

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Biologická fakulta

Katedra obecné biologie



**Vliv interferonu gama (IFN- γ) a specifických polyklonálních
protilátek na průběh experimentální perorální infekce
*Encephalitozoon cuniculi in vivo***

Magisterská diplomová práce

Bc. Jiří Jelínek

Vedoucí práce: **Doc. RNDr. Jan Kopecký, CSc.**

Školitel specialista: **RNDr. Jiří Salát, PhD.**

Bc. Jelínek J., 2007: Vliv interferonu gama (IFN- γ) a specifických polyklonálních protilátek na průběh experimentální perorální infekce *Encephalitozoon cuniculi in vivo* [The influence of IFN- γ and specific antibodies on the p.o. infection with *Encephalitozoon cuniculi in vivo*] – 46 pp., Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The influence of IFN- γ and specific antibodies on the infection with *E. cuniculi in vivo* has been studied. Reconstruction of SCID mice with CD4+ T-lymphocytes from BALB/c mice and from mice with defect gene for IFN- γ was used. Effects of the treatment with mouse recombinant IFN- γ and anti-*E. cuniculi* sera on survival of *E. cuniculi* infected SCID mice were monitored. The influence of the immunization with *E. cuniculi* antigen on the survival of *E. cuniculi* infected mice with defect gene for IFN- γ was examined.

Tato práce byla financována grantem:

- grant č. 524/03/D167 Grantové agentury České republiky, řešitel RNDr. Jiří Salát, PhD.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou magisterskou práci vypracoval samostatně, pouze s použitím citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové magisterské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 26. dubna 2007

.....

*Chtěl bych poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. za podporu a vstřícnost, školiteli specialistovi RNDr. Jiřímu Salátovi, PhD. za vynikající vedení mé práce, Mgr. Jindřichovi Chmelařovi za výrobu rekombinantního myšního IFN- γ , RNDr. Bohumilovi Sakovi, PhD. za spóry *E. cuniculi* a celému pracovnímu kolektivu oddělení Imunologie parazitóz, Biologické centrum, AV ČR v Českých Budějovicích. V neposlední řadě bych touto cestou rád poděkoval svým rodičům za velkou podporu při studiu a Martině Růžičkové za skoro nekonečnou trpělivost.*

Obsah

1. Úvod	6
1.1. Mikrosporidie	6
1.1.1. Taxonomie	6
1.1.2. Morfologie	6
1.1.3. Životní cyklus	7
1.1.3.1. Přenos mikrosporidií na hostitele	7
1.1.3.2. Mechanismus vystřelení pólového vlákna	8
1.1.3.3. Infekce hostitelské buňky	8
1.1.3.4. Vývoj mikrosporidie v hostitelské buňce	10
1.1.3.5. Šíření mikrosporidiové infekce.....	10
1.1.4. Mikrosporidíóza u člověka	10
1.1.5. Diagnostika a léčba mikrosporidíózy	11
1.2. <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	12
1.3. Imunitní odpověď savčích hostitelů na infekci <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	12
1.3.1. Význam buněčné složky imunity při infekci <i>E. cuniculi</i>	12
1.3.1.1. Význam CD8+ T- a CD4+ T-lymfocytů.....	12
1.3.1.2. Význam NK buněk a $\gamma\delta$ T-lymfocytů.....	13
1.3.1.3. Úloha interferonu gama a interleukinu 12	14
1.3.1.4. Cytotoxický T-lymfocytární odpověď	14
1.3.2. Význam humorální složky imunity při infekci <i>E. cuniculi</i>	15
1. 4. Myši s defektním genem pro IFN- γ	16
1. 5. Myši s těžkou kombinovanou imunodeficiencí (SCID myši)	16
2. Cíle Práce	17
3. Materiál a metody	18
3.1. Spóry <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	18
3.2. Čištění spor <i>E. cuniculi</i>	18
3.3. Myši	18
3.4. Experimentální perorální infekce <i>E. cuniculi</i>	19
3.5. Pozitivní izolace CD4+ T-lymfocytů	19
3.5.1. Příprava suspenze splenocytů	19
3.5.2. Deplece CD8+ T-lymfocytů	19
3.5.3. Pozitivní imunomagnetická separace CD4+ T-lymfocytů	19
3.6. Analýza jednotlivých buněčných subpopulací pomocí průtokové cytometrie ..	20
3.7. Získání anti- <i>E. cuniculi</i> séra	21
3.8. Titrace myšího rekombinantního IFN- γ	21
3.9. Příprava antigenu <i>E. cuniculi</i> a následná imunizace myší s defektním genem pro IFN- γ	22
3.10. Monitorování hladiny anti- <i>E. cuniculi</i> IgG protilátek v průběhu infekce <i>E. cuniculi</i> u myší s defektním genem pro IFN- γ	22
3.11. Nepřímá ELISA	22
3.12. Sandwichová ELISA pro antigen	23
3.13. Barvení Calcofluorem	24
3.14. Filtrace přes kolonu zachycující bakteriální lipopolysacharid (LPS).....	24
3.15. Schéma jednotlivých typů experimentů	24
3.15.1. Adoptivní přenos CD4+ T-lymfocytů z BALB/c myší nebo myší s defektním genem pro IFN- γ	24

3.15.2. Adoptivní přenos CD4+ T-lymfocytů z naivních nebo <i>E. cuniculi</i> imunizovaných BALB/c myší	25
3.15.3. Terapie komerčním myším rekombinantním IFN- γ a polyklonálním anti- <i>E. cuniculi</i> sérem.....	25
3.15.4. Terapie anti- <i>E. cuniculi</i> sérem	25
3.15.5. Terapie rekombinantním myším IFN- γ vyrobeným na našem pracovišti.....	26
3.15.6. Vliv imunizace antigenem <i>E. cuniculi</i> na vývoj infekce <i>E. cuniculi</i> myší z defektním genem pro IFN- γ	26
3.16. Statistické hodnocení výsledků	27
4. Výsledky	28
4.1. Vliv adoptivního přenosu izolovaných populací CD4+ T-lymfocytů z BALB/c myší nebo myší s defektním genem pro IFN- γ na průběh experimentální p.o. infekce <i>E. cuniculi</i> u myší SCID	28
4.2. Vliv adoptivního přenosu izolovaných populací CD4+ T-lymfocytů z naivních nebo <i>E. cuniculi</i> imunizovaných BALB/c myší na průběh následné experimentální p.o. infekce <i>E. cuniculi</i> u myší SCID	29
4.3. Vliv terapie komerčním myším rekombinantním IFN- γ a anti- <i>E. cuniculi</i> myším sérem na experimentální p.o. infekci <i>E. cuniculi</i> u myší SCID.....	30
4.4. Vliv terapie myším rekombinantním IFN- γ vyrobeným v naší laboratoři na experimentální p.o. infekci <i>E. cuniculi</i> u myší SCID.....	31
4.5. Vliv imunizace antigenem <i>E. cuniculi</i> na průběh experimentální p.o. infekce <i>E. cuniculi</i> u myší s defektním genem pro IFN- γ	32
5. Diskuze.....	35
6. Souhrn	39
7. Seznam použitých zkratk.....	40
8. Literatura	41

1. Úvod

1. 1. Mikrosporidie

1. 1. 1. Taxonomie

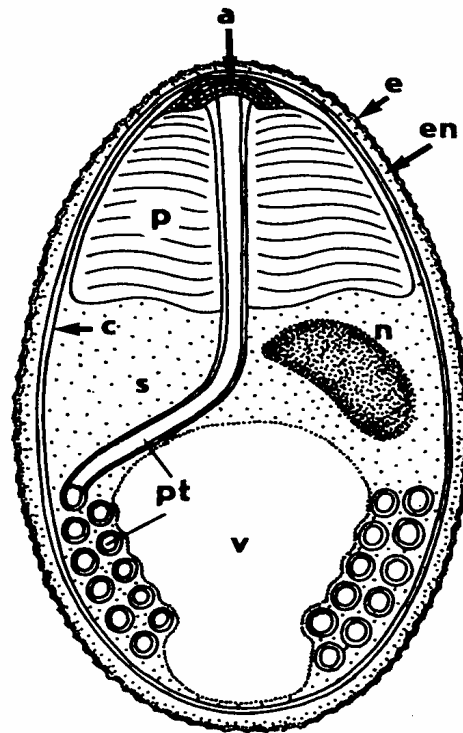
Mikrosporidie jsou jednobuněční intracelulární paraziti napadající prvoky, bezobratlé a všechny třídy obratlovců. Poprvé byly popsány v roce 1857, kdy byla *Nosema bombicis* označena za parazita bource morušového. Mikrosporidie se řadí do kmene Mikrosporidia v říši Fungi (Cavalier-Smith 1998). Tento kmen obsahuje dvě třídy *Haplophasea* a *Diplophasea*, které zahrnují přibližně 1200 druhů rozdělených do 150 rodů. Do třídy *Haplophasea* jsou zařazeny mikrosporidie mající během buněčného cyklu pouze jedno jádro, zatímco třída *Diplophasea* zahrnuje mikrosporidie u nichž se během buněčného cyklu tvoří diplokaryon (dvě synchronně se dělící jádra) (Sprague a spol. 1992).

Protože mikrosporidie vykazují určité prokaryotní znaky jako je absence mitochondrií, peroxyzomů, klasického Golgiho aparátu a 5,8S rRNA nebo naopak přítomnost 16S a 23S rRNA (Vávra a Larrison 1999, Vossbrinck a Woese 1986), byly považovány za fylogeneticky velmi stará primitivní eukaryota (Vossbrinck a spol. 1987). Avšak další analýzy mikrosporidiového genomu dokázaly přítomnost mitochondriálních genů např. genu pro mitochondriální heat-shock protein 70 (Germot a spol. 1997). Tyto geny prokazují úzkou příbuznost právě s říši Fungi a jsou jedním z hlavních důvodů toho, že v současnosti se na mikrosporidie nahlíží jako na fylogeneticky poměrně mladá eukaryota vysoce adaptovaná na parazitický způsob života ztrátou či změnou některých organel (Keeling a McFadden 1998).

1.1.2. Morfologie

Všechny známé druhy mikrosporidií vytváří spóry (obr. 1), které jsou velmi odolné vůči vlivům okolního prostředí a jako jediné vývojové stadium přežívají mimo hostitelskou buňku. Spóra má vejčitý tvar a měří 2-7 μm . Gramovým barvením se barví pozitivně a pod světelným mikroskopem při nativním pozorování opaleskuje. Buněčnou stěnu spóry tvoří dvě vrstvy, vnější elektrondenzní proteinová exospora a vnitřní elektronlucentní chitinová endospora (Canning a Lom 1986). Mrazovým lámáním a leptáním bylo u rodu *Encephalitozoon* odhaleno, že se exospora skládá ze tří vrstev, a to z vnější ostnaté vrstvy, lupínkovité střední vrstvy a z vláknité vnitřní vrstvy (Bigliardi a spol. 1996, 1997). Právě díky buněčné stěně je zralá spóra tak odolná vůči vnějšímu prostředí. Pod buněčnou stěnou se

nachází cytoplazmatická membrána. Dále spóra obsahuje tzv. vystřelovací aparát, což je soubor organel skládající se z kotvícího disku, proteinového pólového vlákna, polaroplastu a z posteriorní vakuoly. Pólové vlákno je 100 až 500 μm dlouhé a spirálovitě stočené do 3 až 20 vrstev. Počet závitů je druhově specifický. Jedním koncem je pólové vlákno upevněno tzv. kotvícím diskem v apikální části spóry (Keohane a Weiss 1999). V místě kde kotvící disk přiléhá ke stěně spóry, je buněčná stěna, zřejmě z důvodu usnadnění vystřelení pólového vlákna, ztenčená. Za kotvícím diskem se nachází polaroplast. Ten tvoří jednu třetinu až jednu polovinu objemu celé spóry. Jedná se o seskupení membrán, ze kterých je vytvořen obal pro infekční sporoplazmu vstříknutou při infekci skrz



Obr. 1: Schéma spóry mikrosporidií rodu *Nosema* (Ergens a Lom 1970)

a - kotvící disk; **c** - cytoplazmatická membrána; **e** - exospora; **en** - endospora; **n** - jádro; **p** - polaroplast; **pt** - pólové vlákno; **s** - sporoplazma; **v** - posteriorní vakuola

pólové vlákno do hostitelské buňky (Weidner a spol. 1984). Jádro je pravé eukaryotní a může se vyskytovat, jak již bylo výše zmíněno, jednotlivě (např. u rodu *Encephalitoozon*) nebo ve formě diplokaryonu (např. u rodu *Nosema*). Tvar jádra je nejčastěji kruhový nebo oválný (Vávra a Larsson 1999). Velikost mikrosporidiového genomu se pohybuje v rozmezí od 2,9 Mbp do 19,5 Mbp (Biderre a spol. 1995). K dalším buněčným organelám mikrosporidií patří endoplazmatické retikulum, atypický Golgiho aparát a 70S ribosomy.

1. 1. 3. Životní cyklus

1. 1. 3. 1. Přenos mikrosporidií na hostitele

Hostitel se nejčastěji infikuje požitím nebo vdechnutím infekčních spór (Cox a spol. 1979). Možná je také přímá oční infekce (Weber a Bryan 1994) či transplacentární infekce, která byla prokázána u myší, králíků, psů, koní a opic (Canning a Lom 1986).

1. 1. 3. 2. Mechanismus vystřelení pólového vlákna

Vystřelení pólového vlákna je nepostradatelnou součástí úspěšné infekce hostitelské buňky mikrosporidií. U aktivované mikrosporidie dochází ke zvýšení osmotického tlaku uvnitř spóry (Undeen a Frixione 1990), který vyvolá příliv vody z okolí do mikrosporidie přes transmembránové kanály (Frixione a spol. 1997), což způsobí zvětšení intracelulární matrix spóry, bobtnání polaroplastu a expanzi posteriorní vakuoly. To vede k vystřelení pólového vlákna a k protlačení infekční sporoplazmy skrz pólové vlákno do okolí mikrosporidie (Weidner a spol. 1984, Undeen 1990).

Co zapříčiní vzestup osmotického tlaku, není ještě zcela přesně známo. Podle Dalla (1983) je prudké zvýšení osmotického tlaku způsobeno změnou pH v okolí mikrosporidie z kyselého-neutrálního na zásadité, které vyvolá transport kationtů mezi buněčnými organelami (polaroplast, posteriorní vakuola) a sporoplazmou. Kromě změny pH je také potřebná přítomnost vápenatých kationtů a polyaniontů (např. glutamát a hlen) (Pleshinger a Weidner 1985). Odlišnou teorii navrhli Undeen a Vander Meer (1994), ve které považují za příčinu vzestupu osmotického tlaku přeměnu trehalosy na glukosu.

1. 1. 3. 3. Infekce hostitelské buňky

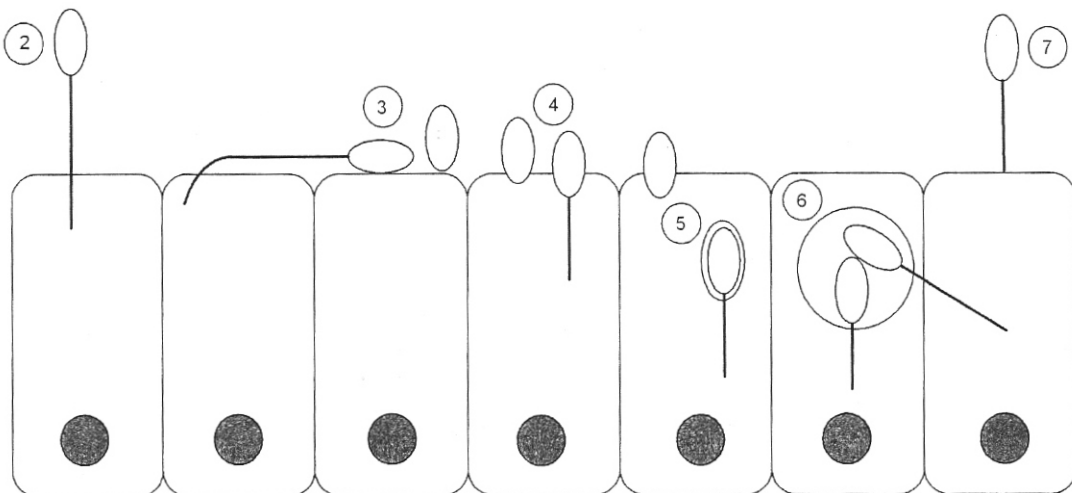
Mikrosporidie mohou infikovat hostitelskou buňku tzv. aktivní invazí. Ta probíhá tak, že mikrosporidie vystřelí pólové vlákno, které jako jehla pronikne skrz cytoplazmatickou membránu do hostitelské buňky. Vzápětí pomocí pólové trubice vstříkne do hostitelské buňky infekční sporoplazmu (obr. 2[2]). Aktivní invaze byla považována dlouhou dobu za hlavní způsob infekce hostitelské buňky, avšak v posledních deseti letech byla publikována řada prací, které dokazují, že mikrosporidie často využívají k infekci hostitelské buňky fagocytických procesů (Franzen 2004). Infekce *Encephalitozoon intestinalis* a *Encephalitozoon cuniculi* je *in vitro* inhibována cytochalasinem D (mykotoxin bránící polymerizaci aktinových vláken). To nasvědčuje tomu, že fagocytóza spór hostitelskou buňkou hraje důležitou úlohu při mikrosporidiové infekci (Foucault a Drancourt 2000, Franzen a spol. 2005). Podle Franzena a spol. (2005) je u *Encephalitozoon cuniculi* infekce pomocí fagocytických procesů desetkrát častější než infekce způsobená aktivní invazí.

