



Förändring i uttryck av CXCL6 i ekvina lungceller efter exponering för *Parascaris* L3- larver

Alexandra Barkfeldt

Examensarbete/Självständigt arbete • 15 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Institutionen för husdjurens biovetenskaper
Veterinärprogrammet
Uppsala 2026



Förändring i uttryck av CXCL6 i ekvina lungceller efter exponering för *Parascaris* L3-larver

Change in expression of CXCL6 in equine lung cells after exposure to Parascaris L3-larvae

Alexandra Barkfeldt

Handledare:	Magnus Åbrink, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens biovetenskaper
Examinator:	Gunnar Carlsson, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för husdjurens biovetenskaper
Omfattning:	15 hp
Nivå och fördjupning:	Grundnivå, G2E
Kurstitel:	Självständigt arbete i veterinärmedicin
Kurskod:	EX0862
Program/utbildning:	Veterinärprogrammet
Kursansvarig inst.:	Institutionen för husdjurens biovetenskaper
Utgivningsort:	Uppsala
Utgivningsår:	2026
Nyckelord:	<i>Parascaris univalens</i> , hästens spolmask, CXCL6, qPCR

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för husdjurens biovetenskaper

Sammanfattning

Hästens spolmask, *Parascaris univalens*, är en relevant parasit hos häst med i princip global förekomst. Infektion med *Parascaris univalens* kan ge upphov till symptom såsom hosta, näsflöde, feber, och i värsta fall tarmobstruktion med dödlig utgång. Det är en särskilt kliniskt relevant endoparasit hos unga individer som saknar inlärd immunitet. Samtidigt ses ett växande problem med resistensutveckling mot tillgängliga avmaskningsmedel (anthelmintika) hos parasitmaskarna, och stor brist på nya antiparasitära medel på marknaden.

Parascaris univalens livscykel kännetecknas av en hepatotrakeal migrationsfas där larverna passerar lever och lunga, vilket kan orsaka vävnadsskada och inflammation. När maskarna passerar lungorna är de i larvstadiet, vilket gör att immunsvaret kan skilja sig från det skyddande typ 2 immunsvaret man vanligen associerar med adulta parasitmaskar i tarmen. Parasitmaskar är också ökända för sina många immunmodulerande förmågor vilket gör det extra svårt för immunförsvaret att bekämpa dem.

På grund av den ökande resistensproblematiken finns det ett behov av att bättre förstå hur hästens immunförsvaret reagerar vid spolmaskinfektion, samt nya metoder för att tidigt kunna identifiera infektionen. Dagens vanliga metoder såsom flotation vilken identifierar ägg i träcken, innebär att vid diagnostik så har hästen redan hunnit bidra till smittspridningen. En möjlighet skulle därför kunna vara att hitta en immunologisk biomarkör som kan identifieras under tidig infektion, vilket potentiellt i framtiden skulle kunna bidra till bättre diagnostik, mer riktad behandling, och till minskad smittspridning.

CXCL6 är en gen som kodar för en kemokin som kännetecknas av ett ELR+-motiv (glutaminsyra, leucin, arginin), och har en viktig proinflammatorisk funktion genom rekrytering av granulocyter till infektionsstället. CXCL6 har visats vara viktig för immunförsvaret vid flertalet sjukdomsprocesser då den är involverad i ökad kärlpermeabilitet, och plasmaextravasering, samt aktivering och migration av neutrofiler.

I en pilotstudie togs lungceller från tre äldre hästar, och efter stimulering med nykläckta *Parascaris*-L3-larver sågs ett uppreglerat uttryck av CXCL6 vid RNA-sekvenseringsanalys. Syftet med denna studie är att undersöka om fyndet i pilotstudien också kan ses hos unghästar, genom analys med qPCR av CXCL6 uttrycksnivåer i insamlade lungceller från 13 hästar, i åldrarna sex månader till fem år, före och efter stimulering med *Parascaris*-L3-larver, samt att diskutera den potentiella praktiska relevansen av att mäta uttrycket av CXCL6.

Mycket av kunskapen om CXCL6 som beskrivs i texten är extrapolerad från andra djurslag och andra sjukdomstillstånd då det finns en kunskapslucka, exempelvis ger inte sökorden "*Parascaris*" och "CXCL6" tillsammans något resultat på flera av de vanliga sökmotorerna för vetenskapliga artiklar. Det tyder på att detta är ett viktigt forskningsområde för att fylla luckorna.

Resultatet från denna studie visade att uttrycket av CXCL6 ökade signifikant vid exponering, men det krävs ytterligare studier för att kunna dra några slutsatser om CXCL6's lämplighet som biomarkör, eller för att kliniskt kunna tillämpa den nyvunna informationen.

Nyckelord: *Parascaris univalens*, hästens spolmask, CXCL6, qPCR

Abstract

The equine roundworm, *Parascaris univalens*, is a relevant parasite in horses with a practically global occurrence. Infection with *Parascaris univalens* can cause symptoms such as coughing, nasal discharge, fever, and in more extreme cases, intestinal obstruction with a fatal outcome. It is a particularly relevant endoparasite in young individuals who lack acquired immunity. At the same

time, there is a growing problem with the development of resistance to available anthelmintics and a great shortage of new antiparasitic agents on the market.

The life cycle of *Parascaris univalens* is characterized by a hepatotracheal migration phase where the larvae pass through the liver and lungs, which can cause tissue damage and inflammation. When the worms pass through the lungs, they are in their larval stage, which means that the immune response can differ from the typical type 2 immune response usually associated with adult parasitic worms in the intestine. Parasitic worms are also notorious for their many immunomodulatory abilities, which makes it extra difficult for the immune system to fight them.

Due to the increasing resistance problem, there is a need to better understand how the horse's immune system reacts to roundworm infection, and to develop new methods for early identification of the infection. Today's common methods such as flotation identify eggs in the feces, and this means that by the time of diagnosis the horse has already contributed to the spread of the infection. One possibility could therefore be to find an immunological biomarker that can be identified during early infection, which could potentially contribute to better diagnostics, more targeted treatment, and reduce the spread of the infection in the future.

CXCL6, a gene that encodes a chemokine characterized by an ELR+ motif (glutamic acid, leucine, arginine), has an important pro-inflammatory function through the recruitment of granulocytes. CXCL6 has been shown to be important for the immune system in several disease processes as it is involved in the activation and migration of neutrophils, increased vascular permeability, and plasma extravasation.

In a pilot study, lung cells from three older horses were taken, and after stimulation with newly hatched *Parascaris* L3 larvae, an upregulated expression of CXCL6 was seen in RNA sequencing analysis. The aim of this study is to investigate whether the finding in the pilot study can also be seen in young horses, by analyzing with qPCR the CXCL6 expression levels in collected lung cells from 13 horses, aged six months to five year, before and after stimulation with *Parascaris* L3 larvae, and to discuss the potential practical relevance of measuring the expression of CXCL6.

Much of the knowledge about CXCL6 described in the text is extrapolated from other animal species and other disease states as there is a knowledge gap, for example, the search terms “*Parascaris*” and “CXCL6” together do not yield any results on several of the common search engines for scientific articles. This indicates that this is a highly relevant area of research.

The results of this study showed that the expression of CXCL6 increased significantly upon exposure, but further studies are required to be able to draw any conclusions about CXCL6's suitability as a biomarker, or to be able to clinically apply the newly acquired information.

Keywords: *Parascaris univalens*, equine roundworm, CXCL6, qPCR

Innehållsförteckning

Tabellförteckning	6
Figurförteckning	7
1. Bakgrund	8
1.1 <i>Parascaris univalens</i>	8
1.2 Nematodinfektion	10
1.3 Lungornas immunrespons	13
1.4 Kemokiner	15
1.5 CXCL6	16
1.6 Sjukdomar där CXCL6 är av relevans	17
2. Syfte	19
3. Metod	20
3.1 Litteratursökning	20
3.2 Framrening av <i>Parascaris univalens</i> ägg	20
3.3 Bronkoalveolärt lavage	21
3.4 Cellisolering och stimulering	21
3.5 RNA-extraktion från stimuleringsförsökstillfälle	21
3.6 cDNA syntes	22
3.7 qPCR	24
3.8 Kvantifiering av värden från qPCR och statistisk analys	25
4. Resultat	26
4.1 Samtliga individer	26
4.2 Första kohorten	27
4.3 Andra kohorten	27
5. Diskussion	30
5.1 Tolkning av resultat	30
5.2 Biologisk tolkning	31
5.3 Begränsningar och förbättringar	33
6. Slutsats	35
Referenser	36

Tabellförteckning

Tabell 1. Resultat från NanoDrop.....	22
Tabell 2. Volymmer för DNAs treatment mix.	23
Tabell 3. Volymmer för master mix 1.	23
Tabell 4. Volymmer för master mix 2.	23
Tabell 5. Volymmer för qPCR master mix.....	24
Tabell 6. Programmet för qPCR.....	25
Tabell 7. Översikt resultat.	26

Figurförteckning

Figur 1A och B. Spaghetti plot över samtliga individer, oavsett tid för exponering. Figur 1A är utifrån värdena på ΔCt , och 1B är utifrån värdena på fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Å6-Å10 exponerades för Parascaris L3-larver i 6 timmar, och resterande individer i 24 timmar.....	27
Figur 2A och B. Figur 2A visar en spaghetti plot utifrån ΔCt -värden för Å6-Å10 som blev exponerade i 6 timmar, och 2B är utifrån värdena på fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)..	27
Figur 3A och B. Figur 3A är en spaghetti plot över ΔCt -värden från den andra kohorten, Å1-Å5, exponerade för Parascaris L3-larver i 24 timmar. Figur 3B är utifrån värdena på fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).	28
Figur 4A och B. Figur 4A visar en spaghetti plot över ΔCt -värden från prov från den andra kohorten, 37, 71, och 111, och 4B är utifrån fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).	28
Figur 5A och B. Spaghetti plot över samtliga individer från den andra kohorten, 5A är utifrån ΔCt -värden, och 5B är utifrån fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).....	29

1. Bakgrund

Parasitinfektioner utgör en betydande sjukdomsproblematik hos hästar, särskilt i populationer med stor andel unga individer som ännu inte har hunnit utveckla immunitet. De vanligaste och mest kliniskt relevanta endoparasiterna hos häst är stor blodmask (*Strongylus vulgaris*), liten blodmask (*Cyathostominae* spp.), bandmask (*Anoplocephala perfoliata*), och spolmask (*Parascaris univalens*) (Osterman Lind et al., 2007; Young och Finno, 2022).

Infektion med spolmask kan ge kliniska problem som kan bli allvarliga till följd av resistens mot många behandlingsalternativ. *Parascaris* spp. anses vara de mest patogena parasiterna som infekterar unghästar (Reinemeyer, 2009). I svåra fall kan infektion leda till tarmobstruktion som kräver buköppning, obehandlat kan det leda till dödsfall (Cribb et al., 2006; Tatz et al., 2012). När spolmasklarver migrerar genom lever och lungor kan inflammation och vävnadsskada uppstå (Nicholls et al., 1978; Brown och Clayton, 1979).

När larverna befinner sig i lungorna kan man se symptom som näsflöde och hosta (Nielsen, 2015), eftersom larverna ska hostas upp för att sedan sväljas så att de kan fullborda sin livscykel och bli adulter i tarmen. Generellt för spolmaskinfektion är att man i vissa fall även kan se diffusa symptom i form av nedsatt allmäntillstånd och ibland kolikkänningar (Nielsen, 2015; Reinemeyer, 2009).

På grund av de kliniska problemen som uppstår och att infekterade individer kan utsöndra stora mängder ägg som under lång tid kontaminerar betesmarker, samt att det råder brist på nya avmaskningsmedel, är det viktigt att det bedrivs forskning inom ämnet. Det behövs för att kunna hitta nya sätt för diagnostik och behandling, samt för att ge en bättre förståelse kring spolmaskens påverkan på immunsystemet och värdjuret. Att ta reda på vilka gener som är involverade i immunsvaret mot *Parascaris univalens* kan vara ett steg mot att hitta en lämplig biomarkör för att upptäcka maskinfektion tidigare. Det är främst adulta maskar som orsakar tarmproblem och utsöndrar ägg i miljön, men en biomarkör för den hepato-trakeala migrationsfasen skulle kunna hjälpa till att upptäcka infektion tidigt, vilket gör att man kan sätta in behandling innan utvecklingen till adulter sker. Att identifiera immunologiska biomarkörer och få en bättre förståelse för immunsvaret vid en spolmaskinfektion kan även vara ett steg mot utvecklingen av andra kontrollmetoder, såsom vaccin, i framtiden.

1.1 *Parascaris univalens*

Parascaris univalens är nära släkt med *Parascaris equorum*. De ansågs tidigare vara samma art, men forskning har delat upp de i två separata arter inom släktet *Parascaris*. Båda arterna infekterar föl och unghästar, och de ger upphov till

samma typ av symptom. Morfologiskt kan man inte skilja mellan arterna, men de skiljer sig med avseende på deras karyotyper (Zhou et al., 2023).

