

1. IMUNITNÍ MECHANISMY (přehled)

Základ rozpoznávání vlastního a cizího. Tato schopnost je vyvinuta už u prvoků (přijímání potravy, páření).

Úloha imunity u mnohobuněčných organismů (obr.1.1):

- omezení následků kontaktu s alogenními organismy
- zábrana proliferace mutantních buněk
- obrana proti invadujícím patogenům.

Bezobratlí: přirozená imunita, zejména buněčná, proti povrchovým strukturám.

Obratlovci: adaptivní imunita -diversita

- paměť
- protilátky
- mechanismy nespecifické rezistence
- přenos rezistence proti infekci na potomstvo.

Hlavní histokompatibilní komplex:

Umožňuje rozpoznání vlastního (obr.1.2). HLA antigeny u lidí na chr. 6, H-2 komplex u myši na chr. 17. MHC antigeny třídy I na všech jaderných buňkách, Ag třídy II na Ag-prezentujících buňkách (makrofágy, dendritické buňky, Langerhansovy buňky, B buňky, někt. T buňky).

Struktura: heterodimery. MHC I alfa řetězec a beta₂ mikroglobulin, MHC II alfa a beta řetězce.

Variabilní a konstantní domény, štěrbina pro Ag.

Lymfocyty:

Vývoj a diferenciaci lymfocytů na obr. 1.3. Vývoj z kmenových buněk kostní dřeně.

B buňky - produkce protilátek (Ab)

T buňky - pomocná funkce a buněčná imunita. Maturace v thymu, rozpoznávání vlastních MHC Ag a cizích Ag (pozitivní a negativní selekce). CD4 - pomocné buňky, CD8 - cytotoxické buňky. Recirkulace mezi krví a sekundárními lymfoidními orgány.

B buňky diferencují v kostní dřeni. T a B buňky mají receptory pro Ag (imunoglobuliny a T receptory). T receptor - heterodimer alfa + beta nebo gama + delta řetězců.

Organizace sekundárních lymfoidních orgánů (obr.1.4). T a B buňky jsou rozmístěny do přesně definovaných oblastí. Lymfa protéká přes tyto orgány drénující určitou oblast a recirkuluje přes ductus thoracicus. Lymfocyty mohou vstupovat do lymfatických uzlin i z krve přes high endothelium venules.

Rozpoznávání antigenu a zahájení imunitní odpovědi:

Zpracování antigenu a jeho prezentace T_H buňkám. Přímý kontakt Ag s lymfocytem může

indukovat neodpovídavost. Exogenní Ag je enzymaticky zpracován v endosomu a malé fragmenty (cca 10 AK) jsou prezentovány s MHCII (obr. 1.5). Rozpoznání T lymfocytů zahrnuje interakci MHC-Ag s TCR-CD4 a interakci dalších adhezivních molekul (obr. 1.6).

Endogenní Ag je prezentován s MHCI. Následuje klonální expanze lymfocytů, která je závislá ještě na rozpustných faktorech ze začátku produkovaných Ag-prezentujícími buňkami (APC).

Některé T buňky diferencují na efektorové T_H a T_{CTL}, nebo paměťové buňky. Produkci lymfokinů ovlivňují další lymfocyty a myeloidní buňky.

Cytotoxické T lymfocyty mohou rozpoznávat i Ag intracelulárních parazitů.

Úlohu v imunitě proti parazitům hrají i NK buňky. Jejich rozpoznávací mechanismy nejsou omezené MHC, mají však TCR geny, IL-2 receptor a CD8 marker.

Cytokiny:

Vývoj a aktivity imunních a zánětlivých buněk jsou regulovány molekulami cytokinů, které jsou buď volné, nebo vázané na membrány (obr. 1.7). Jsou produkovány řadou buněk včetně lymfocytů a makrofágů. Vazba cytokinu na membránový receptor často vede k produkci dalších cytokinů a expresi dalších receptorů (kaskádovitý průběh). Cílovou buňkou je buňka produkující (autokrinní účinek) nebo jiná buňka (parakrinní účinek).