Způsobů jak mohou mikrosporidie využívat fagocytózu spór k infekci hostitelské buňky je několik. Schottelius a spol. (2000) u *Encephalitozoon* spp. a Bigliardi a Sacchi (2001) u *Encephalitozoon hellem* popsali pomocí elektronového skanovacího mikroskopu invaginaci volného konce již vystřeleného pólového vlákna do hostitelské buňky (obr. 2[7]). Další způsob, který zahrnuje: specifickou interakci mezi posteriorním pólem spóry a

cytoplazmatickou membránou hostitelské buňky, vystřelení pólového vlákna a následnou fagocytózu sporoplazmy hostitelskou buňkou, byl popsán u infekce *Encephalitozoon intestinalis* v Caco-2 buňkách (buňky odvozené od lidských enterocytů) Foucaultem a Drancourtem (2000) (obr. 2[3]). U *Encephalitozoon cuniculi* byl popsán další neméně zajímavý způsob infekce. V tomto případě byly fagocytovány celé spóry s nevystřeleným pólovým vláknem. Ze vzniklého fagozomu pak spóry vystřelily pólové vlákno a infikovaly okolní cytoplazmu hostitelské buňky sporoplazmou (Franzen 2005) (obr. 2[5]). Velice podobný způsob infekce pozorovala Magaud a spol. (1997) u *Encephalitozoon intestinalis*. Spóra přilnula apikálním koncem k cytoplazmatické membráně hostitelské buňky a zatímco byla fagocytována vystřelila pólové vlákno skrz vznikající fagozom a infikovala hostitelskou buňku sporoplazmou (obr. 2[4]).

Fagozom se spórami obsahuje endo-lysozomální markery a spóry, které z fagozomu neuniknou, jsou zničeny (Couzinet a spol. 2000, Franzen 2005). Tyto výsledky vyvrací dřívější teorii o schopnosti mikrosporidií blokovat fúzi fagozomu s lysozomem, která byla navržena Weidnerem (1975) či Weidnerem a Sibleyem (1985).

V současné době řada dalších objevů dokazuje důležitost fagocytických procesů při mikrosporidiové infekci. U *Encephalitozoon cuniculi* byl objeven mikrosporidiový adherentní protein (EcMsAP) (Southern a spol. 2006a), který reaguje s glykósaminoglykany na membráně hostitelské buňky (Hayman a spol. 2005). Pomocí tohoto proteinu se spóra specificky váže na hostitelskou buňku. Analog EcMsAP byl již objeven i u *Encephalitozoon intestinalis* (Southern a spol. 2006a). Neméně důležitý je také fakt, že je možné prokazatelně zvýšit intenzitu infekce *E. cuniculi* či *E. intestinalis* v buněčné kultuře, usnadníme-li adherenci spór k hostitelské buňce pomocí hořečnatých nebo manganatých kationtů (Southern a spol. 2006b).



Obr. 2: Způsoby jak mohou mikrosporidie infikovat hostitelskou buňku (Franzen 2005)

1. 1. 3. 4. Vývoj mikrosporidie v hostitelské buňce

Ze sporoplazmy, kterou je hostitelská buňka infikována, vznikají meronti. Tato vývojová stadia mají velké jádro nebo diplokaryon a velké množství volných ribosomů. Povrch meronta tvoří pouze cytoplazmatická membrána. Meronti se množí buďto binárním mitotickým dělením (např. rody *Encephalitozoon* či *Nosema*), nebo vznikají mnohojaderná merogoniální plazmodia, která se následně rozdělí na jednotlivé meronty (např. rody *Enterocytozoon* či *Pleistophora*). Namnožení meronti se následně vyvíjejí ve sporonty, kteří již mají na rozdíl od merontů elektrondenzní povrch. Následně se každý sporont jednou dělí (stejně jako meront stejného rodu) a vyvíjí se ve sporoblast. Sporoblast již obsahuje částečně vytvořený vystřelovací aparát a neprodělavá už další buněčné dělení, pouze dozrává v infekční spóry (Vávra a Larrison 1999).

V předchozím odstavci popsáný vývoj může probíhat volně v cytoplazmě hostitelské buňky (např. rod *Enterocytozoon*), nebo v tzv. parazitoformní vakuole (např. rod *Encephalitozoon*) (Vávra a Larrison 1999). Původ parazitoformní vakuoly není ještě zcela znám. Podle Hollisterové a spol. (1996) vytváří parazitoformní vakuolu hostitelská buňka i mikrosporidie společně.

1. 1. 3. 5. Šíření mikrosporidiové infekce

Mikrosporidie se množí tak dlouho až vyplní celý objem hostitelské buňky, čímž způsobí její prasknutí. Bylo zjištěno, že mikrosporidie vytváří dvě generace spór. Spóry první generace mají tenčí buněčnou stěnu a způsobují tzv. sekundární infekci. Ta spočívá v tom, že spóra vystřelí své pólové vlákno ještě v hostitelské buňce ve snaze infikovat okolní buňky (obr. 2[6]). Spóry druhé generace, které jsou vybaveny silnější buněčnou stěnou, se po prasknutí hostitelské buňky dostávají neaktivované z hostitele do vnějšího prostředí jeho tělními exkrety nebo se po jeho smrti uvolní do okolí (Franzen 2005, Vávra a Larrison 1999).

1. 1. 4. Mikrosporidióza u člověka

Mikrosporidióza je u člověka považována za zoonózu s celosvětovým výskytem (Mathis a spol. 2005). Mezi nejběžnější druhy mikrosporidií, které mohou infikovat člověka patří: *Enterocytozoon bienersi*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon cuniculi* a *Encephalitozoon hellem* (Didier 2005). U zdravého jedince probíhá mikrosporidióza, kromě očních infekcí, asymptomaticky, nebo může být doprovázena krátkodobými průjmy a nevolnostmi (Didier a Weiss 2006). Avšak u dočasně či trvale imunosuprimovaných jedinců se

mohou mikrosporidiové infekce rozvinout v závažná onemocnění. Mezi nejvíce ohrožené skupiny patří lidé s AIDS nebo pacienti po transplantaci kostní dřeně či jiných orgánů. Bylo zjištěno, že u lidí s AIDS se riziko komplikací při mikrosporidiových infekcích výrazně zvýší, mají-li méně než 100 CD4+ T-lymfocytů v 1 µl krve. Pro orientaci, množství CD4+ T-lymfocytů v 1 µl krve zdravého člověka se pohybuje v rozmezí 500 až 1200 (Morpeth a Thielman 2006, Orenstein a spol. 2005).

U takových pacientů způsobuje výše zmíněný *Enterocytozoon bieneusi* a *Encephalitozoon* spp. intestinální infekce, které se projevují chronickými průjmy, abdominálními bolestmi a ztrátou tělesné hmotnosti. Infekce *Encephalitozoon* spp. navíc často diseminuje a může tak vyvolat systémovou infekci (Didier a Weiss 2006). Mezi další mikrosporidie infikující člověka patří např. *Trachypleistophora hominis*, *Pleistophora* spp. a *Branchiola algerae*, které vyvolávají myositidy a sinusitidy (Visvesvara a spol. 2005, Didier a Bessinger 1999, Chupp a spol. 1993). Mikrosporidiové infekce oka způsobené *Nosema ocularum*, *Brachiola vesicularum*, *Microsporidium* spp. a *Encephalitozoon* spp. jsou nebezpečné i pro imunokompetentní jedince obzvláště v kombinaci s užíváním kontaktních čoček a mohou vést k zánětu a zvrhodování rohovky (Ashton a Wirasinha 1973, Cali a spol. 1991, Didier 2005, Didier a Bessinger 1999).

1. 1. 5. Diagnostika a léčba mikrosporidiózy

Diagnostika mikrosporidiózy je založena na průkazu spór mikrosporidií v tkáních a tělních tekutinách. K tomu se využívá barvení optickými bělidly (např. calcofluorem), které zvýrazňují chitinovou endosporu (Garcia 2002). K určení jednotlivých druhů mikrosporidií se používají specifické monoklonální protilátky (Mo a Drancourt 2004) nebo PCR (polymerázová řetězová reakce) s využitím specifických primerů pro příslušnou mikrosporidiální rDNA (Garcia 2002).

Mikrosporidióza může být léčena albendazolem, což je benzimidazol blokující mikrotubulární syntézu. Je účinný proti *Encephalitozoon* spp. avšak nepůsobí na *Enterocytozoon bieneusi* (Blanshard a spol. 1992). Antibiotikum produkované plísní *Aspergillus fumigatus*, Fumagilin, je sice účinné i proti *E. bieneusi*, avšak jeho nevýhodou je poměrně vysoká toxicita (Molina a spol. 2002). Dobrou antimikrosporidiální aktivitu a nízkou toxicitu ukazují tzv. analogy mikrosporidiálních polyaminů (Bacchi a spol. 2002) a fluoroquinolony blokující aktivitu topoisomerázy IV, která zatím nebyla kromě mikrosporidií u eukaryot identifikována (Didier a spol. 2005a). Při léčbě mikrosporidiózy u HIV pozitivních

pacientů významně pomáhá imunitní rekonstituce pomocí antiretrovirální terapie (Didier a spol. 2005b).

1. 2. *Encephalitozoon cuniculi* Levaditi, Nicolau a Schoen, 1923

Encephalitozoon cuniculi byl poprvé izolován z mozku, míchy a ledvin králíka s motorickou paralýzou v roce 1922 (Wright a Craighead 1922) a o rok později byl pojmenován (Levaditi a spol. 1923). *E. cuniculi* napadá široké spektrum savčích hostitelů zahrnující hlodavce, přežvýkavce, šelmy a primáty včetně člověka (Canning a Lom 1986, Didier a spol. 1998). V hostiteli může *E. cuniculi* perzistovat aniž by ho nějak vážně poškozoval. Pokud však z nějakého důvodu imunitní systém hostitele nedokáže udržet množení *E. cuniculi* pod kontrolou, dojde k rozvoji infekce, což má za následek poškození trávicího epitelu, jater, ledvin, plic nebo mozku (Mathis a spol. 2005, Canning a Lom 1986). U člověka způsobuje *E. cuniculi* převážně oportunní infekce asociované s AIDS, postransplantační imunosupresí či atterací (viz. kapitola Mikrosporidiodóza u člověka).

Velikost zralých spór *E. cuniculi* se pohybuje okolo $1,5 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$. Pólová trubice má 3 až 5 závitů. V hostitelské buňce se vývoj *E. cuniculi* odehrává v parazitoformní vakuole a všechna vývojová stádia mají pouze jedno jádro. Meronti se u tohoto druhu rozmnožují binárním dělením. *E. cuniculi* má jeden z nejmenších známých mikrosporidiových genomů. Jeho velikost se pohybuje okolo 2,9 Mbp (Biderre a spol. 1995).

Na základě biochemických, imunologických a molekulárních odlišností byli identifikovány u *E. cuniculi* tři různé kmeny (I, II, III). Zdá se, že tyto kmeny nejsou příliš hostitelsky specifické (Deplazes a spol. 1996). U člověka byly zatím popsány infekce pouze kmenem I a III (Didier a spol. 1996, Didier a spol. 1995, Deplazes a spol. 1996).

1. 3. Imunitní odpověď savčích hostitelů na infekci *Encephalitozoon cuniculi*

1. 3. 1. Význam buněčné složky imunity při infekci *E. cuniculi*

1. 3. 1. 1. Význam CD8⁺ T- a CD4⁺ T-lymfocytů

Bylo prokázáno, že CD8⁺ T-lymfocyty dokáží ochránit hostitele jak proti intraperitoneální (i.p.) tak i proti perorální (p.o.) infekci *E. cuniculi*. V případě i.p. nákazy je k úspěšné eliminaci infekce přítomnost CD8⁺ T-lymfocytů dokonce nezbytná (Braunfuchsová a spol. 2002). Ochranný efekt CD8⁺ T-lymfocytů spočívá v zabránění množení *E. cuniculi* v hostiteli tím, že jsou specificky likvidovány infikované buňky pomocí

cytotoxické T-lymfocytární odpovědi (CTL), ve které právě CD8⁺ T-lymfocyty fungují jako efektorové zabíjecí buňky (Khan a spol. 2001).

Narozdíl od CD8⁺ T-lymfocytů není přítomnost CD4⁺ T-lymfocytů nutná k potlačení jak i.p. tak p.o. infekce *E. cuniculi*. To dokazují pokusy na CD4^{-/-} myších (myši bez CD4⁺ T-lymfocytů), které přežívají infekci *E. cuniculi* stejně jako imunokompetentní kmeny (Khan a spol. 2001). Přesto pokusy s adoptivními přenosy imunity do SCID myší (myši s těžkou kombinovanou imunodeficiencí) prokázaly, že CD4⁺ T-lymfocyty jsou zapojeny do protektivní odpovědi imunitního systému na p.o. infekci *E. cuniculi* (Braunfuchsová a spol. 2002). Tato protektivní imunitní odpověď je nezávislá na přítomnosti CD8⁺ T-lymfocytů. Tedy ochrání hostitele proti p.o. infekci *E. cuniculi* aniž by došlo k aktivaci CTL. Jak se později ukázalo, je tento ochranný efekt způsoben kombinací účinků CD4⁺ T-lymfocytů a anti-*E. cuniculi* protilátek (Sak a spol. 2006). Samotný účinek CD⁺ T-lymfocytů nezabrání rozvinutí ani p.o. letální infekce *E. cuniculi*, pouze zpomaluje její rozvoj v systémovou infekci. To dokazují přenosy izolovaných CD4⁺ T-lymfocytů do SCID myší (myši s těžkou kombinovanou imunodeficiencí), u kterých je následně pozorováno prodloužené přežívání p.o. infekce *E. cuniculi*, avšak nedojde ke kompletnímu uzdravení a myš nakonec infekci podlehe (Salát a spol. 2006).

Jakým způsobem CD4⁺ T-lymfocyty ovlivňují průběh p.o. infekce *E. cuniculi* je předmětem dalších výzkumů.

1. 3. 1. 2. Význam NK buněk a $\gamma\delta$ T-lymfocytů

NK (natural killer) buňky slouží při infekci *E. cuniculi* jako zdroj interferonu gama (IFN- γ) pro aktivaci CTL (Khan a spol. 2001). Přestože NK buňky jsou hlavním nástrojem přirozené buněčné cytotoxicity a uplatňují se jako zabíječi např. virem infikovaných nebo nádorových buněk, jejich cytotoxická aktivita nehraje při infekci *E. cuniculi* významnou roli. Dokazují to pokusy na athymických myších (myši bez T-lymfocytů). Tyto myši mají vysokou aktivitu NK buněk, avšak infekci *E. cuniculi* nepřežívají (Niederhorn a spol. 1983).

$\gamma\delta$ T-lymfocyty představují zvláštní subpopulaci T-lymfocytů, která je velmi důležitá při obraně organismu hlavně proti intracelulárním patogenům (Krejsek a Kopecký 2004). Při infekci *E. cuniculi* spočívá úloha $\gamma\delta$ T-lymfocytů, stejně jako NK buněk, v produkci IFN- γ pro CTL. Dokazují to pokusy na myších s nefunkčními $\gamma\delta$ T-lymfocyty. Tyto myši nepřežívají vysoké infekční dávky *E. cuniculi* právě díky snížené aktivitě CTL (Khan a spol. 2001).