Parascaris univalens är en stor, spolformad nematod som infekterar hästdjur, och utgör en av de mest betydelsefulla endoparasiterna hos föl och unghästar (Osterman Lind et al., 2007). Morfologiskt kännetecknas parasiten av en långsträckt och osegmenterad kropp, som täcks av en kutikula. Deras inre strukturer består av en vätskefylld pseudocoelom, longitudinella muskler, en fullständig tarmkanal, samt ett enkelt nervsystem. Arten är dioik, vilket innebär att maskarna är könsskilda (Bowman och Georgi, 2009; Taylor et al., 2016).

Parascaris univalens är migratorisk, och har en direkt livscykel, vilket innebär att de inte använder sig av en mellanvärd. Infektion sker peroralt till mottagliga hästar genom intag av embryonerade ägg innehållande infektiösa larver. Efter intag kläcks larverna i tunntarmen, för att sedan penetrera tarmväggen och transporteras via portalblod till levern. Sedan fortsätter migrationen via blodet till hjärtat, och sedan till lungornas kapillärbädd där larverna bryter sig ut i alveolerna. Larverna vandrar sedan genom bronkioler, bronker, och trachea, där de hostas upp och sväljs för att åter hamna i tunntarmen där de utvecklas till adulta maskar. Prepatensperioden är ca 10-12 veckor (Taylor et al., 2016; Urquhart et al., no date).

De adulta maskarna etablerar sig i tunntarmen där de reproducerar. Honorna blir upp till 50 cm långa, och kan producera flera hundratusentals ägg dagligen. Äggen är sfäriska och har en diameter på ungefär 85-100µm. När äggen kommer ut med träcken är de omogna, men under rätt förhållanden embryoneras de i miljön och blir infektiösa. Äggen har ett tjockt skal som gör dem mycket motståndskraftiga, de kan förbli livsdugliga i flera år och är svåra att avlägsna, men de är känsliga för uttorkning (Bowman och Georgi, 2009).

Infektionens kliniska symptom varierar beroende på parasitens utvecklingsstadium. Larvernas migration genom levern är ofta asymptomatisk, men vid infektion med *Parascaris equorum* har man sett fibrotiska lesioner i levern, "white spots" (Brown och Clayton, 1979), vilket även är förknippat med infektion med andra ascarider. Under den pulmonella fasen kan larverna orsaka respiratoriska symptom, så som hosta, näsflöde, och feber (Nielsen, 2015), till följd av ett inflammatoriskt eller allergiskt svar. Larver under migration kan orsaka stor infiltration av eosinofiler. Vävnadsskadan som uppstår kan även predisponera för sekundära infektioner, och potentiellt påverka effekten av vaccinationer (Taylor et al., 2016).

De adulta maskarna i tunntarmen kan ge upphov till allvarliga tillstånd som tarmobstruktion eller tarmperforation om de är tillräckligt många (Cribb et al., 2006; Tatz et al., 2012), men det vanligaste är subklinisk infektion eller att det ger nedsatt tillväxt och diarre hos yngre djur. Infektionen är vanligast och mest kliniskt relevant hos föl och unghästar på grund av deras immunologiska naivitet

(Young och Finno, 2022). Infektionen hos vuxna djur brukar vara asymptomatisk. Immunitet mot ascarider utvecklas gradvis efter exponering, men tar flera månader. Efter utvecklad immunitet minskar antalet infekterade djur, men trots detta kan äldre individer fungera som reservoarer och bidra till fortsatt äggutsöndring och miljökontaminering (Bowman och Georgi, 2009; Taylor et al., 2016).

1.2 Nematodinfektion

Under 1970-talet var forskningsintresset kring nematodinfektioner relativt stort, men detta minskade med utvecklingen av effektiva anthelmintika, särskilt makrocycliska laktoner. Denna utveckling ledde till en uppfattning om att infektioner kunde kontrolleras genom rutinmässig avmaskning. På senare år har den globala resistensutvecklingen mot våra vanligaste avmaskningsmedel åter gjort *Parascaris* spp. till ett prioriterat forskningsområde. Resistens, i kombination med brist på utveckling av nya antiparasitära läkemedel, har skapat ett behov av ökad förståelse för funktionella interaktioner som sker mellan värd och parasit, särskilt avseende immunrespons och mekanism bakom infektion och persistens (Reinemeyer, 2009; Kaplan, 2004).

Trots delvis ökad kunskap om immunbiologin och epidemiologin vid helmint-infektioner, speciellt hos människor, fortsätter de att orsaka kliniska och ekonomiska problem globalt. Det beror på faktorer som hög incidens, läkemedelsresistens, och avsaknaden av effektiva vaccin. Utvecklingen av vaccin hindras av komplexiteten i förhållanden mellan värd och parasit, och att man inte fullständigt förstår de molekylära och immunregulatoriska systemen associerade med utvecklandet av immunitet. En del forskning har fokuserat på att identifiera och karaktärisera molekyler som är involverade i detta (Foster och Elsheikha, 2012).

En central egenskap hos helminter är deras immunmodulerande förmåga, vilket möjliggör en långvarig överlevnad i värdjuret. En av mekanismerna bakom immunmoduleringen är genom utsöndring av extracellulära vesiklar, vilka innehåller bioaktiva molekyler såsom proteiner och microRNA. Dessa komponenter påverkar värdens immunfunktion genom att reglera genuttryck och signaleringsvägar i immunceller. Särskilt har olika lektiner associerade med extracellulära vesiklar visats bidra till modulering av det lokala immunsvaret i den gastrointestinala kanalen vilket skapar en mer gynnsam miljö för parasiten (Coakley et al., 2016).

Nematodinfektioner inducerar generellt ett Th2-dominerat immunsvaret med aktivering av eosinofiler, mastceller, och basofiler, samt antikroppsswitch hos plasmaceller från IgM till IgE och IgG under påverkan av cytokiner som IL-4, IL-5, och IL-13. Effekten av nematodinfektion i den gastrointestinala kanalen kan

beskrivas genom två huvudsakliga mekanismer, “self cure”, samt steril immunitet som är beroende av adaptivt immunsvaret (Foster och Elsheikha, 2012).

På grund av bristen på specifika studier på *Parascaris* spp. används ofta *Ascaris suum* som experimentell modell för att studera immunologiska mekanismer vid ascarid-infektion, detta för att *A. suum* är mer relevant för människor som främst infekteras av *Ascaris lumbricoides* (Lamberton och Jourdan, 2015).

I människor har det visats att migrerande *Ascaris*-larver inducerar ett lokalt inflammationssvar i lungan, likaså hos experimentellt infekterade möss. I möss har inflammationen blivit beskriven som ett typ 2-svar, som domineras av IL-4, IL-13, och till viss del IL-5. I den akuta infektionsfasen hos människor infekterade med helminter involverar immunsvaret typ 2-associerade cytokiner (IL-4, IL-5, IL-9, IL-12), initialt av medfödda leukocyter, men senare av antigenspecifika CD4 T-celler (Gazzinelli-Guimaraes och Nutman, 2018). Även *Ascaris lumbricoides* infektioner i regioner där det finns endemiskt är associerade med ett typ 2 cytokin-svar (Cooper et al., 2000).

Vid infektion med *Ascaris suum* har man sett att det sker en omfattande systemisk inflammation i luftvägar och lungor för att migrationen av larverna ska kunna kontrolleras. Inflammationen tros vara skyddande vid larvernas spridning genom vävnaderna, men orsakar samtidigt symptom som hosta, feber, och eosinofil pneumoni (Amorim et al., 2024). Under den tidiga larvmigration i lungorna ses initialt en kraftig infiltration av neutrofiler, följt av eosinofiler och mononukleära celler, vilket leder till vävnadsskada (Nogueira et al., 2016).

Experimentella infektionsstudier på råttor och möss har visat att nematoder inducerar ett Th2 dominant immunsvaret, med tydligt ökat antal av mukosala mastceller och intestinala eosinofiler. Vid infektion med *Ascaris suum* hos BALB/c möss har man dessutom sett att upprepade exponeringar leder till en kraftig pulmonell inflammation associerat med ett polariserat Th2/Th17 svar. Detta immunsvaret är avgörande för att kontrollera larvernas migration genom kroppen (Nogueira et al., 2016).

Vid multipla exponeringar med *Ascaris suum* ses ökad cellularitet i BAL-vätska, och ökat antal mononukleära immunceller (lymfocyter och makrofager), samt en intensiv granulocytär (eosinofiler och neutrofiler) lunginflammation som leder till sämre respiratorisk funktion. I återinfekterade möss har man också sett högre nivåer av IL-4, IL-5, IL-10, IL-6, TNF-alfa, och IL-17a jämfört med djur som bara blivit infekterade en gång (Nogueira et al., 2016).

Vid experimentell infektion med *Ascaris sum* hos gris har det observerats ett “self-cure” svar där adulta maskar stöts ut från tarmen omkring 10 dagar efter infektion, med fullständig eliminering efter ungefär 17 till 21 dagar. Detta “self-cure” svar har associerats med mukosalt IgA och systemiskt IgG1, men inte med eosinofili eller ökat antal mukosala mastceller. Resultatet tyder därför på att “self-

cure” främst är kopplat till IgA och Th2-cytokiner snarare än till medfödda effektorceller, även om Th2-cytokiner är viktiga i eosinofilaktivering (Foster och Elsheikha, 2012).

Det är viktigt att notera att många experimentella studier baseras på gnagarmodeller, vilket ofta ger detaljerad och molekylär information men som fullt ut inte speglar den naturliga interaktionen mellan värd och parasit. Detta eftersom gnagare som värd inte tillåter fullständig utveckling av ascarider i tarmen. Dessa senare larvstadier är viktiga att undersöka, och en del äldre studier har gjorts av *Ascaris suum* och *Ascaris lumbricoides* på gris. Detta eftersom de kan infektera människor och anses mer relevanta inom forskning. Det skyddande immunsvaret mot *Ascaris* i grisar och människor är dominerat av ett Th2-svar baserat på *Ascaris*-inducerad IgE produktion, perifer eosinofili, och ökad lymfocytär Th2-cytokinproduktion. “Self-cure” i tunntarmen hos gris har även visats vara associerat med ett lokaliserat mastcellsberoende hypersensitivitetssvar. Det har även observerats ökade nivåer av IL-4 och IL-12 i ileum och BAL-vätska hos *Ascaris suum*-infekterade grisar utan signifikant ökning av typiska Th1-cytokiner som IFN-gamma och TNF-alfa i samma vävnader och vätskor (Dawson et al., 2005).

Infektion med *Parascaris equorum* inducerar både cellulärt och humoralt immunsvaret. Det humoral svaret kännetecknas av ökade nivåer av immunoglobuliner, främst IgE och IgG. En studie visade att råttor exponerade för *Parascaris equorum* antigen hade signifikant ökade nivåer av IgE och IgG 14 och 21 dagar efter infektion (Yehia et al., 2024). IgE-responsen är kopplad till aktivering av eosinofiler och mastceller, och kan bidra till allergiliknande reaktioner och inflammatoriska processer i infekterade vävnader (Burk et al., 2016).

Det cellulära immunsvaret mot *Parascaris equorum* i gnagarmodell involverar ökat antal vita blodceller i både lunga och tarm, och man ser framför allt infiltration av makrofager, neutrofiler, lymfocyter, och eosinofiler. Den ökade cytokinproduktionen inkluderar IL-5, IL-13, IL-33, och IFN-gamma, vilket till skillnad från det klassiska Th2-svaret som ofta associeras med helminter indikerar ett mer komplext svar som delvis också inkluderar ett Th1 och Th17-associerat svar (Yehia et al., 2024).

Trots den kliniska betydelsen är forskningen kring *Parascaris univalens* begränsad, och mycket som man vet är extrapolerat från *Parascaris equorum* eller andra ascarider. 1979 publicerade Brown och Clayton en artikel (*Hepatic pathology of experimental Parascaris equorum infection in worm-free foals*) där de hade undersökt levern på föl efter infektion med *Parascaris equorum*, och vilka immunceller som kunde ses kring lesionerna. Men det går inte att hitta motsvarande studier på lungvävnad efter infektion med *Parascaris univalens*, i alla fall inte om man söker information om immuncellernas genuttryck.

En pilotstudie har dock visat på uppreglering av flera inflammations- och immunrelaterade gener, inklusive IL-1 β , CXCL6, MIP-2 β , PTX3, SERPINB2, MRGPRX2, OSM, EPOP, MAP, och IL-36gamma i lungceller. Dessa fynd tyder på att larverna inducerar ett kraftigt medfött immunsvaret i luftvägarna, och understryker behovet av vidare studier av de immunologiska mekanismerna vid infektion med *Parascaris univalens*.

