

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**



Magisterská diplomová práce

**Úloha CD4+ a CD8+ T-lymfocytů v imunitní odpovědi při  
žaludeční kryptosporidíóze savců**

Bc. Alena Kodádková

Školitel: Ing. Martin Kváč, Ph.D.

Školitel specialista: RNDr. Jiří Salát, Ph.D.

České Budějovice, 2009

**Kodádková A.**, 2009: Úloha CD4+ a CD8+ T-lymfocytů v imunitní odpovědi při žaludeční kryptosporidii savců [Roles of CD4+ and CD8+ T-lymphocytes in immune response to the gastric cryptosporidiosis]. 36 pp., University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Science, Czech Republic.

**Annotation:**

The roles of CD4+ and CD8+ T-cells were studied by using *Cryptosporidium muris* and mouse model of infection: immunized and naive BALB/c mice as a source of cells for adoptive transfer of immunity to SCID mice. Naive and primed CD4+ T-cells have a major effect in immunity of cryptosporidial infection. However SCID mice reconstituted with primed CD8+ T-cells were able to recover from the infection. The purity of the adoptive transfer pre and post-inoculation is discussed.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své magisterské práce, a to v nezkrácené podobě, Biologickou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách. Prohlašuji, že jsem uvedenou magisterskou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím citované literatury.

V Českých Budějovicích dne 3. května 2009

.....

Práce je součástí programu Laboratoře lékařské a veterinární parazitologie, Parazitologického ústavu, BC AV ČR, v.v.i. a byla financována z grantu GA AV KJB500960701, Imunitní odpověď myši na infekci různými druhy savčích žaludečních kryptosporidií (řešitel: Martin Kváč).

**poděkování:**

Můj velký dík patří celé laboratoři Veterinární a lékařské parazitologie, zejména mému školiteli Martinovi Kváčovi. Za podnětné konzultace děkuji školiteli specialistovi Jiřímu Salátovi. Dále děkuji Robertovi Tropkovi ze pomoc nejen se statistikou a celé rodině za podporu.

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>2</b>
1.1. Kryptosporidie.....	2
1.1.1. Biologie kryptosporidií.....	2
1.1.2. Žaludeční kryptosporidie.....	3
1.1.2.1. Druhy a genotypy žaludečních kryptosporidií .....	3
1.1.2.2. Hostitelská specifita žaludečních kryptosporidií savců.....	3
1.1.2.3. Patogenita žaludečních kryptosporidií.....	5
1.2. Imunitní odpověď na infekci žaludečními kryptosporidii.....	5
1.2.1. Přírozená imunita u žaludečních kryptosporidií savců.....	6
1.2.2. Získaná imunita u žaludečních kryptosporidií savců .....	7
1.2.2.1. Humorální odpověď.....	7
1.2.2.2. Buněčná imunita .....	7
<b>2. Cíle práce</b> .....	<b>9</b>
<b>3. Materiál a metodika</b> .....	<b>10</b>
3.1. Oocysty <i>Cryptosporidium muris</i> .....	10
3.2. Čištění a diagnostika oocyst <i>C. muris</i> .....	10
3.2.1. Čištění kryptosporidií na sacharózovém gradientu (Arrowood et Sterling 1987). .	10
3.2.2. Čištění kryptosporidií na cesium-chloridovém gradientu (Arrowood et Donaldson 1996).....	10
3.2.3. Dezinfekce a filtrace přes sítko.....	11
3.2.4. Diagnostika oocyst kryptosporidií .....	11
3.3. Myši.....	11
3.4. Experimentální perorální infekce <i>C. muris</i> .....	11
3.5. Získání suspenze splenocytů.....	12
3.6. Deplece CD4+ a CD8+ T-lymfocytů.....	12
3.6.1. Standardizace metodiky deplece .....	12
3.7. Pozitivní imunomagnetická separace CD4+ a CD8+ T-lymfocytů pomocí Dynalbeads (Dynal Biotech ASA, Oslo, NOR).....	13
3.8. Pozitivní izolace CD4+ a CD8+ T-lymfocytů pomocí MicroBeads (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE) .....	14
3.10. Kontrola čistoty přenosu T-lymfocytů z myši po pokusu.....	15
3.11. Design jednotlivých infekčních experimentů.....	16
3.11.1. Adoptivní přenos CD4+ a CD8+ T-lymfocytů (imunomagnetická izolace MACS) .....	16
3.11.2. Adoptivní přenos splenocytů s deplecí CD4+ nebo CD8+ T-lymfocytů .....	17
3.11.3. Adoptivní přenos CD4+ a CD8+ T-lymfocytů s předchozí deplecí.....	17
3.12. Statistické metody.....	17
<b>4. Výsledky</b> .....	<b>19</b>
4.1. Standardizace metodiky deplece .....	19
4.2. Vliv adoptivního přenosu izolovaných populací CD4+ a CD8+ T-lymfocytů na infekci SCID myši (experiment 1).....	19
4.3. Vliv adoptivního přenosu splenocytů s deplecí CD4+ nebo CD8+ T-lymfocytů na infekci SCID myši (experiment 2).....	21
4.4. Vliv adoptivního přenosu izolovaných CD4+ a CD8+ T-lymfocytů s předchozí deplecí na infekci SCID myši (experiment 3).....	22
4.5. Shrnutí výsledků.....	22
<b>5. Diskuze</b> .....	<b>29</b>
<b>6. Závěr</b> .....	<b>32</b>
<b>7. Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>32</b>
<b>8. Literatura</b> .....	<b>34</b>

# 1. Úvod

## 1.1. Kryptosporidie

### 1.1.1. Biologie kryptosporidií

Kryptosporidie jsou lékařsky a veterinárně významní jednobuněční paraziti infikující všechny třídy obratlovců. První zástupce, *Cryptosporidium muris*, byl popsán Tyzzerem v roce 1907 z žaludečních žláz laboratorních myší. Kryptosporidie mají své jméno odvozeno od morfologického znaku chybějící sporocysty v oocystě .

Kryptosporidie jsou jednou z linií kmene Apicomplexa, jejich příbuzenské vztahy v rámci kmene jsou stále diskutovány. Dříve byly kryptosporidie řazeny mezi kokcidie (Corliss 1994, Fayer et al. 1997). Nicméně na základě fylogenetických studií malé ribosomální podjednotky RNA (SSU rRNA) byla prokázána jejich příbuznost s gregarinami, s nimiž tvoří sesterskou skupinu na bázi celého kmene Apicomplexa (Carreno et al. 1999). Jejich bazální pozici podporuje také nepřítomnost apikoplastu a fylogenetická studie celých genomů u sedmi druhů Apicomplex (Zhu et al. 2000, Kuo et al. 2008). Mezi společné morfologické znaky kryptosporidií a gregarin patří zánik apikálního komplexu brzy po invazi hostitelské buňky a morfologická stavba organel sloužících k přichycení k hostitelské buňce (u kryptosporidií *feeder organella*, u gregarin *epimerit*) (Valigurová et al. 2007).

Kryptosporidie infikují převážně gastrointestinální trakt hostitele. Monoxenní vývojový cyklus kryptosporidií zahrnuje pohlavní (gamogonie) a nepohlavní fáze (sporogonie, merogonie). Lokalizace kryptosporidií vůči hostitelské buňce byla nazývána jako intracelulární extracytoplasmatická. Valigurová et al. (2008), po podrobné morfologické studii, charakterizují lokalizaci jako epicelulární: parazit je v parazitoformní vakuole, která vzniká z vnější mikrovilární membrány hostitelské buňky (obrázek 1).



**Obrázek 1.** Přichycení k hostitelské buňce, parazitoformní vakuola (převzato z Valigurová et al. 2008).

V rámci rodu *Cryptosporidium* lze podle lokalizace vývojového cyklu v hostiteli odlišit dvě skupiny - skupinu infikující primárně žaludek a skupinu s afinitou ke sliznici střeva. Tyto skupiny žaludečních a střevních kryptosporidií jsou monofyletické (Xiao et al. 2004). Nápadným odlišujícím znakem je také velikost oocyst. Střevní kryptosporidie mají menší kulaté oocysty (např. *C. parvum* 5 × 4,5 μm; Tyzzer 1912), kdežto žaludeční druhy mají oocysty větší a oválné (např. *C. andersoni* 7,4 × 5,5 μm; Lindsay et al. 2000).

### **1.1.2. Žaludeční kryptosporidie**

#### **1.1.2.1. Druhy a genotypy žaludečních kryptosporidií**

Do současnosti bylo popsáno ze žaludku obratlovců šest druhů kryptosporidií, *C. muris* a *C. andersoni* u savců, *C. serpentis* u plazů, *C. galli* u ptáků, *C. molnari* u ryb a *C. fragile* u obojživelníků (Tyzzer et al. 1910, Levine 1980, Pavlásek et al. 1999, Lindsay et al. 2000, Alvarez-Pellitero et Sitjá-Bobadilla 2002, Jirků et al. 2008). Dále je známo šest genotypů žaludečních kryptosporidií „*Cryptosporidium* Caribou“ ze soby, „*Cryptosporidium muris* Japanese field mouse“ z myšice japonské, „*Cryptosporidium* Lizard“ z ještěrky, „*Cryptosporidium* Tortoise“ z želvy, „*Cryptosporidium* Woodcock“ ze sluky lesní a „*Cryptosporidium* galli Finch“ z pěnkavy (Fayer 2008).

#### **1.1.2.2. Hostitelská specifita žaludečních kryptosporidií savců**

Vedle molekulárních rozdílů, morfologie vývojových stádií a lokalizace vývojového cyklu, je přirozená hostitelská specifita jedním ze základních znaků odlišujících od sebe jednotlivé druhy kryptosporidií (Xiao et al. 2004). Dosud byly u savců popsány dva druhy žaludečních kryptosporidií *C. andersoni* a *C. muris* s řadou kmenů lišících se svou hostitelskou specifitou (Tyzzer 1910, Lindsay et al. 2000, Morgan et al. 2000, Xiao et al. 2004). V současnosti převládá názor, že oba druhy představují komplex skrytých druhů tak, jak to bylo dříve prokázáno u střevních druhů kryptosporidií (Kváč et al. 2008). Naproti tomu se u některých kmenů/izolátů může jednat o rozdíl způsobený vnitrodruhovou variabilitou (Xiao et al. 2004).

Druh *C. andersoni* byl donedávna spojován pouze s přežvýkavci (zejména skot) a považován za neinfekční pro myši (Lindsay et al. 2000). Před popisem byla *C. andersoni* řazena spolu s dalšími žaludečními kmeny do skupiny označované *C. muris* nebo *C. muris*-like. Koudela et al. (1998) pomocí experimentálních infekcí pískomilů mongolských (*Meriones unguiculatus*) žaludečními kryptosporidii ze skotu rozšířil znalosti o

hostitelském spektru druhu, jenž byl později identifikován jako ze skotu popsaný druh *C. andersoni* (Lindsay et al. 2000). V roce 2003 byl publikován první molekulárně podpořený nález *C. andersoni* u nepřezvýkavce ve volné přírodě, konkrétně u sviště bobaka (*Marmota bobak*) (Ryan et al. 2003). Koyama et al. (2005) popsali v rámci druhu *C. andersoni* kmen Kawatabi získaný z přirozeně infikované krávy, který byl infekční pro laboratorní SCID myši, a tím padl poslední odlišující znak mezi *C. andersoni* a *C. muris* a to neinfekčnost pro laboratorní myši. Navíc izolát *C. andersoni* z přirozeně infikovaného velblouda dvouhrbého (*Camelus bactrianus*) není infekční pro telata (Wang et al. 2008).

Hostitelské spektrum *C. muris* je oproti předešlému druhu mnohem širší, nelze již jednoznačně konstatovat, že typickým hostitelem *C. muris* jsou hlodavci (Tyzzer 1910). V rámci tohoto druhu byly totiž popsány kmeny přirozeně infikující především přezvýkavce. Přirozená infekce byla popsána také z velblouda dvouhrbého (*Camelus bactrianus*) (*C. muris* 22) a žirafy síťované (*Giraffa camelopardalis reticulata*) (*C. muris* GC07) (Morgan et al. 2000, Kodádková 2007). Hostitelská specifita se navíc výrazně liší i v rámci jednotlivých kmenů/izolátů.