1. 3. 1. 3. Úloha interferonu gama a interleukinu 12

Interferon gama (IFN- γ) i interleukin 12 (IL-12) patří do skupiny Th1 cytokinů. Oba tyto cytokiny jsou významně zapojeny do imunitní odpovědi na mikrosporidiovou infekci (Salát a spol. 2004).

IL-12 je jeden z cytokinů, který je produkován makrofágy a dendritickými buňkami při infekci *E. cuniculi* či jinými intracelulárními patogeny a který zřejmě aktivuje NK buňky a $\gamma\delta$ T-lymfocyty k produkci IFN- γ (Khan a spol. 2001, Sousa a spol. 1997). Jeho přítomnost je nezbytná pro přežití jak i.p. tak i p.o. infekce *E. cuniculi*. V tomto ohledu se imunitní odpověď na infekci *E. cuniculi* částečně liší od imunitní odpovědi na infekci způsobenou dalším zástupcem rodu *Encephalitozoon*, *E. intestinalis*, kde absence IL-12 má za následek letální průběh pouze při i.p. infekci (Salát a spol. 2004).

IFN- γ je spoluaktivátorem přeměny CD8+ T-lymfocytů na cytotoxické T-lymfocyty a bez jeho přítomnosti nedojde k rozvoji CTL odpovědi (Khan a Moretto 1999, Krejsek a Kopecký 2004). Absence IFN- γ vede na rozdíl od IL-12 k letálnímu průběhu i.p. i p.o. infekce způsobené jak *E. cuniculi* tak i *E. intestinalis* (Salát a spol. 2004). Pomocí pokusů na peritoneálních myších makrofágách *in vitro* byla odhalena i další úloha IFN- γ při infekci *E. cuniculi*. Zatímco v neaktivovaných makrofágách se *E. cuniculi* množí po celou dobu trvání pokusu (72 hodin), v IFN- γ aktivovaných makrofágách se růst populace *E. cuniculi* zastaví po 24 hodinách a dále už zůstává konstantní. Jsou-li makrofágy aktivovány současně IFN- γ a lipopolysacharidem, populace *E. cuniculi* se dokonce v průběhu pokusu zmenší (Didier 1995). Didierová (1995) označila oxid dusnatý (NO) za látku způsobující zabíjení spór *E. cuniculi* v aktivovaných makrofágách. Tato úloha NO však byla zpochybněna pokusy na myších s nefunkční NO syntázou, které přežívaly infekci *E. cuniculi* jako imunokompetentní kmeny (Khan a Moretto 1999).

1. 3. 1. 4. Cytotoxická T-lymfocytární odpověď

Jelikož se cytotoxická T-lymfocytární odpověď (CTL) ukázala být neúčinnější imunitní reakcí proti mikrosporidiové i.p. i p.o. infekci, zaslouží si být podrobněji popsána v samostatné kapitole.

V infikované tkáni jsou volné spóry *E. cuniculi* fagocytovány makrofágy a dendritickými buňkami. Makrofágy následně začnou produkovat řadu cytokinů např. tumor nekrosis faktor alfa (TNF- α), interleukin 1 (IL-1), IL-6, IL-8, IL-10 a IL-12 (Didier a Bessinger 1999). Některé z těchto cytokinů, zejména TNF- α a IL-12, pak aktivují NK buňky a $\gamma\delta$ T-lymfocyty k produkci IFN- γ (Khan a spol. 2001). Dendritické buňky pomocí

membránové molekuly CD1 a infikované epiteliální buňky pomocí membránových molekul MIC A a MIC B mohou podporovat aktivaci $\gamma\delta$ T-lymfocytů vazbou na $\gamma\delta$ T-receptor (Krejsek a Kopecký 2004).

IFN- γ následně stimuluje CD8+ T-lymfocyty k přeměně na cytotoxické T-lymfocyty (Tc) (Khan a Moretto 1999, Khan a spol. 2001). Ve všeobecném modelu se předpokládá, že k přeměně CD8+ T-lymfocytu na Tc a následné proliferaci tohoto klonu je nutný, kromě aktivace pomocí IFN- γ , také kontakt s antigen prezentující buňkou (makrofágy, dendritické buňky). Ta pomocí kostimulačních molekul (CD80, CD86) dává další signál k proliferaci a přeměně na Tc CD8+ T-lymfocytům specificky rozpoznávajícím komplex MHC I molekuly s peptidem příslušného patogenu na antigenprezentující buňce pomocí T receptoru (TCR) (Hořejší a Bartůňková 2002). V případě mikrosporidiové infekce není k přeměně CD8+ T-lymfocytů na cytotoxické T-lymfocyty nutná přítomnost Th1 CD4+ T-lymfocytů, které podporují CTL produkcí IL-2 (Khan a spol. 2001).

Cytotoxické T-lymfocyty v místě infekce rozpoznají infikované buňky pomocí TCR. Ten se specificky váže na komplex MHC I molekuly s antigenem *E. cuniculi*, který je exprimován na infikovaných buňkách (Hořejší a Bartůňková 2002). Takto identifikované infikované buňky jsou následně usmrceny granuly, které obsahují perforin a granzymy (Khan a spol. 2001). Perforin je protein, který je podobný C9 složce komplementu a stejně jako ona dokáže vytvářet póry v cytoplazmatické membráně. Tyto póry pak slouží jako vstupní brána pro granzymy. To jsou enzymy aktivující tzv. kaspázy, tj. enzymy spouštějící v aktivním stavu reakční kaskádu, která vyvolá apoptickou smrt buňky (Hořejší a Bartůňková 2002).

1. 3. 2. Význam humorální složky imunity při infekci *E. cuniculi*

Infekce *E. cuniculi* vyvolává poměrně silnou humorální imunitní odpověď, avšak samotné protilátky nezabrání rozvinutí letální i.p. nebo p.o. infekce (Salát a spol. 2004, Sak a Ditrich 2005). Pokusy s adoptivním přenosem CD8+ T-lymfocytů do myši SCID (myši s těžkou kombinovanou imunodeficiencí) dokonce dokázaly, že humorální složka imunity nemusí být vůbec přítomna při úspěšném potlačení i.p. i p.o. infekce *E. cuniculi* (Horká 2004). Přesto je humorální složka imunity částečně zapojena do potlačení p.o. infekce *E. cuniculi*. Důkazem je adoptivní přenos CD4+ T-lymfocytů do SCID myši kombinovaný s pravidelným podáváním anti-*E. cuniculi* séra. Tato rekonstrukce imunitního systému ochrání myši SCID proti rozvinutí letální p.o. infekce *E. cuniculi*, zatímco samotný přenos CD4+ T-lymfocytů do SCID myši pouze prodlouží dobu jejich přežívání (Sak a spol. 2006).

I pokusy *in vitro* potvrzují vliv protilátek na infekci *E. cuniculi*. Bylo zjištěno, že specifickými protilátkami opsonizovaná spóra *E. cuniculi* obtížněji infikuje hostitelskou buňku, což má za následek zpomalení šíření infekce *E. cuniculi* v kulturách neprofesionálně fagocytujících buněk (Enriquez a spol. 1998, Schmidt a Shaddock 1984).

Z pokusů *in vitro* vyplývá, že role protilátek zřejmě spočívá ve zpomalení šíření infekce *E. cuniculi*. Tento názor podporuje i prodloužené přežívání p.o. infekce *E. cuniculi* u SCID myši, kterým byla podávána monoklonální protilátka proti exosporě *E. cuniculi* (Sak a spol. 2006).

1. 4. Myši s defektním genem pro IFN- γ

C. 1297S7(B6)-Ifng^{tm1Ts} je kmen myši, který byl vytvořen z BALB/c myši cílenou mutací genu pro IFN- γ , která způsobila jeho nefunkčnost. Homozygoti s touto mutací jsou života schopní a plodní, avšak jejich buňky neprodukují IFN- γ . Z tohoto důvodu je u nich funkčně redukována Th1 odpověď, mají sníženou aktivitu NK (natural killer) buněk a nedochází u nich k rozvoji cytotoxické T-lymfocytární odpovědi. Také mají nižší expresi MHC II molekul, což se projevuje sníženou schopností prezentovat antigen. Z těchto důvodů je tento myší kmen velice náchylný k infekcím, u kterých se uplatňuje buněčná složka imunitního systému (www.jax.org).

1. 5. Myši s těžkou kombinovanou imunodeficiencí (SCID myši)

Myši SCID (severe combined immunodeficiency) jsou myši, u kterých byla podchycena homozygotní forma mutace některého z genů, které jsou zapojeny do vytvoření V-D-J segmentu pro T nebo B receptor, což má za následek nefunkčnost všech T- a B-lymfocytů. Myši SCID tedy nevyvíjejí žádnou adaptivní imunitu a jedinými plně funkčními lymfocyty u těchto myši jsou NK (natural killer) buňky. Přirozená složka imunity není u myši SCID poškozena (Bosma a Carroll 1983).

Právě z těchto důvodů jsou SCID myši vhodným modelem pro studium významu jednotlivých subpopulací lymfocytů při různých infekcích pomocí adoptivních přenosů imunity.

2. Cíle práce

- Posoudit úlohu IFN- γ produkovaného CD4+ T-lymfocyty pomocí adoptivních přenosů imunity.
 - a) Přenést izolovanou populaci CD4+ T-lymfocytů z naivních BALB/c myší nebo z myší s defektním genem pro IFN- γ do SCID myší. Rekonstituované myši SCID následně p.o. infikovat *E. cuniculi*. Z rozdílů v době přežívání mezi oběma skupinami posoudit roli IFN- γ při zpomalování šíření p.o. infekce *E. cuniculi*.
 - b) Přenést izolovanou populaci CD4+ T-lymfocytů z naivních nebo *E. cuniculi* imunizovaných BALB/c myší do myší SCID. Porovnat dobu přežívání následné p.o. infekce *E. cuniculi*.
- Zhodnotit vliv terapie myším rekombinantním IFN- γ a anti-*E. cuniculi* sérem na průběh p.o. infekce *E. cuniculi* u myší SCID.
- Zhodnotit vliv imunizace antigenem *E. cuniculi* na průběh následné p.o. infekce *E. cuniculi* u myší s defektním genem pro IFN- γ .

3. Materiál a metody

3. 1. Spóry *Encephalitozoon cuniculi*

Pro pokusy byly použity spóry *E. cuniculi* kmene EC2 (Koudela a spol. 1994), které byly kultivovány v tkáňové kultuře buněk opičích ledvin Vero E6 v mediu RPMI-1640 s 2,5 % bovinního fetálního séra (BOFES) s 1 % antibiotik (SIGMA Cell Culture Antibiotic Antimycotic).

3. 2. Čištění spór *E. cuniculi*

Zkumavka se spórami a zbytky Vero E6 buněk byla centrifugována 20 minut při 1370 g. Supernatant byl odstraněn a k peletu bylo přidáno 5 ml sterilního PBS (fosfáty pufovaný fyziologický roztok) a 200 µl antibiotik. Spóry byly uvolněny ze zbytků Vero E6 buněk opětovným nasátím a rychlým vystříknutím injekční inzulinovou stříkačkou (Chirana T. injecta a.s.). Následně bylo ke směsi spór a zbytků buněk přidáno 5 ml percolu (SIGMA-ALDRICH), který byl sterilizován antibakteriálním filtrem (0,2 µm Milex GP). Poté byly spóry purifikovány na percolovém gradientu centrifugací při 1300 g po dobu 30 minut. Supernatant byl odebrán a sediment obsahující purifikované spóry byl dvakrát promyt deionizovanou vodou centrifugací při 1700 g po dobu 20 minut. Vyčištěné spóry *E. cuniculi* byly přeneseny do 10 ml deionizované vody s 2 % antibiotik, spočítány v Bürkerově komůrce a uskladněny při 4°C. Ve všech pokusech byly použity spóry ne starší než 7 dní.

3. 3. Myši

BALB/c myši (Velaz s.r.o., Česká republika) byly chovány za standardních podmínek (22°C, r.h. 65 %) ve zvěřinci Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích.

Myši s těžkou kombinovanou imunodeficiencí (SCID myši) kmene C.B-17 (Fox Chase Centre, Philadelphia, USA) a myši s defektním genem pro interferon gama (IFN- γ) kmene C. 129/S7(B6)-Ifng^{tm1Ts} (The Jackson Laboratory, USA) byly chovány v izolátorech (BEM Znojmo, Česká republika) s vzdušnými filtry (HEPA).

Pro pokusy byly používány 6 až 8 týdnů staré myši obou pohlaví. Všechny myši byly krmeny komerční směsí (RACIO s.r.o., Břeclav, Česká republika) a napájeny vodou *ad libitum*. Pro imunodeficientní kmeny myší v izolátorech byly krmení i voda před použitím autoklávovány.

3. 4. Experimentální perorální infekce *E. cuniculi*

Myši byly perorálně (p.o.) infikovány pomocí intragastrické sondy dávkou 10^7 spór *E. cuniculi* v 0,1 ml deionizované vody na myš.

3. 5. Pozitivní izolace CD4+ T-lymfocytů

3. 5. 1. Příprava suspenze splenocytů

Pro získání populace CD4+ T-lymfocytů byly použity splenocyty naivních nebo *E. cuniculi* imunizovaných BALB/c myši a splenocyty myši s nefunkčním genem pro IFN- γ . Příslušné BALB/c myši byly dvakrát intraperitoneálně (i.p.) imunizovány dávkou 10^7 živých spór *E. cuniculi* v 0,1 ml PBS na myš. Druhá imunizace byla provedena 7 dní po první.

Po usmrcení (zlomení vazy) byla myši vyjmuta slezina a homogenizací přes sítko byla ze sleziny připravena suspenze splenocytů. Ta byla třikrát promyta médiem RPMI-1640 centrifugací 10 minut při 160 g. Následně byly splenocyty resuspendovány v 1 ml RPMI-1640 media s 10 % BOFES a jejich počet byl spočítán pomocí Bürkerovy komůrky. Množství CD4+ T-lymfocytů bylo určeno jako 20 % ze všech splenocytů, což je standardní procentuální zastoupení CD4+ T-lymfocytů v suspenzi myších splenocytů (tento údaj byl získán předchozí analýzou myších splenocytů na průtokovém cytometru). Poté bylo odebráno takové množství splenocytů, které obsahovalo námi požadovaný počet CD4+ T-lymfocytů.

3. 5. 2. Deplece CD8+ T-lymfocytů

CD8+ T-lymfocyty byly v suspenzi splenocytů depletovány pomocí anti-CD8 protilátky a komplementu. Na jeden milión splenocytů bylo přidáno 11,5 μ l RPMI-1640 média a 1 μ l anti-myší CD8 monoklonální protilátky (2.43, získáno od Dr. Khana, USA). Buňky byly s protilátkou inkubovány 30 minut při 4 °C. Pak bylo přidáno 28 μ l média RPMI-1640 a 10 μ l morčecího séra (zdroj komplementu). Po inkubaci 30 minut při 37 °C byly buňky třikrát promyty RPMI-1640 médiem centrifugací 10 minut při 160 g.

3. 5. 3. Pozitivní imunomagnetická separace CD4+ T-lymfocytů

K pozitivní imunomagnetické separaci CD4+ T-lymfocytů byly použity paramagnetické kuličky Dynabeads Mouse CD4 (L3T4) (DynaL Biotech ASA, Oslo, Norsko). Tyto kuličky mají na svém povrchu navázanou monoklonální protilátku proti membránovému antigenu L3T4, který je prezentován na T_H buňkách všech myších kmenů.

Požadované množství paramagnetických kuliček bylo přeneseno do plastové zkumavky (50 ml) s promývacím pufrem (1% BOFES v PBS). Pomocí magnetu (Dynal Biotech ASA, Oslo, Norsko) byly paramagnetické kuličky přichyceny ke stěně zkumavky. Použitý promývací pufr byl odstraněn a kuličky byly znovu resuspendovány v čerstvém promývacím pufru. Tento postup byl dvakrát opakován.