1.3 Lungornas immunrespons

Luftvägsepitelet är den första barriären mot inhaleda mikroorganismer och främmande substanser som kommer utifrån, och har en viktig roll både under normala och patologiska omständigheter. Det är en aktiv barriär mellan yttre och inre miljöer, och svarar på många olika stimuli. Epitelet utgörs av många olika celltyper, bland annat cilierade, icke-cilierade, mukusproducerande bägarceller, och precursorceller. Dessa har en central roll i att hindra patogener från att nå de nedre luftvägarna. Eftersom epitelet ständigt exponeras för yttre miljöfaktorer så har det utvecklat mekanismer för att snabbt kunna svara på stimuli. Efter mekanisk skada kan epitelcellerna proliferera och migrera för att stänga den uppkomna skadan (Crosby och Waters, 2010).

Lungeepitelet bildar en kontinuerlig fysisk barriär som separerar den underliggande vävnaden från exempelvis inhaleda antigen som tagit sig in via luftvägarna. Epitelcellerna upprätthåller barriären genom starka intercellulära bindningar, tight junctions, adherens junctions, och desmosomer, där tight junctions främst reglerar den paracellulära permeabiliteten och förflyttningen av joner mellan celler. Som svar på främmande patogener och partiklar släpper epitelcellerna ut immunfaktorer (alarminer). Epitelcellernas produktion och stressrelaterade utsöndring av IL-33, IL-25, och CC-kemokiner är viktiga epiteliala faktorer som kan initiera och öka inflammation i luftvägarna. Dessa kemokiner produceras innan IL-4, IL-5, och IL-13, tre Th2-mediatorer man vanligen associerar med allergisk inflammation i lungorna. Epitelet utgör en viktig och effektiv barriär eftersom det svarar på leukocyters sekretion av cytokiner, kemokiner, och tillväxtfaktorer. Tillsammans med leukocyter är epitelceller viktiga för homeostasen i vävnad, då problem med epitelets barriärfunktion kan leda till utveckling av inflammatoriska luftvägssjukdomar (Hallstrand et al., 2014).

En viktig mekanisk försvarsmekanism i luftvägarna är den mukociliära transporten, där cilierade epitelceller tillsammans med mukus effektivt transporterar bort inhaleda partiklar och mikroorganismer från luftvägarna (Fahy och Dickey, 2010). Efter det mekaniska skyddet kommer det medfödda immunsvaret i lungan aktiveras. Detta svar involverar flera celltyper, bland annat makrofager och mastceller, som snabbt aktiveras vid infektion eller vävnadsskada.

Alveolarmakrofager är de dominerande medfödda immuncellerna i de nedre luftvägarna. De sköter homeostasen och ser till att det sker optimalt gasutbyte. Utöver det är de snabba på att känna igen och interagera med partiklar och patogener, samt att initiera inflammation (Kang et al., 2023).

Alveolarmakrofagerna har en unik CD14+CD16+ fenotyp som skiljer dem från cirkulerande monocyter i blodet, och gör de särskilt effektiva vid fagocytos och antigenpresentation (Gressler et al., 2022). De producerar även cytokiner och kemokiner som reglerar det lokala immunförsvaret.

Mastceller är en annan viktig del av det medfödda immunförsvaret i lungan. De förekommer främst som mukosala mastceller i luftvägarna och kan ackumuleras i bronkoalveolära områden vid inflammation. De är viktiga för både antigenpresentation och antimikrobiellt försvar, bland annat genom uttryck av MHC klass II-molekyler, komplementfaktorer, och enzymer så som lysozym (Akula et al., 2022). Vid aktivering som leder till degranulering frisätter mastceller många inflammatoriska mediatorer, vilket bidrar till förstärkning av inflammationssvaret och snabb rekrytering av andra immunceller.

Neutrofiler är viktiga i det akuta inflammatoriska svaret. De rekryteras snabbt till inflammationsområden via kemokinsignalering, och bidrar till det antimikrobiella försvaret genom fagocytos, produktion av reaktiva syreradikaler, och frisättning av proteolytiska enzymer. Neutrofiler kan även bilda så kallade neutrophil extracellular traps (NETs), som består av extracellulärt DNA med histoner och enzymatiska proteiner, och bidrar med att fånga och bryta ned främmande organismer. Samtidigt kan överdriven neutrofilaktivering bidra till vävnadsskada och fibros (Pham, 2006).

Rekryteringen av neutrofiler i lungorna vid inflammation regleras i viss utsträckning av CXC-kemokiner. CXCL6 är en kemokin som attraherar neutrofiler till inflammationsområden, och den kan produceras av epitelceller, makrofager, och endotelceller enligt en *in vitro* studie (Pampalone et al., 2024). Vid akut inflammation i lunga på råttor, inducerad med bleomycin och lungskada orsakad av nanomaterial, har ökad produktion av CXCL6 setts. Även försök med inandning och intratracheal instillation på råttor har gett ökad CXCL6 (Tomonaga et al., 2024). Andra ELR+ motivbärande CXC-kemokiner så som CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL7, och CXCL8 har också setts attrahera neutrofiler (Rohde et al., 2014).

Cytokinen IL-17A har en viktig regulatorisk funktion och stimulerar epitelceller till att producera CXCL6 och andra neutrofilrekryterande kemokiner, vilket förstärker den inflammatoriska responsen (Fossum et al., 2017). Neutrofiler kan även rekryteras till inflammerade områden med hjälp av elafin, som är en antimikrobiell peptid som uttrycks av alveolarmakrofager och epitelceller (Rohde et al., 2014).

Det adaptiva immunsvaret i lungan domineras av T-lymfocyter, vilka har en avgörande roll i att koordinera immunresponsen och upprätthålla homeostasen i lungorna. Hos häst återfinns CD8⁺T-celler i BAL-vätska, medan CD4⁺T-hjälparceller främst cirkulerar i perifert blod (Gressler et al., 2022). CD4⁺ T-celler kan differentiera till olika effektorcell-subtyper beroende på cytokinsignalering.

Th1-celler producerar typ1 cytokiner, såsom IL-2, interferon-gamma och TNF-alfa och främjar cellmedierad immunitet, medan aktiverade Th2-celler istället producerar typ2 cytokiner såsom IL-4, IL-5 och IL-13 och är viktiga vid parasitinfektioner, allergiska reaktioner, och humoral immunitet. Utöver dessa finns även andra subtyper, som Th17-celler, vilka främst bidrar till rekrytering av neutrofiler, och förstärkning av inflammatoriska processer (Geginat et al., 2014; Wan, 2010).

Cytokinmiljön i lungan varierar beroende på typ av infektion eller inflammatoriskt tillstånd, vilket speglar den komplexa regleringen av immunresponsen (Richard et al., 2014). Balansen mellan de olika celltyperna och cytokinerna är avgörande för att kunna eliminera patogener och samtidigt begränsa överdriven vävnadsskada.

1.4 Kemokiner

Kemokiner är en grupp små, konserverade cytokiner, som är involverade i många biologiska processer, inklusive kemotaxi, degranulation av leukocyter, angiogenes, och hematopoes. De verkar genom att binda till G-proteinkopplade receptorer. Kemokinerna delas in i undergrupper beroende på placeringen i peptidkedjan av de två till fyra första konserverade cystein-aminosyrorna. De två största undergrupperna är CC-och CXC-kemokiner. Hos CC-kemokiner sitter de första två cysteinerne bredvid varandra, medan hos CXC-kemokiner separeras de med en aminosyra-rest (Miller och Mayo, 2017).

CXC-kemokinerna kan i sin tur delas in i ELR(+) och ELR(-) beroende på om de har ett specifikt trepeptidmotiv innan de konserverade cysteinresterna, bestående av glutaminsyra (E), leucin (L), och arginin (R). ELR(+)-kemokinerna är angiogeniska och har *in vitro* visat sig vara kemotaktiska för endotelceller och andra celltyper. ELR(-)-kemokinerna har däremot angiostatiska egenskaper i närvaro av ELR(+)-kemokiner eller andra angiogeniska faktorer. Aminosyramotivet ELR har visat sig vara viktigt vid ligand-receptorinteraktioner på neutrofiler, och motivet är mycket konserverad i alla CXC-kemokiner som har biologisk aktiveringsförmåga av neutrofila granulocyter (Strieter et al., 1995).

Till skillnad från CXC-kemokinerna som främst verkar på neutrofiler, verkar CC-kemokiner främst kemotaktiskt på monocyter men bidrar också till deras differentiering till makrofager (Yan et al., 2024).

Eftersom kemokiner är viktiga för många biologiska aktiviteter har de även en viktig roll i de flesta och olika patologiska tillstånd, bland annat cancer och HIV (Miller och Mayo, 2017).

1.5 CXCL6

Det finns begränsad information om CXCL6 hos häst, men genen finns annoterad i genomet och antas binda till samma receptorer och ha lika egenskaper som hos människa (UniProt). Majoriteten av tillgänglig kunskap kommer från studier gjorda på människa och gnagare. De flesta studierna gjorda på CXCL6 hos häst har varit i kombination med andra kemokiner, och främst i tillstånd såsom senskador och fång.

Hos mus är CXCL5 ortolog mot CXCL6 hos människa, och hos råttor har CXCL5 nyligen bytt namn till CXCL6 (Zlotnik och Yoshie, 2012). Hos möss uttrycks CXCL5 i lungor och är delaktig i inflammatoriska processer (Bahudhanapati et al., 2024). Hos människa uttrycks CXCL6 primärt i lungor, hjärta, lever, pancreas, hjärna, njurar, och placenta (Du et al., 2024).

CXCL6 kodar för en kemokin med samma namn, CXCL6 (C-X-C motif chemokine ligand 6), även kallad GCP-2 (granulocyte chemotactic protein-2). Det är en ELR⁺-CXC-kemokin som har en viktig roll i immunförsvaret. Initialt isolerades CXCL6 uttryck och protein från osteosarkomceller. CXCL6 delar i stort samma uppbyggnad som CXCL8 (IL-8), och är primärt involverad i kemotaxi, vilket innebär att den fungerar som en signalmolekyl för att attrahera immunceller till inflammationsområdet (Cheng et al., 2019).

CXCL6 rekryterar neutrofiler och monocyter genom att binda till två G-proteinkopplade receptorer, CXCR1 och CXCR2. På humana perifera leukocyter uttrycks CXCR1 och CXCR2 högst på neutrofiler, och båda receptorerna uttrycks ungefär lika mycket. Monocyter uttrycker däremot högre nivåer av CXCR2 än CXCR1. Till CXCR2 binder även andra CXC-kemokiner, men det är bara CXCL6 och CXCL8 som binder till CXCR1 (Cheng et al., 2019). Av dessa två receptorer anses CXCR2 vara den viktigaste för CXCL6-medierad neutrofilrekrytering. Bindningen till CXCR2 leder till ökad kärlpermabilitet och plasma-extravasering, vilket är viktigt för att rekrytera leukocyter till platsen för inflammation eller infektion. I möss har inte rollen av CXCR1 etablerats för neutrofilmigration (Bullock och Richmond, 2021). Bindning till CXCR2 är viktig för inflammatoriska sjukdomar så som astma, ARDS (acute respiratory distress syndrome), autoimmuna sjukdomar, COPD (chronic obstructive lung disease) och cancer. Uppregleringen av CXCR2 och ökad neutrofilmigration har ett samband med kronisk inflammation (Cheng et al., 2019).

In vivo leder CXCL6 till ansamling av neutrofiler, ökad kärlpermeabilitet, och plasmaextravasering. *In vitro* har CXCL6 visat öka intracellulära kalciumnivåer, inducera frisättning av MMP9, och vara kemotaktisk för neutrofiler och

endotelceller (Gijssbers et al., 2004). CXCL6 proinflammatoriska egenskaper gör att den effektivt kan modulera immunsvaret. CXCL6 kan även verka synergistiskt med IL-8 för att öka inflammationssvaret genom ökad neutrofilkemotaxi (Sun et al., 2025). CXCL6 främjar angiogenes och tumörcellmigration genom att öka aktiviteten av MMP-9, ett enzym som bryter ned extracellulär matrix, vilket underlättat spridningen av tumörceller. Utöver det har CXCL6 mycket starkare antibakteriella egenskaper än CXCL5 och CXCL7 vid lokal infektion (Tamimi et al., 2022). CXCL6 främjar tumörprogression genom att reglera angiogenes, cellmotilitet, celltillväxt, immuncellsinfiltration, och genom att modulera lokala anti-tumör svar (Ma et al., 2017). Vid inflammation är det framför allt makrofager, epitelceller, och mesenkymala celler som producerar CXCL6 (Chittur et al., 2011). IL-1 β har visats vara en stark inducerare av CXCL6, tillsammans med LPS, vid humana försök (Gijssbers et al., 2004). Uttrycket av CXCL6 regleras genom transkriptionsfaktorer så som EHF, där minskat uttryck kan leda till nedreglering av CXCL6, både under normala omständigheter och inflammatoriska (Proost et al., 1993). IL-17 uppreglerar uttrycket av CXCR2 kemokiner, vilket kan tyda på att Th17-celler är viktiga i neutrofilsvaret som man ser vid allvarlig astma och COPD (Traves och Donnelly, 2008).