Rozdělení T_H buněk podle produkovaných cytokinů na T_H0 , T_H1 a T_H2 (obr. 8).

Protilátky:

Produkce většiny Ab je závislá na T_H buňkách. Na thymu nezávislé Ag pomoc nepotřebují. Jsou to většinou karbohydráty se seriově se opakujícími epitopy. To umožňuje propojení většího počtu Ig molekul na povrchu B buněk.

Proliferace a diferenciací B buněk vede ke vzniku plasmatických buněk produkujících Ab a buněk paměťových. Plasmatické buňky nejdříve produkují IgM, potom se pod kontrolou T buněčných cytokinů přepnou na produkci dalších izotypů s původní specifitou.

Primární funkcí Ig je rozpoznání a vazba na Ag. Další biologické funkce jsou spojeny se strukturou Ig molekuly (obr. 1.9).

Jednotlivé izotypy se poněkud liší svou strukturou a specializovanou funkcí (obr. 1.10). IgM a IgA mohou být aktivně sekretovány přes mukózní membrány, sekretorická komponenta je stabilizuje před účinkem trávicích enzymů.

Vazba Ig na parazitární Ag má řadu následků:

-neutralizace toxinů a inaktivace enzymů

-opsonizace parazitů usnadňuje jejich fagocytózu, nebo dochází k adhezi fagocytujících buněk k velkým parazitům, což vede k uvolnění lysosomálních enzymů a cytotoxických faktorů a poškození parazita (ADCC)

-aktivace komplementu.

Efektory ADCC: makrofágy, neutrofilové, eosinofily, destičky (obr. 1.11), protilátky: IgM, IgG, IgA. Efektory mohou být vyzbrojeni imunními komplexy s volnými vazebnými místy pro Ag.

Dvě dráhy aktivace komplementu: klasická (iniciovaná Ag-Ab komplexem) a alternativní (iniciovaná patogenem) (obr. 1.12). Řada produktů aktivace komplementu je biologicky aktivní. Zprostředkují chemotaxi zánětlivých buněk, buněčnou adhezi, uvolnění vazoaktivních látek a samozřejmě lýzu cílových buněk. C3b a její inaktivní derivát iC3b se vážou na parazitární membrány a umožňují adhezi buněk majících C3b/iC3b receptory (makrofágy mají CR1 pro C3b a CR3 a CR4 pro iC3b). Anafylatoxiny C3a a C5a se vážou na receptory na bazofilích a žírných buňkách a tím indukují chemotaktickou a anafylatoxickou aktivitu.

Uvolnění vazoaktivních mediátorů z bazofilů a žírných buněk zprostředkují i IgE protilátky.

Interakce mezi lymfocyty a myeloidními buňkami:

Monocyty cirkulující v krvi jsou prekurzory makrofágů. Kromě své funkce v přirozené rezistenci jsou zahrnuty do indukce, regulace a exprese imunitní odpovědi. To zahrnuje zpracování a prezentaci Ag, produkci cytokinů a interakci s povrchy nádorových buněk a parazitů. Bylo definováno 50 receptorů na povrchu makrofágů (nejdůležitější jsou Fc a C3b receptory). MF aktivita je zvýšena cytokiny z T lymfocytů (IFN gama) a faktory prezentovanými invadujícími

patogeny (LPS). Aktivované MF uvolňují pleiotropní IL-1, zvyšují expresi MHCII i svou metabolickou aktivitu. Jako efektorové buňky jsou nespecifické, pokud nejsou vybaveny protilátkou. Schopnost MF zabít parazity po kontaktu nebo fagocytóze je dána produkcí řady faktorů (obr. 1.13), z nichž nejdůležitější jsou lysozomální enzymy, metabolity kyslíku (singletový kyslík, peroxid vodíku a superoxid), N-oxid a TNF.