Následně byly promyté paramagnetické kuličky přidány k suspenzi splenocytů, aby počet kuliček a počet odhadovaných CD4⁺ T-lymfocytů byl v poměru 4:1 a zároveň koncentrace kuliček dosahovala 10⁷ na 1 ml RPMI-1640 media ředěného promývacím pufrem v poměru 2:1. Tato směs kuliček a splenocytů byla promíchána a inkubována v plastové zkumavce (50 ml) 20 minut za stálého míchání na ledu. Po 20 minutách byly paramagnetické kuličky s navázanými CD4⁺ T-lymfocyty pomocí magnetu přichyceny ke stěně zkumavky a zbytek splenocytů byl odstraněn. Paramagnetické kuličky s navázanými CD4⁺ T-lymfocyty byly následně dvakrát promyty promývacím pufrem.

Po promytí byly paramagnetické kuličky vytěsněny z povrchu CD4⁺ T-lymfocytů pomocí anti-L3T3 protilátky DETACHaBEAD Mouse CD4 (L3T3) (Dynal Biotech ASA, Oslo, Norsko). Na 10⁶ CD4⁺ T-lymfocytů bylo přidáno 100 µl RPMI-1640 media s 10 % BOFES a 10 µl DETACHaBEAD. Tato směs byla promíchána a inkubována v plastové zkumavce (15 ml) 60 minut za stálého míchání při laboratorní teplotě.

Pomocí magnetu byly paramagnetické kuličky přichyceny ke stěně zkumavky a roztok obsahující CD4⁺ T-lymfocyty byl následně slit do nové zkumavky. Kvalita populace CD4⁺ T-lymfocytů byla hodnocena pomocí průtokové cytometrie.

3. 6. Analýza jednotlivých buněčných subpopulací pomocí průtokové cytometrie

Pro analýzu jednotlivých buněčných subpopulací bylo použito půl milionu splenocytů nebo 250 × 10⁵ buněk z izolované populace CD4⁺ T-lymfocytů. Příslušné množství buněk bylo resuspendováno v 50 µl PBS s 1 % BOFES. Ve splenocytech byly předtím lýzovány erythrocyty 0,84% roztokem NH₄Cl při teplotě 37°C po dobu 3 minut. Následně byly k buňkám přidány podle typu a doporučeného ředění monoklonální protilátky proti sledovaným povrchovým antigenům. Sledovány byly antigeny CD3, CD4, CD8 a CD19.

K označení sledovaných antigenů byly použity tyto protilátky: FITC anti-mouse CD3 (klon KT3, SEROTEC), FITC anti-mouse CD4 (L3T4) (klon H 129.19, PharMingen), PE anti-mouse CD8a (Ly-2) (klon 53-6.7, PharMingen) PE anti-mouse CD19 (klon 1D3, PharMingen). Každá série vzorků zahrnovala isotypovou kontrolu FITC / PE IgG_{2a} (isotype control, PharMingen).

Vzorky byly inkubovány 30 minut s příslušnými protilátkami při teplotě 4 °C. Pak byly promyty centrifugací 10 minut při 160 g a rozředěny do 1 ml PBS s 1 % BOFES. Následně byly buňky analyzovány pomocí Epics XL Flow Cytometer (Coulter), který je vybaven 15-mW argonovým laserem. Analyzováno bylo deset tisíc označených buněk v každé buněčné suspenzi. Označené subpopulace buněk byly roztříděny pomocí softwaru System 2.

3. 7. Získání anti-*E. cuniculi* séra

Pro získání anti-*E. cuniculi* séra byly použity BALB/c myši. Každá myš byla imunizována i.p. třemi imunizačními dávkami (10^7 spór *E. cuniculi* v 0,1 ml PBS). Jednotlivé imunizace se konaly vždy 7 dní po předchozí.

Osmý den po poslední imunizaci byla BALB/c myším odebrána krev. Ta byla přes noc ponechána ve zkumavce při 4 °C. Ráno byla krevní sraženina oddělena od vzniklého séra centrifugací při 160 g po dobu 10 minut. Supernatant (sérum) byl odebrán do mikrozkušavky a uskladněn při -75 °C.

3. 8. Titrace myšího rekombinantního IFN- γ

Při zjišťování aktivity myšího rekombinantního IFN- γ se využívá jeho schopnosti ochránit buňky linie myších fibroblastů L 929 proti cytopatickému efektu, který u těchto buněk vyvolává infekce virem myší encefalo-myelokarditidy (EMCV).

Do mikrotitrační destičky s plochým dnem (TPP, 96 jamek, Švýcarsko) bylo přidáno 5×10^4 L 929 buněk ve 200 μ l E-MEM media s 5% PTS (prekolostrální telecího sérum) na jamku. Ve vybraných jamkách byl titrován dvojkovou řadou myší rekombinantní IFN- γ od koncentrace 25 ng na ml média do 0,09 ng na ml média. Destička byla inkubována přes noc při 37 °C a 3% CO₂. Pak bylo do každé jamky přidáno 25 μ l EMCV tak, aby objem v jamce obsahoval 10-100 TCD₅₀ viru (ředění 10^{-4}). Po 48 hodinách inkubace bylo médium odsáto a buňky s virem fixovány 5% formalaldehydem po dobu 5 minut. Následně byly buňky v jednotlivých jamkách barveny krystalovou violetí 10 minut. Po barvení byla přebytečná krystalová violet z jamek odstraněna jemným propláchnutím destičky v nádobě s vodou. Krystalová violet z obarvených buněk byla vymyta 50 μ l 70% methanolu.

Intenzita barvy v jednotlivých jamkách, která odpovídala množství buněk, byla měřena na vertikálním spektrofotometru (Labsystems Multiscan MCC/340, Finsko) při vlnové délce 540 nm.

3. 9. Příprava antigenu *E. cuniculi* a následná imunizace myši s defektním genem pro IFN- γ

Potřebné množství spór *E. cuniculi* (10^7 na myš) bylo dvanáctkrát sonikováno po dobu 20 vteřin v 1 ml PBS. Sonikované spóry *E. cuniculi* byly devitalizovány 10 minut při 60 °C. Postup devitalizace spór *E. cuniculi* byl proveden podle Koudely a spol. (1999).

Takto připraveným antigenem (0,2 ml na myš) byly myši následně třikrát intraperitoneálně imunizovány. Jednotlivé imunizace se konaly týden po předchozí. Poslední imunizační dávka byla podána 5 dní před experimentální p.o. infekcí *E. cuniculi*.

3. 10. Monitorování hladiny anti-*E. cuniculi* IgG protilátek v průběhu infekce *E. cuniculi* u myši s defektním genem pro IFN- γ

Hladina anti-*E. cuniculi* IgG protilátek byla monitorována v myším séru pomocí metody nepřímá ELISA. Myším byla odebírána krev z ocasu v intervalu šesti dní. První odběr se konal těsně po infikování a poslední v 18. dni infekce. Odběr krve byl proveden následujícím způsobem. Myši byla žiletkou naříznuta kůže na ocasu a krev z rány byla jímána do mikrozkuhavky. Z krve bylo následně standardním způsobem připraveno sérum (viz. kapitola 3. 7.), které bylo skladováno při -75 °C.

3. 11. Nepřímá ELISA

Množství specifických polyklonálních protilátek proti *E. cuniculi* v séru bylo stanoveno pomocí modifikace metody ELISA podle Hollisterové a Canningové (1987).

Do mikrotitrační destičky s plochým dnem (TPP, 96 jamek, Švýcarsko) bylo nasazeno 10^6 spór *E. cuniculi* v 100 μ l vazebného roztoku (1,59 g Na_2CO_3 , 2,93 g NaHCO_3 v 1 litru H_2O , pH 9,6). Spóry v jamkách byly imobilizovány inkubací přes noc ve vlhké komůrce při 4 °C. Po inkubaci byl panel vysušen a spóry byly fixovány 10 minut směsí acetonu a methanolu v poměru 1:1. Nespecifické vazby byly blokovány 200 μ l blokovacího roztoku (5% PTS v PBS) na jamku po dobu 30 minut při 37 °C. Následně byla destička třikrát promyta promývacím roztokem T-PBS (0,05% Tween v PBS). Poté bylo přidáno 100 μ l testovaného myšího séra, které bylo předtím smícháno s ředícím roztokem (2% PTS v PBS) v poměru 1:100. Při zjišťování titru myšího séra bylo takto naředěné sérum titrováno dvojkovou řadou. Po 30 min. inkubaci při 37 °C byla destička třikrát promyta v T-PBS. Následně bylo přidáno 100 μ l peroxidázou značené protilátky proti konstantní části myších IgG protilátek (SwAM/Px, SEVAC Praha, Česká republika) ředěné v ředícím roztoku v poměru 1:2000 na jamku. Následovala inkubace 30 minut při 37 °C a trojí propláchnutí mikrotitrační destičky

v T-PBS. Enzymová reakce byla vyvolána přidáním 100 μ l substrátového roztoku (1,84 g $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ a 0,51 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ve 100 ml H_2O , 4 μ l 30% H_2O_2 , 4 mg o-phenylendiamin, pH 5) na jamku. Po deseti minutách byla enzymatická reakce zastavena přidáním 100 μ l 2M H_2SO_4 na jamku. Absorbance byla změřena na vertikálním spektrofotometru (Labsystems Multiscan MCC/340, Finsko) při vlnové délce 490 nm.

3. 12. Sandwichová ELISA pro antigen

Koncentrace interferonu gama ($\text{IFN-}\gamma$) byla zjišťována pomocí metody Sandwichová ELISA pro antigen.

Do každé použité jamky mikrotitrační destičky s plochým dnem (TPP, 96 jamek, Švýcarsko) bylo nasazeno 50 μ l vazebného roztoku (1,59 g Na_2CO_3 , 2,93 g NaHCO_3 v 1 litru H_2O , pH 9,6) s primární anti- $\text{IFN-}\gamma$ protilátkou (BD PharmingenTM, Erembodegem, Belgie) o koncentraci 2 μ g na ml. Po inkubaci přes noc ve vlhké komůrce při 4 °C byla destička 2krát promyta T-PBS (0,05% Tween v PBS) a nespecifické vazby blokovány 2 hodiny 200 μ l 10% PTS v PBS na jamku při laboratorní teplotě. Poté byla destička dvakrát promyta v T-PBS. Následně bylo přidáno 50 μ l testovaného roztoku na jamku a vzorek byl titrován dvojkovou řadou. Stejným způsobem byla připravena i kalibrační řada $\text{IFN-}\gamma$ o známé koncentraci. Následovala inkubace přes noc ve vlhké komůrce při 4°C. Po této inkubaci byla destička čtyřikrát promyta T-PBS a do každé použité jamky bylo přidáno 50 μ l 10% PTS v PBS se sekundární anti- $\text{IFN-}\gamma$ protilátkou (BD PharmingenTM, Erembodegem, Belgie) o koncentraci 2 μ g na ml. Následovala inkubace 45 minut při laboratorní teplotě. Poté byla destička šestkrát promyta T-PBS a do každé použité jamky bylo přidáno 100 μ l roztoku streptavidin peroxidázy (SIGMA-ALDRICH) ředěného v 10% PTS v PBS v poměru 1:1000. Po inkubaci 30 minut při laboratorní teplotě byla destička osmkrát promyta T-PBS. Enzymová reakce byla vyvolána přidáním 100 μ l substrátového roztoku (1,84 g $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ a 0,51 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ve 100 ml H_2O , 4 μ l 30% H_2O_2 , 4 mg o-phenylendiamin, pH 5) na jamku. Po 10 minutách byla enzymatická reakce zastavena přidáním 100 μ l 2M H_2SO_4 na jamku. Absorbance byla změřena na vertikálním spektrofotometru (Labsystems Multiscan MCC/340, Finsko) při vlnové délce 490 nm.

3. 13. Barvení Calcofluorem

Přítomnost volných spór *E. cuniculi* a infikovaných buněk v peritoneu uhynulých myší byla zjištěna pomocí barvení Calcofluorem (optické bělidlo) (van Gool a spol. 1993, Vávra a spol. 1993).

Na podložním sklíčku byl zhotoven nátěr z peritoneální tekutiny. Po zaschnutí byl nátěr fixován směsí acetonu a methanolu v poměru 1:1. Po zaschnutí fixovacího roztoku byl nátěr barven 0,1% roztokem Calcofluoru (SIGMA-ALDRICH) v PBS (pH 7,2) po dobu 10 minut. Následně byl vodou ze sklíčka zlehka odmyt zbylý roztok Calcofluoru a nátěr byl barven 0,5% roztokem Ewansovy modře v PBS po dobu 20 sekund. Poté byla zbylá Ewansova modř zlehka odmyta vodou a nátěr byl ponechán ve tmě oschnout. Přítomnost spór *E. cuniculi* v nabarveném nátěru byla hodnocena pomocí fluorescenčního mikroskopu (Olympus IX 70) pod olejovou imerzí.

3. 14. Filtrace přes kolonu zachycující bakteriální lipopolysacharid (LPS)

Touto metodou se ve vyrobeném myším rekombinantním IFN- γ snižovala koncentrace bakteriálního LPS (endotoxin).

Kolona Endo Trap Red (Cambrex, Walkersville, USA) byla dvakrát promyta 3 ml regeneračního pufru (Endo Trap Red Regeneration buffer, Cambrex, Walkersville, USA). Následovalo dvojí promytí 3 ml equilibračního pufru (Endo Trap Red Equilibration buffer, Cambrex, Walkersville, USA). Po promytí byl na kolonu po 1 ml nanesen vzorek obsahující myší rekombinantní IFN- γ . Vzorek proteklý kolonou byl sbírán do zkumavky (přečištěný IFN- γ). K vytěsnění zbytku vzorku z kolony byl použit 1 ml equilibračního pufru. Následně byla kolona dvakrát promyta 3 ml equilibračního pufru. Po promytí byla kolona skladována v 1 ml regeneračního pufru při 4 °C.

3. 15. Schéma jednotlivých typů experimentů

3. 15. 1. Adoptivní přenos CD4⁺ T-lymfocytů z BALB/c myší nebo myší s defektním genem pro IFN- γ

Byly použity 3 skupiny SCID myší. Do první skupiny (5 myší) byly přeneseny CD4⁺ T-lymfocyty z naivních myší s nefunkčním genem pro IFN- γ . Do druhé skupiny (5 myší) byly přeneseny CD4⁺ T-lymfocyty z naivních BALB/c myší. CD4⁺ T-lymfocyty byly přeneseny intraperitoneálně (i.p.), vždy 2 miliony příslušných CD4⁺ T-lymfocytů v 0,5 ml RPMI-1640 media na jednu SCID myš. Jako kontrola byla použita třetí skupina (4 myší), která obsahovala

myši SCID bez rekonstrukce imunity. Týden po přenosu CD4+ T-lymfocytů byly všechny tři skupiny myši experimentálně p.o. infikovány *E. cuniculi*. Experiment byl vyhodnocen na základě střední doby úhynu infikovaných myši v jednotlivých skupinách.

3. 15. 2. Adoptivní přenos CD4+ T-lymfocytů z naivních nebo *E. cuniculi* imunizovaných BALB/c myši

Byly použity 3 skupiny myši SCID. Každá skupina obsahovala 6 myši. Do první skupiny byly přeneseny CD4+ T-lymfocyty z *E. cuniculi* imunizovaných BALB/c myši. Do druhé skupiny byly přeneseny CD4+ T-lymfocyty z naivních BALB/c myši. CD4+ T-lymfocyty byly přeneseny i.p., vždy 2 miliony příslušných CD4+ T-lymfocytů v 0,5 ml RPMI-1640 media na jednu SCID myš. Jako kontrola byla použita třetí skupina, která obsahovala myši SCID bez rekonstrukce imunity. Týden po přenosu CD4+ T-lymfocytů byly všechny tři skupiny myši experimentálně p.o. infikovány *E. cuniculi*. Experiment byl vyhodnocen na základě střední doby úhynu infikovaných myši v jednotlivých skupinách.

3. 15. 3. Terapie komerčním myším rekombinantním IFN- γ a polyklonálním anti-*E. cuniculi* sérem

Byly použity 4 skupiny SCID myši. Každá skupina obsahovala 3 myši. První skupině byl podáván IFN- γ (R&D System) s anti-*E. cuniculi* sérem (3×10^3 U IFN- γ a 30 μ l anti-*E. cuniculi* séra v 0,2 ml 0,1% BSA (bovinní sérový albumin) v PBS tj. jedna terapeutická dávka). Druhé skupině byl podáván samotný IFN- γ (3×10^3 U IFN- γ v 0,2 ml 0,1% BSA v PBS tj. jedna terapeutická dávka) a třetí skupině bylo podáváno samotné anti-*E. cuniculi* sérum (30 μ l anti-*E. cuniculi* séra v 0,2 ml 0,1% BSA v PBS tj. jedna terapeutická dávka). Jako kontrola byla použita čtvrtá skupina, které byl podáván pouze 0,1% BSA v PBS (0,2 ml 0,1% BSA v PBS tj. jedna terapeutická dávka).