Nejpodrobněji jsou prostudovány tři izoláty, *C. muris* CB03 nalezený u velblouda dvouhrbého (*Camelus bactrianus*) v zoologické zahradě v Plzni, *C. muris* TS03 z hlodouna východoafrického (*Tachyoryctes splendens*), který byl použit k infekčním pokusům v této diplomové práci, a *C. muris* RN66 (typový izolát) z potkana obecného (*Rattus norvegicus*). Částečné sekvence genu SSU rRNA jsou identické u *C. muris* CB03 a *C. muris* RN66, *C. muris* TS03 má navíc inzert ATT, A a jednu substituci T-C. Rozdíly v dostupných sekvencích genu SSU rRNA u všech dosud známých izolátů *C. muris* jsou uvedeny v tabulce 1. Izoláty RN66 a TS03 jsou navzdory jejich molekulárním rozdílům neinfekční pro ovce a kozy, zatímco izolát CB03, identický s izolátem RN66, je pro ně infekční. Všechny tři izoláty jsou infekční pro kysu malou (*Mastomys coucha*; Kváč et al. 2008).

**Tabulka 1.** Rozdíly mezi izoláty *C. muris* v SSU rRNA.

Druh/izolát	Hostitel	číslo v GenBank	Lokalizace mutací v genu SSU rRNA <sup>a</sup>								
			40	52	422	443	462	467-9	483	521	608
<i>C. muris</i> RN 66	<i>Rattus norvegicus</i>	EU24505	C	A	T	A	T	-	C	-	-
<i>C. muris</i> 22	<i>Camelus bactrianus</i>	AF093497	C	A	T	A	T	-	C	-	-
<i>C. muris</i> 34	<i>Procapra capensis</i>	AF093498	C	A	T	A	T	-	C	-	-
<i>C. muris</i> CB03	<i>Camelus bactrianus</i>	EU245044	C	A	T	A	T	-	C	-	-
<i>C. muris</i> TS03	<i>Tachyoryctes splendens</i>	EU245043	T	A	T	A	T	TTA	C	A	-
<i>C. muris</i>	<i>Felis catus</i>	DQ836341	C	G	T	A	T	-	C	-	-
<i>C. muris</i>	<i>Canis familiaris</i>	EU549784	?	?	T	A	T	-	C	-	-
<i>C. muris</i>	<i>Phoca hispida</i>	EU156446	C	A	T	G	A	-	C	-	-
<i>C. muris</i> Kawatabi	<i>Apodemus speciosus</i>	AY642591	T	A	C	A	-	-	T	-	G
<i>C. muris</i> GC07	<i>Giraffa camelopardalis reticulata</i>	FJ883577	C	A	T	A	T	-	C	-	-

<sup>a</sup> Pozice nukleotidů v alignmentu. Pozice v jednotlivých sekvencích se liší vlivem gapů vzniklých v alignovaných sekvencích (781 bp).; ? chybějící data; - gap

### 1.1.2.3. Patogenita žaludečních kryptosporidií

Kryptosporidíóza způsobená žaludečními druhy má ve většině případů asymptomatický průběh. Zejména u nich nebývají pozorované průjmové příznaky, které jsou charakteristické pro infekce způsobené střevními druhy kryptosporidií. Klinické příznaky spojené s anorexií a úbytkem hmotnosti byly popsány pouze v několika případech (Anderson 1987, Pospischil et al. 1987). Infekce je lokalizována výhradně v žlázaté části žaludku, u přežvýkavců pouze v pravém žaludku – slezu (Kváč et Vítovec 2003).

Ve většině případů žaludečních kryptosporidíóz nebyly detekovány makroskopické, ani mikroskopické změny, zejména nejsou přítomny zánětlivé procesy v *lamina propria* žaludeční sliznice (Anderson 1987, Iseki et al. 1989, Özkul et Audin 1994, Kváč et Vítovec 2003). Nicméně v ojedinělých případech byly tyto zánětlivé infiltráty v *lamina propria* popsány, především v místě probíhající infekce při vysokých infekčních dávkách *C. muris* u myší, koinfekce *C. muris*-like s bakterií podobné *Helicobacter heilmannii* u opic, nebo u skotu s dlouhodobou chronickou infekcí *C. andersoni* (Taylor et al. 1999, Dubey et al. 2002, Masuno et al. 2006).

## 1.2. Imunitní odpověď na infekci žaludečními kryptosporidiiemi

Průběh žaludeční kryptosporidíózy je u imunokompetentních jedinců často asymptomatický, naproti tomu u imunodeficitních jedinců (např. AIDS pacienti) jsou klinické projevy závažnější (Flanigan et al. 1992). Vzhledem k tomu, že doposud neexistuje žádná účinná terapie kryptosporidíózy, specifická imunitní odpověď je jediným známým účinným

mechanismem k eliminaci kryptosporidií (Hommer et al. 2003). Její pochopení je proto pro nalezení účinných imunoterapeutik nezbytné.

Imunitní mechanismy jsou nejlépe prostudovány u střevního druhu *C. parvum*. Ten je věkově specifický: dospělá zvířata k němu nejsou přirozeně vnímavá a dají se považovat za rezistentní. Žaludeční druh *C. muris* představuje vhodný model pro studium imunitní odpovědi z důvodu dlouhé prepatentní a patentní periody a absenci věkové specifity, díky které lze provádět srovnávací studie infekivity u imunokompetentních a imunodeficitních myší (McDonald et Bancroft 1993). Zatímco imunokompetentní myši se z infekce *C. muris* vyléčí, u imunodeficitních myší přetrvává chronická forma infekce (McDonald 1996). Další výhodou *C. muris* je snadné uchování v laboratoři pomocí pasáží přes některé druhy hlodavců, u nichž se i přes jejich imunokompetenci vyvíjí chronická infekce (krysa malá *Mastomys coucha*).

### 1.2.1. Přirozená imunita u žaludečních kryptosporidií savců

Přirozená imunita zahrnuje především makrofágy, dendritické buňky, granulocyty, NK buňky (*natural killers*, přirození zabijáci) a komplement. U SCID myší, kterým díky absenci B a T-lymfocytů chybí získaná imunita, jsou všechny součásti přirozené imunity přítomny, tato část imunitní odpovědi je však u nich málo studována. V případě infekcí způsobených *C. parvum* byla sledována interference mucinu se schopností sporozoita přichytit se a invadovat hostitelskou buňku (Cevallos et al. 2000). Přestože při žaludeční kryptosporidióze tato interference nebyla dosud sledována, lze předpokládat stejnou schopnost mucinu v žaludku jako ve střevě.

Interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), který je produkován NK buňkami a T-lymfocyty, je součástí přirozené i získané imunity. Během infekce BALB/c myší se postupně od 14 DPI (dny po infekci) zvyšuje jeho produkce, nejvyšší je po vyléčení infekce (Tilley et al. 1995). U infikovaných BALB/c myší se po podání anti-INF- $\gamma$  protilátky zvýšila produkce oocyst. Nicméně opakované dávky anti-INF- $\gamma$  vyléčení z infekce nezabránilo. To nasvědčuje tomu, že INF- $\gamma$  hraje důležitou roli v počátcích vývoje imunity proti infekci *C. muris* (McDonald et al. 1992).

Kromě studovaného vlivu NK buněk byly u *C. muris* sledovány počty neutrofilů, eosinofilů a monocytů (prekursory makrofágů) a pravděpodobně k eliminaci parazita významně nepřispívají (Miller et Schaefer 2007).

### 1.2.2. Získaná imunita u žaludečních kryptosporidií savců

Získaná imunita je specifická, její vývoj trvá určitou dobu a zahrnuje složku humorální a buněčnou. Z chronické infekce SCID myši vyplývá, že významný prvek v eliminaci parazita zaujímají B a T-lymfocyty, jejichž absencí jsou SCID myši charakterizovány.

#### 1.2.2.1. Humorální odpověď

Protilátky specifické proti kryptosporidiím se během infekce objevují v krvi a v mukóze u řady savců, zjištěny byly např. u lidí a u skotu (Ungar et al. 1986, Peeters et al. 1992). Infekce SCID myši s rekonstitucí splenocyty s depletovanými B-lymfocyty probíhala shodně jako u SCID myši s rekonstitucí splenocyty, u nichž tyto buňky depletovány nebyly (McDonald et al. 1992). Existuje řada prací zabývajících se pasivní imunizací mláďat matkou, která prodělala infekci. Kuřata slepic, které prodělaly infekci *C. baileyi*, byla ke stejné infekci rezistentnější než kontrolní skupina (Hornok et al. 1998). Nicméně u lidí s chronickou kryptosporidiózou nebyla prokázána vnímavost při léčbě bovinním kolostrem obsahujícím antikryptosporidiální protilátky (Saxon et Weinstein 1987). Protilátková imunita má zřejmě omezenou schopnost eliminovat reprodukci parazita. Tomu odpovídá množství cirkulujících B-lymfocytů, které se po infekci zvyšuje a dosahuje maxima 3 DPI (dny po infekci) a pak postupně klesá (Miller et Schaefer 2007).

#### 1.2.2.2. Buněčná imunita

Význam T-lymfocyty zprostředkované imunity u kryptosporidiózy je zřejmý zejména u AIDS pacientů, u kterých při nízkém počtu cirkulujících CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů (<180 mm<sup>3</sup>) přechází infekce v chronickou a život ohrožující (Flanigan et al. 1992).

Imunita k infekci může být adoptivně přenesena do SCID myši nejčastěji ze sleziny nebo mízní uzliny z imunokompetentní myši. Pokud přenesené buňky pocházely z imunizovaného dárce s infekcí stejným druhem/kmenem kryptosporidie, SCID myši se vyléčily dříve než kontrola rekonstituovaná lymfocyty od naivního dárce (BALB/c myši) (McDonald et al. 1996).

Při rekonstituci imunity depletovanými CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty nedošlo u SCID myši k samovyléčení, navíc podáváním anti-CD4<sup>+</sup> protilátky došlo u imunokompetentních myši ke zhoršení průběhu infekce (Ungar et al. 1991, McDonald et al. 1994). Nicméně při depleci CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů u přenášených buněk se SCID myši nevyléčily. Naopak deplece CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů měla na protektivní imunitu přenesených buněk jen nepatrný negativní efekt (delší patentní perioda) (McDonald et al. 1994, 1996).

Význam CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů není dosud plně objasněn. V rozporu s teorií, že CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty nejsou nutné k potlačení infekce je práce o zánětlivé odpovědi skotu na *C. parvum* (Abrahamsen et al. 1997). Skot byl rezistentní k reinfekci, při níž se v klcích zvýšil pouze počet CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů. Z toho je možné usuzovat, že tato subpopulace T-lymfocytů je v rezistenci u reinfekce důležitá. Na určitou minoritní roli CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů poukazují i McDonald et al. (1994), protože při podávání anti-CD8<sup>+</sup> protilátek došlo ke zvyšování produkce oocyst.

Hostitel na infekci odpovídá aktivací CD4<sup>+</sup> pomocných T-lymfocytů (*helper cells*, Th), které produkují různé cytokiny, které směřují imunitní odpověď buď k Th1 (produkci INF- $\gamma$  a IL-2), nebo k Th2 (produkci IL-4, IL-5 a IL-10). Při intracelulárních infekcích, mezi něž patří i kryptosporidióza, se vyvíjí směrem k Th1, vývoj k Th2 by naopak mohl vést k prodloužení infekce nebo ke smrti (McDonald 2000). To bylo potvrzeno i na IEL (intraepiteliární lymfocyty) kdy se po infekci zvýšilo jejich množství produkující INF- $\gamma$ , a na buňkách ze sleziny a mízních uzlin, které po infekci zvýšily produkci IL-2 (Culshaw et al. 1997, Davami et al. 1997).

## 2. Cíle práce

- Pomocí adoptivních transferů imunity definovaných subpopulací lymfocytů z imunokompetentních naivních a imunních dárců (BALB/c) do imunodeficitních příjemců (SCID) popsat roli v protektivní imunitě proti žaludeční kryptosporidii.
  - standardizovat metodiku deplece
  - popsat vliv CD4+ a CD8+ T-lymfocytů na průběh infekce
  - popsat vliv CD4+ a CD8+ T-lymfocytů na množství vylučovaných kryptosporidií v průběhu patentní periody
  - popsat roli CD4+ a CD8+ T-lymfocytů ve procesu zvládnutí kryptosporidiové infekce
  - zjistit jak se výše zmiňované efekty liší u obou populací T-lymfocytů z naivních a imunních dárců

### 3. Materiál a metodika

#### 3.1. Oocysty *Cryptosporidium muris*

Izolát *C. muris* TS03 původně získaný z přirozené infekce z hlodouna východoafrického (*Tachyoryctes splendens*) byl v laboratoři udržován pasážováním v krysách malých (*Mastomys coucha*). Oocysty byly poté přečištěny z jejich trusu a použity k infekčním experimentům.

