WS – zapadna Sardinija. Eksponent negativne binomijalne raspodjele (k) nije pokazao statistički značajnu razliku između zabilježenih i očekivanih frekvencija, $p < 0,05$.



Dodatna slika 10.1 Prikaz pripreme uzoraka, procesa izrade cDNA knjižnice i normalizacije, prema uputama za korisnike, odakle je slika preuzeta i prilagođena. Prvi je korak purifikacija mRNA s poly-A repom, nakon čega slijedi fragmentacija i sinteza prvog lanca cDNA koristeći reverznu transkriptazu i nasumične početnice. Prepoznavanje drugog lanca postiže se zamjenom dTTP-ova s dUTP-ovima, a sinteza drugog lanca cDNA odvija se s pomoću DNA Polimeraze I i RNaze H. Nakon dodavanja slijeda A na 3' kraj, slijedi ligacija adaptora i PCR amplifikacija. Knjižnicama se tada provjerava kakvoća, kvantificiraju se i razrijede za sekvenciranje.



Dodatna slika 10.2 Prikaz Illumina tehnologije sekvenciranja s pomoću sinteze. Denaturirana, jednolančana cDNA modificirana adaptorom, koji je komplementaran početnicama na protočnoj ćeliji, bude pričvršćena hibiridizacijom. Nakon toga odvija se umnažanje početnih kalupa, zatim umnažanje njihovih kopija s pomoću početnica i stvaraju se nakupine identičnih cDNA molekula. Nakupine se denaturiraju i odcijepe. Osnova je ovog tipa sekvenciranja zabilježiti fluorescentni signal koji nastane nakon ugradnje obilježenih deoksiribonukleotida. Slika je preuzeta iz literature [210] i prilagođena hrvatskom jeziku, uz dopuštenje izdavača.

11.Kratka biografija

Ime i prezime: Ivana Bušelić Garber
Matični broj znanstvenika: 339655
Datum i mjesto rođenja: **25. siječnja 1989., Split, Hrvatska**
Adresa i kontakt**: Šetalište Ivana Meštrovića 63, Split, +385 21 408 047, buselic@izor.hr**

Obrazovanje (razdoblje, institucija, kvalifikacija):
2013. – danas, Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, doktorski studij Translacijska istraživanja u biomedicini (TRIBE)
2010. – 2012., Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel za studije mora, Magistra biologije i ekologije mora
Radno iskustvo (godina, institucija, radno mjesto, područje rada):
2013. – danas, Institut za oceanografiju i ribarstvo, Laboratorij za akvakulturu, Split, asistent, parazitologija morskih organizama
Akademska i znanstvena postignuća:
2011. Nagrada Rektora prof. dr. sc. Ivana Pavića sa Sveučilišta u Splitu za akademsku godinu 2010./2011., za izvanredne rezultate postignute tijekom studija
Usavršavanja:
2018. Radionica *Advanced RNA-Seq Analysis*, EMBL-EBI, Hinxton, Ujedinjeno Kraljevstvo.
2015. Tečaj Poduzetničke kompetencije za inovacijske poduhvate i Upravljanje projektnim ciklusom za mlade istraživače i poslijedoktorande, Ured za transfer tehnologije, Sveučilište u Splitu, Hrvatska.
2014. Tečaj Ronitelj u pomoćnim poslovima za potrebe podvodnih istraživanja, Učilište Meštar, Hrvatska.
2012. Erasmus stručna praksa u Španjolskoj (Sveučilište u Gironi) u trajanju od 3 mjeseca
Članstva u profesionalnim organizacijama:
2014. – danas, European Association of Fish Pathologists (EAFP), član student
2018. – danas, EuroMarine Young Scientist Working Group (18 članova na razini Europe), predstavnica Instituta za oceanografiju i ribarstvo
***Web of Science* publikacije:**

[1] Bušelić I, Trumbić Ž, Hrabar J, Vrbatović A, Bočina I, Mladineo I. Molecular and cellular response to experimental *Anisakis pegreffii* (Nematoda, Anisakidae) third-stage larval infection in rats. Front Immunol 2018;9:2055.

[2] Bušelić I, Botić A, Hrabar J, Stagličić N, Cipriani P, Mattiucci S, et al. Geographic and host size variations as indicators of *Anisakis pegreffii* infection in European pilchard (*Sardina pilchardus*) from the Mediterranean Sea: Food safety implications. Int J Food Microbiol 2018;266:126–32.