Každé myši bylo i.p. podáno celkem 6 příslušných terapeutických dávek každý třetí den jedna. První dávka byla aplikována zároveň s experimentální p.o. infekcí *E. cuniculi*. Experiment byl vyhodnocen na základě střední doby úhynu infikovaných myši v jednotlivých skupinách.

3. 15. 4. Terapie anti-*E. cuniculi* sérem

Byly použity 3 skupiny SCID myši. První skupině (5 myši) bylo podáváno anti-*E. cuniculi* sérum (30 μ l anti-*E. cuniculi* séra v 0,2 ml 0,1% BSA v PBS tj. jedna terapeutická dávka). Druhé skupině (4 myši) byl podáván pouze 0,1% BSA v PBS (0,2 ml 0,1% BSA

v PBS tj. jedna terapeutická dávka). Třetí skupina (5 myší) byla pouze infikována bez jakékoli terapie.

Každé myši bylo i.p. podáno celkem 17 příslušných terapeutických dávek. První dávka byla podána zároveň s experimentální p.o. infekcí *E. cuniculi*. Experiment byl vyhodnocen na základě střední doby úhynu infikovaných myší v jednotlivých skupinách.

3. 15. 5. Terapie myším rekombinantním IFN- γ vyrobeným na našem pracovišti

Byly použity 3 skupiny SCID myší. Každá skupina obsahovala 6 myší. První skupině byl podáván rekombinantní IFN- γ [$1,5 \times 10^4$ U v 0,2 ml TBS (25 mM hydroxymethylaminomethan, 150 mM NaCl v H₂O) tj. jedna terapeutická dávka]. Druhé skupině byl podáván LPS (1,4 ng LPS v 0,2 ml TBS tj. jedna terapeutická dávka) To odpovídalo zbytkovému bakteriálnímu LPS v roztoku z IFN- γ , který obsahovala jedna terapeutická dávka pro první skupinu. Třetí skupina obsahovala SCID myši bez jakékoli terapie.

Každé myši bylo intraperitoneálně podáno celkem 12 příslušných dávek každý druhý den jedna. První dávka byla podána zároveň s experimentální p.o. infekcí. Experiment byl vyhodnocen na základě střední doby úhynu infikovaných myší v jednotlivých skupinách.

Myší rekombinantní IFN- γ V tomto pokuse použitý byl připraven Mgr. Jindřichem Chmelařem.

3. 15. 6. Vliv imunizace antigenem *E. cuniculi* na vývoj infekce *E. cuniculi* u myší s defektním genem pro IFN- γ

Byly použity 3 skupiny myší s defektním genem pro IFN- γ . První skupinu tvořilo 5 myší, které byly imunizovány antigenem *E. cuniculi* podle schématu uvedeném v kapitole 3. 9. Druhá skupina obsahovala 5 naivních myší. Třetí skupina myší byla použita jako kontrola imunogenity a neinfekčnosti antigenu *E. cuniculi*. Tato skupina obsahovala 4 *E. cuniculi* antigenem imunizované myši, které však nebyly narozdíl od prvních dvou skupin infikovány *E. cuniculi*.

Příslušné myši byly experimentálně p.o. infikovány *E. cuniculi* 5 dní po poslední imunizaci v první skupině. Experiment byl vyhodnocen na základě střední doby úhynu infikovaných myší v jednotlivých skupinách.

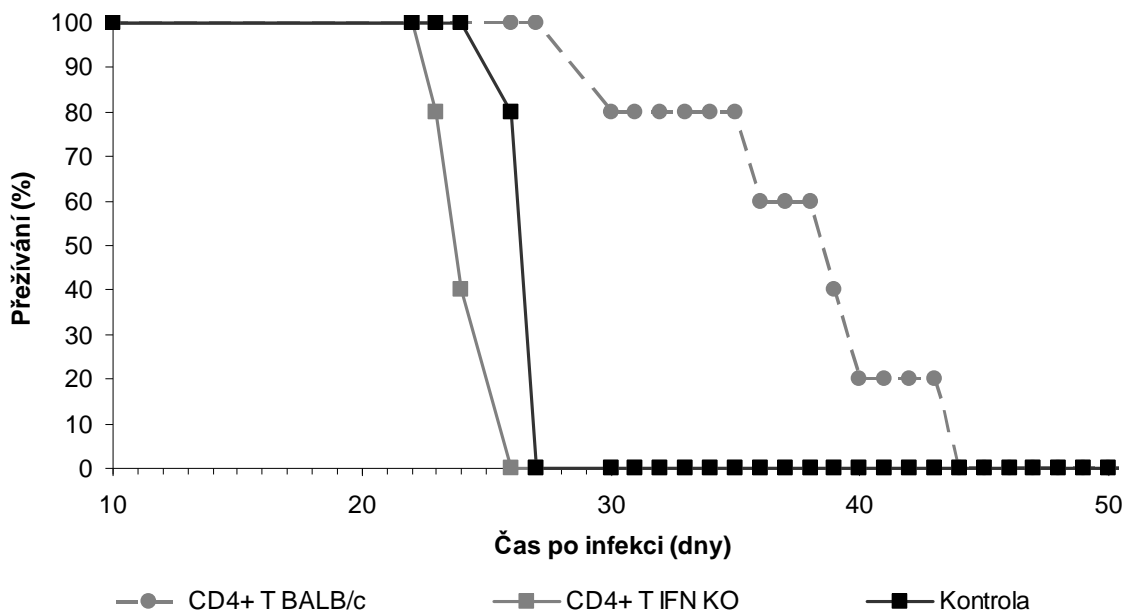
3. 16. Statistické hodnocení výsledků

Rozdíly v délce přežívání p.o. infekce *E. cuniculi* mezi jednotlivými skupinami byly porovnávány Mann-Whitney U-testem v programu Statistica 6®. Statisticky významné rozdíly v relativním množství anti-*E. cuniculi* protilátek byly zjišťovány pomocí analýzy variance (jednocestná ANOVA) taktéž v programu Statistica 6®.

4. Výsledky

4. 1. Vliv adoptivního přenosu izolovaných populací CD4+ T-lymfocytů z BALB/c myši nebo myši s defektním genem pro IFN- γ na průběh experimentální p.o. infekce *E. cuniculi* u myši SCID

Cílem tohoto pokusu bylo porovnat vliv přenosu dvou populací CD4+ T-lymfocytů, které se liší ve schopnosti produkovat IFN- γ , na průběh experimentální p.o. infekce *E. cuniculi* u myši SCID. Metodické schéma tohoto pokusu je vysvětleno v kapitole 3. 15. 1. Výsledek pokusu znázorňuje graf č. 1. Z grafu je patrné, že přenos CD4+ T-lymfocytů z imunokompetentních naivních BALB/c myši, které mohou produkovat IFN- γ , prokazatelně prodloužil dobu přežívání následné p.o. infekce *E. cuniculi* u takto rekonstituovaných SCID myši. Střední doba úhynu ve skupině, do které byly přeneseny CD4+ T-lymfocyty z naivních BALB/c myši (37,8 dní), byla statisticky významně delší než střední doba úhynu ve skupině, kterou tvořili pouze infikované myši SCID bez rekonstrukce imunitního systému (26,75 dní) ($p < 0,05$). Avšak pokud byly do myši SCID přeneseny CD4+ T-lymfocyty z naivních myši s defektním genem pro IFN- γ , nebyla u takto rekonstituovaných myši (střední doba úhynu 24,6 dní) pozorována statisticky významně prodloužená doba přežívání následné p.o. infekce *E. cuniculi* vůči skupině, kterou tvořili pouze infikované myši SCID bez rekonstrukce

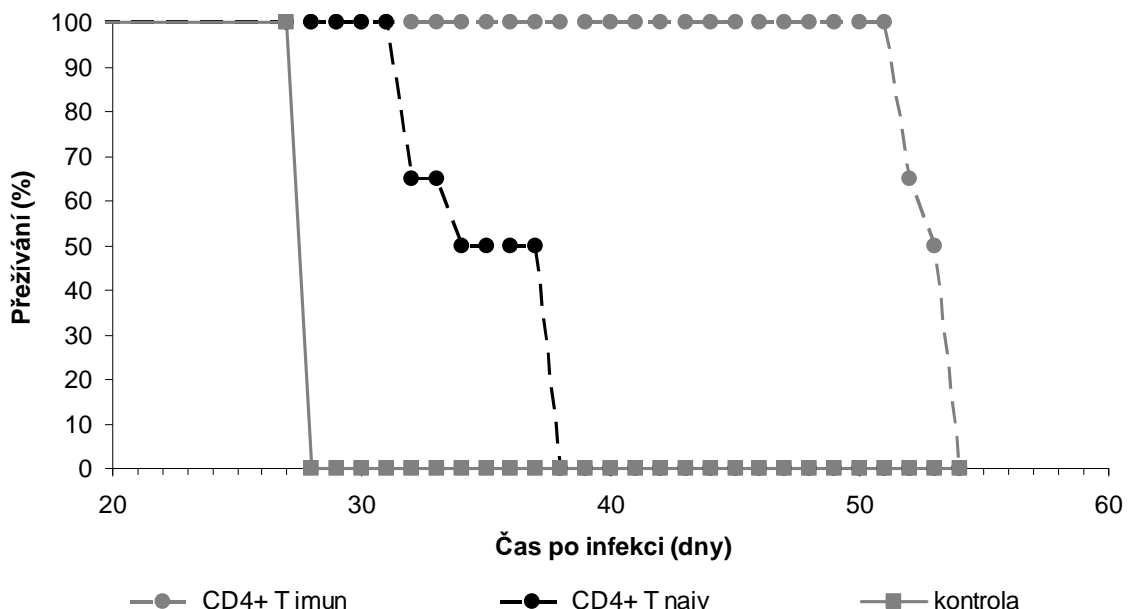


Graf č. 1: Vliv adoptivního přenosu CD4+ T-lymfocytů z BALB/c myši nebo myši s defektním genem pro IFN- γ na průběh p.o. infekce *E. cuniculi* u myši SCID. **CD4+ T BALB/c naiv.** = přenos 2×10^6 CD4+ T-lymfocytů z naivních BALB/c myši; **CD4+ T IFN KO** = přenos 2×10^6 CD4+ T-lymfocytů z naivních myši s defektním genem pro IFN- γ ; **Kontrola** = pouze infikované SCID myši.

imunitního systému (střední doba úhynu 26,75 dní). Pokus byl dvakrát opakován se srovnatelnými výsledky.

4. 2. Vliv adoptivního přenosu izolovaných populací CD4+ T-lymfocytů z naivních nebo *E. cuniculi* imunizovaných BALB/c myší na průběh následné experimentální p.o. infekce *E. cuniculi* u myší SCID

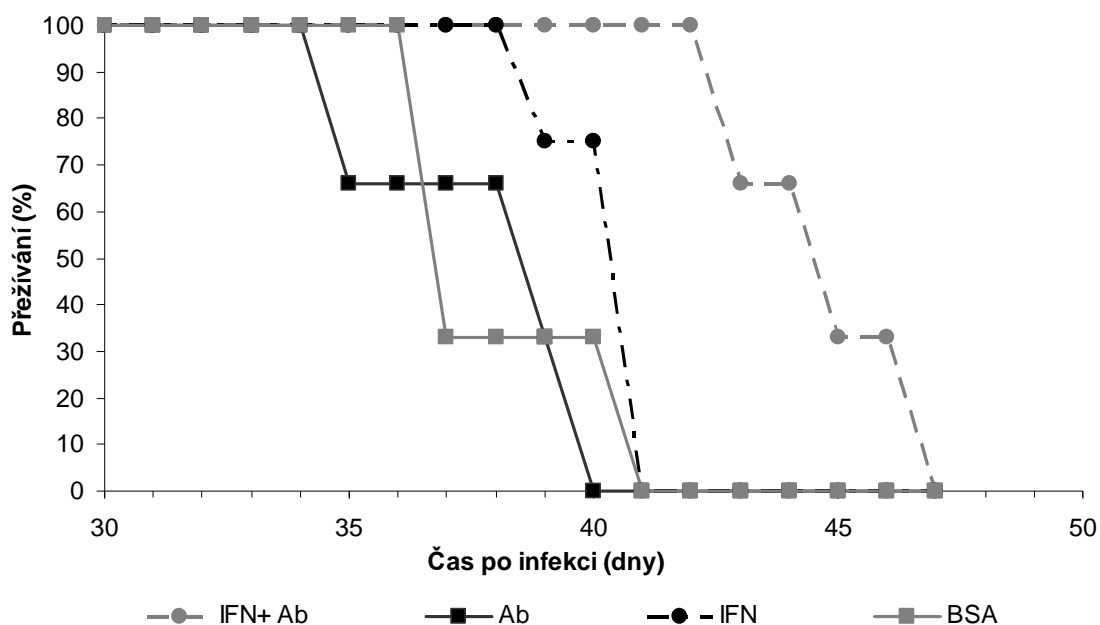
V tomto pokuse byl porovnáván vliv adoptivního přenosu dvou populací CD4+ T-lymfocytů z imunokompetentních BALB/c myší na průběh p.o. infekce *E. cuniculi* u myší SCID. Jedna populace přenášených buněk byla z naivních myší a druhá z *E. cuniculi* imunizovaných myší. Schéma tohoto pokusu je popsáno v kapitole 1. 15. 2. Z grafu č. 2, který znázorňuje výsledek pokusu, je patrné, že doba přežívání p.o. infekce *E. cuniculi* u rekonstituovaných myší byla ovlivněna tím, jestli přenesené CD4+ T-lymfocyty pocházely z naivních, nebo z *E. cuniculi* imunizovaných BALB/c myší. Střední doba úhynu ve skupině, do které byly přeneseny CD4+ T-lymfocyty z *E. cuniculi* imunizovaných BALB/c myší (53,16 dní), byla statisticky významně delší než střední doba úhynu ve skupině, do které byly přeneseny CD4+ T-lymfocyty z naivních BALB/c myší (35,3 dní) ($p < 0,05$). Zároveň obě rekonstituované skupiny SCID myší přežívaly p.o. infekci *E. cuniculi* statisticky významně déle než pouze infikované SCID myši ($p < 0,05$). Střední doba úhynu v této skupině byla 28 dní. Pokus byl dvakrát opakován se srovnatelnými výsledky.



Graf č. 2: Vliv adoptivního přenosu CD4+ T-lymfocytů z naivních nebo *E. cuniculi* imunizovaných BALB/c myší na průběh p.o. infekce *E. cuniculi* u myší SCID. **CD4+ T BALB/c imun.** = přenos 2×10^6 CD4+ T-lymfocytů z *E. cuniculi* imunizovaných BALB/c myší; **CD4+ T BALB/c naiv.** = přenos 2×10^6 CD4+ T-lymfocytů z naivních BALB/c myší; **Kontrola** = pouze infikované SCID myši.