#### 3.2. Čištění a diagnostika oocyst *C. muris*

##### 3.2.1. Čištění kryptosporidií na sacharózovém gradientu (Arrowood et Sterling 1987)

Vzorky trusu z krys malých byly zhomogenizovány ve třecí misce a přecezeny přes sítko. Do centrifugačních kyvet byly navrstveny následující gradienty: spodní vrstva 30 ml Sheaterova roztoku (deionizovaná voda 259 ml, cukr 405 g, fenol 7,29 g) 1+2 (1 díl Sheaterova roztoku + 2 díly PBS Tween (fosfátový pufr, 0,5 ml Tween 20 (Serva, Heidelberg, DE))), 30 ml Sheaterova roztoku 1+4 a 15 ml naředěného vzorku trusu. Kyvety s gradienty byly centrifugovány (20 min, 1370 g, 4 °C). Supernatant byl přenesen do nové kyvety a doplněn deionizovanou vodou. Po centrifugaci byla horní polovina kyvety odsáta vodní vývěvou a supernatant byl doplněn deionizovanou vodou na původní objem. Promývací proces byl dvakrát opakován. Pelet s oocystami byl přenesen pasteurovou pipetou do čisté zkumavky a skladován v chladničce při 4 °C do dalšího přečištění.

##### 3.2.2. Čištění kryptosporidií na cesium-chloridovém gradientu (Arrowood et Donaldson 1996)

Jeden ml roztoku CsCl ( $\rho = 1,15 \text{ g/ml}$ ; 21,07g CsCl; 100 ml deionizovaná voda) v 2 ml mikrozkuhavce byl převrstven 0,5 ml oocystami kryptosporidií v PBS (fosfátový pufr) a následně centrifugován (3 min, 16000 g, 4 °C). Odebrán byl 1 ml supernatantu s oocystami (oocysty vytvoří viditelný prsteneček) do čisté 2 ml mikrozkuhavky, objem byl doplněn 1 ml PBS. Centrifugace a promytí CsCl bylo dvakrát opakováno. Pelet s oocystami byl přenesen do zkumavky a skladován v deionizované vodě v chladničce při 4 °C.

### 3.2.3. Dezinfekce a filtrace přes sítko

K roztoku oocyst s deionizovanou vodou (1 ml) bylo přidáno 5 ml 5% NaOCl (Savo) a na ledu mícháno 15 min. Následně byl roztok 5× promyt nadbytkem deionizované vody (centrifugace 20 min, 1370 g, 4 °C). Roztok byl poté přefiltrován přes mikrosítka s otvory o velikosti 10 µl, oocysty byly dále skladovány v chladničce při 4 °C.

### 3.2.4. Diagnostika oocyst kryptosporidií

Oocysty kryptosporidií byly v trusu infikovaných zvířat detekovány pomocí specifického barvení anilin-karbol-metyl violetí s dobarvením tartrazinem (Miláček et Vítovec 1985). Vzorek trusu natřený na sklíčko byl fixován metanolem v plameni a barven 30 minut roztokem metylvioleti (0,6 g methylviolet, 1 ml anilin, 1 g fenol, 30 ml etanol, 70 ml deionizovaná voda). Sklíčka byla opláchnuta vodou a diferencována v kyselině sírové (2% vodný roztok). Sklíčka byla opět opláchnuta vodou a dobarvena v tartrazinu (1% tartrazin v 1% kyselině octové). Poté byla sklíčka znovu opláchnuta vodou a nechána zaschnout. Nabarvené vzorky byly prohlíženy světelným mikroskopem (Olympus IX 70) při zvětšení 1000× s olejovou imerzí. Stanovení hodnoty OPG (oocyst na gram) dle Kváč et al. (2007).

## 3.3. Myši

BALB/c myši (Charles River, DE) a myši s těžkou kombinovanou imunodeficiencí (SCID myši) (vlastní chovy BC AV ČR, v.v.i., Parazitologický ústav) kmene C.B-17 byly chovány v chovných nádobách s podestýlkou z pilin v izolátorech (BEM, Znojmo, ČR) se vzdušnými filtry (HEPA) ve zvěřinci Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR, v.v.i., v Českých Budějovicích.

Pro pokusy byly používány 8 týdnů staré myši obou pohlaví. Všechny myši byly krmeny komerční směsí (RACIO s.r.o., Břeclav, ČR) a napájeny vodou *ad libitum*, podestýlka, potrava i voda byly před použitím autoklávovány.

## 3.4. Experimentální perorální infekce *C. muris*

Myši byly perorálně (p.o.) infikovány pomocí jícnové sondy dávkou  $1 \times 10^6$  oocyst *C. muris* v 200 µl deionizované vody na myš.

### 3.5. Získání suspenze splenocytů

Suspenze buněk ze slezin byly získány z naivních nebo kmenem *C. muris* TS03 imunizovaných BALB/c myši usmrčených 28 DPI.

Myši byly humánně usmrčeny zlomením vazů. Poté byla vyjmuta slezina a homogenizací přes sítko byla připravena suspenze splenocytů. Získaná suspenze buněk byla třikrát promyta médiem RPMI-1640 centrifugací (10 min, 160 g, 4 °C). Následně byly splenocyty resuspendovány v 1 ml RPMI-1640 media (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) s 10% BOFES (inaktivované bovinní fetální sérum; Zvos, Hustopeče, ČR). Splenocyty byly nabarveny trypanovou modří (0,5 ml trypanové modře 0,5% vodný roztok, 0,5 ml RPMI, 10 µl buněk) a živé buňky byly spočítány v Bürkerově komůrce. Pro další zpracování bylo odebráno takové množství splenocytů, které obsahovalo námi požadovaný počet T-lymfocytů.

### 3.6. Deplece CD4+ a CD8+ T-lymfocytů

#### 3.6.1. Standardizace metodiky deplece

Ke standardizaci metodiky deplece byla použita myši anti-CD4+ monoklonální protilátka (klon GK 1,5; c = 1 mg/ml) a séra z morčete a králíka, jako zdroj komplementu pro depleci. Séra byla uskladněna při -18 °C a nebyla více než 2 měsíce stará.

K testování bylo použito 20 mil. splenocytů z BALB/c myši v každé skupině. Byly testovány různé kombinace použitých médií, protilátek a sér (tabulka 2).

**Tabulka 2.** Kombinace použitých médií, protilátek a sér při standardizaci deplece T-lymfocytů.

skupiny	médium pro splenocyty	protilátky	sérum
1	200 µl RPMI	–	králík
2	200 µl RPMI	–	morče
3	200 µl 10% BOFES	–	králík
4	200 µl 10% BOFES	–	morče
5	200 µl RPMI	2,5 µl Ab a-CD4	králík
6	200 µl RPMI	2,5 µl Ab a-CD4	morče
7	200 µl 10% BOFES	2,5 µl Ab a-CD4	králík
8	200 µl 10% BOFES	2,5 µl Ab a-CD4	morče

Po zpracování sleziny byla připravena buněčná suspenze v koncentraci 100 mil. splenocytů na 1 ml RPMI-1640. Pro značení a fixaci kompletu u CD4+ a CD8+ T-lymfocytů byly použity krysí anti-CD4+ (klon GK 1,5; c = 1 mg/ml, eBioscience, San Diego, USA) a anti-CD8+ (klon 2,43; c = 0,2 mg/ml, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)

monoklonální protilátky. Na 100 mil. splenocytů bylo přidáno 12,5 µg anti-CD8+ nebo anti-CD4+ protilátek. Buňky byly s protilátkami inkubovány 30 minut při 4 °C (na ledu) s občasným jemným promícháním. Kvůli vymytí nenavázaných protilátek byly splenocyty centrifugovány v nadbytku RPMI-1640 (10 min, 160 g, 4 °C). Pelety buněk byly opatrně a důkladně resuspendovány a bylo přidáno na základě předpokusu morčecí sérum ředěné v RPMI-1640 v poměru 1:5 (1 ml morčecího séra a 4 ml RPMI na 100 mil. buněk). Po inkubaci (30 min, 37 °C) ve vodní lázni s občasným promícháním byly buňky dvakrát promyty RPMI-1640 mediem centrifugací (10 min, 160 g, 4 °C). Depletované suspenze byly analyzovány průtokovým cytometrem.

### **3.7. Pozitivní imunomagnetická separace CD4+ a CD8+ T-lymfocytů pomocí Dynalbeads (Dynal Biotech ASA, Oslo, NOR)**

K pozitivní imunomagnetické separaci CD4+ a CD8+ T-lymfocytů byly použity paramagnetické kuličky Dynabeads Mouse CD4 (L3T4) (Dynal Biotech ASA, Oslo, NOR) a Dynabeads Mouse CD8 (Ly-2) (Dynal Biotech ASA, Oslo, NOR). Tyto kuličky o velikosti 4,5 µl mají na svém povrchu navázanou monoklonální protilátku proti membránovému antigenu CD4 nebo CD8. Požadované množství paramagnetických kuliček bylo přeneseno do plastové zkumavky (50 ml) s promývacím pufrem (1% BOFES v PBS). Pomocí magnetu (Dynal Biotech ASA, Oslo, NOR) 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, aby došlo k odstanění azidu sodného.

Následně byly promyté paramagnetické kuličky přidány k suspenzi splenocytů tak, aby počet kuliček a počet odhadovaných CD4+ nebo CD8+ T-lymfocytů byl v poměru 4:1 a zároveň koncentrace kuliček dosahovala počtu  $10^7$  na 1 ml RPMI-1640 media ředěného promývacím pufrem v poměru 2:1. Tato směs kuliček a splenocytů byla inkubována v plastové zkumavce 20 minut za stálého míchání na ledu. Po 20 minutách byly paramagnetické kuličky s navázanými CD4+ nebo CD8+ T-lymfocyty pomocí magnetu přichyceny ke stěně zkumavky a zbytek splenocytů byl odstraněn. Paramagnetické kuličky s navázanými CD4+ nebo CD8+ T-lymfocyty byly následně dvakrát promyty promývacím pufrem.

Po promytí byly paramagnetické kuličky vytěsněny z povrchu CD4+ nebo CD8+ T-lymfocytů pomocí protilátky anti-CD4 DETACHaBEAD Mouse CD4 (L3T4) nebo pomocí DNAzy (Dynal Biotech ASA, Oslo, NOR). Na  $10^6$  CD4+ nebo CD8+ T-lymfocytů bylo

přidáno 100 µl RPMI-1640 media s 10% BOFES a 10 µl DETACHaBEAD. Tato směs byla za stálého míchání inkubována v plastové zkumavce (60 min, 20 °C). Pomocí magnetu byly paramagnetické kuličky přichyceny ke stěně zkumavky a roztoky obsahující CD4<sup>+</sup> nebo CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty byly následně přeneseny do nové zkumavky. Kvalita vyizolovaných populací byla hodnocena pomocí průtokové cytometrie.

### **3.8. Pozitivní izolace CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů pomocí MicroBeads (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE)**

Suspenze splenocytů byla přefiltrována přes mikrosítka (póry 30 µl, pre-separation filters, MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE) a promyta pufrém (pufr ředění 1:20, BSA stock solution : rinsing solution, MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE). Na 100 mil. splenocytů bylo použito 900 µl pufru. Do této suspenze bylo na 100 mil. splenocytů přidáno 100 µl MicroBeads (monoklonální protilátka s navázanými magnetickými kuličkami o velikosti 50 nm, MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE), pro značení CD8<sup>+</sup> T lymfocytů bylo použito CD8a (Ly-2) MicroBeads a pro CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů CD4 (L3T4) MicroBeads a suspenze byly za občasného jemného promíchání inkubovány (15 min, 4 °C). Zkumavka byla doplněna 15-20 ml pufru a centrifugována (10 min, 160 g, 4 °C). Pelet s buňkami byl pufrém doplněn do 1 ml.

Pro magnetickou separaci byla použita LS kolona (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE), která byla umístěna v magnetu (MiniMACS separator, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE). Kolona byla navlhčena 3 ml pufru (postupně po 1 ml). Pod kolonu byla umístěna sběrná zkumavka a suspenze buněk byla nanášena na kolonu a třikrát promyta 5 ml pufru. Po promytí nenavázaných buněk byla kolona vyjmuta z magnetu, byl na ní nanášen 1 ml pufru a pomocí pístu byly vytlačeny požadované buňky. Vyizolované buňky byly centrifugovány (10 min, 160 g, 4 °C) a analyzovány průtokovým cytometrem.

### **3.9. Analýza buněk pomocí průtokové cytometrie**

Pro analýzu jednotlivých buněčných subpopulací bylo použito 0,5 mil. splenocytů (buňky z izolace či deplece CD4<sup>+</sup> nebo CD8<sup>+</sup> T lymfocytů). Příslušné množství buněk bylo resuspendováno v 50 µl PBS s 1% BOFES. U splenocytů byla provedena lyzace erytrocytů 0,84% roztokem NH<sub>4</sub>Cl při teplotě 37 °C po dobu 3 minut ve vodní lázni (k lyzaci použity 2 mil. splenocytů) a buňky byly dvakrát promyty v PBS s 1% BOFES. U buněk po depleci CD4<sup>+</sup> nebo CD8<sup>+</sup> T lymfocytů nebylo třeba provádět lyzaci erytrocytů, protože komplement (morčecí sérum) erytrocyty zlyzoval.