[3] Mladineo I, Trumbić Ž, Hrabar J, Vrbatović A, Bušelić I, Ujević I, et al. Efficiency of target larvicides is conditioned by ABC-mediated transport in the zoonotic nematode *Anisakis pegreffii*. Antimicrob Agents Chemother 2018;62:e00916-18.

[4] Cipriani P, Sbaraglia GL, Palomba M, Giulietti L, Bellisario B, Bušelić I, et al. *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in European anchovy *Engraulis encrasicolus* from the Mediterranean Sea: Fishing ground as a predictor of parasite distribution. Fish Res 2018;202:59–68.

[5] Levsen A, Svanevik CS, Cipriani P, Mattiucci S, Gay M, Hastie LC, et al. A survey of zoonotic nematodes of commercial key fish species from major European fishing grounds—Introducing the FP7 PARASITE exposure assessment study. Fish Res 2018;202:4–21.

[6] Cipriani P, Sbaraglia GL, Paoletti M, Giulietti L, Bellisario B, Palomba M, et al. The Mediterranean European hake, *Merluccius merluccius*: Detecting drivers influencing the *Anisakis* spp. larvae distribution. Fish Res 2018;202:79–89.

[7] Mladineo I, Trumbić Ž, Radonić I, Vrbatović A, Hrabar J, Bušelić I. *Anisakis simplex* complex: ecological significance of recombinant genotypes in allopatric area of the Adriatic Sea inferred by genome-derived simple sequence repeats. Int J Parasitol 2017;47:215–23.

[8] Mladineo I, Bušelić I, Hrabar J, Vrbatović A, Radonić I. Population parameters and mito-nuclear mosaicism of *Anisakis* spp. in the Adriatic Sea. Mol Biochem Parasitol 2017;212:46–54.

[9] Bao M, Pierce GJ, Pascual S, González-Muñoz M, Mattiucci S, Mladineo I, et al. Assessing the risk of an emerging zoonosis of worldwide concern: anisakiasis. Sci Rep 2017;7:43699.

[10] Mladineo I, Bušelić I, Hrabar J, Radonić I, Vrbatović A, Jozić S, et al. Autochthonous bacterial isolates successfully stimulate *in vitro* peripheral blood leukocytes of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Front Microbiol 2016;7:1244.

[11] Purroy A, Šegvić-Bubić T, Holmes A, Bušelić I, Thébault J, Featherstone A, et al. Combined use of morphological and molecular tools to resolve species mis-identifications in the Bivalvia The case of *Glycymeris glycymeris* and *G. pilosa*. PLoS One 2016;11:e0162059.

[12] Messina CM, Pizzo F, Santulli A, Bušelić I, Boban M, Orhanović S, et al. *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) products modulate oxidative stress and apoptosis-related biomarkers in human cell lines. Parasit Vectors 2016;9:607.

[13] Emre Y, Emre N, Aydogdu A, Bušelić I, Smales LR, Mladineo I. Population dynamics of two diplectanid species (Monogenea) parasitising sparid hosts (Sparidae). Parasitol Res 2015;114:1079–86.

[14] Lepen Pleić I, Bušelić I, Trumbić Ž, Bočina I, Šprung M, Mladineo I. Expression analysis of the Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) pro-inflammatory cytokines, IL-1β, TNFα1 and TNFα2 in response to parasites *Pseudocycnus appendiculatus* (Copepoda) and *Didymosulcus katsuwonicola* (Digenea). Fish Shellfish Immunol 2015;45:946–54.

[15] Bušelić I, Stagličić N, Lloret J, Matić-Skoko S. Can restrictions in mediterranean artisanal fisheries be beneficial for target species? Acta Ichthyol Piscat 2015;45:31–8.

[16] Bušelić I, Peharda M, Reynolds DJ, Butler PG, González AR, Ezgeta-Balić D, et al. *Glycymeris bimaculata* (Poli, 1795) - A new sclerochronological archive for the Mediterranean? J Sea Res 2015;95:139–48.

[17] Bošnjak I, Borra M, Iamunno F, Benvenuto G, Ujević I, Bušelić I, et al. Effect of bisphenol A on P-glycoprotein-mediated efflux and ultrastructure of the sea urchin embryo. Aquat Toxicol 2014;156:21–9.