1.6 Sjukdomar där CXCL6 är av relevans

CXCL6 är involverad i många olika sjukdomar, exempelvis olika typer av cancer och tumörsjukdomar, men även akuta och kroniska inflammatoriska tillstånd och har visats bidra till tumörtillväxt, metastasering, angiogenes, och neutrofil-medierad vävnadsskada. Ett ökat uttryck av CXCL6 har påvisats i flera sjukdomstillstånd hos både människa och djur vilket indikerar bred biologisk relevans.

I lungorna spelar CXCL6 en viktig roll i regleringen av inflammatoriska processer, främst genom att rekrytera neutrofiler till luftvägarna. Vid cystisk fibros inducerar cytokinen IL-17A produktionen av CXCL6 i bronkernas epitelceller, vilket leder till neutrofil och en ökad inflammation i lungorna. Den neutrofil-dominerade inflammationen är särskilt framträdande i det tidiga förloppet av sjukdomen. Genuttrycket av CXCL6 i lungorna regleras bland annat av EHF, som aktiveras vid inflammatoriska stimuli som IL-17A och LPS (Fossum et al., 2017).

Hos patienter med idiopatisk pulmonell fibros har även förhöjda nivåer av CXCL6 påvisats i BAL-vätska. Blockering med anti-CXCL6-antikroppar minskade neutrofilinfiltrationen och kollagendepositionen hos lungorna i möss (Besnard et al., 2013).

Övriga sjukdomstillstånd som CXCL6 har visats vara uppreglerad i är olika typer av cancer och tumörer, då den är involverad i angiogenes och tumörgenes (Gijssbers et al., 2004). Uppreglering av CXCL6 har påvisats i flera tumörcellinjer

samt i mesenkymala celler (Cheng et al., 2019). Uppregleringen identifierades i småcellig lungcancer, och uttrycket korrelerade med tumörprogression, speciellt under sämre förhållanden så som vid brist på syre (Cheng et al., 2019). Vid småcellig lungcancer fungerar CXCL6 som en autokrin tillväxtfaktor (Oliveira-Ferrer et al., 2020).

Vid gastrointestinala tumörer påverkar CXCL6 tumörprogression genom angiogenes och kemotaxi av neutrofiler vilket ökar tumörcellernas invasiva förmåga (Cheng et al., 2019). CXCL6 har även visats vara överuttryckt vid bröstcancer, lungcancer, colorektalcancer, thyroideacancer (Ma et al, 2017), osteosarkom, endometrialcancer (Tamimi et al., 2022), och prostatacancer (Liu et al., 2013).

Andra sjukdomar som CXCL6 är involverad i är till exempel inflammatoriska tarmsjukdomar däruttrycket i kolon hos patienter med ulcerativ kolit var högre jämfört med med kontrollgrupper (Boshagh et al., 2019), ledrelaterade problem (Bundgaard et al., 2020), och virusinfektioner. I luftvägar hos spädbarn infekterade med hRSV hittades CXCL6 i nasofaryngeala aspirat, men inte i friska kontroller. hRSV-infektion stör polariteten av pediatriiskt respiratoriskt epitel i lungorna, och associeras med immunomodulerande proteiner som CXCL6 (Touzelet et al., 2020).

I tarm hos häst har man sett att förhöjda nivåer CXCL6 kan indikera förändring av mikrobiotan i olika tarmpartier, detta eftersom IL-17 som skyddar mot extracellulär bakteriella patogener uppreglerar uttrycket av CXCL6 (Moss et al., 2024).

2. Syfte

Syftet med studien är att med qPCR validera uttrycket av CXCL6 i ekvina lungceller exponerade för *Parascaris univalens* L3 larver. Hypotesen är att genen uppregleras då den i en tidigare pilotstudie visats vara det, samt att den skulle kunna vara relevant i immunsvaret mot *Parascaris univalens*-infektioner.

3. Metod

3.1 Litteratursökning

Till litteratursökningen användes främst databaserna PubMed, Google Scholar, och Nature. Även AI-sökmotorn Ai2 Asta användes för att hitta artiklar.

Följande sökord användes: "CXCL6", "GCP-2", "*Parascaris*", "*Parascaris univalens*", "equine lung", "horse roundworms", "horse", "immune response", "chemokines", "immune response nematodes", "immune response lungs" i olika kombinationer.

Det var svårt att vara selektiv kring artiklar då området är väldigt begränsat, och det inte hittades några artiklar som uppfyllde de tre viktigaste sökorden tillsammans ("*Parascaris univalens*", "CXCL6", och "horse"). Många artiklar som användes uppfyllde därför bara enstaka av sökorden vilket innebar att mycket information, speciellt om CXCL6 och immunsvaret, fick extrapoleras från andra djurslag, ascarider, och forskningsområden.

3.2 Framrening av *Parascaris univalens* ägg

Parascaris univalens ägg renades fram från insamlade träckprov.

Initialt gjordes en äggräkning i proverna, 3 g av träcken mättes upp och blandades med 42 ml vatten, för att sedan silas genom en 150 µm sil. Vätskan samlades i 15 ml rör för att sedan centrifugeras vid 1500 rpm i 3 minuter. Supernatanten aspirerades bort. Pelleten blandades sedan med 15 ml mättad socker-salt-lösning bestående av 360 g NaCl, 1000 ml vatten, och 500 g socker. Sedan fylldes McMaster kammaren och antal ägg räknades. Antalet multiplicerades sedan med 50 för att få den totala "eggs per gram" (EPG).

EPG användes sedan för att uppskatta totala mängden ägg i träckprovet. Träcken blandades med lika mängd vatten med hjälp av en stavmixer och silades sedan genom ett 1 mm filter. Det spolades med kranvatten tills bara fast material var kvar. Det som hade gått genom 1 mm-filtret silades sedan genom 150 µm på samma sätt, därefter genom ett dubbel-filter som bestod av ett 70 µm filter på utsidan och med ett 110 µm filter stående i 70 µm filtret. Parasitmaskäggen tvättades sedan tills vattnet som rann igenom var färglöst/klart. Innerfiltret togs sedan bort och det som var kvar fördes över till ett 15 ml Falcon-rör. Äggen sedimenterades genom att centrifugera på 1000 g i 5 minuter, varpå vätskan aspirerades och pelleten suspenderades i 13,5 ml vatten. Detta upprepades tre gånger och efter sista centrifugeringen och aspirationen fylldes rören med 13,5 ml "Milton-solution", och blandades tills det blev homogent, sedan centrifugerades äggen på 425 g i 5 minuter.

Supernatanten i 3,5 ml fraktioner fördes sedan över i fyra 15 ml Falcon rör, och blandades med vatten för att späda "Milton-solution". Äggen tvättades sedan tre gånger med vatten och centrifugerades på 1000 g i 5 minuter. Äggen räknades och flyttades till en Erlenmeyer flaska, som förvarades i en skakinkubator i mörker för att mogna. Ungefär 21 dagar efter framrening hade L2/L3 larver mognat fram i äggen. Efter formalinbehandling över natt, och flera tvättar av äggen, kläcktes de mekaniskt med 7 slag i en glashomogenisator. Kläckta larver flyttades till en "migration device" (20 µm sil) under fyra timmar, varpå migrerade larver räknades och förbereddes för "challenge" av BAL-cellerna i kultur.

3.3 Bronkoalveolärt lavage

Bronkoalveolärt lavage (BAL) utfördes på 13 olika individer i åldrarna 6 månader till 5 år för att få ut cellerna. Hästarna spolades med 300 ml NaCl vardera, BAL-vätskan samlades, och transporterades kylt tillbaka till labbet för vidare cellisolering.

3.4 Cellisolering och stimulering

BAL-vätskan centrifugerades och tvättades i flera steg för att få ut lungcellerna: BAL-vätskan späddes först med 1 volym PBS, och centrifugerades därefter vid 1300 rpm i 5 minuter. Supernatanten avlägsnades och mer PBS tillsattes till pelleten. Tvättsteget upprepades fyra till fem gånger.

Efter sista tvätten räknades cellerna, och cellpopulationen bestod huvudsakligen av immunceller, såsom monocyter/makrofager, lymfocyter, och enstaka granulocyter. Av dessa celltyper är de framför allt monocyter och makrofager som uttrycker CXCL6.

2×10^6 BAL-celler per brunn sattes upp och odlades i kultur (serumfri HBSS-medium eller DMEM) i 6-hålsbrunnar, och exponerades i triplikat med 1000 per brunn av de framkläckta migrerade L3-larverna. BAL-cellerna exponerades för larver i 6 respektive 24 timmar. Ostimulerade BAL-celler användes som kontroll. Individer Å6-Å10 exponerades i 6 timmar, och individer Å1-Å5, 37, 71, och 111 exponerades i 24 timmar.

3.5 RNA-extraktion från stimuleringsförsökstillfälle

TotalRNA extraherades från stimuleringstillfället med TRIzol-reagens. Cellerna lyserades i 1 ml TRIzol, och 0,2 ml kloroform per ml TRIzol. Provet inkuberades i 10 minuter och centrifugerades sedan i 15 minuter på 12000 rpm i 4 °C. Den övre färglösa vattenfasen, innehållande RNA, överfördes till nytt rör. Den undre röda fasen innehåller TRIzol, det bildas som en hinna mellan faserna, innehållande proteiner, lipider, och genomiskt DNA.

TotalRNA isolerades sedan med Macherey-Nagel nucleospin RNA Clean-up XS-kolonner enligt tillverkarens instruktioner. En volym Buffer RCU tillsattes till provet i det nya röret och blandades två gånger, 5 sekunder per gång. Max 300 µl åt gången av provblandningen sattes i en Nucleospin RNA XS-kolonn som satt i ett uppsamlingsrör, och centrifugerades i 30 sekunder vid 11000 rpm. Steget upprepades då provmängden översteg 300 µl.

Kolonnen placerades i ett nytt uppsamlingsrör (2 ml) och centrifugerades i 30 sekunder på 11000 rpm. Sedan tillsattes 400 µl Buffer RA3 till kolonnen och den centrifugerades återigen i 30 sekunder på 11000 rpm. Genomflödet kasserades. Ytterligare 200 µl Buffer RA3 tillsattes. För att torka totalRNA:t centrifugerades kolonnen i 2 minuter på 11000 rpm.

Slutligen placerades kolonnen i ett nukleas-fritt uppsamlingsrör (1,5 ml), och RNA:et eluerades med 30 µl RNase-fritt vatten. Det isolerade RNA samlades i uppsamlingsröret.

3.6 cDNA syntes

cDNA syntetiserades från det framtagna totalRNA:t genom omvänd transkription (Superscript IV, Invitrogen). Först bestämdes RNA-koncentrationen med NanoDrop. Resultatet från NanoDrop efter RNA-extraktion syns i tabell 1.

Tabell 1. Resultat från NanoDrop.

Prov	Koncentration	260/280	260/230
C1	79,42 ng/µl	1,64	0,72
C2	55,73 ng/µl	1,7	0,66
C3	52,90 ng/µl	1,63	0,93
P1	64,31 ng/µl	1,48	0,23
P2	69,89 ng/µl	1,5	0,22
P3	41,44 ng/µl	1,56	0,51

Den bästa kontrollen valdes, det vill säga den som hade ett värde närmast 2 på 260/280, och närmast 1 på 260/230. Det blev i detta fall C3. Utifrån koncentrationen på C3 användes 3,8 µl RNA och 18,2 µl DNAs treatment mix (73 µl Nukleas-fritt vatten i DNAs mixen).

Sedan förbereddes en lite större mängd av master mixarna än vad som beräknades behövas för alla prover, för att ta hänsyn till eventuellt spill eller felpipettering. Tabell 2 är för DNAs treatment mix, tabell 3 för master mix 1, och tabell 4 för master mix 2.

Tabell 2. Volymmer för DNase treatment mix.

Reagens	1x volym (μ l)	10x volym (μ l)
10x buffer	2,2	22
AMPD1	2,2	22
Nukleas-fritt vatten	Upp till 22	Upp till 220
Total volym	22	220

Tabell 3. Volymmer för master mix 1.

Reagens	1x volym (μ l)	10x volym (μ l)
dNTP 10 μ M	1,2	12
Random hexamer	1	10
Oligo DT	0,2	2
Total volym	2,4	24

Tabell 4. Volumer för master mix 2.

Reagens	1x volym (μ l)		10x volym (μ l)	
	RT+	RT-	RT+	RT-
5x buffer	4	0,8	40	8
0,1M DDT	1	0,2	10	2
Superscript IV RT (200 U/ μ l)	1	0	10	0
Nukleas-fritt vatten	1	0,4	10	4
Total volym	7	1,4	70	14

För master mix 2 blandades ett rör med reverse transcriptase och ett utan. Det är master mix 2 som gör själva transkriberingen från RNA till DNA. Anledningen till att göra det är för att se om det fanns DNA i proven från början.