Granulocyty.

Neutrofilové (mikrofágy) mají jako primární funkci fagocytózu a destrukci mikroorganismů. Zabíječské mechanismy: lysozym, lysozomální enzymy, kationické proteiny, metabolity kyslíku. Mají Fc a C3b receptory a fungují v ADCC. Jsou pozitivně přitahovány C3a a dalšími faktory z lymfocytů a žírných buněk.

Akumulace neutrofilů indukovaná imunními komplexy může vyvolat hypersenzitivní reakci III. typu.

Granula eosinofilů obsahují řadu hydrolytických enzymů včetně peroxidázy. Mají Fc a C3b receptory, takže mohou adherovat k povrchům obaleným protilátkou a C3b. Kromě Fc receptoru pro IgG mají i nízkofinální receptor pro IgE. Adheze k povrchu parazita vede k uvolnění obsahu granul, který pak poškozují buněčnou membránu parazita. Produkce a aktivita eosinofilů jsou regulovány T lymfocyty (IL-5) a faktory produkovanými žírnými buňkami a bazofily (ECF-A, chemotaktický faktor pro eosinofily). Eozinofily také mohou produkovat cytokiny.

Buňky obsahující aminy.

Patří sem bazofily a žírné buňky. Bazofily cirkulují v krvi, žírné buňky jsou vázány na mukózní povrchy nebo na pojivovou tkáň. Jejich granula obsahují histamin, serotonin, heparin, enzymy a chemotaktické faktory. Mají vysoce afinní Fc receptor pro IgE a určité IgG podtřídy. Přemostění na membránu vázaných Ig molekul antigenem vede k exocytóze granul a uvolnění jejich obsahu. Bazofily a žírné buňky též produkují cytokiny a mohou hrát důležitou roli v polarizaci T_H odpovědi. Interakce mezi lymfocyty, buňkami obsahujícími aminy, eosinofily a parazity jsou na obr. 1.14.

Hypersenzitivita:

4 typy hypersenzitivních reakcí jsou shrnuty na obr. 1.15.

Časný typ přecitlivělosti je spuštěn přemostěním Ab molekul na bazofily nebo žírných buňkách. Uvolněné mediátory (histamin) způsobují konstriktci hladkých svalů a zvýšenou propustnost krevních cév a epiteliálních membrán. Lokalizovaná anafylaxe (senná rýma), systémová reakce - anafylaktický šok. Do místa hypersenzitivní reakce typu I jsou selektivně přitahovány eosinofily.

Hypersenzitivita z imunních komplexů souvisí s aktivací komplementu, uvolněním anafylatoxinů C3a a C5a, které způsobují uvolnění faktorů chemotaktických pro neutrofilové z bazofilů a žírných buněk. Neutrofilové fagocytují imunní komplexy a uvolňují enzymy poškozující okolní tkáň (lokální Arthusova reakce, systémová sérová nemoc).

Oddálený typ přecitlivělosti (DTH) chrání proti řadě intracelulárních infekcí. Je zahájen aktivací T_H1 buněk, které po aktivaci antigenem atrahují makrofágy do místa interakce s Ag a aktivují je. V případě perzistence Ag dochází k tvorbě granulomu.

Specializovaná forma DTH reakce je Jones-Motova reakce, neboli kožní bazofilní hypersenzitivita, která hraje významnou roli v obraně proti ektoparazitům.

2. Experimentální imunoparazitologie

Imunoparazitologie jako speciální disciplína existuje asi 20 let.

Hlavní problémy imunoparazitologie:

- a/ udržování parazitů v laboratoři
- b/ antigenní komplexita
- c/ identifikace a měření imunity.

Ad a/ řada významných parazitů má pevnou hostitelskou specifitu a nemůže být pasážována na laboratorních zvířatech. Řešení: výzkum se provádí na příbuzných parazitech nebo se paraziti kultivují *in vitro* (*Plasmodium falciparum*, krevní formy trypanozom).