Následně byly k buňkám přidány podle typu a doporučeného ředění monoklonální protilátky proti sledovaným povrchovým antigenům. Sledovány byly antigeny CD4, CD8 a CD45. K označení sledovaných antigenů byly použity tyto protilátky: 0,5 µl FITC anti-mouse CD4 (L3T4) (klon GK 1,5; c = 0,5 mg/ml; eBiosciences, San Diego, USA), 0,5 µl PE anti-mouse CD8a (Ly-2) (klon 53-6,7; c = 0,2 mg/ml; eBiosciences, San Diego, USA), 0,3 µl PE anti-mouse Cy5 CD45 (klon 30-F 11; c = 0,2 mg/ml; eBiosciences, San Diego, USA) a 0,5 µl sekundární protilátky FITC IgG Goat Anti-Rat (F(ab)2; c = 0,2 mg/ml, Serotec, Martinsried, DE). Sekundární protilátka FITC IgG Goat Anti-Rat byla použita po depleci k označení CD4+ a CD8+ T-lymfocytů, protože primární anti-CD4+ a anti-CD8+ protilátky zůstaly navázány na receptorech, pokud nebyly buňky zlyzovány komplementem. Každá série vzorků zahrnovala isotypovou kontrolu 0,5 µl FITC rat IgG<sub>2b</sub> (klon eB149/10H5; c = 0,5 mg/ml; eBiosciences, San Diego, USA) a 0,5 µl PE rat IgG<sub>2a</sub> (klon eBR2a; c = 0,2 mg/ml; eBiosciences, San Diego, USA). U intraepiteliálních lymfocytů vyizolovaných ze SCID myši po přenosu byly ještě navíc změřeny  $\gamma\delta$  T-lymfocyty protilátkou FITC anti- $\delta\gamma$ TCR (klon GL3; c = 0,5 mg/ml, eBiosciences, San Diego, USA) s příslušnou izotypovou kontrolou FITC IgG Armenian Hamster (klon 299, c = 0,5 mg/ml; eBiosciences, San Diego, USA). Vzorky byly inkubovány s příslušnými protilátkami (30 min, 4 °C). Pak byly promyty centrifugací (10 min, 160 g, 4 °C) a pelet ze splenocytů byl rozředěn PBS s 1% BOFES do 0,5 ml a z žaludků do 0,3 ml. Následně bylo přidáno 50 000 fluorescenčně značených kuliček (Fluorospheres Flow-Count, Backman Coulter, Fullertown, CA, USA), aby bylo možno spočítat absolutní počet intraepiteliálních lymfocytů.

Buňky byly analyzovány pomocí Epics XL Flow Cytometer (Backman Coulter, Fullertown, USA), který je vybaven 15-mW argon-ionovým laserem. Analyzováno bylo deset tisíc označených buněk v každé buněčné suspenzi. Označené subpopulace buněk byly roztrženy pomocí softwaru System 2 (Backman Coulter, Fullertown, USA).

### **3.10. Kontrola čistoty přenosu T-lymfocytů z myši po pokusu**

SCID myši byly po ukončení experimentu utraceny zlomením vazů a byla jim vyjmuta slezina a žaludek. Slezina byla zpracována (viz kap. 3.5.), subpopulace T-lymfocytů byly analyzovány průtokovou cytometrií.

Ze žaludků, které byly propláchnutím deionizovanou vodou očištěny od zbytků potravy, byly izolovány intraepiteliální lymfocyty (Kearsey et Stadnyk 1996). Žaludky byly propláchnuty ve dvou lázních PBS (3 min, 4 °C) a v RPMI-1640 obsahujícím 2% BOFES (30

min, 4 °C). Žaludky byly předány do přehřátých kádinek s 6 ml HBSS (0,49 g HBSS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) v 50 ml deionizované H<sub>2</sub>O bylo sterilizováno přes filtr 0,2 µm a 50 µl 1 mM DTT (DiThioTreitol, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a 2,5 ml BOFES) a za občasného mírného promíchání inkubovány ve vodní lázni (60 min, 37 °C). Poté byla suspenze přenesena do čistých zkumavek a ponechána 5 min odstát. Po usazení nečistot byl supernatant přenesen do čistých zkumavek a centrifugován (10 min, 150 g, 4 °C). Pelet byl rozmíchán přidáním 5 ml 30% Percollu (3 díly 100% Percollu (1 díl 10× koncentrovaného PBS, 9 dílů Percollu stock (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), pH 7,2-7,4), 7 dílů RPMI 1640 s 2% BOFES) a centrifugován (15 min, 160 g, 4 °C). Pelet byl rozmíchán přidáním 4 ml 45% Percollu (4,5 dílu 100% Percollu, 6,5 dílu 2% RPMI), navrstven na 3 ml 75% Percollu (3 díly 100% Percollu, 1 díl 2% RPMI) a centrifugován (30 min, 150 g, 4 °C). Intraepiteliální lymfocyty byly získány z prstence vytvořeného na rozhraní gradientu a dvakrát promyty nadbytkem PBS s 1% BOFES a analyzovány průtokovým cytometrem.

### **3.11. Design jednotlivých infekčních experimentů**

#### **3.11.1. Adoptivní přenos CD4+ a CD8+ T-lymfocytů (imunomagnetická izolace MACS)**

K přenosu byly použity splenocyty z 5 naivních a 5 *C. muris* TS03 imunizovaných (usmrceny 28 DPI) BALB/c myši (shodné pro všechny experimenty). Celkem bylo použito pět skupin SCID myši, v každé bylo pět jedinců. Do první skupiny byly přeneseny vyizolované imunní CD4+ T-lymfocyty (dále označována jako CD4 i), do druhé naivní CD4+ T-lymfocyty (CD4 n), do třetí imunní CD8+ T-lymfocyty (CD8 i), do čtvrté naivní CD8+ T-lymfocyty (CD8 n). CD4+ nebo CD8+ T-lymfocyty byly přeneseny intraperitoneálně (i.p.), vždy 2 mil. příslušných CD4+ T-lymfocytů nebo 1 mil. příslušných CD8+ T-lymfocytů v 0,5 ml RPMI-1640 media na jednu SCID myš. Jako kontrola byla použita pátá skupina, která zahrnovala myši SCID bez rekonstrukce imunity. Týden po přenosu subpopulací T-lymfocytů byly všechny skupiny myši experimentálně infikovány p.o. *C. muris* TS03 (kapitola 3.4.). Všem SCID myším byl každý den odebírán a vyšetřován trus na kryptosporidie po dobu 60 DPI.

### 3.11.2. Adoptivní přenos splenocytů s deplecí CD4+ nebo CD8+ T-lymfocytů

K přenosu byly použity splenocyty s depletovanými CD4+ nebo CD8+ T-lymfocyty. Opět bylo sledováno pět experimentálních skupin po pěti jedincích SCID myší: imunní splenocyty s deplecí CD4+ T-lymfocytů (dále označována jako CD4- i), naivní splenocyty s deplecí CD4+ T-lymfocytů (CD4- n), imunní splenocyty s deplecí CD8+ T-lymfocytů (CD8- i), naivní splenocyty s deplecí CD8+ T-lymfocytů (CD8- n) a kontrolní skupina bez přenosu buněk. Splenocyty s deplecí CD4+ nebo CD8+ T-lymfocyty byly přeneseny i.p. v množství 8 mil. splenocytů s deplecí CD4+ T-lymfocytů (odpovídá 1 mil. CD8+ T-lymfocytů) nebo 9 mil. splenocytů s deplecí CD8+ T-lymfocytů (odpovídá 2 mil. CD4+ T-lymfocytů) v 0,5 ml RPMI-1640 media na jednu SCID myš. Týden po přenosu subpopulací T-lymfocytů byly všechny skupiny myší experimentálně infikovány p.o. *C. muris* TS03 (kapitola 3. 4.) a poté byl jejich trus denně vyšetřován na výskyt oocyst kryptosporidií 43 DPI.

### 3.11.3. Adoptivní přenos CD4+ a CD8+ T-lymfocytů s předchozí deplecí

Buňky k přenosu byly před izolací depletovány, vždy tak, že byla depletována jiná populace než izolovaná, tzn. deplece CD4+ T-lymfocytů a následná izolace CD8+ T-lymfocytů (pomocí DynaBeads) a naopak. V každé z experimentálních skupin bylo pět jedinců SCID myší. Experimentálních skupin bylo pět: první skupina přenos imunních CD4+ T-lymfocytů (CD4 i), druhá skupina přenos naivních CD4+ T-lymfocytů (CD4 n), třetí skupina přenos imunních CD8+ T-lymfocytů (CD8 i), čtvrtá skupiny přenos naivních CD8+ T-lymfocytů (CD8 n) a pátá kontrolní skupina bez přenosu buněk. CD4+ nebo CD8+ T-lymfocyty byly přeneseny i.p., vždy 2 mil. příslušných CD4+ T-lymfocytů nebo 1 mil. příslušných CD8+ T-lymfocytů v 0,5 ml RPMI-1640 media na jednu SCID myš. Týden po přenosu subpopulací T-lymfocytů byly všechny skupiny myší experimentálně infikovány p.o. *C. muris* TS03 (kapitola 3. 4.). Následně byl trus SCID myší denně vyšetřován na výskyt oocyst kryptosporidií po dobu 60 DPI.

### 3.12. Statistické metody

Rozdíly v průběhu infekce *C. muris* mezi jednotlivými pokusnými skupinami myší byly testovány pomocí programů Statistica 8.0 (Statsoft, Ithaca, USA) a R 2.7.2 (The R Foundation for Statistical Computing, Auckland, New Zealand). Rozdíly ve vylučování kryptosporidií mezi jednotlivými pokusnými skupinami byly testovány analýzou variance s opakovanými měřeními (*repeated measurements ANOVA*), testovány byly jak rozdíly v intenzitě infekce (průměrné množství oocyst vylučovaných každou skupinou myší za celou dobu pokusu;

faktor *GROUP*), tak v jejím průběhu (průměrné množství oocyst vylučovaných každou pokusnou skupinou v jednotlivých dnech infekce; kombinace faktorů *GROUP\*within effect(TIME)*). Počty vylučovaných oocyst byly před oběma testy logaritmičsky transformovány. Následné srovnání jednotlivých skupin v rámci celého modelu bylo provedeno pomocí *Sjotvoll-Stoline* testu (tj. Tukey HSD test pro nevyrovnané vzorky). Rozdíly mezi délkami prepatentních a patentních period byly testovány jednocestnou analýzou variance (*one-way ANOVA*). Vliv jednotlivých subpopulací T-lymfocytů na vyléčení kryptosporidiózy byl testován pomocí analýz přežívání (*survival analysis*), kde jako vysvětlovaná proměnná sloužil den vyléčení myši (tzn. den, po kterém nebylo přinejmenším následujících 5 dní zjištěno vylučování kryptosporidií). Rozdíly mezi pokusnými skupinami pak byly testovány pomocí *Mantel-Haenszelova (log-rank)* testu.

## 4. Výsledky

### 4.1. Standardizace metodiky deplece

Schéma experimentu a počty buněk po depleci jsou uvedeny v tabulce 3. Složení použitého media (RPMI vs. 10% BOFES) nemělo významný vliv na výsledné množství buněk a jejich čistotu. Samotné králíčí sérum bez přidaných protilátek lyzovalo CD8+ T-lymfocyty 6 × více a CD4+ T-lymfocyty 1,7 × více než morčecí sérum.

Při inkubaci splenocytů s anti-CD4+ monoklonální protilátkou došlo u všech testovaných skupin k výraznému poklesu počtů CD8+ T-lymfocytů (poklesy CD4+ T-lymfocytů jsou díky cílené depleci žádoucí). V případě kombinace králíčího séra a anti-CD4+ monoklonální protilátky byla depletovaná populace (CD4+) zastoupena 1-2 %, avšak v porovnání s celkovým 90% úbytkem všech splenocytů není tato čistota překvapující. Při kombinaci morčecího séra a protilátky byl zjištěn celkový úbytek splenocytů okolo 50 % a depletovaná populace byla zastoupena 3 %. Při lyzaci morčecím sérem vznikly přiměřené ztráty buněk a dosažená čistota je v rámci možností přijatelná (tabulka 3), proto bylo v následujících experimentech k depleci použito sérum z morčete.