För att eliminera eventuellt genomiskt DNA som kan förekomma, behandlades RNA-proverna med DNase. Volymen RNA som användes var det som krävdes för att den totala mängden RNA skulle bli 200 ng, vilket varierade beroende på koncentrationen, sedan tillsattes DNase treatment mix så att den totala volymen skulle bli 22 μ l.

DNase treatment mix bestod i detta fall av 11 μ l (5x 2,2 μ l) 10x buffer, 11 μ l (5x 2,2 μ l) AMPD1, 88 μ l Nukleasfritt vatten, vilket räcker till fem prover.

Reagenserna blandades försiktigt genom pipettering och inkuberades i rumstemperatur i 15 minuter. Därefter tillsattes 2,2 μ l EDTA (DNase stop) för att stoppa reaktionen. Detta gjordes löpande för alla prover. Sedan inkuberades proverna i 70 °C i 10 minuter, kylde på is i 5 minuter, och centrifugerades sedan kort.

För syntes av cDNA tillsattes 2,4 µl master mix 1 till det DNase-behandlade RNA:et (24,2 µl), så den totala volymen blev 26,6 µl för respektive prov. Master mix 1 bestod i detta fall av 6 µl (5x 1,2 µl) dNTP 10 µM, 5 µl (5x 1 µl) random hexamer, och 1 µl oligo DT. Den totala volymen var 12 µl. Blandningen inkuberades i 59 °C på en värmeplatta i 5 minuter, och sattes sedan på is i drygt en minut. Sedan tillsattes 7 µl av master mix 2 till 22,2 µl RNA, vilket gjorde den totala volymen 29,2 µl. Master mix 2 (RT+) bestod av 20 µl 5x buffer, 5 µl 0,1M DDT, 5 µl superscript, 5 µl Nukleasfritt vatten.

En negativ kontroll utan enzym (RT-) inkluderades för varje prov för att kontrollera kontamination av genomiskt DNA, reagenserna för det bestod av 4,4 µl RNA, 0 master mix 2, och 1,4 µl RT- master mix. Den totala volymen för vardera prov var 5,8 µl. RT- master mixen bestod av 4 µl 5x buffer, 1 µl 0,1M DDT, och 2 µl Nukleasfritt vatten, vilket räcker till 5 prover.

Proverna blandades försiktigt med pipett, och inkluderades sedan 15 minuter i 25 °C, 60 minuter i 55 °C, och slutligen 15 minuter i 70 °C för att inaktivera enzymet.

Proverna med cDNA späddes sedan 1:5 med RNAsfritt vatten och förvarades i -20 °C tills vidare analys.

3.7 qPCR

Först förbereddes master mixen till qPCR, volymerna syns i tabell 5.

Tabell 5. Volymen för qPCR master mix.

Reagens	1x volym (µl)	40x volym (µl)
SYBRGreen master mix	12,5	500
Primer fwd (10 µM)	1	40
Primer rev (10 µM)	1	40
Nukleasfritt vatten	8,5	340
Total volym	23	920

Primerkoncentrationen ska vara 10µM för att ge 400 nM i reaktionsvolymen, de som fanns var 100µM vilket innebär att de späddes. I detta fall bestod master-mixen av 875 µl SYBR green, 70 µl primer fwd, 70 µl primer rev, och 595 µl nukleasfritt vatten.

Till 96-hålsplattan tillsattes 2 µl prov samt 23 µl master mix per brunn.

Primerparen som användes för CXCL6 var:

Forward (5' -> 3'): CAAGAAGGAAGTCTGTCTGGACC

Reverse (5' -> 3'): AGCCGCAGGGACAAACATAG

Vilket ger oss en 271 baspar lång PCR produkt . Programmet för qPCR-körningen syns i tabell 6.

Tabell 6. Programmet för qPCR.

Steg	Cykler	Temperatur	Tid
Denature	1	95 °C	5 minuter
Amplification	39	95 °C	15 sekunder
		60 °C	30 sekunder
		72 °C	30 sekunder
Melt curve	60 °C -> 95		10 sekunder
(smältkurva)	°C med 0,5		dwel time
	°C steg		

Primerarna blev testade för att hitta optimal temperatur. Efter qPCR storleksseparerades en av produkterna på 1% agarose-gel för att kontrollera att produkten var av rätt storlek. Från qPCR är det Cq/Ct-värdet (det värde som fås när mätbar produktmängd har bildats) som ska användas till beräkningarna. Tröskelvärdet för positiv signalstyrka som användes var 460 för proverna samt referensgenerna. Smältkurvan fungerar som kvalitetskontroll för att kontrollera att det bara är en produkt och av rätt storlek.

3.8 Kvantifiering av värden från qPCR och statistisk analys

Metoden som användes för att beräkna förändringen i genuttrycket från qPCR-datan var $\Delta\Delta C_t$ ($\Delta\Delta C_q$). Målgenens (CXCL6) Ct-värde normaliserades mot ett geometriskt medelvärde av referensgenernas (RPL32 och GAPDH) Ct-värde. alltså roten ur ($x^2 + y^2$), och sedan jämfördes differensen mot kontrollerna för respektive prov (Livak och Schmittgen, 2001).

För att se om uppregleringen av genuttrycket var signifikant i proverna jämfört med kontrollerna gjordes en parad analys med Student's t-test. Medelvärde från triplikaten jämfördes mot sin egen kontroll. Ett p-värde på under 0,05 tyder på statistisk signifikant skillnad. Proverna analyserades tillsammans men även indelat efter exponeringstid.

4. Resultat

För att kunna göra normalisering av qPCR-data analyserades uttrycket av två referensgener, GAPDH och RPL32. Ct-värdena uppvisade låg variation mellan proverna och ingen signifikant skillnad observerades mellan prover och kontroller för någon av referensgenerna, vilket indikerar stabilt uttryck och lämplighet för normalisering.

Uttrycket av CXCL6 analyserades med qPCR. Det relativa uttrycket beräknades med $\Delta\Delta\text{Ct}$ -metoden. Ct-värden normaliserades först mot medelvärdet av referensgenerna för att erhålla ΔCt -värden, och därefter jämfördes proverna med kontrollerna för beräkning av $\Delta\Delta\text{Ct}$. Det relativa genuttrycket uttrycks som fold change ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$).

För statistisk analys gjordes parat analys (Student's t-test) där medelvärdet av ΔCt -värden från triplikaten jämfördes mot respektive kontroll. Konfidensgraden var 95%. Resultaten visualiserades med spaghetti plots för både ΔCt och fold change ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) för lättare visualisering.

Tabell 7 är en översikt av resultaten från den parade analysen.

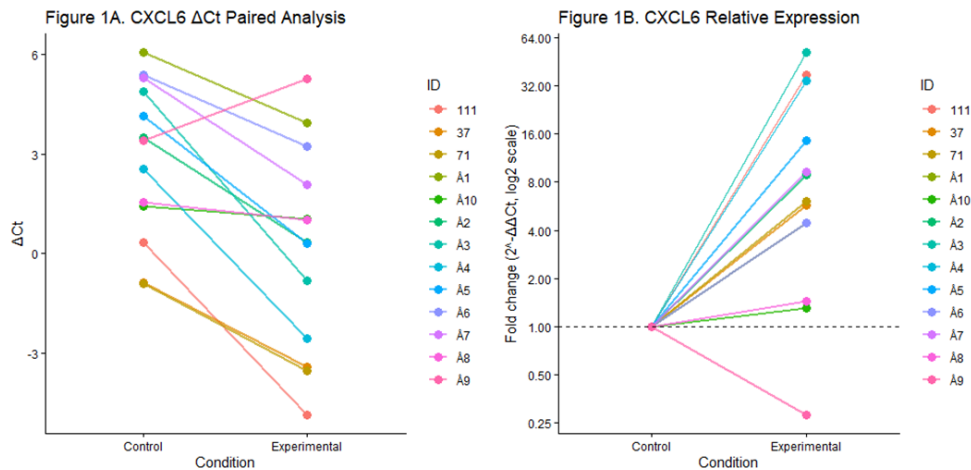
Tabell 7. Översikt resultat.

Individer	Exponeringstid	p-värde	Konfidensintervall	Genomsnittlig skillnad (mean difference)
Samtliga	-	<0,05	-3,96 till -1,38	-2,67
Kohort 1: Å6-Å10	6 timmar	>0,05	-3,28 till 1,5	-0,88
Kohort 2: Å1-Å5, 37, 71, 111	24 timmar	<0,05	-4,95 till -2,63	-3,79

4.1 Samtliga individer

När samtliga 13 individer analyserades tillsammans, oavsett tid för exponering, erhöles ett p-värde på 0,000694. Konfidensintervallet var -3,96 till -1,38. Den genomsnittliga skillnaden mellan exponerad och kontroll låg på -2,67.

Figur 1A och 1B visar skillnaden i genuttrycket av CXCL6 för samtliga individer oavsett längden på exponering. Figur 1A är baserad på ΔCt -värden, och Figur 1B är utifrån fold change ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) för lättare visualisering.

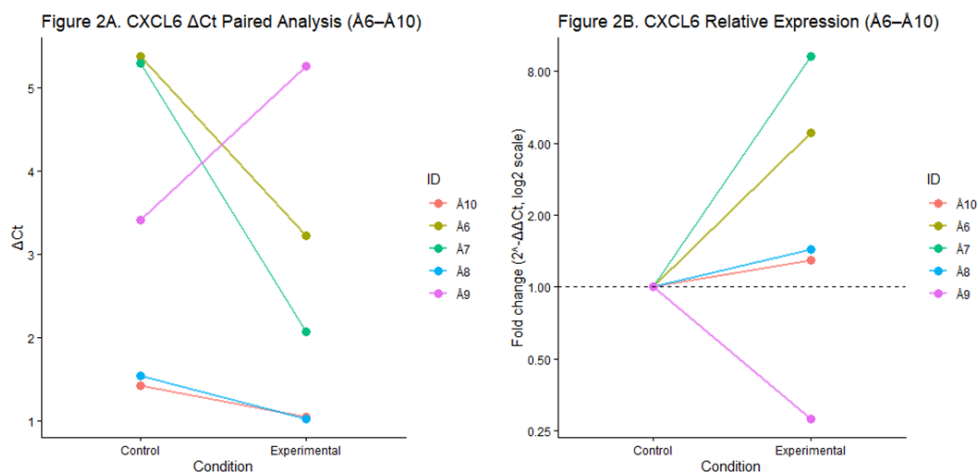


Figur 1A och B. Spaghetti plot över samtliga individer, oavsett tid för exponering. Figur 1A är utifrån värdena på ΔCt , och 1B är utifrån värdena på fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Å6-Å10 exponerades för *Parascaris* L3-larver i 6 timmar, och resterande individer i 24 timmar.

4.2 Första kohorten

För den första kohorten (individer Å6-Å10), erhölls ett p-värde på 0,3631. Konfidensintervallet var -3,28 till 1,5. Den genomsnittliga skillnaden låg på -0,88.

Figur 2A och 2B visar resultatet från den första kohorten, som blev exponerad i 6 timmar. 2A är utifrån ΔCt -värdena, och 2B är utifrån fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).



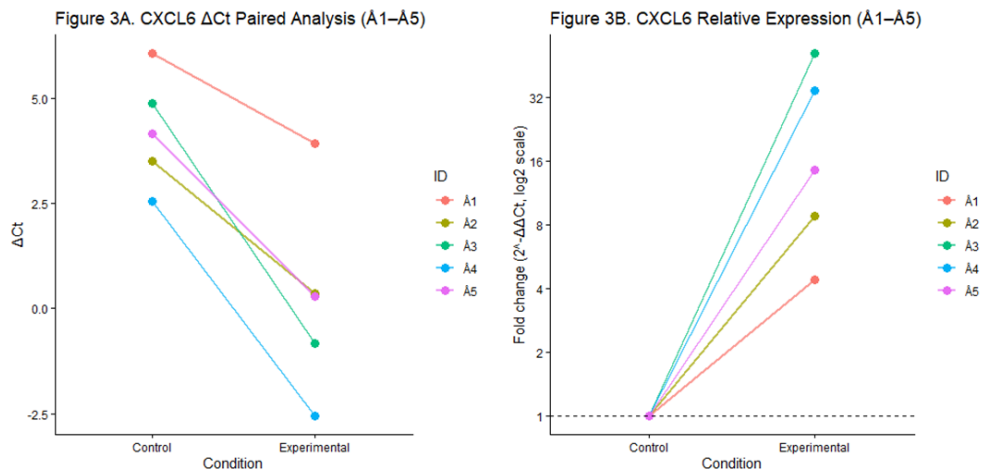
Figur 2A och B. Figur 2A visar en spaghetti plot utifrån ΔCt -värden för Å6-Å10 som blev exponerade i 6 timmar, och 2B är utifrån värdena på fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

4.3 Andra kohorten

För den andra kohorten, individer Å1-Å5, 37, 71, och 111, erhölls ett p-värde på 0,00012. Konfidensintervallet låg på -4,95 till -2,6267, och genomsnittlig skillnad

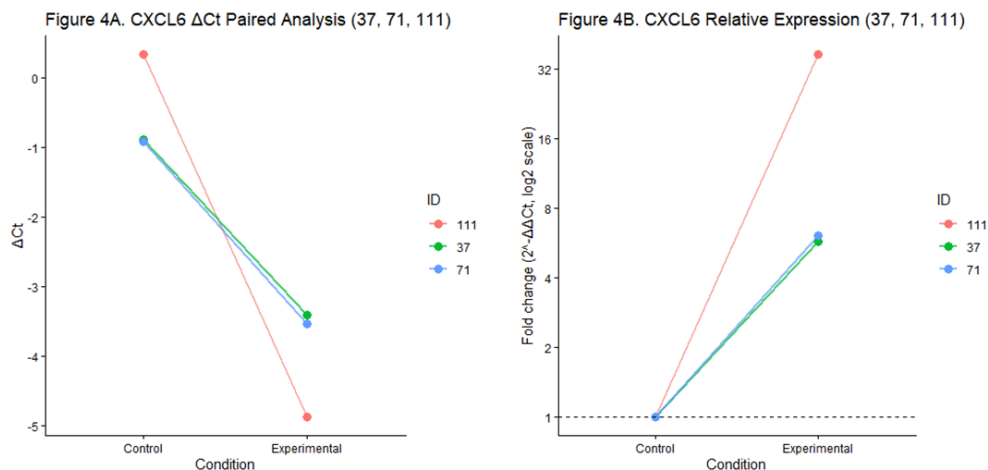
-3,788.