Ad b/ množství Ag-ů díky komplexním vývojovým cyklům. Řada Ag-ů není definovaná. Rozlišují se strukturní, exkreční (turnover povrch. struktur) a sekreční Ag-y. Jen některé vyvolají při imunizaci ochranu (protektivní Ag-y) (obr 2.1).

Další problém - chybí informace o původu, biologické fci Ag-ů a způsobu, jak jsou prezentovány imunitnímu systému (obr. 2.2).

Průběžná změna Ag-ů u afrických trypanozom jim umožňuje unikat imunitní kontrole. Ag-y intracelulárních parazitů mohou být prezentovány na povrchu infikovaných buněk. U helmintů jsou důležité povrchové Ag-y. Ale inaktivace trávicích enzymů protilátkami může také vést k eliminaci parazita. U ektoparazitů se imunitní odpověď indukuje proti Ag-ům slin a střeva.

Ad c/ měření jednotlivých imunitních mechanismů neposkytuje informaci o jejich protektivní úloze. Protektivní imunita se sleduje podle vlivu na vývoj, reprodukci a přežití parazita.

Experimentální přístupy:

- a/korelace mezi určitým typem odpovědi a *in vivo* expresí rezistence.
- b/*in vitro* schopnost jednotlivých efektorů zabít parazity.
- c/manipulace s hostitelem a parazitem v experimentálních systémech.

Pro korelační studie jsou důležitá epidemiologická data z endemických oblastí.

Experimentální studie na zvířatech (primáti - malárie a schistozomóza).

Laboratorní myši - nejlépe geneticky a imunologicky definované (obr. 3.3).

3. Plasmodium a malárie.

Intracelulární parazit. Miliarda lidí je ohrožena, 200 milionů je infikováno. V Africe milion úmrtí ročně, hlavně dětí. Přenášejí komáři rodu *Anopheles*. Použití insekticidů snížilo výskyt malárie v některých zemích, ale vyvíjí se rezistence na insekticidy i léky.

Člověk je intermediálním hostitelem *Plasmodii*, pohlavní rozmnožování probíhá v komárech. Infekce začíná injekcí sporozoitů komárem do krevního oběhu (obr. 3.1). Sporozoity infikují hepatocyty a asexuálně se množí (schizogonie). Po prasknutí infik. buněk se uvolňují merozoity, které infikují erythrocyty. Po fázi množení vznikají erythrocytární schizonti dávající vznik merozoitům, kteří infikují další krvinky. Parazit se živí cytoplasmou erythrocytů. Hemoglobin je štěpen na AK, hem je uchován ve formě nerozpustného pigmentu. Po prasknutí ery je hem vyplaven do krve a spolu s dalšími splodinami vyvolává charakteristickou horečku. Po několika cyklech asexuálního množení přichází sexuální fáze. Merozoiti invadují ery a produkují samiččí gametocyty, které jsou nasáty komárem. Produkce samčích gamet a oplodnění se uskutečňuje v žaludku komára. Zygota penetruje stěnou žaludku a vytvoří oocystu. Ta produkuje větší množství sporozoitů, které pronikají do slinných žláz komára.

U *P. falciparum* a *P. malariae* je trvání infekce závislé na trvání asexuální fáze v erythrocytech. U *P. ovale* a *P. vivax* prolongovaná infekce vzniká z reinvaze erythrocytů merozoity uvolňovanými z jaterních schizontů.

Patolog. důsledky malárie jsou primárně spojeny s anémií a vaskulárním kolapsem. U *P. falciparum* jsou buňky obsahující schizonty ukládány v kapilárách vnitřních orgánů, což působí jejich zablokování (cerebrální malárie).

Rezistence a imunita k malárii.

Přirozená rezistence.