**Tabulka 3.** Výsledky deplece v rozdílných kombinacích media, protilátek a sér.

skupiny	médium pro splenocyty	protilátky	sérum	počty buněk po depleci		
				CD4+	CD8+	ostatní splenocyty
1	200 µl RPMI	✘	králík	1,9 mil.	0,3 mil.	5,8 mil.
2	<b>200 µl RPMI</b>	✘	<b>morče</b>	<b>3,4 mil.</b>	<b>1,4 mil.</b>	<b>9,2 mil.</b>
3	200 µl 10% BOFES	✘	králík	1,9 mil.	0,2 mil.	2,9 mil.
4	<b>200 µl 10% BOFES</b>	✘	<b>morče</b>	<b>2,9 mil.</b>	<b>1,6 mil.</b>	<b>11,2 mil.</b>
5	200 µl RPMI	✓	králík	0,04 mil.	0,1 mil.	1,9 mil.
6	<b>200 µl RPMI</b>	✓	<b>morče</b>	<b>0,3 mil.</b>	<b>1,0 mil.</b>	<b>8,7 mil.</b>
7	200 µl 10% BOFES	✓	králík	0,03 mil.	0,2 mil.	2,8 mil.
8	<b>200 µl 10% BOFES</b>	✓	<b>morče</b>	<b>0,2 mil.</b>	<b>0,7 mil.</b>	<b>6,1 mil.</b>
			výchozí počty	4 mil.	2 mil.	14 mil.

✘ bez protilátky, ✓ anti-CD4+ monoklonální protilátka

### 4.2. Vliv adoptivního přenosu izolovaných populací CD4+ a CD8+ T-lymfocytů na infekci SCID myši (experiment 1)

Délky prepatentních period se u všech skupin SCID myši navzájem signifikantně neliší (F=0,2; df=(4, 18); p=0,93; tabulka 4). V celkovém množství vylučovaných oocyst v průběhu

experimentu (60 dní) byl prokázán rozdíl ( $F=26,35$ ;  $df=(4, 18)$ ;  $p<10^{-6}$ ). Post-hoc srovnání odhalilo, že SCID myši rekonstituované imunními CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty vylučovaly statisticky průkazně nejnižší množství oocyst ve srovnání s ostatními skupinami (obrázek 3A). Nebyl zjištěn průkazný rozdíl ve vylučování oocyst mezi skupinami myší rekonstituovanými naivními CD4<sup>+</sup> nebo imunními CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty a největší množství vyloučených oocyst bylo zaznamenáno u kontrolní a u CD8 n skupiny.

Průběh infekce u jednotlivých skupin se signifikantně lišil ( $F=2,85$ ;  $df=(192, 864)$ ;  $p<10^{-6}$ ; obrázek 2A). Všechna experimentální zvířata ze skupiny CD4 i a CD4 n se vyléčila vyjma jedné myši ve skupině CD4 n. Navíc zvířata s imunními CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty se vyléčila rychleji ( $21 \pm 3,3$  DPI) než s naivními CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty ( $42,7 \pm 5$  DPI). Naopak rekonstituce imunními nebo naivními CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty neměla, vyjma jediného případu, žádný efekt na zvládnutí infekce během experimentu ( $\chi=21$ ;  $df=2$ ;  $p<10^{-4}$ ; obrázek 4A), přestože u jedinců ze skupiny CD8 i byla prokázána nižší intenzita infekce (viz výše).

Významná byla pozorovaná čistota přenesených buněk a následně kontrola přítomnosti CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů ve slezině a žaludku u rekonstituovaných SCID myší na konci experimentu. Přestože se čistota přenesených buněk pohybovala v rozmezí 70-84 % u cílené subpopulace a nežádoucí subpopulace byla zároveň zastoupena 1 %, byl na konci experimentu u skupin CD8 i a CD8 n zjištěn ve slezině větší počet CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů než byla původní majoritní populace CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů a v žaludku naopak převažovaly CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty (obrázek 5A a 5B). U skupin CD4 i a CD4 n se ve slezině i v žaludku téměř žádné CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty nevyskytovaly (nejlepší dosažená čistota ze všech experimentů) a počet CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů v žaludku byl největší ve srovnání s ostatními skupinami ve všech experimentech.

**Tabulka 4.** Délky prepatentní a patentní periody a doba vyléčení, v závorce jsou uvedené procenta myší, které se vyléčily.

skupina	prepatentní perioda (dny)	patentní perioda (dny)	vyléčení (DPI)
<b>CD4 i</b>	$13,2 \pm 1,6$	$6,8 \pm 3,7$	$21,0 \pm 3,3$
<b>CD4 n</b>	$13,5 \pm 1,7$	$27,3 \pm 6,2$ (80%)	$42,7 \pm 5$ (80%)
<b>CD8 i</b>	$13,8 \pm 1,3$	39,0 (20%)	52,0 (20%)
<b>CD8 n</b>	$13,0 \pm 1,7$	$> 46,7 \pm 1,4$	ne
<b>kontrola</b>	$14,0 \pm 2,3$	chronická infekce	ne

#### 4.3. Vliv adoptivního přenosu splenocytů s deplecí CD4+ nebo CD8+ T-lymfocytů na infekci SCID myši (experiment 2)

Také v tomto experimentu nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v délce prepatentní periody u jednotlivých skupin SCID myši ( $F=2,8$ ;  $df=(4, 19)$ ;  $p=0,6$ ; tabulka 5). Vylučování oocyst se průkazně lišilo u jednotlivých skupin SCID myši s přenosem imunity ( $F=24,63$ ;  $df=(1, 18)$ ;  $p<10^{-6}$ ). Post-hoc srovnáním byly zjištěny rozdíly mezi konkrétními skupinami: signifikantně se lišilo vylučování všech skupin s adoptivním přenosem imunity od kontroly, obě skupiny s imunními T-lymfocyty vylučovaly signifikantně méně oocyst než skupiny s naivními buňkami (obrázek 3B).

Rovněž byl zjištěn signifikantní rozdíl v průběhu infekce u jednotlivých skupin ( $F=2,34$ ;  $df=(132, 594)$ ;  $p<10^{-6}$ , viz obrázek 2B). Všechny myši ze skupin CD4- i a CD8- i se v průběhu experimentu vyléčily z infekce během 18 DPI. Ve skupinách myši rekonstituovaných CD4- n nebo CD8- n buňkami se vyléčilo 60%, respektive 80 % jedinců ( $\chi^2=26,8$ ;  $df=3$ ;  $p<10^{-4}$ ; obrázek 4B).

Procentuální zastoupení depletované populace se pohybovalo u skupin CD8- n a CD8- i do 1 % a u skupin CD4- n a CD4- i do 5%. Počty obou populací T-lymfocytů ve slezině byly nejvyšší ve srovnání s experimenty 1 a 3 (obrázek 5C a 5D). Skupiny CD8- i a CD8- n měly malé množství CD8+ T-lymfocytů ve slezině i v žaludku. U myši ze skupin CD4- n a CD4- i převládaly ve slezině CD4+ T-lymfocyty, které byly cílem deplece. Ve sliznici žaludku tomu bylo naopak.

**Tabulka 5.** Délky prepatentní a patentní periody a doba vyléčení, v závorce jsou uvedena procenta myši, které se vyléčily.

skupina	prepatentní perioda (dny)	patentní perioda (dny)	vyléčení (DPI)
CD8- i	11,0 ± 0,6	6,5 ± 1,1	18,5 ± 0,9
CD8- n	9,8 ± 0,7	16,5 ± 5,3 (80%)	27,0 ± 5,9 (80%)
CD4- i	12,6 ± 2,8	4,6 ± 4,4	18,2 ± 6,3
CD4- n	10,8 ± 0,7	18,7 ± 7,3 (60%)	29,3 ± 7,6 (60%)
kontrola	9,5 ± 0,5	chronická infekce	ne

#### 4.4. Vliv adoptivního přenosu izolovaných CD4+ a CD8+ T-lymfocytů s předchozí deplecí na infekci SCID myši (experiment 3)

Délky prepatentní periody se u skupin CD4 i a CD4 n průkazně lišily ( $F=6,35$ ;  $df=4,16$ ;  $p=0,003$ ). Vylučování oocyst u jednotlivých skupin SCID myši s přenosem imunity se průkazně lišilo ( $F=90,07$ ;  $df=(4, 14)$ ;  $p<10^{-6}$ ). Signifikantně se lišilo vylučování skupin CD4 i a CD4 n od kontrolní skupiny, nicméně celkové množství vyloučených oocyst mezi jedinci ze skupiny s rekonstitucí CD4+ T-lymfocyty se od sebe průkazně nelišilo. Naopak skupiny CD8 i a CD8 n se průkazně lišily navzájem i od skupin CD4 i a CD4 n (obrázek 3C).

Také průběh infekce se u jednotlivých skupin signifikantně lišil ( $F=9,82$ ;  $df=(200, 700)$ ;  $p<10^{-6}$ , viz obrázek 2C). Všechna zvířata ze skupin CD4 i, CD4 n a CD8 i se v průběhu experimentu vyléčila (seřazené podle rychlosti vyléčení) ( $\chi=20,2$ ;  $df=3$ ;  $p<10^{-4}$ ). SCID myši rekonstituované jak imunními, tak naivními CD4+ T-lymfocyty se vyléčili, výrazně rychleji než myš rekonstituované imunními CD8+ T-lymfocyty (obrázek 4C).

Čistota přenesených buněk nepřesahovala u izolovaných populací CD4+ T-lymfocytů a CD8+ T-lymfocytů naivních nebo imunních 98 % a u druhé populace nepřesahovala 0,5 %. Ve slezinách byly zjištěny malé počty CD8+ T-lymfocytů u obou analyzovaných skupin. Naopak v žaludku byla zaznamenána zvýšená migrace CD8+ T-lymfocytů u skupin s rekonstitucí CD4 buňkami, přičemž počet CD8+ buněk byl vyšší u skupiny s CD4 n než u CD4 i (obrázek 5E a 5F).

**Tabulka 6.** Délky prepatentní a patentní periody a doba vyléčení, v závorce jsou uvedena procenta myši.

skupina	prepatentní perioda (dny)	patentní perioda (dny)	vyléčení (DPI)
CD4 i	10,6 ± 1,2	5,4 ± 2,0	17,0 ± 2,5
CD4 n	10,2 ± 0,4	18,7 ± 4,2	31,3 ± 5,3
CD8 i	13,3 ± 0,9	36,3 ± 0,9	51,7 ± 0,9
CD8 n	13,7 ± 0,5	> 46,7 ± 0,9	ne
kontrola	14,0 ± 2,3	chronická infekce	ne

#### 4.5. Shrnutí výsledků

Výsledky tří různých rekonstitucí byly porovnány z hlediska prepatentní, patentní periody a množstvím CD4+ nebo CD8+ T-lymfocytů po pokusu (metodické odlišnosti jsou popsány v kapitolách 3.6. - 3.8.). Byla zjištěna určitá variabilita v délkách prepatentních period. Skupiny s CD4+ T-lymfocyty (CD4 i, CD8-i, CD4 n, CD4- n) měly prepatentní