Figur 3A och 3B är resultatet från proven Å1-Å5, som kom från samma anläggning som Å6-Å10, men blev exponerade i 24 timmar. Figur 3A är en plot efter ΔCt -värdena, och Figur 3B är efter fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).



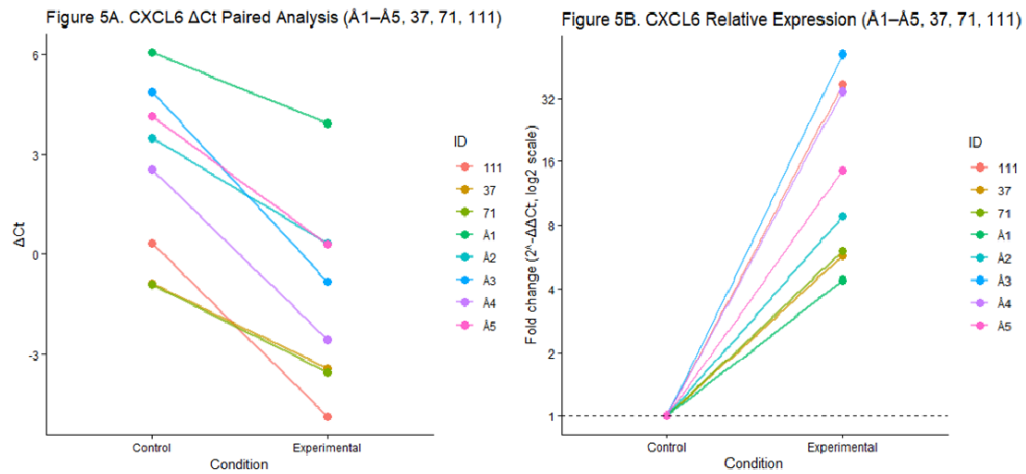
Figur 3A och B. Figur 3A är en spaghetti plot över ΔCt -värden från den andra kohorten, Å1-Å5, exponerade för *Parascaris* L3-larver i 24 timmar. Figur 3B är utifrån värdena på fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Figur 4A och 4B visar resultaten från individ 37, 71, och 111 som blev exponerade i 24 timmar. Figur 4A är efter ΔCt -värden, och 4B är utifrån fold change.



Figur 4A och B. Figur 4A visar en spaghetti plot över ΔCt -värden från prov från den andra kohorten, 37, 71, och 111, och 4B är utifrån fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Figur 5A och 5B visar resultatet från hela den andra kohorten, det vill säga individ Å1-Å5, 37, 71, och 111. Vilket är alla individer som blev exponerade i 24 timmar.



Figur 5A och B. Spaghetti plot över samtliga individer från den andra kohorten, 5A är utifrån ΔCt -värden, och 5B är utifrån fold change ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$).

5. Diskussion

Denna studie undersökte hur exponering för *Parascaris univalens* L3-larver påverkade uttrycket av CXCL6 i ekvina lungceller. Resultatet visade att CXCL6 uppreglerades efter exponering för larver, detta var särskilt tydligt i den andra kohorten som var exponerad i 24 timmar, vilket tyder på att genen skulle kunna vara involverad i det tidiga immunsvaret i lungorna mot parasitmasken.

5.1 Tolkning av resultat

Studien genomfördes i två separata kohorter. Den första kohorten bestod av fem äldre individer, Å6-Å10, och exponerades för *Parascaris*-larver under 6 timmar. Då resultatet från denna kohort var svårtolkat upprepades försöket med en andra kohort bestående av åtta individer, Å1-Å5, 37, 71, och 111 där exponeringstiden istället var 24 timmar. Den andra kohorten analyserades både tillsammans, och uppdelat i två grupper utefter vilken anläggning de kom ifrån.

För den första kohorten erhöles ett p-värde på över 0,05 vid Student's t-test, vilket tyder på att uppregleringen inte var statistiskt signifikant. En av individerna i den första kohorten (Å9) var en tydlig outlier då genuttrycket hos den individen var nedreglerat efter exponering. Det fanns misstankar om att den individen hade en pågående *Parascaris*-infektion, vilket skulle kunna förklara resultatet. När samma analys upprepades, men utan den individen låg p-värdet på 0,1054 vilket är lägre men fortfarande inte statistiskt signifikant. Det skulle kunna indikera att 6 timmars exponering inte är tillräckligt för att inducera ett tydligt CXCL6-svar, men man måste ha i åtanke att antalet individer i analysen är direkt kopplat till den statistiska styrkan. Färre individer ger större osäkerhet, och om det då som i detta fall finns en outlier påverkar den resultatet mycket. Konfidensintervallet för den första kohorten sträckte sig över 0 vilket återigen indikerar att skillnaden före och efter exponering inte var signifikant. Den genomsnittliga skillnaden (mean difference) var ungefär -0,88 för hela kohorten, och standardfelet var 0,86 vilket nästan är lika stort som den genomsnittliga skillnaden. Det gör uppskattningen osäker. Få individer och stor variation gav även en hög standardavvikelse, 1,93.

I den andra kohorten exponerades cellerna för *Parascaris* i 24 timmar, och analysen för alla yngre individer tillsammans (Å1-Å5, 37, 71, och 111) gav ett p-värde på under 0,05 vilket tyder på att uppregleringen av CXCL6 var statistisk signifikant. Konfidensintervallet låg på -4,95 till -2,63, och en genomsnittlig skillnad på -3,79. Standardfelet var 0,5 vilket är litet jämfört med den genomsnittliga skillnaden. Standardavvikelsen låg på 1,39.

Separat analys gav ett p-värde på 0,0034 för individ Å1-Å5, som kom från samma anläggning som individ Å6-Å10, och ett p-värde på 0,0597 för individ 37, 71, och 111 som kom från en annan anläggning. Detta tyder på att uppregleringen

i första gruppen var signifikant, men inte i den andra gruppen, trots att alla individer hade uppreglerat uttryck. Men i detta fall får man även ta hänsyn till att antalet individer i vardera grupp var väldigt få till antalet, speciellt i den andra gruppen som bara bestod av tre individer.

När samtliga individer analyserades tillsammans oavsett exponeringstid blev p-värdet 0,000694 vilket indikerar statistisk signifikans. Detta beror sannolikt på att den andra kohorten uppvisade en starkare respons samt att fler individer i analysen gav större säkerhet. Analysen upprepades även utan individ Å9 för att se om det gjorde någon skillnad, och det gav ett ännu lägre p-värde. Konfidensintervallet för analysen av samtliga individer låg på -3,96 till -1,38. Den genomsnittliga skillnaden före och efter exponering var -2,67, och standardfelet var ungefär 0,6 vilket är litet i jämförelse. Oavsett vilka individer man har med i analysen tyder resultatet i alla fall på en tendens till uppreglering.

Som referensgener användes GAPDH och RPL32. Referensgener fungerar som interna kontroller, och används för att kunna normalisera datan från qPCR och korrigera för eventuell variation mellan olika prover. Det är viktigt att använda gener som uttrycks konstant i celltyper och för grundläggande funktioner då man vill att de ska vara stabila.

GAPDH är ett enzym som katalyserar den oxidativa fosforyleringen av glyceraldehyd-3-fosfat under glykolysen. Den används rutinmässigt för normalisering av data från qPCR-analyser (Sikand et al., 2012). RPL32 är en gen som kodar för en strukturell komponent av ribosomers 60S subenhet. Den är att föredra över GAPDH eftersom den uttrycks stabilt i olika vävnader, och har visats lämplig att använda för qPCR i bronkoalveolärceller (Kriegova et al., 2008).

I ingen av kohorten observerades någon signifikant ändring av referensgenernas uttryck, det är som förväntat då referensgenerna behöver vara stabila. Det är även en viktig kvalitetskontroll och tyder på att förändringarna av CXCL6 sannolikt reflekterar biologiska förändringar inducerade av L3-larver, och inte bara tekniska artefakter eller andra felkällor.

5.2 Biologisk tolkning

Att uttrycket av CXCL6 uppregleras kan tyda på att genen är involverad i lungcellernas immunsvaret mot *Parascaris univalens* L3-larver, eftersom det innebär att genuttrycket ökade efter exponering, i alla fall *in vitro*. Att uppregleringen var signifikant innebär även att den inte bara var slumpmässig. Den stora variationen mellan individer innebär dock att resultatet bör tolkas med viss försiktighet.

CXCL6 kodar för en proinflammatorisk kemokin som är starkt kopplad till aktivering av immunsvaret, speciellt neutrofilrekrytering till inflammation och infektion. Då neutrofiler ofta associeras med tidiga infektioner kan det tyda på att CXCL6 är viktig i det tidiga försvaret mot patogener. När spolmaskslarverna

vandrar genom lungvävnaden kan de trigga komplexa immunkaskader vilket resulterar i uppreglering av CXCL6 hos de immunceller som vanligen uttrycker genen, vilket bidrar till larvinducerad lunginflammation. Uppregleringen i proverna var därmed biologiskt rimligt efter att cellerna hade utsatts för inflammatorisk stimulans i form av parasitära antigen.

Att uppregleringen blev signifikant i andra kohorten kan även tyda på att svaret blir tydligare efter 24 timmars exponering, än efter 6 timmar. Det skulle kunna tyda på att uttrycket av CXCL6 är tidsberoende och ökar efter längre exponering för larverna, i alla fall upp till 24 timmar. Den starkare responsen efter 24 timmar är biologiskt rimlig eftersom inflammatoriska signalvägar och transkriptionell aktivering kan kräva tid.

Studier som gjorts på parasitära infektioner i lungvävnad visar på ett cytokinmönster som skulle kunna hjälpa till att förklara det bredare sammanhanget som CXCL6 verkar i. När *Ascaris*-larver är i lungorna triggar det ett starkt, både medfött och adaptivt, immunsvaret som karaktäriseras av ökade nivåer av cytokinerna IL-4, IL-5, IL-6, och IL-33 (Vieira-Santos et al., 2021). Immunsvaret ökar vid upprepade exponeringar för *Ascaris*, vilket leder till ökade nivåer av systemiska cytokiner som IL-4, IL-10, IL-17a, och TNF-alpha (Nogueira et al., 2016). Cytokiner som IL-17 och TNF-alpha bidrar till neutrofilmigration, och gör att mikromiljön blir fördelaktig för neutrofiler. Eftersom dessa cytokiner som är associerade med neutrofiler ökar vid parasitmaskinfektion är det inte helt omöjligt att det är rimligt att CXCL6 också uppregleras.

Även om forskning har gjorts på *Parascaris univalens*, lungans immunsvaret, och CXCL6 var för sig, är det inte mycket som har gjorts som inkluderar alla delar tillsammans, speciellt inte gällande förändringar i genuttrycket. Enbart att hitta information om *Parascaris univalens* påverkan på immunsvaret var svårt och mycket information är extrapolerad från andra ascarider och djurslag. Sökorden "Parascaris" och "CXCL6" gav tillsammans inget resultat vid sökning på vanliga databaser för artiklar, bland annat PubMed och Google Scholar. Det gav inte heller något resultat vid sökning i AI-litteratursökmotorer.