Vstup merozoitů do ery závisí na interakci mezi receptory na ery a příslušným proteinem na povrchu parazita. Některé ery nemají receptorové molekuly (merozoity *P. vivax* nemohou infikovat ery, kterým chybí Duffy blood group antigens.

Osoby heterozygotní v genu pro srpkovou anémii, které mají substituci jedné AK v hemoglobinu jsou výrazně chráněny proti infekci *P. falciparum*. Parazit se může dobře vyvíjet v defektních ery *in vitro*, ale za sníženého přístupu kyslíku v kapilárách dochází k úniku draslíku z buněk a parazit hyne. V endemických oblastech malárie proto ex-je selekční tlak vedoucí k zachování defektního genu, podmiňujícího srpkovou anémii.

Získaná imunita.

Přesto, že je člověk exponován značné dávce parazitárních Ag-ů, imunita je pouze nekompletní a rapidně klesá, pokud člověk není reinfikován. Dospělí v endemických oblastech však mají vyšší imunitu než děti, které na infekci nejčastěji umírají. Děti do 3 měsíců věku jsou chráněny mateřskými Ab a tím, že mají fetální hemoglobin.

Důvody nedostatečné imunity jsou shrnuty na obr. 3.2. Paraziti vykazují značnou Ag diverzitu a variabilitu mezi druhy, kmeny i vývojovými stadii. Parazit se "schovává" do buněk a mizí z orgánů bohatých na makrofágy. Infekce stimuluje T-nezávislou imunitu, je zde malá T-buněčná paměť. Paraziti zmatou nebo suprimují imunitní odpověď.

Imunita proti jednomu druhu malárie nepůsobí proti jinému druhu. Z toho plyne, že skříženě reagující Ag-y nemají význam pro ochranu. Imunita proti jednomu stadiu nepůsobí proti jinému.

Sporozoity jsou v krvi přítomny jen 45 minut a vyvolávají nízkou protektivní imunitu. Ale imunizace Ag-y sporozoitů může vyvolat dobrou protektivní imunitu. Protilátky blokují schopnost sporozoitů infikovat hepatocyty. Propojení jejich povrchových molekul protilátkou snižuje jejich pohyblivost. Většina jejich povrchu je pokryta cirkumsporozoitovým proteinem (CSP), jehož struktura a imunologie jsou dobře známy. CSP je charakterizován 45 opakováními AK sekvence asparagin-alanin-asparagin-prolin (NANP) (obr. 3.3.). NANP tvoří dominantní epitop rozpoznávaný protilátkami. T epitopy jsou také v této a sousedních oblastech. Injekce anti-CSP MAbs dává vysokou protekci. V obraně proti sporozoitům se uplatňuje jak humorální, tak buněčná imunita.

Intracelulární stadia. Ex-je cytotoxický mechanismus uplatňující se proti parazitárním Ag exprimovaným na povrchu hepatocytů. Byly prokázány CD8+ a CD4+ CTL rozpoznávající tyto Ag. Byla prokázána úloha některých cytokinů (IL-1, IL-6, IFN gama, TNF) působících přímo či nepřímo (přes NO) destrukci parazita (obr. 3.4).

Merozoity jsou dobrým cílem pro imunitní mechanismy, zvláště Ab. Úloha těchto Ab může být studována *in vitro*. Ab mohou blokovat vstup merozoitů do ery nezávisle na C. Ab proti povrchovému proteinu merozoitů (MSP1) inhibují invazi erytrocytů. Podobně chrání i Ab proti antigenům rhoptrií.

Schizonti jsou v ery chráněni před CTL, ale jsou známy tzv. "crisis forms" parazitů vykazujících známky degenerace. Myslí se, že je to důsledek poškození cytotox. faktory uvolňovanými z MF, neutrofilů nebo NK buněk, které procházejí membránou ery (NO, TNF).