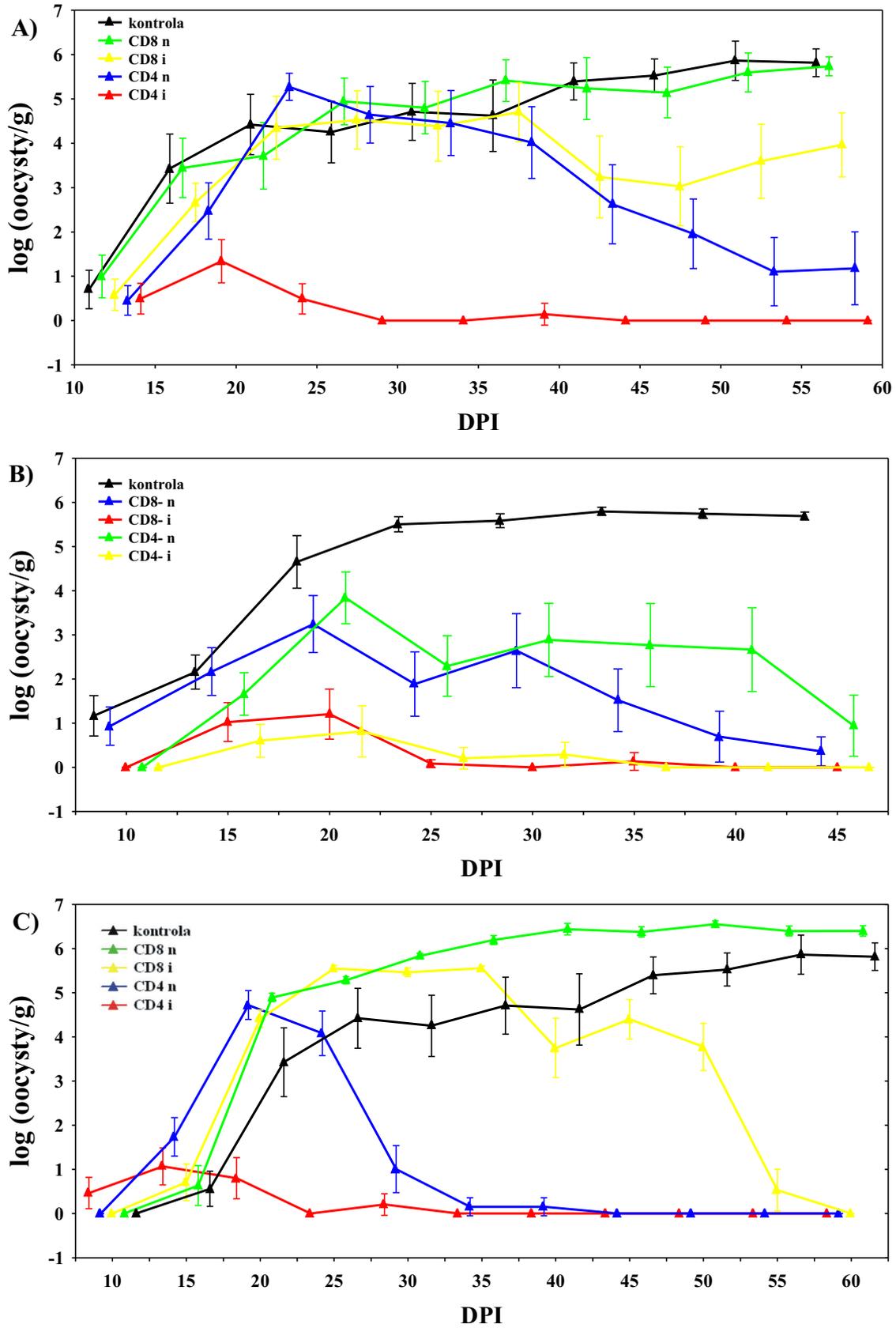
periodu nejkratší. Nejkratší patentní periodu a tedy i nejrychlejší uzdravení měla skupina s imunními CD4+ T-lymfocyty.

V experimentu 1 se vyléčily myši ze skupin CD4 i a CD4n, v experimentu 2 se vyléčily myši ze skupin CD4- i a CD8- i (imunní CD4+ a CD8+ T-lymfocyty) a v experimentu 3 se vyléčilo nejvíce skupin a to CD4 i, CD4 n a CD8 i. Přenos imunních CD4+ T-lymfocytů ve všech experimentech vyvolal u myši vyléčení se z infekce. Dále naivní CD4+ T-lymfocyty a imunní CD8+ T-lymfocyty dokázaly myši z infekce vyléčit u dvou ze tří experimentů.

V souhrnné tabulce 7 jsou sloučeny skupiny z experimentů 1 a 3, sloučení s experimentem 2 nebylo možné díky odlišnosti přenesených buněk (přenášely se splenocyty s deplecí CD4+ nebo CD8+ T-lymfocytů). Skupina CD4 i měla nejméně buněk nežádoucí populace (CD8+ T-lymfocyty).

**Tabulka 7.** Souhrnné výsledky z 3 experimentů.

skupina SCID myši	prepatentní perioda	patentní perioda	počty přenesených cílených T- lymfocytů	slezina		žaludek	
				CD4	CD8	CD4	CD8
CD4 i	11,9 ± 1,9	6,1 ± 3	2 mil.	327516 136949	12559	1305 3	368
CD8- i	11 ± 0,6	11 ± 0,6	2 mil.	8	34987	7899	1770
CD4 n	11,7 ± 2	23 ± 6,8 (kromě 1myši)	2 mil.	236615	20016	2793 2	1941
CD8- n	9,8 ± 0,7	9,8 ± 0,7	2 mil.	674827	14787	2199 8	3769
CD8 i	13,6 ± 1,2	37 ± 1,4 (4 myši <46 ± 1,4)	1 mil.	148152	28512	3698	8988
CD4- i	12,6 ± 2,8	12,6 ± 2,8	1 mil.	734890	506173	1740	4879
CD8 n	13,3 ± 1,4	< 46,7 ± 1,1	1 mil.	200892	174578	2463	3580
CD4-n	10,8 ± 0,7	10,8 ± 0,7	1 mil.	294719	207373	4821	21391
kontrola	12 ± 2,8	chronická infekce					

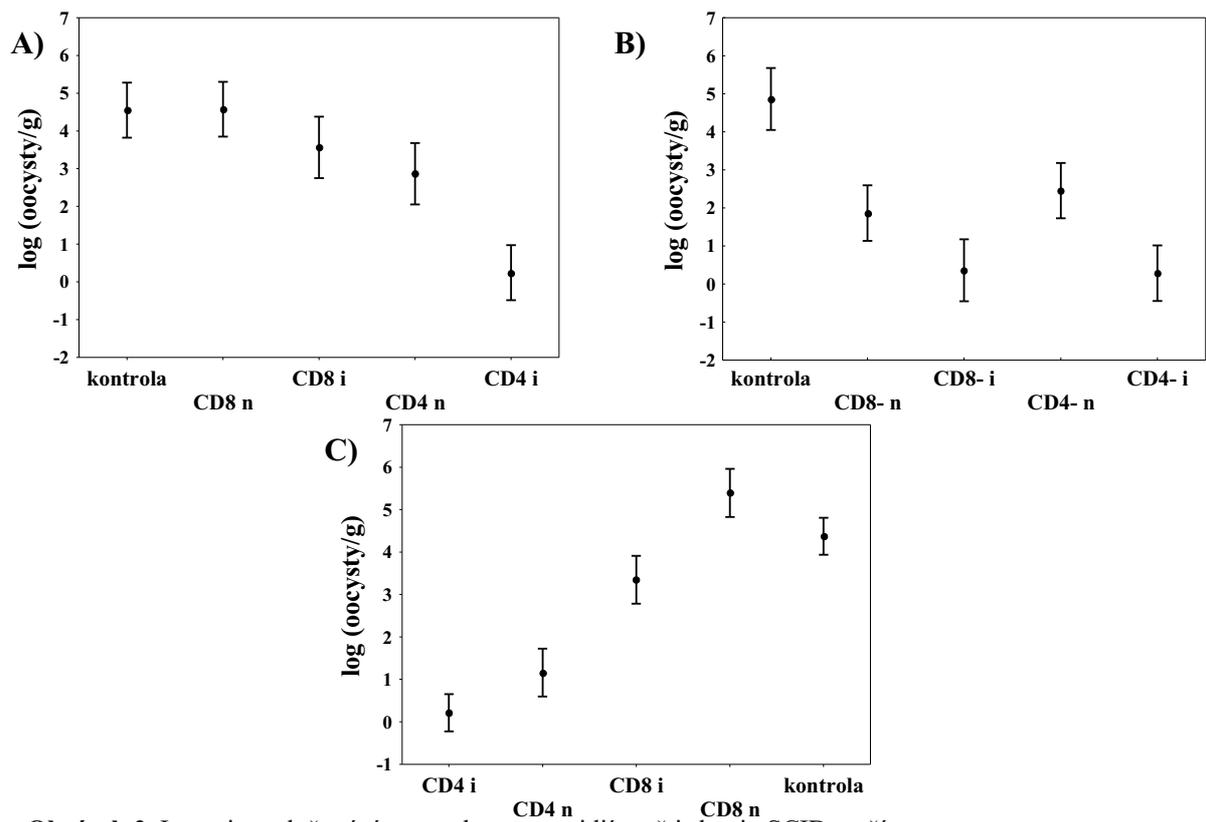


**Obrázek 2.** Průběh infekce kryptosporidiiemi u pěti skupin SCID myší.

A) experiment 1

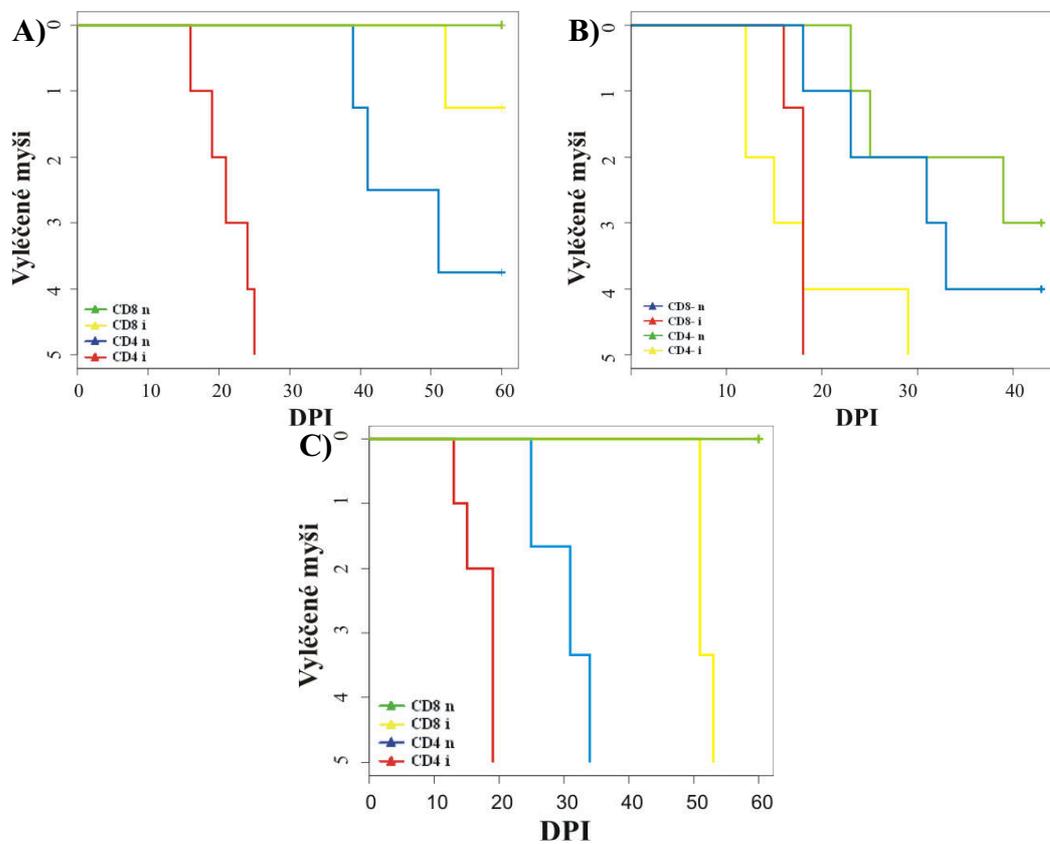
B) experiment 2

C) experiment 3



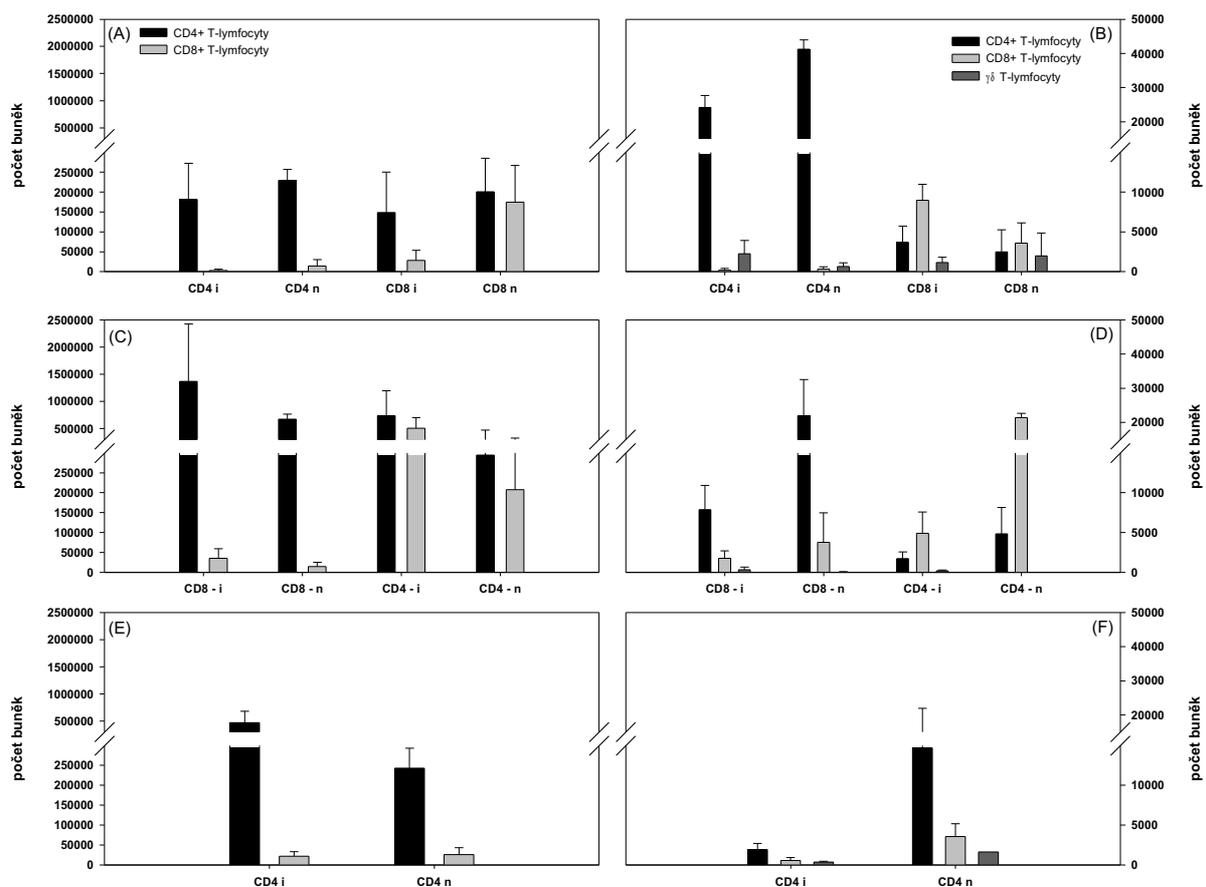
**Obrázek 3.** Intenzita vylučování oocyst kryptosporidií u pěti skupin SCID myši.