Då mycket av informationen kring CXCL6 kommer från studier gjorda på människor gör det tolkningen av resultatet i denna kontext mer osäker. Mycket forskning som gjorts på CXCL6 har varit länkad till specifika sjukdomstillstånd, och man kan inte dra slutsatsen om kemokinens påverkan i alla celler, vävnader, och vid alla tillstånd. Det gjorde att den publicerade informationen som fanns att tillgå gav väldigt begränsat med hjälp med avseende på *Parascaris* spp. och ekvina lungceller. Däremot är kemokinen starkt länkad till neutrofiler, och vid parasitmaskinfektioner har man sett att neutrofiler är involverade. Det kan vara en tydlig indikator på att genen faktiskt är involverad i immunsvaret mot *Parascaris univalens*, även om mekanismerna inte är klarlagda. Men det är ytterligare en anledning till varför det är viktigt att forska mer kring detta ämne.

Om man jämför dessa resultat med pilotstudien så stämmer det att CXCL6 ska vara uppreglerad efter exponering, vilket stärker hypotesen. Det stämmer även överens med andra studier som extrapolerats från andra djurslag eller andra sjukdomstillstånd.

5.3 Begränsningar och förbättringar

Begränsningar i detta arbete var att det var lungceller från få individer som användes, och dessa individer var även relativt lika i avseende på exempelvis ras. Detta kan dock även ses som en styrka då det kan ta bort variationen som skulle kunna uppstå mellan olika raser. Individerna var mellan 6 månader till 5 år gamla, och de i den första kohorten (Å6-Å10) var äldst. Detta kan ha påverkat resultatet och vara ytterligare en anledning till varför den första kohorten var lite klurig då det är större sannolikhet att de har varit infekterade tidigare i livet och byggt upp ett försvar mot parasitmasken.

Då det var få individer minskar den statistiska styrkan utifrån hur signifikans räknas, då provantalet spelar in. Kraven för ett parat t-test är bland annat beroende av stickprovsstorleken och att mätningarna ska vara normalfördelade. Ett större antal individer minskar standardfelet och ger en högre sannolikhet att se en faktisk skillnad eftersom risken för typ II-fel blir lägre. Detta blev speciellt tydligt när analysen delades upp i de olika kohorterna, och kan vara en anledning till den statistiska signifikansen i uppreglering sett till hela studien, eftersom fler individer gör att påverkan från eventuella outliers blir lägre. Ett annat krav för parat t-test är att mätvärdena måste komma från samma objekt eller individ, det vill säga biologiska replikat i detta fall. Lungcellerna som exponerades jämfördes med sin egna kontroller, från samma individ och tillfälle utsådda i triplikat, men eftersom det inte var samma celler som agerade som sin egen kontroll kan man motivera för att det skulle vara tekniska replikat istället för biologiska.

Variationen i resultaten kan bero på flera faktorer, exempelvis kan individuell variation i immunrespons påverka. Andra möjliga confounders är skillnader i celltäthet och celltyp i kulturerna från BAL-vätskan, variation i kvaliteten på RNA:et som extraherades, samt variation i basal inflammationsnivå mellan individer. Det sistnämnda är dock inte så troligt att det har någon större påverkan eftersom proven jämfördes mot sina egna kontroller. Tekniska faktorer som effektiviteten av cDNA-syntesen, och variation i pipettering kan också spela in. Att en individ även skulle kunna haft en pågående infektion när det bronkoalveolära lavaget utfördes kan ha påverkat analysen.

Man måste även ta hänsyn till själva upplägget på studien då man tolkar resultatet, då den genomfördes *in vitro*. Cellerna var tvättade med PBS och exponerades i en kontrollerad serumfri cellkulturmiljö. Det återspeglar inte de immunologiska processerna som sker i en levande organism. Det är särskilt relevant när man ser på immunförsvaret eftersom det är många celler och

proteiner som interagerar med varandra. Parasitmaskarna i sig är även komplexa organismer, och återfinns i fler vävnader och utvecklingsstadier i värden samtidigt, vilket inte heller kan återspeglas *in vitro*.

Dessutom analyserades bara genuttryck, inte proteinmängd, även om ökat genuttryck i teorin bör leda till ökade nivåer av proteinet. Det behövs därför kompletterande analyser om man är intresserad av den biologiska betydelsen av själva kemokinen vid spolmaskinfektioner.

Utöver detta så är inte CXCL6 specifik för spolmaskinfektioner, så även om den skulle kunna användas som biomarkör behöver analyserna göras i kombination med andra biologiskt relevanta mätpunkter.

Förslag till framtida studier är att upprepa detta med fler individer och fler exponeringstider. Det är även relevant att undersöka fler inflammatoriska markörer för att få en bredare bild av immunresponsen och mekanismerna bakom. Om nödvändigt kan man även i framtiden gå vidare med *in vivo* studier då det kan skilja sig från *in vitro* eftersom levande organismer är mer komplicerade och det är fler celler och signalvägar som spelar in.

6. Slutsats

I detta försök observerades en signifikant uppreglering av CXCL6 i ekvina lungceller efter exponering för *Parascaris univalens* L3-larver. Resultatet stödjer hypotesen om att CXCL6 uppregleras och skulle kunna vara involverad i det tidiga inflammatoriska svaret i hästens lungor vid spolmaskinfektion. Ytterligare studier krävs dock för att bekräfta dessa fynd och för att avgöra om CXCL6 skulle kunna fungera som en praktiskt användbar biomarkör hos häst.

Referenser

- Akula, S., Riihimäki, M., Waern, I., Åbrink, M., Raine, A., Hellman, L., Wernersson, S. (2022). Quantitative Transcriptome Analysis of Purified Equine Mast Cells Identifies a Dominant Mucosal Mast Cell Population with Possible Inflammatory Functions in Airways of Asthmatic Horses. *International journal of molecular sciences*, 12;23(22):13976. DOI: 10.3390/ijms232213976
- Amorim, C. C. O., Nogueira, D. S., Gazzinelli-Guimaraes, A. C., Leal-Silva, T., Barbosa, F. S., Oliveira, F. M. S., Kraemer, L. R., de Almeida, R. M., Souza, J. L. N., Magalhaes, L. M. D., Russo, R. C., Caliari, M. V., Gaze, S., Bueno, L. L., Fujiwara, R. T. (2024). Dose-response effects of multiple *Ascaris suum* exposures and their impact on lung protection during larval ascariasis. *PLOS neglected tropical diseases*, 18(2). DOI: 10.1371/journal.pntd.0012678
- Bahudhanapati, H., Tan, J., Apel, R. M., Seeliger, B., Schupp, J., Li, X., Sullivan, D. I., Sembrat, J., Rojas, M., Tabib, T., Valenzi, E., Lafyatis, R., Mitash, N., Hernandez Pineda, R., Jawale, C. (2024). Increased expression of CXCL6 in secretory cells drives fibroblast collagen synthesis and is associated with increased mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal*, 63(1): 2300088.
- Besnard, A.-G., Struyf, S., Guabiraba, R., Fauconnier, L., Rouxel, N., Proost, P., Uyttenhove, C., Van Snick, J., Couillin, I., Ryffel, B. (2013). CXCL6 antibody neutralization prevents lung inflammation and fibrosis in mice in the bleomycin model. *Journal of leukocyte biology*, 94(6):1317-23. DOI: 10.1189/jlb.0313140
- Boshagh, M. A., Foroutan, P., Moloudi, M. R., Fakhari, S., Malakouti, P., Nikkhoo, B., Jalili, A. (2019). ELR positive CXCL chemokines are highly expressed in an animal model of ulcerative colitis. *Journal of inflammation research*, 25:12:167-174. DOI: 10.2147/JIR.S203714
- Bowman, D.D., Georgi, J.R. (2009). Georgis' parasitology for veterinarians. 9. ed. Saunders Elsevier.
- Brown, P.J., Clayton, H.M. (1979). Hepatic pathology of experimental *Parascaris equorum* infection in worm-free foals. *Journal of Comparative Pathology*, 89 (1), 115–123. DOI: [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(79\)90015-X](https://doi.org/10.1016/0021-9975(79)90015-X)
- Bullock, K. K., Richmond, A. (2021). Suppressing MDSC Recruitment to the Tumor Microenvironment by Antagonizing CXCR2 to Enhance the Efficacy of Immunotherapy. *Cancers*, 13. DOI:10.3390/cancers13246293
- Bundgaard, L., Stensballe, A., Elbæk, K.J., Berg, L. C. (2020). Mass spectrometric analysis of the in vitro secretome from equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells to assess the effect of chondrogenic differentiation on response to interleukin-1 β treatment. *Stem Cell Research and Therapy*, 11, 187. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01706-7>
- Burk, S., Dangoudoubiyam, S., Brewster-Barnes, T., Howe, D., Carter, C., Bryant, U. K., Rossano, M. (2016). Equine antibody response to larval *Parascaris equorum*

- excretory-secretory products. *Veterinary Parasitology*, 226, 83-7. DOI: 10.1016/j.vetpar.2016.06.036
- Cheng, Y., Ma, X.-L., Wei, Y.-Q., Wei, X.-W. (2019). Potential roles and targeted therapy of the CXCLs/CXCR2 axis in cancer and inflammatory diseases. *BBA Reviews on Cancer*, 1871(2), 289-312. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.01.005>
- Chittur, S., Parr, B., Marcovici, G. (2011). Inhibition of inflammatory gene expression in keratinocytes using a composition containing carnitine, thioctic Acid and saw palmetto extract. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2011:2011:985345. DOI: 10.1093/ecam/nep102
- Coakley, G., Buck, A. H., Maizels, R. M. (2016). Host parasite communications- Messages from helminths for the immune system: Parasite communication and cell-cell interactions. *Molecular and biochemical parasitology*, 208(1):33-40. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2016.06.003
- Cooper, P. J., Chico, M. E., Sandoval, C., Espinel, I., Guavara, A., Kennedy, M. W., Urban Jr, J. F., Griffin, G. E., Nutman, T. B. (2000). Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with a polarized cytokine response. *The journal of infectious diseases*, 182(4):1207-13. DOI: 10.1086/315830
- Cribb, N. C., Cote, N. M., Bouré, L. P., Peregrine, A. S. (2006). Acute small intestinal obstruction associated with *Parascaris equorum* infection in young horses: 25 cases (1985-2004). *New Zealand Veterinary Journal*, 54(6), 338-43. DOI: 10.1080/00480169.2006.36721
- Crosby, L. M., Waters, C. M. (2010). Epithelial repair mechanisms in the lung. *American journal of physiology*, 298(6):L715-31. DOI: 10.1152/ajplung.00361.2009
- Dawson, H. D., Beshah, E., Nishi, S., Solano-Aguilar, G., Morimoto, M., Zhao, A., Madden, K. B., Ledbetter, T. K., Dubey, J. P., Shea-Donohue, T., Lunney, J. K., Urban Jr, J. F. (2005). Localized Multigene Expression Patterns Support an Evolving Th1/Th2-Like Paradigm in Response to Infections with *Toxoplasma gondii* and *Ascaris suum*. *Infection and immunity*, 73, 116-1128. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.73.2.1116-1128.2005>
- Du, J., Liu, H., Wang, P., Wu, W., Zheng, F., Wang, Y., Meng, B. (2024). Identification and analysis of inflammation-related biomarkers in tetralogy of Fallot. *Translational pediatrics*, 13(7):1033-1050. DOI: 10.21037/tp-24-8
- Fahy, J. V., Dickey, B. F. (2010). Airway mucus function and dysfunction. *The New England journal of medicine*, 2;363(23):2233-47. DOI: 10.1056/NEJMra0910061
- Fossum, S. L., Mutolo, M. J., Tugores, A., Ghosh, S., Randell, S. R., Jones, L. C., Leir, S., Harris, A. (2017). Ets homologous factor (EHF) has critical roles in epithelial dysfunction in airway disease. *The Journal of biological chemistry*, 30;292(26):10938-1094. DOI:10.1074/jbc.M117.775304
- Foster, N., Elsheikha, H.M. (2012). The immune response to parasitic helminths of veterinary importance and its potential manipulation for future vaccine control