4. 3. Vliv terapie komerčním myším rekombinantním IFN- γ a anti-*E. cuniculi* myším sérem na experimentální p.o. infekci *E. cuniculi* u myši SCID

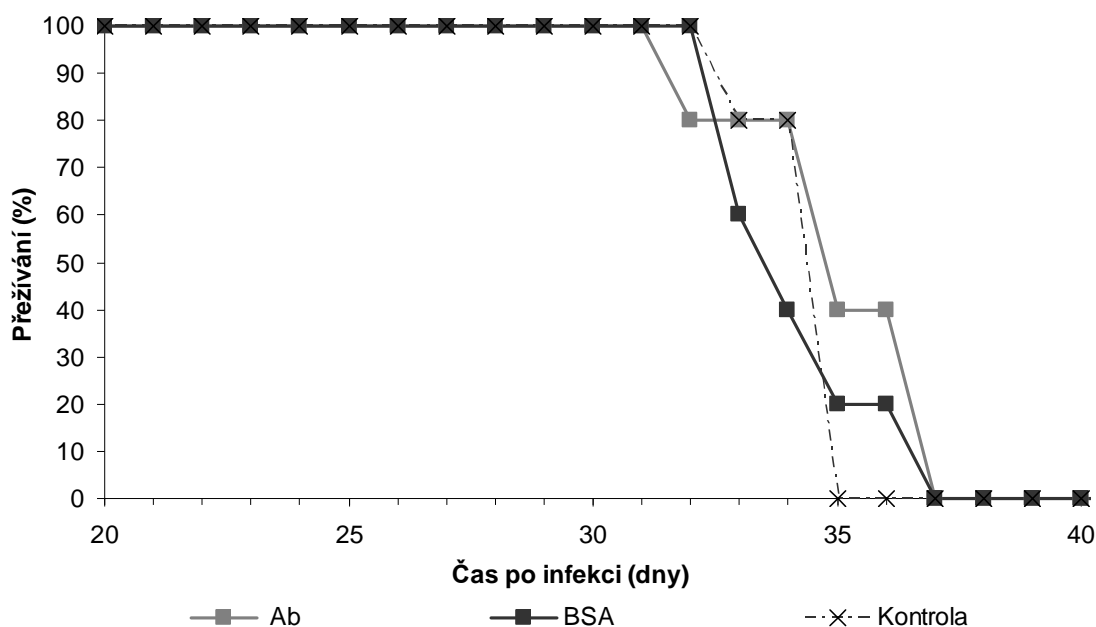
V tomto pokuse byl sledován vliv terapie komerčně vyrobeným rekombinantním myším IFN- γ a anti-*E. cuniculi* sérem na průběh experimentální p.o. infekce *E. cuniculi* u myši SCID. Schéma pokusu je popsáno v kapitole 3. 15. 3. Výsledek pokusu znázorňuje graf č. 3. Podávání anti-*E. cuniculi* séra nemělo na průběh p.o. infekce *E. cuniculi* u myši SCID žádný vliv. Mezi skupinou, které bylo podáváno pouze anti-*E. cuniculi* sérum (střední doba úhynu 38,33 dní) a kontrolní skupinou (střední doba úhynu 38,33 dní), které byl podáván pouze 0,1% roztok BSA v PBS, nebyl zaznamenán rozdíl v délce přežívání p.o. infekce *E. cuniculi*. U skupiny, která byla léčena pouze IFN- γ , bylo pozorováno prodloužení přežívání p.o. infekce *E. cuniculi* (střední doba úhynu 40,33 dní). Toto prodloužení však nebylo statisticky významné vůči kontrolní skupině nebo skupině, které bylo podáváno pouze anti-*E. cuniculi* sérum. Teprve v případě kombinované terapie IFN- γ a anti-*E. cuniculi* sérem byl zaznamenán prokazatelný vliv na přežívání p.o. infekce *E. cuniculi* u myši SCID. Střední doba úhynu v této skupině (45 dní) byla statisticky významně delší než střední doby úhynu ve všech ostatních skupinách ($p < 0,05$). Pokus byl dvakrát opakován se srovnatelnými výsledky.



Graf č. 3: Vliv terapie komerčně vyráběným myším rekombinantním IFN- γ a anti-*E. cuniculi* sérem na průběh p.o. infekce *E. cuniculi* u myši SCID. **IFN + Ab** = terapie 3×10^3 U IFN- γ + 30 μ l anti-*E. cuniculi* séra v 0,2 ml 0,1% BSA v PBS; **Ab** = terapie 30 μ l anti-*E. cuniculi* séra v 0,2 ml 0,1% BSA v PBS; **IFN** = terapie 3×10^3 U IFN- γ v 0,2 ml 0,1% BSA v PBS; **BSA** = terapie 0,2 ml 0,1% BSA v PBS.

Vliv častější a dlouhodobější terapie anti-*E. cuniculi* sérem na průběh experimentální p.o. infekce *E. cuniculi* u myši SCID byl monitorován v následujícím pokuse jehož schéma popisuje kapitola 3. 15. 4. I v případě, že byl zvýšen počet dávek anti-*E. cuniculi* séra a doba

mezi jeho jednotlivými aplikacemi byla zkrácena, se vliv terapie anti-*E. cuniculi* sérem na přežívání p.o. infekce *E. cuniculi* u myší SCID neprojevil. Střední doba úhynu ve skupině, které bylo podáváno anti-*E. cuniculi* sérum (35,2 dní), se nelišila od střední doby úhynu ve skupině, které byl podáván pouze 0,1% BSA v PBS (34,4 dní) (graf. č. 4). V tomto pokuse byl také sledován vliv opakované intraperitoneální (i.p.) aplikace terapeutických dávek na přežívání *E. cuniculi* infikovaných SCID myší. Z grafu č. 4 je patrné, že způsob podávání terapeutických dávek neměl vliv na přežívání *E. cuniculi* p.o. infikovaných SCID myší. Střední doba úhynu ve skupině, které byl podáván 0,1% roztok BSA v PBS (34,4 dní), se nelišila od střední doby úhynu ve skupině, bez jakékoli terapie (34,6 dní). Pokus byl dvakrát opakován se srovnatelnými výsledky

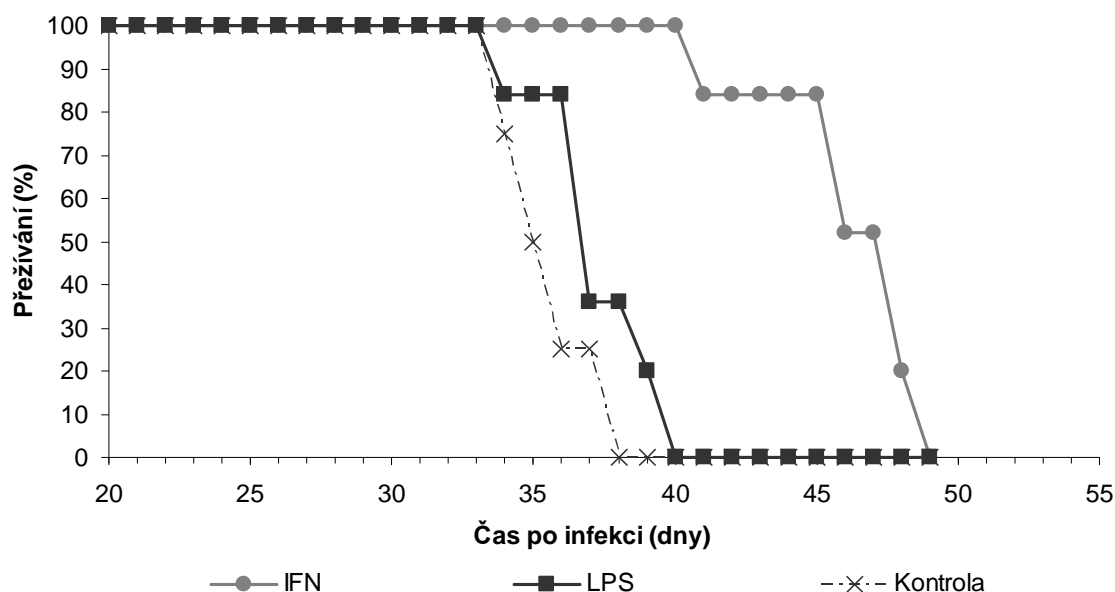


Graf č. 4: Vliv terapie anti-*E. cuniculi* sérem na průběh p.o. infekce *E. cuniculi* u myší SCID. **Ab** = terapie 30 μ l anti-*E. cuniculi* séra v 0,2 ml 0,1% BSA v PBS; **BSA** = terapie 0,2 ml 0,1% BSA v PBS; **Kontrola** = myší SCID bez jakékoli terapie.

4. 4. Vliv terapie myším rekombinantním IFN- γ vyrobeným v naší laboratoři na experimentální p.o. infekci *E. cuniculi* u myší SCID

V tomto pokuse byl sledován vliv rekombinantního IFN- γ , který byl vyroben v naší laboratoři, na průběh p.o. infekce *E. cuniculi*. Tento IFN- γ vykazoval stejnou účinnost při ochraně buněk linie myších fibroblastů L 929 proti infekci virem myší encefalomyelokarditidy jako IFN- γ komerční. Schéma pokusu popisuje kapitola 3. 15. 5. Výsledek pokusu znázorňuje graf č. 5. Pokud byl SCID myším podáván IFN- γ , prokazatelně se u nich prodloužila doba přežívání experimentální p.o. infekce *E. cuniculi* vůči oběma kontrolním skupinám. Střední doba úhynu ve skupině, které byl podáván IFN- γ byla 46,3 dní, zatímco

střední doba úhynu v kontrolních skupinách dosahovala pouze 37,33 nebo 35,7 dní. Vliv zbytkového LPS, který se nepodařilo z myšního rekombinantního IFN- γ odstranit a resuspendačního pufru (TBS) na průběh p.o. infekce *E. cuniculi* nebyl prokázán. Mezi první kontrolní skupinou, které byl podáván roztok LPS v TBS (střední doba úhynu 37,33 dní), a druhou kontrolní skupinou, která byla bez jakékoli terapie (střední doba úhynu 35,7 dní), nebyl zaznamenán rozdíl v přežívání p.o. infekce *E. cuniculi*. Látkou, která způsobila prodloužené přežívání p.o. infekce *E. cuniculi* u myši SCID byl tedy skutečně IFN- γ .

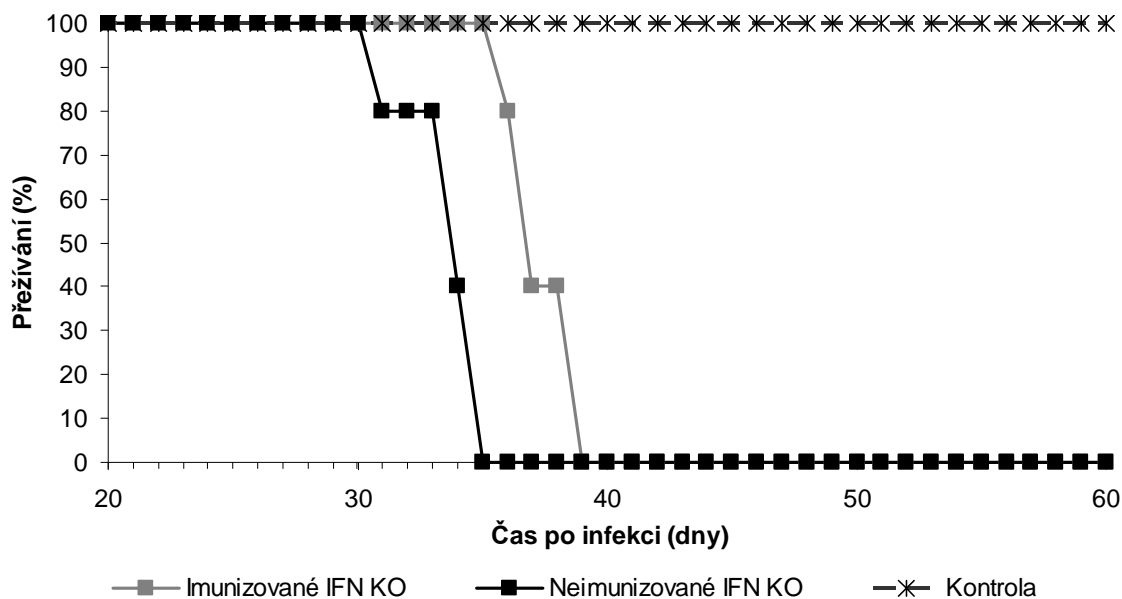


Graf č. 5: Vliv terapie myším rekombinantním IFN- γ vyrobeným na našem pracovišti na průběh p.o. infekce *E. cuniculi* u myši SCID. **IFN** = terapie $1,5 \times 10^4$ U IFN- γ v 0,2 ml TBS; **LPS** = terapie 1,4 ng LPS v 0,2 ml TBS; **Kontrola** = myši SCID bez jakékoli terapie.

4. 5. Vliv imunizace antigenem *E. cuniculi* na průběh experimentální p.o. infekce *E. cuniculi* u myši s defektním genem pro IFN- γ

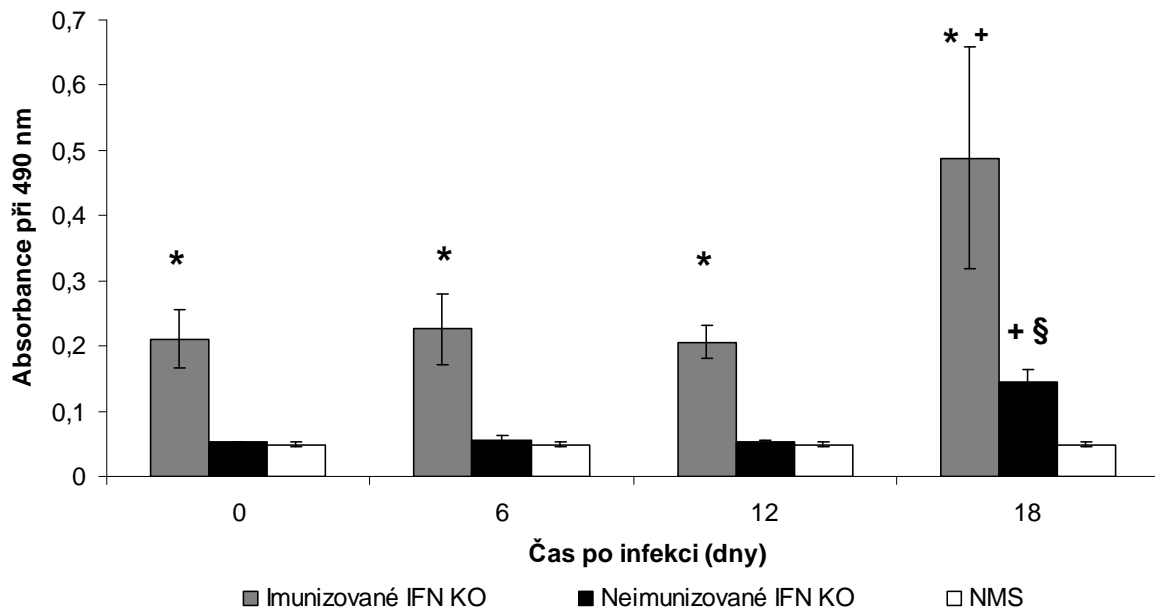
Pomocí imunizace antigenem *E. cuniculi* byl sledován vliv protilátek na průběh experimentální p.o. infekce *E. cuniculi* u myši s defektním genem pro IFN- γ . Schéma pokusu popisuje kapitola 3. 15. 6. Z grafu č. 6, který znázorňuje výsledek pokusu, je patrné, že imunizace antigenem *E. cuniculi* měla vliv na průběh následné p.o. infekce *E. cuniculi* u myši s defektním genem pro IFN- γ . Ve skupině, která byla imunizována antigenem *E. cuniculi*, dosáhla střední doba úhynu 37,6 dní, zatímco v neimunizované infikované kontrolní skupině byla střední doba úhynu 33,8 dní. Tento pozorovaný rozdíl byl statisticky významný ($p < 0,05$). Imunizace nezpůsobila u myši infekci *E. cuniculi*, neboť v druhé kontrolní skupině

antigenem *E. cuniculi* imunizovaných ale neinfikovaných myší nebyl zaznamenán žádný úhyn. Tento pokus byl dvakrát opakován se srovnatelnými výsledky.



Graf č. 6: Vliv imunizace antigenem *E. cuniculi* na průběh p.o. infekce *E. cuniculi* u myší s defektním genem pro IFN- γ . **Imunizované IFN KO** = antigenem *E. cuniculi* imunizované a *E. cuniculi* infikované myši s defektním genem pro IFN- γ ; **Neimunizované IFN KO** = naivní *E. cuniculi* infikované myši s defektním genem pro IFN- γ ; **Kontrola** = antigenem *E. cuniculi* imunizované a neinfikované myši s defektním genem pro IFN- γ .