- A) experiment 1
- B) experiment 2
- C) experiment 3



**Obrázek 4.** Průběh vyléčení SCID myši s rekonstituovanou imunitou.

- A) experiment 1
- B) experiment 2
- C) experiment 3



**Obrázek 5.** Počty T-lymfocytů ve slezinách a žaludcích u SCID myši s rekonstituovanou imunitou.

- A) Počty T-lymfocytů ve slezině (experiment 1)
- B) Počty T-lymfocytů v žaludku (experiment 1)
- C) Počty T-lymfocytů ve slezině (experiment 2)
- D) Počty T-lymfocytů v žaludku (experiment 2)
- E) Počty T-lymfocytů ve slezině (experiment 3)
- F) Počty T-lymfocytů v žaludku (experiment 3)

## 5. Diskuze

Výsledky této práce ukázaly, že králíčí sérum v koncentraci 1:5 není vhodné pro depleci myších splenocytů z důvodů velkých ztrát leukocytů během procesu deplece. Tyto závěry odpovídají výsledkům Culshawa et al. (1997), kteří ve srovnatelných experimentech používali králíčí sérum v koncentraci 1:15 a zaznamenali 40% poklesy počtů splenocytů při depleci CD4<sup>+</sup> nebo CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů. Vysoký stupeň lyzace leukocytů by bylo možné vysvětlit nižší fylogenetickou příbuzností mezi myší a králíkem než mezi myší a morčetem (Huchon et al. 2002).

Srovnání patentních a prepatentních period je komplikované z důvodu odlišného použití počtu oocyst k infekci, množství přenesených buněk, různých izolátů, stáří a kmene myší. Prepatentní perioda se u SCID myší s rekonstituovanou imunitou ( $2 \times 10^6$  IEL nebo buněk z mízních uzlin) při infekci  $2 \times 10^5$  oocyst *C. muris* RN66 pohybovala kolem 10 DPI (McDonald et al. 1996). My jsme zjistili tuto periodu v průměru u všech studovaných skupin 12 DPI. Patentní perioda u přenosu imunních splenocytů (z BALB/c 35 DPI) s depletovanými CD4<sup>+</sup> nebo CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty ( $1 \times 10^6$  buněk) trvala 11, respektive 8 DPI (McDonald et al. 1994). Tyto patentní periody jsou srovnatelné u deplece CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů (7 dní), ale u deplece CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů byla patentní perioda ještě kratší (5 dní) a není pochyb, že to bylo způsobeno „nečistotou“ přenesených buněk.

V současné době je obecně přijímán názor, že rozhodující úlohu v procesu vyléčení z kryptosporidiové infekce hraje buněčná imunita, konkrétně CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty. Role ostatních lymfocytů, zejména CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů je podceňována (McDonald 2008). Navíc u jedinců jež prodělali žaludeční kryptosporidiózu se pravděpodobně vyvíjí celoživotní imunita, která je chrání před opakovanou infekcí stejným, případně jiným druhem žaludeční kryptosporidie (McDonald et al. 1992, Kváč et al. 2009). Naše výsledky (zjm. experiment 2) ukazují, že imunní splenocyty (skupiny SCID myší CD8<sup>-</sup> i, CD4<sup>-</sup> i) vyléčily myši dříve z infekce oproti naivním splenocytům. Tyto výsledky jsou v souladu s daty McDonalda et al. (1992, 1996), kteří popsali, že SCID myši rekonstituované lymfocyty pocházejícími z imunizovaného dárce s infekcí stejným druhem kryptosporidie se vyléčily dříve než kontrola rekonstituovaná lymfocyty od naivního dárce (BALB/c myši).

Pokud jsou depletovány CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty nedojde u SCID myší k samovyléčení, navíc podáváním anti-CD4<sup>+</sup> protilátky dochází u imunokompetentních myší ke zhoršení průběhu infekce (Ungar a kol. 1991; McDonald a kol. 1994). V našich pokusech výsledky

experimentů poukazují na významnější roli CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů v protektivní imunitě proti kryptosporidii. Tento model imunitní odpovědi odpovídá stavu AIDS pacientů s nízkou hladinou CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů, u kterých dochází k vymizení infekce po následné antiretrovirové léčbě spolu s rostoucím počtem CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů (Schmidt et al. 2001).

Na základě výsledků experimentů s izolátem *C. muris* TS03 by bylo možné konstatovat, že imunní i naivní CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty jsou schopné SCID myši zbavit infekce. Tomu odpovídají i výsledky McDonalda et al. (1994), kde rekonstituce imunity SCID myši imunními splenocyty s depletovanými CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty nedokázala myši z infekce vyléčit a průběh infekce je stejný jako u rekonstituce SCID myši naivními splenocyty. Nicméně SCID myši s rekonstitucí imunními CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty se vyléčily z infekce ve dvou experimentech 2 a 3, v experimentu 1 klesalo vylučování oocyst, je pravděpodobné, že pokud by pokus trval déle než 60 DPI všechny myši by se vyléčily.

Je obecně známo, že CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty potřebují k proliferaci aktivaci IL-2, který je produkován CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty. U přenesených CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů z imunních dárců tato aktivace už proběhla, tudíž v souladu s našimi výsledky z experimentu 3 se skupina CD8<sup>+</sup> vyléčila. Takovýto přenos můžeme přirovnat k reinfekci. U skotu, který byl reinfikován druhem *C. parvum*, byl v místě infekce pozorován nárůst počtu pouze CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů (Abrahamsen et al. 1997). Také ve studii Millera et Schaefera (2007) měřili v krvi množství CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů po reinfekci. Při reinfekci myši *C. muris* pozorovali postupný vzestup CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů o 6 % do 3 DPI a pak následoval pokles na stejnou hladinu jako u kontrolní skupiny myši, které nebyly reinfikovány. Tuto fluktuaci v periferní krvi lze vysvětlit migrací buněk do místa infekce. Rekonstituce imunity imunními IEL s depletovanými CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty měla oproti rekonstituci IEL bez deplece vliv na prodloužení patentní periody z 22 dnů na 29 dnů (McDonald et al. 1996). Navíc podávání anti-CD8<sup>+</sup> protilátek průkazně zvyšovalo produkci oocyst (McDonald et al. 1994).

Na základě výsledků dosažených by bylo možné vyslovit následující hypotézu. Eliminace kryptosporidií přes CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty je zřejmě přes Th1 odpověď, Th1 lymfocyty produkují IL-2 a INF- $\gamma$ . Dochází k aktivaci makrofágů a mohou stimulovat i B-lymfocyty k produkci opsonizačních protilátek IgG. Méně prostudovanou populací jsou tzv. cytotoxické CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty, které cílovou buňku zabíjejí přes perforiny a granzymy (Appay 2001). CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty, které se aktivují INF- $\gamma$  a kontaktem s antigen prezentující buňkou a ta dává signál k proliferaci a přeměně na cytotoxické T-lymfocyty (Tc). Tc zabíjí cílové buňky pomocí lytických granuloz, které obsahují cytotoxické proteiny (perforin, granzymy a granulysin) je hlavním efektorovým mechanismem tvorba pórů u cílových

buněk. Dalším způsobem zabíjecího mechanismu u Tc jsou Fas ligandy, které se váží na buněčný apoptický receptor (CD95) (Janeway et al. 2005).

Nicméně i při použití tří rozdílných metod izolace CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů a dosažené čistotě cílových buněk 98 % jsme nedokázali 100% depletovat nežádoucí populaci buněk. Následně bylo zjištěno zastoupení nežádoucí populace T-lymfocytů jak v žaludcích, tak i ve slezinách SCID myši po ukončení pokusu. Kromě depletované populace se ve slezině i v dalších orgánech se nacházejí ještě nediferenciované tzn. dvojité pozitivní CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T-lymfocyty, které se podle našich zkušeností při izolaci částečně izolují spolu s cílenou populací a hůře podléhají lyzaci kompletem. Mají také oproti CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytům větší schopnost proliferace a postupně se diferencují buď na CD4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) nebo CD8<sup>+</sup> (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) T-lymfocyty. McDonald et al. (1994) uvádí depleci CD4<sup>+</sup> nebo CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů s 85% úspěšností. Je velmi pravděpodobné, že při takové „nízké“ čistotě se dokázala částečně depletovaná populace namnožit a měla výrazný vliv na průběh infekce. Přestože námi zjištěný počet nežádoucích buněk byl v některých případech zanedbatelný, nelze předem odhadnout potřebné množství buněk k aktivaci ostatních. Navíc počty T-buněk byly u všech skupin zjišťovány až po ukončení experimentu, tedy v čase, kdy někteří jedinci již několik týdnů nevylučovali oocysty a další se z infekce ani nevyléčili. Nelze tedy s jistotou říci, že jedna populace způsobuje protektivní imunitu.

Ve světle těchto poznatků se jeví použití specifických knock-outů (např. s nefunkčním genem pro CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty, CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty, perforin) jako další varianta pro sledování vlivu jednotlivých složek buněčné imunity na proces zvládnutí kryptosporidiové infekce. Nicméně je zde nevýhoda interakce ostatních složek specifické imunity, která u SCID myši chybí.

## 6. Závěr

Adoptivními přenosy imunity byl sice prokázán signifikantní vliv imunních a naivních CD4+ T-lymfocytů a imunních CD8+ T-lymfocytů na vylučování oocyst, průběh a kontrolu kryptosporidiové infekce, nicméně na základě detekce jak CD4+, tak i CD8+ T buněk ve slezinách a žaludcích myši po 43, respektive 60 DPI se tyto transfery nejeví jako metodicky vhodné pro důkaz, které populace vyvolávají protektivní imunitu.