- strategies. *Parasitol Res*, 110, 1587–1599. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2832-y>
- Gazzinelli-Guimaraes, P. H., Nutman, T. B. (2018). Helminth parasites and immune regulation. *FL1000research*. DOI: 10.12688/fl1000research.15596.1
- Geginat, J., Paroni, M., Maglie, S., Alfen, J. S., Kastirr, I., Gruarin, P., De Simone, M., Pagani, M., Abrignani, S. (2014). Plasticity of Human CD4 T Cell Subsets. *Frontiers in Immunology*, 16;5:630. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00630
- Gijssbers, K., Van Assche, G., Joossens, S., Struyf, S., Proost, P., Rutgeerts, P., Geboes, K., Van Damme, J. (2004). CXCR1-binding chemokines in inflammatory bowel diseases: down-regulated IL-8/CXCL8 production by leukocytes in Crohn's disease and selective GCP-2/CXCL6 expression in inflamed intestinal tissue. *European journal of immunology*, 34(7): 1992-2000. DOI: 10.1002/eji.200324807
- Gressler, A. E., Lubke, S., Wagner, B., Arnold, C., Lohmann, K. L., Schnabel, C. L. (2022). Comprehensive Flow Cytometric Characterization of Bronchoalveolar Lavage Cells Indicates Comparable Phenotypes Between Asthmatic and Healthy Horses But Functional Lymphocyte Differences. *Frontiers in Immunology*, 13:896255. DOI: 10.3389/fimmu.2022.896255
- Hallstrand, T. S., Hackett, T. L., Altemeier, W. A., Matute-Bello, G., Hansbro, P. M., Knight, D. A. (2014). Airway epithelial regulation of pulmonary immune homeostasis and inflammation. *Clinical Immunology*, 151(1):1-15. DOI: 10.1016/j.clim.2013.12.003
- Kang, H., Cheong Lee, G. K., Bienzle, D., Arroyo, L. G., Sears, W., Nillie, B. N., Beeler-Marfisi, J. (2023). Equine alveolar macrophages and monocyte-derived macrophages respond differently to an inflammatory stimulus. *PLoS One*, 18(3). DOI: 10.1371/journal.pone.0282738
- Kaplan, R. M. (2004). Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology*, 20(10), 477-481. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.08.001>
- Kriegova, E., Arakelyan, A., Fillerova, R., Zatloukal, J., Mrazek, F., Navratilova, Z., Kolek, V., du Bois, R. M., Petrek, M. (2008). PSMB2 and RPL32 are suitable denominators to normalize gene expression profiles in bronchoalveolar cells. *BMC Molecular Biology*, 9(69). DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-69>
- Lamberton, P. H., Jourdan, P. M. (2015). Human Ascariasis: Diagnostics Update. *Current Tropical Medicine Reports*, 2(4), 189-200. DOI: 10.1007/s40475-015-0064-9
- Liu, Q., Russell, M. R., Shahriari, K., Jernigan, D. L., Lioni, M. I., Garcia, F. U., Fatatis, A. (2013). Interleukin-1 β Promotes Skeletal Colonization and Progression of Metastatic Prostate Cancer Cells with Neuroendocrine Features. *Cancer Res*, 73(11), 3297-3305. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3970>
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402-408.

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202301912629?via%3Dihub>
- Ma, J.-C., Sun, X.-W., Su, H., Chen, Q., Guo, T.-K., Li, Y., Chen, X.-C., Guo, J., Gong, Z.-Q., Zhao, X.-D., Qi, J.-B. (2017). Fibroblast-derived CXCL12/SDF-1 α promotes CXCL6 secretion and co-operatively enhances metastatic potential through the PI3K/Akt/mTOR pathway in colon cancer. *World journal of gastroenterology*, 23(28), 5167-5178. DOI: 10.3748/wjg.v23.i28.5167
- Miller, M.C. och Mayo, K.H. (2017). Chemokines from a structural perspective. *International journal of molecular science*, 18(2088). DOI:10.3390/ijms18102088
- Moss, C. D., Wilson, A. L., Reed, K., Jennings, K. J., Kunz, I., Landolt, G. A., Metcalf, J. L., Engle, T. E., Coleman, S. (2024). Gene Expression Analysis before and after the Pelvic Flexure in the Epithelium of the Equine Hindgut. *Animals*. DOI: 10.2147/JIR.S203714
- Nicholls, J.M., Clayton, H. M., Pirie, H. M., Duncan, J. L. (1978). A pathological study of the lungs of foals infected experimentally with *Parascaris equorum*. *Journal of Comparative Pathology*, 88(2), 261-74. DOI: 10.1016/0021-9975(78)90030-0
- Nielsen, M. K. (2015). Evidence-based considerations for control of *Parascaris* spp. Infections in horses. *Equine Veterinary Education*, 28(4), 224-231. DOI: <https://doi.org/10.1111/eve.12536>
- Nogueira, D., Gazzinelli-Guimaraes, P., Barbosa, F., Resende, N. M., Silva, C., de Oliveira, L. M., Amorim, C., Oliveira, F., Mattos, M., Kraemer, L., Caliari, M., Gaze, S., Bueno, L., Russo, R. C., Fujiwara, R. (2016). Multiple Exposures to *Ascaris suum* Induce Tissue Injury and Mixed Th2/Th17 Immune Response in Mice. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004382
- Oliveira-Ferrer, L., Milde-Langosch, K., Eylmann, K., Rossberg, M., Muller, V., Schmalfeldt, B., Witzel, I., Wellbrock, J., Fiedler, W. (2020). Mechanisms of Tumor-Lymphatic Interactions in Invasive Breast and Prostate Carcinoma. *International journal of molecular sciences*, 17;21(2):602. DOI: 10.3390/ijms21020602
- Osterman Lind, E., Rautalinko, E., Ugglä, A., Waller, P. J., Morrison, D. A., Höglund, J. (2007). Parasite control practices on Swedish horse farms. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 49(1):25. DOI: 10.1186/1751-0147-49-25
- Pampalone, M., Cuscino, N., Iannolo, G., Amico, G., Ricordi, C., Vitale, G., Carcione, C., Castelbuono, S., Scilabra, S. D., Coronello, C., Gruttadauria, S., Pietrosi, G. (2024), Human Amniotic MSC Response in LPS-Stimulated Ascites from Patients with Cirrhosis: FOXO1 Gene and Th17 Activation in Enhanced Antibacterial Activation. *International Journal of Molecular Sciences*, 28; 25(5):2801. DOI: 10.3390/ijms25052801
- Pham, C. T. N. (2006). Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nature reviews. Immunology*, 6(7):541-50. DOI: doi: 10.1038/nri1841
- Proost, P., De Wolf-Peters, C., Conings, R., Opdenakker, G., Billiau, A., Van Damme, J. (1993). Identification of a novel granulocyte chemotactic protein (GCP-2) from

- human tumor cells. In vitro and in vivo comparison with natural forms of GRO, IP-10, and IL-8. *Journal of Immunology*, 1;150(3):1000-10.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8423327/>
- Reinemeyer, C. R. (2009). Diagnosis and control of anthelmintic-resistant *Parascaris equorum*. *Parasites and Vectors*, 2, S8. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-S2-S8>
- Richard, E. A., Depecker, M., Defrontis, M., Leleu, C., Fortier, G., Pitel, P.-H., Courouche-Malblanc, A. (2014). Cytokine Concentrations in Bronchoalveolar Lavage Fluid from Horses with Neutrophilic Inflammatory Airway Disease. *Journal of veterinary Internal Medicine*, 28(6), 1838-1844. DOI: <https://doi.org/10.1111/jvim.12464>
- Rohde, G., Message, S. D., Haas, J. J., Keadze, T., Parker, H., Laza-Stance, V., Khaitov, M. R., Kon, O. M., Stanciu, L. A., Mallia, P., Edwards, M. R., Johnston, S. L. (2014). CXC chemokines and antimicrobial peptides in rhinovirus-induced experimental asthma exacerbations. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 44(7):930-9. DOI: 10.1111/cea.12313
- Sikand, K., Singh, J., Ebron, J. S., Shukla, G. C. (2012). Housekeeping Gene Selection Advisory: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) and β -Actin Are Targets of miR-644a. *PLoS One*, 16;7(10). DOI: 10.1371/journal.pone.0047510
- Strieter, R., Polverini, P., Kunkel, S., Arenberg, D., Burdick, M., Kasper, J., Dzuiba, J., Van Damme, J., Walz, A., Marriott, D., Chan, S., Roczniak, S., & Shanafelt, A. (1995). The Functional Role of the ELR Motif in CXC Chemokine-mediated Angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 27348-27357. DOI: 10.1074/jbc.270.45.27348
- Sun, S., Ren, J., Zeng, X., Chen, Y., Zhou, Q., Yang, J., Chen, S. (2025). Integrated machine learning and single-cell RNA sequencing reveal COL4A2 and CXCL6 as oxidative stress-associated biomarkers in periodontitis. *Frontiers in immunology*, 5:16:1598642. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1598642
- Tamimi, R., Mahmoodi, N. M., Samadikhah, H. R., Tackallou, S. H., Benisi, S. Z., Boroujeni, M. E. (2022). Anti-inflammatory effect of green photobiomodulation in human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Lasers in medical science*, 37(9), 3693-3702. DOI: 10.1007/s10103-022-03654-5
- Tatz, A. J., Segev, G., Steinman, A., Berlin, D., Milgram, J., Kelmer, G. (2011). Surgical treatment for acute small intestinal obstruction caused by *Parascaris equorum* infection in 15 horses (2002-2011). *Equine veterinary journal. Supplement*, 43, 111-4. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2012.00607.x.
- Taylor, M. A., Coop, R. L., Wall, R. L. (2016). *Veterinary Parasitology*. 4. ed. Wiley-Blackwell. DOI:10.1002/9781119073680
- Tomonaga, T., Higashi, H., Izumi, H., Nishida, C., Kawai, N., Sato, K., Morimoto, T., Higashi, Y., Yatera, K., Morimoto, Y. (2024). Investigation of pulmonary inflammatory responses following intratracheal instillation of and inhalation

- exposure to polypropylene microplastics. *Particle and fibre toxicology*, 6;21(1):29. DOI: 10.1186/s12989-024-00592-8
- Touzelet, O., Broadbent, L., Armstrong, S. D., Aljabr, W., Cloutman-Green, E., Power, U. F., Hiscox, J. A. (2020). The Secretome Profiling of a Pediatric Airway Epithelium Infected with hRSV Identified Aberrant Apical/Basolateral Trafficking and Novel Immune Modulating (CXCL6, CXCL16, CSF3) and Antiviral (CEACAM1) Proteins. *Molecular and Cellular Proteomics*, 19(5):793-807. DOI: 10.1074/mcp.RA119.001546
- Traves, S. L., Donnelly, L. (2008). Th17 cells in airway diseases. *Current molecular medicine*, 8(5):416-26. DOI: 10.2174/156652408785160998
- UniProt (u.å.). UniProt. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q8MIN2/entry> [2026-01-23]
- Urquhart, G. M., Armour, J., Duncan, L., Dunn, A. M., Jennings, F. W. (no date) *Veterinary Parasitology*
- Vieira-Santos, F., Leal-Silva, T., de Lima Silva Padrao, L., Ruas, A., Nogueira, D., Kraemer, L., Oliveira, F., Caliari, M., Russo, R. C., Fujiwara, R., Bueno, L. (2021). Concomitant experimental coinfection by Plasmodium berghei NK65-NY and Ascaris suum downregulates the Ascaris-specific immune response and potentiates Ascaris-associated lung pathology. *Malaria Journal*, 20. DOI: 10.1186/s12936-021-03824-w
- Wan, Y. Y. (2010). Multi-tasking of helper T cells. *Immunology*, 130(2): 166-171. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2010.03289.x
- Yan, Q., Liu, S., Sun, Y., Chen, C., Yang, Y., Yang, S., Lin, M., Long, J., Lin, Y., Liang, J., Ai, Q., Chen, N. (2024). CC chemokines Modulate Immune responses in Pulmonary Hypertension. *Journal of Advanced Research*, 63, 171-186. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2023.10.015>
- Yehia, S. A., Badr, A. M., Bashtar, A., Ibrahim, M. A., Mousa, M. R., Mostafa, N. A. (2024). Immune response, oxidative stress, and histological changes of Wistar rats after being administered with Parascaris equorum antigen. *Sci Rep*, 14, 18069. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-67788-y>
- Young, A., Finno, C. (2022). Intestinal Parasites in Horses. <https://ceh.vetmed.ucdavis.edu/health-topics/intestinal-parasites-horses>[2026-06-12]
- Zhou, M., Lu, Y., Han, L., Lu, M., Guan, C., Yu, J., Liu, H., Chen, D., Li, H., Yang, Y., Zhang, L., Tian, L., Liu, Q., Hou, Z. (2023). Exploration of Parascaris species in three different Equus populations in China. *Parasites and Vectors*, Jun 15;16:202. DOI: 10.1186/s13071-023-05768-3
- Zlotnik, A., Yoshie, O. (2012). The Chemokine Superfamily Revisited. *Immunity*, 36(5), 705-716. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.05.008

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU kan publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver i sådana fall godkänna publiceringen. I samband med att du godkänner publicering kommer SLU även att behandla dina personuppgifter (namn) för att göra arbetet sökbart på internet. Du kan närsomhelst återkalla ditt godkännande genom att kontakta biblioteket.

Även om du väljer att inte publicera arbetet eller återkallar ditt godkännande så kommer det arkiveras digitalt enligt arkivlagstiftningen.

Du hittar länkar till SLU:s publiceringsavtal och SLU:s behandling av personuppgifter och dina rättigheter på den här sidan:

- <https://libanswers.slu.se/sv/faq/228316>

☒ JA, jag, Alexandra Barkfeldt har läst och godkänner avtalet för publicering samt den personuppgiftsbehandling som sker i samband med detta

☐ NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse till att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.