Vliv imunizace antigenem *E. cuniculi* na intenzitu humorální imunitní odpovědi na následnou p.o. infekci *E. cuniculi* u myší s defektním genem pro IFN- γ byl monitorován v následujícím pokuse pomocí sérové hladiny specifických anti-*E. cuniculi* polyklonálních protilátek izotypu IgG (graf č. 7). Myši imunizované antigenem *E. cuniculi* měli v séru již při p.o. infikování *E. cuniculi* statisticky významně vyšší relativní množství specifických anti-*E. cuniculi* polyklonálních protilátek izotypu IgG než bylo relativní množství těchto protilátek v naivním myším séru ($p < 0,05$). Imunizované myši pak vykazovaly v průběhu celého pokusu (prvních 18 dní p.o. infekce *E. cuniculi*) statisticky vyšší hladinu specifických anti-*E. cuniculi* polyklonálních protilátek izotypu IgG než neimunizované myši ($p < 0,05$). U neimunizovaných myší bylo statisticky významné zvýšení relativního množství anti-*E. cuniculi* IgG protilátek proti hodnotě naměřené v naivním myším séru zaznamenáno až v 18. dni infekce ($p < 0,05$). Prokazatelné zvýšení relativního množství anti-*E. cuniculi* protilátek izotypu IgG nad stav, který byl navozen imunizací, bylo u imunizovaných myší pozorováno také až v 18. dni p.o. infekce *E. cuniculi*.



Graf č. 7: Relativní množství specifických anti-*E. cuniculi* protilátek izotypu IgG v séru *E. cuniculi* infikovaných myši s defektním genem pro IFN- γ . **Imunizované IFN KO** = antigenem *E. cuniculi* imunizované myši s defektním genem pro IFN- γ . **Neimunizované IFN KO** = naivní myši s defektním genem pro IFN- γ . **NMS** = naivní myši sérum; * = rozdíl mezi imunizovanou a neimunizovanou skupinou nebo imunizovanou skupinou a NMS prokazatelný na 5% hladině průkaznosti; + = rozdíl mezi stejnou skupinou v předcházejících časových intervalech prokazatelný na 5% hladině průkaznosti; § = rozdíl mezi neimunizovanou skupinou a NMS prokazatelný na 5% hladině průkaznosti.

5. Diskuze

V této práci byl sledován vliv interferonu gama (IFN- γ) a specifické polyklonální protilátky na průběh infekce *Encephalitozoon cuniculi in vivo* v případě, že nedojde k aktivaci cytotoxické T-lymfocytární odpovědi (CTL).

Pomocí adoptivních přenosů imunity bylo prokázáno, že k potlačení p.o. infekce *E. cuniculi* není zapotřebí aktivace CTL (Braunfuchsová a spol. 2002). Tento ochranný efekt je způsoben kombinací účinků CD4⁺ T-lymfocytů a specifických anti-*E. cuniculi* protilátek (Sak a spol. 2006). Jelikož v pokusech *in vitro* byl dokázán vliv IFN- γ na šíření infekce *E. cuniculi* v peritoneálních myších makrofágách (Didier 1995) a Th1 subpopulace CD4⁺ T-lymfocytů je významným producentem IFN- γ , byla navržena pracovní hypotéza, že role CD4⁺ T-lymfocytů při p.o. infekci *E. cuniculi* spočívá v produkci IFN- γ . Tedy, že význam IFN- γ při p.o. infekci *E. cuniculi in vivo* spočívá nejenom v aktivaci CTL, ale také v navození na CTL nezávislé zvýšené odolnosti organismu proti této infekci.

Tato hypotéza byla v této práci nejdříve prokázána pomocí pokusů s adoptivními přenosy imunity. Pokud byly do myší SCID přeneseny CD4⁺ T-lymfocyty z imunokompetentních BALB/c myší, které mohou produkovat IFN- γ , bylo pozorováno prodloužené přežívání p.o. infekce *E. cuniculi* u takto rekonstituovaných myší vůči kontrolní skupině, které popisuje Horká (2004) nebo Salát (2006). Avšak v případě, že byly do myší SCID přeneseny CD4⁺ T-lymfocyty, které nemohou produkovat IFN- γ (CD4⁺ T-lymfocyty z myší s nefunkčním genem pro IFN- γ), nebyla pozorována u takto rekonstituovaných myší změna odolnosti vůči p.o. infekci *E. cuniculi* (graf č. 1). Tento výsledek prokazuje, že prodloužené přežívání p.o. infekce *E. cuniculi* u myší SCID s přenesenými CD4⁺ T-lymfocyty je způsobeno právě IFN- γ , který je produkován přenesenými buňkami. Toto zjištění potvrzují i výsledky terapie p.o. infekce *E. cuniculi* u myší SCID myším rekombinantním IFN- γ . Pokud byl těmto myším podáván podle schématu popsaném v kapitole 3. 15. 5. myší rekombinantní IFN- γ , byla u nich pozorována prokazatelně prodloužená doba přežívání p.o. infekce *E. cuniculi* oproti kontrolním skupinám.

Na průběh p.o. infekce *E. cuniculi* u myší SCID mělo také vliv zda byly přenášeny CD4⁺ T-lymfocyty z *E. cuniculi* imunizovaných, nebo z naivních BALB/c myší. Přenos CD4⁺ T-lymfocytů z *E. cuniculi* imunizovaných BALB/c myší do myší SCID statisticky významně prodloužil dobu přežívání p.o. infekce *E. cuniculi* u takto rekonstruovaných myší oproti přenosu CD4⁺ T-lymfocytů z naivních BALB/c myší. To nasvědčuje tomu, že odolnost

myši SCID vůči p.o. infekci *E. cuniculi* závisí na množství do nich přenesených CD4+ T-lymfocytů specificky reagujících s prezentovaným antigenem *E. cuniculi*. Účinnost takovéto imunitní odpovědi proti p.o. infekci *E. cuniculi* tedy závisí na množství vyprodukovaného IFN- γ (graf č. 2). Toto tvrzení podporuje také porovnání účinků různě intenzivní terapie myším rekombinantním IFN- γ na p.o. infekci *E. cuniculi* u myši SCID. Pokud bylo myším podáno 6 terapeutických dávek, každý třetí den jedna dávka obsahující 3×10^3 U IFN- γ , účinek terapie se neprojevil (graf č. 3). Avšak zvýšení počtu terapeutických dávek z 6 na 12, zkrácení intervalu mezi jednotlivými aplikacemi ze tří na dva dny a zvýšení obsahu IFN- γ v dávce pro jednu myš z 3×10^3 U na $1,5 \times 10^4$ U IFN- γ mělo za následek prodlouženou dobu přežívání p.o. infekce *E. cuniculi* u takto léčených SCID myši (graf č 4).

Výše popsané výsledky prokazují, že IFN- γ skutečně navozuje vyšší odolnost organismu vůči p.o. infekci *E. cuniculi* nezávisle na aktivaci CTL a že tento účinek je závislý na množství vyprodukovaného či použitého IFN- γ . Jakým způsobem IFN- γ způsobuje prodloužené přežívání p.o. infekce *E. cuniculi* u myši SCID nemůžeme podle našich výsledků přesně určit. Jelikož však u myši SCID nedochází k aktivaci CTL ani humorální složky imunitního systému a cytotoxicita NK buněk nehraje při infekci *E. cuniculi* významnou roli, je vysoce pravděpodobné, že jsou to právě IFN- γ aktivované makrofágy vykazující v pokusech *in vitro* antimikrosporidiální aktivitu (Didier 1995), které způsobí onen zpožděný rozvoj letální p.o. infekce *E. cuniculi* pozorovaný u myši SCID léčených IFN- γ nebo s CD4+ T-lymfocyty z BALB/c myši.

Vzhledem k výsledkům této práce, může být IFN- γ také považován za případný terapeutický prostředek proti mikrosporidióze u imunodeficientních pacientů, který by možná působil proti širšímu spektru druhů mikrosporidií. Jsou však již známy jiné látky (např. analogy polyamínů nebo fluoroquinolony) s antimikrosporidiovým účinkem na širší spektrum rodů mikrosporidií zahrnující např. rod *Enterocytozoon*, který je rezistentní na albendazol (Blanshard a spol. 1992). Použití těchto látek bude zřejmě o mnoho levnější a nemusí být kontraindikováno u pacientů, u kterých je imunodeficiencie navozena záměrně např. u lidí po transplantacích, kteří představují jednu z rizikových skupin ohrožovaných letální mikrosporidiovou infekcí (Orenstein a spol. 2005). Navíc u zřejmě nejvíce mikrosporidiovou infekcí ohrožované skupiny pacientů, u pacientů s AIDS, se osvědčila antiretrovirální terapie, která má za následek částečnou imunitní rekonstrukci pacientů (Didier a spol. 2005b). Proto si nemyslím, že je IFN- γ vhodným kandidátem pro další studie týkající se terapie mikrosporidiózy.

Schéma terapie myším rekombinantním IFN- γ bylo odvozeno z práce Clemonse a spol. (2001), ve které se autoři pokusili o terapii systémové kryptokokózy u myší SCID pomocí IFN- γ (10^5 U v jedné dávce). Jelikož množství dostupného myšího rekombinantního IFN- γ neumožňovalo použití takové dávky, schéma terapie bylo zvoleno vždy tak, aby terapeutické dávky mohly být podávány co možná nejdéle s rozvíjející se p.o. infekcí *E. cuniculi* a zároveň aby množství IFN- γ v jedné dávce co možná nejvíce přesahovalo 10^3 U. Intraperitoneální (i.p.) aplikace terapeutických dávek byla zvolena, protože se nepodařilo podávat myším terapii intravenózně. Také v některých dalších skupinách bylo součástí terapie anti-*E. cuniculi* sérum jehož vliv na p.o. infekci *E. cuniculi* u myší SCID jsme chtěli porovnat s účinkem terapie anti-*E. cuniculi* monoklonální protilátkou, která byla Sakem a spol. (2006) podávána intraperitoneálně.

Druhým úkolem této studie bylo zhodnotit význam specifických polyklonálních protilátek při p.o. infekci *E. cuniculi in vivo*, neboť role specifických protilátek při infekci *E. cuniculi* ještě není úplně známa. Bylo prokázáno, že samotné protilátky nezabrání rozvoji letální p.o. nebo i.p. systémové infekce *E. cuniculi* (Salát a spol. 2004). Přesto však byl zaznamenán určitý vliv specifických protilátek na infekci způsobenou tímto patogenem. V pokusech *in vitro* bylo prokázáno, že opsonizace spór *E. cuniculi* specifickou polyklonální nebo monoklonální protilátkou se projeví zpomalením infekce tímto patogenem v neprofesionálně fagocytujících buňkách (Enriquez a spol. 1998, Schmidt a Shaddock 1984). Tedy funkce specifických protilátek spočívá v případě *E. cuniculi* zřejmě ve zpomalování šíření infekce. Tato funkce specifických protilátek byla prokázána *in vivo* jen při p.o. infekci, kdy terapie monoklonální protilátkou proti exosporě *E. cuniculi* bylo dosaženo prodlouženého přežívání u myší SCID (Sak a spol. 2006). V kombinaci s účinkem CD4⁺ T-lymfocytů dokáží dokonce specifické protilátky ochránit hostitele před rozvojem letální p.o. infekce *E. cuniculi* aniž by došlo k aktivaci cytotoxické T-lymfocytární odpovědi (CTL) (Sak a spol. 2006). Vezmeme-li v úvahu předchozí výsledky, které dokazují, že role CD4⁺ T lymfocytů při infekci *E. cuniculi* spočívá v produkci IFN- γ , potvrzuje zvýšená účinnost kombinované terapie IFN- γ a anti-*E. cuniculi* sérem oproti terapii samotným IFN- γ tuto spolupráci vlivů protilátek a CD4⁺ T-lymfocytů při obraně organismu proti p.o. infekci *E. cuniculi* (graf. č. 3). Důvodem, proč tato kombinovaná terapie nezabránila rozvinutí letální p.o. infekce *E. cuniculi* u myší SCID, ale pouze prodloužila dobu přežívání, bylo zřejmě použití nedostatečně velké terapeutické dávky IFN- γ (3×10^3 U).

Vliv samotné polyklonální protilátky na p.o. infekci *E. cuniculi* byl v této práci pozorován pouze v pokusech na myších s defektním genem pro IFN- γ , kde antigenem *E. cuniculi*

imunizované myši, přežívaly následnou p.o. infekci *E. cuniculi* prokazatelně déle než neimunizovaná kontrola (graf č. 6). Zatímco vliv i.p. terapie anti-*E. cuniculi* sérem na průběh p.o. infekce *E. cuniculi* u myši SCID v této práci prokázán nebyl (graf č. 4). Přesto i tak přináší tato studie další důkaz, že vliv specifických protilátek při p.o. infekci *E. cuniculi in vivo* spočívá ve zpomalení šíření infekce. Vliv terapie anti-*E. cuniculi* sérem na průběh p.o. infekce *E. cuniculi* u myši SCID se neprojevil, protože zřejmě nebyla v krevním oběhu vytvořena dostatečná hladina specifických polyklonálních protilátek. Ačkoliv bylo ověřeno, že specifické polyklonální protilátky z terapeutických dávek přecházely do krevního oběhu.

Jakým způsobem specifické protilátky zpomalují šíření infekce *E. cuniculi* není ještě úplně známo. Oponizace určitou specifickou protilátkou může bránit spóře *E. cuniculi* ve vystřelení pólového vlána a tím zpomalovat šíření infekce (Enriquez a spol. 1998). Jelikož se stále objevují práce zdůrazňující důležitost adherence spóry *E. cuniculi* k cytoplazmatické membráně hostitelské buňky při infekci hostitelské buňky (Southern a spol. 2006a, Southern a spol. 2006b), může být vliv oponizace spór *E. cuniculi* specifickými protilátkami také založen na ztíženém přilnutí spóry *E. cuniculi* k buňkám, které neexprimují Fc receptory (receptory zprostředkávající fagocytózu protilátkami oponizovaných částic). Jelikož byl identifikován mikrosporidiový adherentní protein (EcMsAP), kterým se spóra *E. cuniculi* specificky váže k cytoplazmatické membráně hostitelské buňky (Southern a spol. 2006a), bylo by možné rekombinantním EcMsAP (připraven Southernem a spol. 2006a) imunizovat myši s defektním genem pro IFN- γ a podle případného vlivu této imunizace na následnou p.o. infekci *E. cuniculi* vyvrátit nebo potvrdit tuto hypotézu.

Usnadnění fagocytózy u IFN- γ aktivovaných makrofágů zřejmě nehraje výraznou roli v účincích specifických protilátek na průběh p.o. infekce *E. cuniculi*, neboť spóry *E. cuniculi* využívají fagocytózu k infekci hostitelské buňky (Franzen a spol. 2005).

6. Souhrn

1. Přenos izolované populace CD4+ T-lymfocytů z naivních BALB/c myší prokazatelně prodlouží dobu přežívání následné p.o. infekce *E. cuniculi* u takto rekonstituovaných myší SCID. Narozdíl od přenosu izolované populace CD4+ T-lymfocytů z naivních myší s defektním genem pro IFN- γ .
2. SCID myši rekonstituované CD4+ T-lymfocyty z *E. cuniculi* imunizovaných BALB/c myší přežívají p.o. infekci *E. cuniculi* statisticky významně déle než SCID myši rekonstituované CD4+ T-lymfocyty z naivních BALB/c myší.
3. Terapie IFN- γ (3×10^3 U) kombinovaná s terapií anti-*E. cuniculi* sérem statisticky významně prodlužuje přežívání p.o. infekce *E. cuniculi* u myší SCID.
4. Terapie IFN- γ ($1,5 \times 10^4$ U) prokazatelně prodlužuje dobu přežívání p.o. infekce *E. cuniculi* u myší SCID.
5. Terapie anti-*E. cuniculi* sérem neprodlužuje přežívání p.o. infekce *E. cuniculi* u myší SCID.
6. Imunizace antigenem *E. cuniculi* prokazatelně prodlužuje dobu přežívání p.o. infekce *E. cuniculi* u myší s defektním genem pro IFN- γ .