[18] Jurić I, Bušelić I, Ezgeta-Balić D, Vrgoč N, Peharda M. Age, growth and condition index of *Venerupis decussata* (Linnaeus, 1758) in the Eastern Adriatic Sea. Turkish J Fish Aquat Sci 2012;12:613–8.

[19] Peharda M, Crnčević M, Bušelić I, Richardson CA, Ezgeta-Balić D. Growth and longevity of *Glycymeris nummaria* (Linnaeus, 1758) from the eastern Adriatic, Croatia. J Shellfish Res 2012;31:947–50.

Sudjelovanja na kongresima:

4. – 8. 9. 2017. ***18th EAFP International Conference on Diseases of Fish and Shellfish***, Belfast, Ujedinjeno Kraljevstvo. Sudjelovanje usmenim i poster-prezentacijama, dodijeljena nagrada za studente (*EAFP Student Award*, besplatna kotizacija).

12. – 14. 10. 2016. ***46th WEFTA Conference "From local fish to global dish"***, Split, Hrvatska. Sudjelovanje poster-prezentacijama.

15. – 18. 6. 2016. ***6th Croatian Congress of Microbiology***, Sveti Martin na Muri, Hrvatska. Sudjelovanje poster-prezentacijom.

07. – 11. 9. 2015. ***17th EAFP International Conference on Diseases of Fish and Shellfish***, Las Palmas de Gran Canaria, Španjolska. Sudjelovanje usmenom i poster-prezentacijama, dodijeljena nagrada za studente (*EAFP Student Award*, besplatna kotizacija).

31. 8. – 4. 9. 2015. ***9th International Symposium on Fish Parasites***, Valencia, Španjolska. Sudjelovanje poster-prezentacijama, dodijeljena nagrada za studente (*9th ISFP Student Award,* snižena kotizacija).

12. – 16. 9. 2011. ***46th European Marine Biology Symposium***, Rovinj, Hrvatska. Sudjelovanje poster-prezentacijama.

Sudjelovanja na projektima:

2015. – 2020., **H2020 ParaFishControl** (*Advanced tools and research strategies for parasite control in European farmed fish*); radno mjesto: suradnik asistent na projektu; područje rada: Populacijska dinamika i genetička struktura jednorodnog metilja *Sparicotyle chrisophrii* u divljim i uzgojenim populacijama riba.

2015. – 2019., **COST Action FA1408** (*A European network for foodborne parasites - Euro-FBP*); radno mjesto: vice MC (*Management Committee*) zamjenik predstavnika za Hrvatsku, područje rada: Oblići u morskoj hrani i proizvodima; katalogizacija i harmonizacija analitičkih metoda identifikacije, izolacije i dijagnostike; strategije smanjenja utjecaja nametnika u hrani na ljudsko zdravlje.

2015. – 2016., **European Social Fund projekt BIOAQUA** (Probiotici u akvakulturi - ekološki održiva profilaksa); radno mjesto: suradnik asistent na projektu; područje rada: Analiza bakterijskih izolata iz crijeva lubina za potencijalnu upotrebu kao probiotika u akvakulturi.

2014. – 2018., **HRZZ AnGEl** (*Anisakis spp. Genomic Epidemiology*); radno mjesto: doktorand; područje rada: Geografska distribucija anisakida u Jadranskome moru, interakcija domaćina i nametnika kroz analizu transkriptoma. Sudjelovala u istraživanju mehanizama rane infekcije ličinkom *Anisakis pegreffii* i odgovora slučajnog domaćina, Sprague-Dawley štakora, koji simulira infekciju čovjeka; usporedba odgovora sisavca u odnosu na parateničnog domaćina, lubina, stimulacija perifenih leukocita oba domaćina ukupnim proteinskim ekstraktom nametnika, RNA sekvenciranje i analiza transkriptoma.

2013. – 2016., **FP7 PARASITE** (*Parasite risk assessment with integrated tools in EU fish production value chains*); radno mjesto: suradnik asistent na projektu; područje rada: Pojavnost zoonotičnog oblića *Anisakis* spp. (Nematoda, Anisakidae) u gospodarstveno značajnim ribljim vrstama u Jadranu: populacijska dinamika i genetika.