Na povrchu infikovaných ery jsou parazitární Ag-y (obr. 3.5). Infekce ery také zvyšuje expresi receptorů jako je ICAM-1, které hrají úlohu v sekvestraci infikovaných buněk v kapilárách. To chrání parazita před fagocytózou v játrech či slezině. Paraziti též sekretují Ag-y, které jsou uvolňovány při prasknutí ery. Např. S antigeny mohou též vyvolat protektivní imunitu. Ab proti Ag gametocytů nepůsobí protekci u člověka, ale mohou po nasátí komárem ovlivnit sexuální fázi cyklu (kandidát pro "transmission-blocking vaccines").

Složky protektivní imunity.

Imunita je T-závislá, Ab blokují penetraci do buněk, interferují s výživou parazitů, opsonizují volná stadia parazita nebo infikované ery. Nejefektivnější v protektivní imunitě je izotyp IgG. CD8+ T Ly jsou spojeny s imunitou proti preerytrocytárním stadiím, CD4+ proti erytrocytárním. Např. u infekce *P. chabaudi* bylo uzdravení z prvního píku parazitemi spojeno s Th1 aktivitou, zatímco Th2 buňky převládaly v pozdější chronické fázi.

Imunologická paměť je delší u *P. vivax* než u *P. falciparum*. U infekce *P. vivax* existují perzistentní jaterní stadia, která zřejmě zajišťují dlouhodobou antigenní stimulaci.

Na laboratorních modelech je rekurence (znovuobjevení se) parazitemi spojena s poklesem imunity ale zejména s antigenní variabilitou. Pomalý vývoj rezistence za podmínek přirozené infekce je nyní považován primárně za důsledek expozice antigenně různorodým populacím parazita. Proti každé z nich musí být vytvořena kmenově specifická imunita.

Imunomodulace.

Malárie působí potlačení imunitní odpovědi k nepříbuzným antigenům (obr. 3.6.). Poprvé to bylo pozorováno u nemocných dětí očkovaných tetanickým toxoidem.

Paradoxně je malarie charakteristická zvýšenou produkcí Ig, zejména IgM a IgG. Zřejmě dochází k polyklonální B aktivaci protože většina těchto Ab není specifická pro malarii.

Byla prokázána též interference malariové infekce s prezentací Ag makrofágy a produkcí cytokinů.

Imunopatologie.

Charakteristická horečka je asi způsobena uvolněním cytokinů IL-1 a TNF z fagocytů po záchytu materiálu z popraskaných ery. Parazitární fosfolipidy (glykofosfatidylinositol) působí podobně jako bakteriální endotoxin. Významná úloha v patologii malárie je přičítána TNF, poškození ledvin u infekce *P. malariae* je způsobeno ukládáním imunních komplexů.

Průběh malariové infekce závisí na výskytu určitých HLA antigenů v populaci.

4. Leishmania a leishmaniáza

Všechny druhy *Leishmanií* se množí v buňkách mononukleárního fagocytárního systému (MFS). Leishmanie mohou být rozděleny do 4 druhových komplexů *L. tropica*, *L. donovani*, *L. mexicana* a *L. brasiliensis*.

Nejznámější onemocnění jsou suchý vřed, kožní léze způsobená *L. tropica* a *L. major*, kala azar, převážně viscerální forma způsobená *L. donovani* a espondia, mukokutánní infekce způsobená *L. brasiliensis*.

Životní cykly leishmanií (obr. 4.1) zahrnují vektora, komára rodu *Phlebotomus*. Infekce začíná injekcí metacyklických promastigotů do hostitele při sání flebotoma. Promastigotní stadia vstupují do makrofágů, transformují se na amastigoty a množí se binárním dělením. Když invadované buňky prasknou, uvolněné amastigoty napadnou další MF. U kožní a mukokutánní leishmaniázy zůstává infekce lokalizovaná v kůži a povrchových tkáních. U *L. donovani* se infekce šíří a napadá vnitřní orgány. Komáři se infikují nasátím infikovaných buněk. V komářím střevě se amastigoty uvolní, transformují se na promastigoty a pohybují se směrem k faryngu. *L. tropica* a *L. major* dávají vznik lokalizovaným kožním projevům v místě bodnutí flebotoma. Dochází zde k infiltraci MF ve kterých se množí amastigotní stadia. Později se zde akumulují lymfocyty a nakonec se léze vyhojí. Infekce *L. brasiliensis* může metastázovat do mukózních membrán nosu a úst a poškodit chrupavku. U viscerální leishmaniázy se paraziti šíří z místa primární infekce do celého těla. Reprodukce parazita a buněčná infiltrace vede k charakteristickému zvětšení sleziny a jater. Může dojít k dalším patologickým změnám, např. k anemii, hemoragiím, intestinální ulceraci a poškození srdce.