7. Seznam použitých zkratek

AIDS	acquired immune deficiency syndrome (syndrom získané imunodeficiency)
AV ČR	akademie věd České republiky
BOFES	bovinní telecí sérum
BSA	bovinní sérový albumin
CD	cluster of differentiation (označení povrchových znaků buněk)
CTL	cytotoxická T-lymfocytární odpověď
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMCV	virus encephalo-myelocarditidy
FITC	fluorescein-isothiokyanát
HEPA	high efficiency particule air
HIV	human immunodeficiency virus (virus lidské imunodeficiency)
IFN- γ	interferon gama
IL	interleukin
i.p.	intraperitoneální
LPS	lipopolysacharid
MHC	major histocompatibility complex (hlavní histokompatibilní komplex)
MIC	neklasické MHC molekuly
NK	natural killer (přirozený zabíječ)
PaÚ	parazitologický ústav
PBS	fosfáty pufovaný fyziologický roztok
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
p.o.	perorální
PTS	prekolostrální telecí sérum
SCID	severe combined immunodeficiency (těžká kombinovaná imunodeficiency)
SwAM/Px	prasečí protilátka proti konstantní oblasti myšního imunoglobulinu izotypu IgG
TBS	25 mM hydroxymethylaminomethan, 150 mM NaCl v H ₂ O
T _H	populace pomocných CD4+T-lymfocytů
T _c	cytotoxický T-lymfocyt
TNF- α	tumor nekrosis faktor alfa
T-PBS	Tween 20 ve fosfáty pufovaném fyziologickém roztoku
VERO	buněčná linie z opičích ledvin

8. Literatura

- Ashton N., Wirasinha P. A. 1973:** Encephalitozoonosis (nosematosis) of the cornea. *Br. J. Ophthalmol.* 57: 669-673.
- Bacchi C. J., Weiss L. M., Lane S., Frydman B., Valasinas A., Reddz V., Sun J. S., Marton L. J., Khan I. A., Moretto M., Yarlett N., Winter M. 2002:** Novel synthetic polyamines are effective in the treatment of experimental microsporidiosis, an opportunistic AIDS-associated infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 55-61.
- Biderre C., Pages M., Metenier G., Canning E. U., Vivares C. P. 1995:** Evidence for the mallest nuclear genome (2.9 Mb) in the microsporidium *Encephalitozoon cuniculi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 74: 229-231.
- Bigliardi E., Sacchi L. 2001:** Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes Infect.* 3: 373-379.
- Bigliardi E., Selmi M. G., Lupetti P., Corona S., Gatti S., Scaglia M., Sacchi L. 1996:** Microsporidian spore wall: ultrastructural findings on *Encephalitozoon hellem* exospore. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43: 181-186.
- Bigliardi E., Gatti S., Sacchi L. 1997:** Ultrastructure of microsporidian spore wall: the *Encephalitozoon cuniculi* exospore. *Ital. J. Zool.* 64: 1-5.
- Bosma M. J., Carroll A. M. 1991:** The SCID mouse mutant: definition, characterisation, and potential use. *Ann. Rev. Immunol.* 9: 323-350.
- Braunfuchsová P., Salát J., Kopecký J. 2002:** Comparison of the significance of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in the protection of mice against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J. Parasitol.* 88: 797-799.
- Blanshard C., Ellis D. S., Tovey D. G., Dowel S., Gazzard B. G. 1992:** Treatment of intestinal microsporidiosis with albendazole in patients with AIDS. *AIDS* 6: 311-313.
- Cali A., Meisler D. M., Lowder C. Y., Lembach R., Ayers L., Takvorian P. M., Rutherford I., Longheorth D. L., McMahon J., Bryan R. T. 1991:** Corneal microsporidiosis: characterisation and identification. *J. Protozool.* 38: 215-217.
- Canning E. U., Lom J., 1986:** The microsporidia of vertebrates. Academic Press, New York, 289pp.
- Cavalier-Smith T. 1998:** A revise six-kingdom system of life. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 73: 203-266.

Couzinet S., Cejas E., Schittny J., Deplazes P., Weber R., Zimmerli S. 2000: Phagocytic uptake of *Encephalitozoon cuniculi* by nonprofessional phagocytes. *Infect. Immun.* 68: 6939-6945.

Cox J. C., Hamilton R. C., Attwood H. D. 1979: An investigation of the route and progression of *Encephalitozoon cuniculi* in adult rabbits. *J. Protozool.* 26: 260-265.

Chupp G. L., Alroy J., Adelman L. S., Breen J. C., Skolnik P. R. 1993: Myositis due to *Pleistophora* (Microsporidia) in a patient with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 16: 15-21.

Clemons K. V., Lutz J. E., Stevens D. A. 2001: Efficacy of recombinant gamma interferon for treatment of systemic cryptosporidiosis in SCID mice. *Antimicrobial Agents Chemother.* 45: 686-689.

Dall D. J. 1983: A theory for the mechanism of polar filament extrusion in the Microspora. *J. Theor. Biol.* 41: 647-659.

Deplazes P. A., Mathis R., Baumgartner I., Taner., Weber R. 1996: Immunologic and molecular characteristics of *Encephalitozoon*-like microsporidia isolated from humans and rabbits indicate that *Encephalitozoon cuniculi* is a zoonotic parasite. *Clin. Infect. Dis.* 22: 557-559.

Didier E. S. 1995: Reactive nitrogen intermediates implicated in the inhibition of *Encephalitozoon cuniculi* (phylum Microspora) replication in murine peritoneal macrophages. *Parasite Immunol.* 17: 406-412.

Didier E. S. 2005: Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Trop.* 126:145-166.

Didier E. S., Bessinger G. T. 1999: Host-parasite relationships in microsporidiosis: animal models and immunology. V *The Microsporidia and Microsporidiosis* (Wittner M., Weiss L. M.): 225-395. American Society for Microbiology.

Didier E. S., Bowers L., Stovall M. E. 2005a: Antimicrosporidial activity of (fluoro)quinolones *in vitro* and *in vivo*. *Folia Parasitol.* 52: 173-181.

Didier E. S., Maddry J. A., Brindley P. J. 2005b: Therapeutic strategies for human microsporidia infections. *Expert. Rev. Anti Infect. Ther.* 3: 419-434.

Didier E. S., Snowden K. A., Shadduck J. A. 1998: The biology of microsporidian species infecting mammals. *Adv. Parasitol.* 40: 279-316.

Didier E. S., Visvesvera G. S., Baker M. D., Rogers L. B., Bertucci D. C., DeGroot M. A., Vossbrinck C. R. 1996: A microsporidian isolated from an AIDS patient corresponds to *Encephalitozoon cuniculi* III, originally isolated from domestic dogs. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2835-2837.

- Didier E. S., Vossbrinck C. R., Baker M. D., Rogers L. B., Bertucci D. C., Shadduck J. A. 1995:** Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. Parasitology 111: 411-421.
- Didier E. S., Weiss L. M. 2006:** Microsporidiosis: current status. Curr. Opin. Infect. Dis. 19: 485-492.
- Ergens R., Lom J. 1970:** Původci parazitárních onemocnění ryb. Praha, Academia: 383pp.
- Enriquez F.J., Wagner G., Fragoso M., Ditrich O. 1998:** Effects of an anti-exospore monoclonal antibody on microsporidial development *in vitro*. Parasitology 117: 515-520.
- Foucault C., Drancourt M. 2000:** Actin mediates *Encephalitozoon intestinalis* entry into the human enterocyte-like cell line, Caco-2. Microb. Pathog. 28: 51-58.
- Franzen C. 2004:** Microsporidia: how can they invade other cells? Trends Parazitol. 20: 275-279.
- Franzen C., Müller A., Hartmann P., Salzberger B. 2005:** Cell invasion and intracellular fate of *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia). Parasitology 130: 285-292.
- Franzen C. 2005:** How do microsporidia invade cells? Folia Parasitol. 52: 36-40.
- Frixione E., Ruiz L., Cerbon J., Undeen A. H. 1997:** Germination of *Nosema algerae* (Microspora) spores: conditional inhibition by D₂O, ethanol and Hg²⁺ suggest dependence of water influx upon membrane hydration and specific transmembrane pathways. J. Eucaryot. Microbiol. 44: 109-116.
- Garcia L. S. 2002:** Laboratory identification of the microsporidia. J. Clin. Microbiol. 40: 1892-1901.
- Germot A., Philippe H., Guyader H., 1997:** Evidence for loss of mitochondria in microsporidia, from a mitochondrial-type HSP 70 in *Nosema locustae*. Mol. Biochem. Parasitol. 87: 159-168.
- Hayman J. R., Southern T. R., Nash T. E. 2005:** Role of sulfated glycans in adherence of the microsporidian *Encephalitozoon intestinalis* to host cells *in vitro*. Infect. Immun. 73: 841-848.
- Hollister W. S., Canning E. U., Weidner E., Field A. S., Kench J., Marriott D. J. 1996:** Development and ultrastructure of *Trachipleistophora hominis* n.g., n.sp. after *in vitro* isolation from an AIDS patient and inoculation into athymic mice. Parasitology 122: 143-154.
- Horká H. 2004:** Úloha T buněčných subpopulací při infekci mikrosporidií *Encephalitozoon cuniculi*. Bakalářská práce, Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. 37pp.
- Hořejší V., Bartůňková J. 2002:** Základy imunologie. Nakladatelství TRITON.

- Keeling P. J., McFadden G. I. 1998:** Origins of microsporidia. Trends. Microbiol. 6: 19-23.
- Keohane E. M., Weiss L. M. 1999:** The structure, function and composition of the microsporidian polar tube. V The Microsporidia and Microsporidiosis (Wittner M., Weiss L. M.): 196-224. American Society for Microbiology.
- Khan I. A., Moretto M. 1999:** Role of gamma interferon in cellular immune response against murine *Encephalitozoon cuniculi* infection. Infect. Immun. 67: 1887-1893.
- Khan I. A., Moretto M., Weiss L. M. 2001:** Immune response of *Encephalitozoon cuniculi* infection. Microbes Infect. 3: 401-405.
- Koudela B., Kučerová Š., Hudcovic T. 1999:** Effect of low and high temperatures on infectivity of *Encephalitozoon cuniculi* spores suspended in water. Folia Parasitol 46: 171-174.
- Koudela B., Lom J., Vítovec J., Kučerová Z., Ditrich O., Trávníček J. 1994:** *In vivo* efficacy of albendazole against *Encephalitozoon cuniculi* in SCID mice. J. Eukaryot. Microbiol. 41: 49-50.
- Krejsek J., Kopecký O. 2004:** Klinická imunologie. Vydavatelství NUCLEUS HK.
- Levaditi C., Nicolau S., Schoen R. 1923:** L'agent étiologique de l'encéphalite épizootique du lapin (*Encephalitozoon cuniculi*). C. R. Soc. Biol. Paris 89: 984-986.
- Magaud A., Achbarou A., Desportes-Livage I. 1997:** Cell invasion by the microsporidium *Encephalitozoon intestinalis*. J. Eukaryot. Microbiol. 44: 81S.
- Mathis A., Weber R., Deplazes P. 2005:** Zoonotic potential of the microsporidia. Clin. Microbiol. Rev. 18: 423-445.
- Mo L., Drancourt M. 2004:** Monoclonal antibodies for specific detection of *Encephalitozoon cuniculi*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 11: 1060-1063.
- Molina J. M., Tourneur M., Sarfati C. 2002:** Fumagilin treatment of intestinal microsporidiosis. N. Engl. J. Med. 343: 1963-1969.
- Morpeth S. C., Thielman N. M. 2006:** Diarrhea in patients with AIDS. Curr. Treat. Options Gastroenterol. 9: 23-37.
- Niederkorn J. Y., Brieland J. K., Mayhew E. 1983:** Enhanced natural killer cell activity in experimental murine encephalitozoonosis. J. Parasitol. 71: 70-74.
- Orenstein J. M., Russo P., Didier E. S. 2005:** Fatal pulmonary microsporidiosis due to *Encephalitozoon cuniculi* following allogeneic bone marrow transplantation for acute myelogenous leukemia. Ultrastruct. Pathol. 29: 269-276.
- Pleshinger J., Weidner D. 1985:** The microsporidian invasion tube. Discharge activation begins with pH-triggered Ca²⁺ influx. J. Cell. Biol. 100: 1834-1838.

- Sak B., Ditrich O. 2005:** Humoral intestinal immunity against *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia) infection in mice. *Folia Parasitol* 52: 158-162.
- Sak B., Salát J., Horká H., Saková K., Ditrich O. 2006:** Antibodies enhance the protective effect of CD4⁺ T lymphocytes in SCID mice perorally infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *Parasite Immunol.* 28: 95-99.
- Salát J., Horká H., Sak B., Kopecný J. 2006:** Pure CD4⁺ T lymphocytes fail to protect perorally infected SCID mice from lethal microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi*. *Parasitol Res.* 99: 682-686.
- Salát J., Sak B., Le T., Kopecný J. 2004:** Susceptibility of IFN-gamma or IL-12 knock-out and SCID mice to infection with two microsporidian species, *Encephalitozoon cuniculi* and *E. intestinalis*. *Folia Parasitol.* 51: 275-282.
- Schottelius J., Schmetz C., Kock N. P., Schuler T., Sobottka I., Fleischer B. 2000:** Presentation by scanning electron microscopy of the life cycle of microsporidia of the genus *Encephalitozoon*. *Microbes Infect.* 2: 1401-1406.
- Sousa C. R., Hieny S., Scharton-Kersten T., Jankovic D., Charest H., Germain R. N., Sher A. 1997:** *In vivo* microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J. Exp. Med.* 186: 1819-1829.
- Schmidt E.C., Shadduck J.A. 1984:** Mechanisms of resistance to the intracellular protozoan *Encephalitozoon cuniculi* in mice. *J. Immunol.* 133: 2712-2719.
- Southern T. R., Jolly C. E., Lester M. E., Hayman J. R. 2006a:** Identification of a microsporidia protein potentially involved in spore adherence to host cells. *J. Eukaryot. Microbiol.* 54: 68S-69S.
- Southern T. R., Jolly C. E., Lester M. E., Hayman J. R. 2006b:** Augmentation of microsporidia adherence and host cell infection by divalent cations. *FEMS Microbiol. Lett.* 260: 143-149.
- Sprague V., Becnel J. J., Hazard E. I. 1992:** Taxonomy of phylum Microspora. *Crit. Rev. Microbiol.* 18: 285-395.
- Undeen A. H. 1990:** A proposed mechanism for the germination of microsporidian (Protozoa: Microspora) spores. *J. Theor. Biol.* 142: 223-235.
- Undeen A. H., Frixione E. 1990:** The role of osmotic pressure in the germination of *Nosema algerae* spores. *J. Protozool.* 37: 561-567.

Undeen A. H., Vander Meer R. K. 1994: Conversion of intrasporal trehalose into reducing sugars during germination of *Nosema algerae* (Protista: Microspora) spores: a quantitative study. *J. Eukaryot. Microbiol.* 41: 129-132.

Van Gool T., Snijders F., Reiss P., Schattenkerk J. K., van den Bergh Weerman M. A., Bartelsman J. F., Bruins J. J., Canning E. U., Dankert J. 1993: Diagnosis of intestinal and disseminated microsporidial infections in patients with HIV by new rapid fluorescence technique. *J. Clin. Pathol.* 46: 694-699.

Vávra J., Dahbiová R., Hollister W. S., Canning E. U. 1993: Staining of microsporidian spores by optical brighteners with remarks on the use of brighteners for the diagnosis of AIDS associated human microsporidiosis. *Folia Parasitol.* 40: 267-272.

Vávra J., Larrison J. I. R. 1999: Structure of the microsporidia. V *The Microsporidia and Microsporidiosis* (Wittner M., Weiss L. M.): 7-84. American Society for Microbiology.

Visvesvara G. S., Moura H., Leitch G. J. 2005: Public health importance of *Brachiola algerae* (Microsporidia): an emerging pathogen of humans. *Folia Parasitol.* 52: 83-94.

Vossbrinck C. R., Woese C. R. 1986: Eukaryotic ribosomes that lack a 5.8S RNA. *Nature* 320: 287-288.

Vossbrinck C. R., Maddox J. V., Friedman S., Debrunner-Vossbrinck B. A., Woese C. R. 1987: Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature* 326: 411-414.

Weber R., Bryan R. T. 1994: Microsporidial infections in immunodeficient and immunocompetent patients. *Clin. Infect. Dis.* 19: 517-521.

Weidner E. 1975: Interactions between *Encephalitozoon cuniculi* and macrophages. Parasitophorous vacuole growth and the absence of lysosomal fusion. *Z. Parasitenkd.* 47: 1-9.

Weidner E., Byrd W., Scarborough A., Pleshinger J., Sibley D. 1984: Microsporidian spore discharge and the transfer of sporoplast organelle membrane into plasma membrane. *J. Protozool.* 31: 195-198.

Weidner E., Sibley L. D. 1985: Phagocytized intracellular microsporidian blocks phagosome acidification and phagosome-lysosome fusion. *J. Protozool.* 32: 311-317.

Wright J. H., Craighead E. M. 1922: Infectious motor paralysis in young rabbits. *J. Exp. Med.* 36: 135-140.

www. jax. org.: <http://jaxmice.jax.org/strain/002286.html>