## 7. Seznam použitých zkratek

AIDS	acquired immune deficiency syndrome (syndrom získané imunodeficiencie)
ANOVA	analýza variance
AV ČR	Akademie věd České republiky
BALB/c	kmen imunokompetentních inbredních myši
BOFES	bovinní fetální sérum
CD	cluster of differentiation (označení povrchových znaků buněk)
CD4 i	skupina s přenosem imunních CD4+ T-lymfocytů
CD4 n	skupina s přenosem naivních CD4+ T-lymfocytů
CD4- i	skupina s přenosem imunních splenocytů s deplecí CD4+ T-lymfocytů
CD4- n	skupina s přenosem naivních splenocytů s deplecí CD4+ T-lymfocytů
CD8 i	skupina s přenosem imunních CD8+ T-lymfocytů
CD8 n	skupina s přenosem naivních CD8+ T-lymfocytů
CD8- i	skupina s přenosem imunních splenocytů s deplecí CD8+ T-lymfocytů
CD8- n	skupina s přenosem naivních splenocytů s deplecí CD8+ T-lymfocytů
DPI	days post-inoculation (dny po infekci)
df	degrees of freedom (stupně volnosti)
FITC	fluorescein-isothiokyanát
HBSS	Hanksonův roztok
HEPA	high efficiency particule air
IFN- $\gamma$	interferon gama
IL	interleukin
IEL	intraepiteliární lymfocyty
i.p.	intraperitoneální

i.v.	intravenózní
NK	natural killer (přirozený zabíječ)
OPG	počet oocyst na gram
PaÚ	Parazitologický ústav
PE	phycoerytrin
PBS	fosfáty pufrovaný fyziologický roztok
p.o.	perorální
SCID	severe combined immunodeficiency (těžká kombinovaná imunodeficiencie)
SSU rRNA	gen pro malou ribosomální podjednotku
Tc	cytotoxické T-lymfocyty
Th	populace pomocných CD4+T-lymfocytů

## 8. Literatura

- Abrahamsen M. S., Lancto C. A., Walcheck B., Layton W., Mark A., Jutila M. A., 1997: Localization of a/b and g/d T Lymphocytes in *Cryptosporidium parvum*-Infected Tissues in Naive and Immune Calves. *Infect. Immun.*65: 2482-2433.
- Alvarez-Pellitero P., Sitjá-Bobadilla A., 2002: *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *Int. J. Parasitol.* 32: 1007-1021.
- Appay V., 2004: The physiological role of cytotoxic CD4+ T-cells: the holy grail? *Clin. Exp. Immunol.* 138: 10-13.
- Anderson B. C., 1987: Abdominal cryptosporidiosis in cattle. *Vet. Pathol.* 24: 235-238.
- Arrowood M. J., Donaldson K., 1996: Improved purification methods for calf-derived *Cryptosporidium parvum* oocysts using discontinuous sucrose and cesium chloride gradient. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43, 89S.
- Arrowood B. C., Sterling C. R., 1987: Isolation of *Cryptosporidium* oocyst and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. *J. Parasitol.* 73: 314-319.
- Carreno R. A., Martin D. S., Barta J. R., 1999: *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitol. Res.* 85: 899-904.
- Cevallos A. M., Bhat N., Verdon R., Hamer D. H., Stein B., Tzipori S., Pereira M. E. A., Keusch G. T., Ward H. D., 2000: Mediation of *Cryptosporidium parvum* infection in vitro by mucin-like glycoproteins defined by a neutralizing monoclonal antibody. *Infect. Immun.* 68: 5167-5175.
- Corliss J. O., 1994: An interim utilitarian ("user friendly") hierarchical classification and characterization of the protist. *Acta Protozool.* 33: 1-51.
- Culshaw R. J., Bancroft G. J., McDonald V., 1997: Gut Intraepithelial Lymphocytes Induce Immunity against *Cryptosporidium* Infection through a Mechanism Involving Gamma Interferon Production. *Infect. Immun.* 65: 3074-3079.
- Davami M. H., Bancroft G. J., McDonald V., 1997: *Cryptosporidium* infection in major histocompatibility complex congenic strains of mice: variation in susceptibility and the role of T-cell cytokine responses. *Parasitol. Res.* 83: 257-263.
- Dubey J. P., Markovits J. E., Killary K. A., 2002: *Cryptosporidium muris*-like infection in stomach of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Vet. Pathol.* 39: 363-371.
- Fayer R., Speer C. A., Dubey J. P., 1997: The general biology of *Cryptosporidium*. In Fayer R. (Eds.): *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press. pp. 2-33.

- Fayer R., 2008: General biology. In Fayer R., Xiao L. (Eds.): *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CDC Press. pp. 1-42.
- Flanigan T., Whalen C., Turner J., Soave R., Toerner J., Havlir D., Kotler D., 1992: *Cryptosporidium* infection and CD4 counts. *Am. Intern. Med.* 116: 840-842.
- Hommer V., Eichholz J., Petry F., 2003: Effect of antiretroviral protease inhibitors alone, and in combination with paromomycin, on the excystation, invasion and in vitro development of *Cryptosporidium parvum*. *J. Antimicrob. Chemother.* 52: 359-364.
- Hornok S., Bitay Z., Széll Z., Varga I., 1998: Assessment of maternal immunity to *Cryptosporidium baileyi* in chickens. *Vet. Par.* 79: 203-212.
- Huchon D., Madsen O., Sibbald M., Ament K., Stanhope M. J., Catzeflis F., de Jong W. W., Douzery E. J. P., 2002: Rodent Phylogeny and a Timescale for the Evolution of Glires: Evidence from an Extensive Taxon Sampling Using Three Nuclear Genes. *Mol. Biol. Evol.* 19: 1053-1065.
- Iseki M., Maekawa T., Moriya K., Uni S., Takada S., 1989: Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in various laboratory animals. *Parasitol. Res.* 75: 218-222.
- Janeway C. A., Travers P., Walport M., Schlomchik M., 2005: T cell-mediated immunity In Janeway C. A., Travers P., Walport M., Schlomchik M. (Ed.): *Immunology- the immune system in health and disease*. Garland science publishing. pp. 319-409.
- Jirků M., Valigurová A., Koudela B., Křížek J., Modrý D., Šlapeta J., 2008: New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny. *Folia Parasitol.* 55: 81-94.
- Kearsey J. A., Stadnyk W. A., 1996: Isolation and characterization of highly purified rat intestinal intraepithelial lymphocytes. *J. Immunol. Meth.* 194: 35-48.
- Kodádková A. 2007: Žaludeční kryptosporidie exotických zvířat v ZOO. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Biologická fakulta, 27 pp.
- Koudela B., Modrý D., Vítovec J., 1998: Infectivity of *Cryptosporidium muris* isolated from cattle. *Vet. Parasitol.* 76: 181-188.
- Koyama Y., Satoh M., Maekawa K., Hikosaka K., Nakai Y., 2005: Isolation of *Cryptosporidium andersoni* Kawatabi type in a slaughterhouse in the northern island of Japan. *Vet. Parasitol.* 130: 323-326.
- Kváč M., Vítovec J., 2003: Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. *J. Vet. Med. B.* 50: 451-457.
- Kváč M., Ondráčková Z., Květoňová D., Sak B., Vítovec J., 2007: Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Vet. Parasitol.* 143: 229-233.

- Kváč M., Sak B., Květoňová D., Ditrich O., Hofmannová L., Modrý D., Vítovec J., Xiao L., 2008: Infectivity, pathogenicity, and genetic characteristics of mammalian gastric *Cryptosporidium* spp. in domestic ruminants. *Vet. Parasitol.* 153: 363-367.
- Kváč M., Sak B., Květoňová D., Secor E. W., 2009: Infectivity of gastric and intestinal *Cryptosporidium* species in immunocompetent Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Vet. Parasitol.* (in press).
- Kuo C., Wares J.P., Kissinger J.C., 2008: The Apicomplexan Whole-Genome Phylogeny: An Analysis of Incongruence among Gene Trees. *Mol. Biol. Evol.* 25: 2689-2698.
- Levine N. D., 1980: Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *J. Parasitol.* 66: 830-834.
- Lindsay D. S., Upton S. J., Owens D. S., Morgan U. M., Mead J. R., Blagburn B. L., 2000: *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from Cattle, *Bos taurus*. *J. Eukar. Microbiol.* 47: 91-95.
- Masuno K., Yanai T., Hirata A., Yonemaru K., Sakai H., Satoh M., Masegi T., Nakai Y., 2006: Morphological and immunohistochemical features of *Cryptosporidium andersoni* in cattle. *Vet. Pathol.* 43: 202-207.
- McDonald V., Deer R., Uni S., Iseki M., Bancroft G. J., 1992: Immune responses to *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum* in adult immunocompetent or immunocompromised (nude and SCID) mice. *Infect. Immun.* 60: 3325-3331.
- McDonald V., Bancroft G.J., 1993: *Cryptosporidium muris* in adult mice: a model for investigation of the immunology of mammalian cryptosporidiosis. In: Bartha J. R., Fernando M. A. (Ed.) *Proceedings of the VIth International Coccidiosis Conference.* University of Guelph, Canada p. 133.
- McDonald V., Robinson H. A., Kelly J. P., Bancroft G. J., 1994: *Cryptosporidium muris* in adult mice: adoptive transfer of immunity and protective roles of CD4 versus CD8 cells. *Infect. Immun.* 62: 2289-2294.
- McDonald V., Robinson H. A., Kelly J.P., Bancroft G. J., 1996: Immunity to *Cryptosporidium muris* infection in mice is expressed through gut CD4+ intraepithelial lymphocytes. *Infect. Immun.* 64: 2556-2562.
- McDonald V., 2000: Host cell-mediated responses to infection with *Cryptosporidium*. *Par. Immunol.* 22: 597-604.
- McDonald V., 2008: Immune Responses. In: Fayer R., Xiao L. (Eds.): *Cryptosporidium and cryptosporidiosis.* CDC Press. pp. 209-233.
- Miláček P., Vítovec J., 1985: Differential staining of *Cryptosporidia* by aniline-carbol-methyl violet and tartrazin in smears from faeces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitol.* 32: 50.
- Miller T. A., Schaefer F. W., 2007: Characterization of a *Cryptosporidium muris* infection and reinfection in CF-1 mice. *Vet. Parasitol.* 144: 208-221.

- Morgan U. M., Xiao L., Monis P., Sulaiman I., Pavlásek I., Blagburn B., Olson M., Upton S. J., Kramtsov N. V., Lal A. A., Elliot A., Thompon R. C. A., 2000: Molecular and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* from various hosts. *Parasitol.* 120: 457-464.
- Özkul I. A., Aydin Y., 1994: Natural *Cryptosporidium muris* infection of the stomach in laboratory mice. *Vet. Parasitol.* 55: 129-132.
- Pavlásek I. 1999. Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum, specificity and the environments. *Klin. Mikrobiol. Infekc. Lek.* 3: 290–301.
- Peeters J. E., Villacorta I., Vanopdenbosch E., Vanderghevnst D., Naciri M., Ares-Mazas E., Yvone P., 1992: *Cryptosporidium parvum* in calves: kinetics and immunoblot analysis of specific serum and local antibody responses (immunoglobulin A [IgA], IgG and IgM) after natural and experimental infections. *Infect. Immun.* 60: 2309-2316.
- Pospischil A., Stiglmaier-Herb M. T., von Hegel G., Wiesner H., 1987: Abomasal cryptosporidiosis in mountain gazelles. *Vet. Rec.* 121: 379-380.
- Ryan U., Xiao L., Read C., Zhou L., Lal A. A., Pavlásek I., 2003: Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Appl. Env. Microbiol.* 69: 4302-4307.
- Saxon A., Weinstein W., 1987: Oral administration of bovine colostrum anti-cryptosporidia antibody fails to alter the course of human cryptosporidiosis. *J. Parasitol.* 72: 413-415.
- Schmidt W., Wahnschaffe U., Schäfer M., Zippel T., Arvand M., Meyerhans A., Riecken E. O., Ullrich R., 2001: Rapid increase of mucosal CD4 T cells followed by clearance of intestinal cryptosporidiosis in an AIDS patient receiving highly active antiretroviral therapy. *Gastroenterol.* 120: 984-987.
- Ungar B. L. P., Soave R., Fayer R., Nash T. E., 1986: Enzyme-immunoassay detection of immunoglobulin-M and immunoglobulin-G antibodies to *Cryptosporidium* in immunocompetent and immunocompromised persons. *J. Infect. Dis.* 153: 570-578.
- Ungar B. L. P., Kao T. C., Burris J.A., Finkelman F. D., 1991: *Cryptosporidium* infection in an adult mouse model. Independent roles for IFN-gamma and CD4+ T lymphocytes in protective immunity. *J. Immunol.* 147: 1014-1022.
- Valigurová A., Hofmannová L., Koudela B., Vávra J., 2007: An ultrastructural comparison of the attachment sites between *Gregarina steini* and *Cryptosporidium muris*. *J. Eucaryot. Microbiol.* 54: 495-510.
- Valigurová A., Jirků M., Koudela B., Gelnar M., Modrý D., Šlapeta J., 2008: Cryptosporidia: Epicellular parasites embraced by the host cell membrane. *Int. J. Parasitol.* 38: 913-922.
- Taylor M. A., Marshall R. N., Green J. A., Catchpole J., 1999: The pathogenesis of experimental infections of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in outbred nude mice. *Vet. Parasitol.* 86: 41-48.

- Tilley M., McDonald V., Bancroft G. J., 1995: Resolution of cryptosporidial infection in mice correlates with parasite-specific lymphocyte proliferation associated with both Th1 and Th2 cytokine secretion. *Parasite Immunol.* 17: 459-464.
- Tyzzler E. E., 1907: A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 5: 12-13.
- Tyzzler E. E., 1910: An extracellular coccidium *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. *J. Med. Res.* 23: 487-509.
- Tyzzler E. E., 1912: *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd.* 26: 394-412.
- Wang R., Zhang L., Ning C., Feng Y., Jian F., Xiao L., Lu B., Ai W., Dong H., 2008: Multilocus phylogenetic analysis of *Cryptosporidium andersoni* (Apicomplexa) isolated from a bactrian camel (*Camelus bactrianus*) in China. *Parasitol. Res.* 102: 915-920.
- Xiao L., Fayer R., Ryan U., Upton S. J., 2004: *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clin. Microbiol. Rev.* 17: 72-97.
- Zhu G., Marchewka M. J., Keithly J. S., 2000: *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. *Mikrobiol.* 146: 315-321.