Imunita k leishmaniáze

Vývoj imunity u leishmaniázy je různorodý. Zatím co u *L. major* se léze hojí spontánně a infekce zanechává silnou imunitu, u infekce *L. aethiopica* se léze šíří a nehojí. Neléčené infekce *L. donovani* jsou letální.

Infekce vyvolá silnou buněčnou odpověď měřitelnou DTH a lymfocytární proliferativní odpověď na Ag-y leishmanií. Ab odpověď je dosti variabilní. Buněčná imunitní odpověď chybí u forem, které se nehojí. Specifické Ab jsou produkovány, ale zřejmě nehrají v imunitě významnou úlohu. Dochází i k hypergamaglobulinemii v důsledku polyklonální aktivace B buněk.

Leishmanie vstupují do profesionálních fagocytů a musí přežít působení jejich obranných mechanismů. Vstup do MF se děje po vazbě povrchových molekul parazita na buněčné receptory (obr. 4.2). Kromě interakcí cukr-lektin jsou nejdůležitější receptory pro C3b a iC3b. Dochází k aktivaci komplementu, ale v případě metacyklických promastigotů nedochází k poškození parazita, protože povrchové molekuly parazita (lipofosfoglykan - LPG) brání přístupu membránu atakujícího komplexu k buněčné membráně. Amastigotní stadia *L. donovani* jsou také rezistentní ke komplementu, což může vysvětlovat jejich schopnost pronikat k vnitřním orgánům.

Amastigotní stadia *L. major* jsou ke komplementu senzitivní. Užití komplementových receptorů pro vstup do buněk pomáhá zabránit respiračnímu vzplanutí a uvolnění toxických metabolitů kyslíku, které normálně provázejí fagocytózu.

Parazit se pak dostává do parazitoformní vakuoly a je obklopen hostitelskou membránou (obr. 4.3). Fúze s lysosomem proběhne normálně a parazit dobře přežívá v fagolysosomu. Poškození parazita lysosomálními enzymy brání LPG, který spolu s dalším proteinem (gp63) interferují s funkcí hostitelských enzymů.

Avšak tyto parazity jsou zabiti po aktivaci MF. Nejdůležitější cestou aktivace je působení IFN gama.

L. donovani

Viscerální leishmaniáza není letální pro myš, ale vyvíjí se v dlouhodobé těžké infekce, jejichž průběh závisí na kmenu myši (obr. 4.4). Některé kmeny vykazují přirozenou rezistenci (R), jiné jsou senzitivní (S). Ty se pak dělí na ty, které nevyvíjejí specifickou imunitu a na ty, které ji vyvíjejí (S/R). Rozdíl mezi R a S kmeny je v přirozené rezistenci MF. Tento rozdíl je podmíněn genem původně označeným *Lsh* se dvěma alelami *Lsh^R* a *Lsh^S*. Gen byl lokalizován v chromozomu 1 a je exprimován v Kupfferových buňkách jater. Je identický s geny *Ity* a *Bcg*, které regulují rezistenci k *Salmonella typhimurium* a *Mycobacterium* sp. Nyní jsou souborně označovány jako *Nramp* (natural resistance associated macrophage protein). Gen koduje membránový protein a funguje tak, že ovlivňuje stupeň odpovědi na receptorem zprostředkovaný priming a tak reguluje expresi nespecifických mechanismů rezistence zahrnujících kyslíkové radikály a NO. *Lsh* také reguluje expresi MHC II molekul a tak ovlivňuje prezentaci Ag makrofágy (*Lsh^R* je efektivnější).

Rozdíly mezi S kmeny myši závisí na Th odpovědi a jsou ovlivněny MHC geny. Genetická kontrola zřejmě funguje díky selektivní indukci Th subpopulací. V ochraně hostitele se uplatňují Th1 buňky (aktivace MF přes IFN gama). Stimulace Th2 buněk vede k produkci IL-4 a snížení produkce IFN gama.

Leishmania major

Je zde také jasná geneticky determinovaná variabilita v odpovědi na infekci. Rezistentní kmeny nevyvíjejí léze, citlivé (Balb/c) podléhají viscerální leishmaniáze. Je zde také oddělená kontrola přirozené rezistence a získané imunity. Obdobný gen k *Lsh* je *Scl-1*, mapuje v chromozomu 11 a reguluje odpověď MF. MF z citlivých myši umožňují mnohem větší replikaci parazita (obr. 4.5). Imunita k *L. major* je závislá na T buňkách. Nejdůležitější jsou CD4⁺ buňky. Rezistence je podmíněna aktivací Th1 subpopulace (aktivace MF). Aktivace Th2 subpopulace vede k inhibici IFN gama a k produkci cytokinů (IL-3, GM-CSF), které podporují vývoj nezralých forem MF, ve kterých se parazit může množit. Je zajímavé, že Th1/Th2 fenotyp může být přepnut z rezistence na citlivost injekcí rekombinantních cytokinů nebo antic cytokinových protilátek (obr. 4.6). Ukázalo se, že citlivé myši mají potenciál k vývoji "obranných" Th buněk, ale za normálních podmínek tento potenciál není realizován. Aktivace Th1/Th2 asi závisí na kvantitativních a kvalitativních rozdílech v prezentaci Ag makrofágy. Je známo, že polarizace k Th1 odpovědi je spojena s uvolněním IFN gama z NK buněk v odpovědi na produkci IL-12 ze stimulovaných MF. Polarizace na Th2 odpověď může souviset s uvolněním IL-4 z bazofilů a žírných buněk (obr. 4.7). Ukazuje se, že tato polarizace Th odpovědi má svou paralelu i u lidí.

5. Africké trypanosomy

Nejvýznamnější parazitičtí prvoci žijící extracelulárně. Jejich schopnost přežít je dána antigenní variabilitou, takže jsou vždy krok před imunitní odpovědí. Trypanosomy představují jeden z neúplněji poznáných příkladů strategie přežití parazita v hostiteli.

Trypanosomy jsou bičíkatí prvoci, jejichž životní cyklus zahrnuje fázi v krevním řečišti a tkáňových tekutinách savce, kde se množí binárním podélným dělením a fázi strávenou v těle vektora (obr. 5.1). Vektorem je moucha tsetse, v níž parazit prodělává hlavní morfologické a biochemické změny. Paraziti jsou nasáti s krví při sání mouchy. Krevní formy (trypomastigoti) jsou dlouhé a štíhlé, tubulární mitochondrion je nefunkční, Krebsův cyklus a cytochromový systém nefungují. Část trypomastigotů jsou kratší zavalitější formy s částečně vyvinutou mitochondriální funkcí. Pouze tyto formy přežívají v mouše. Funguje u nich Krebsův cyklus a cytochromový systém transportu elektronů. Po intenzivním množení ve střevě vstupují do slinných žláz, kde se diferencují na epimastigoty a později na infekční metacyklické formy. Přenos se děje při dalším sání mouchy. Je možný mechanický přenos jiným bodavým hmyzem.

Trypanosomiáza

Onemocnění člověka je způsobeno *T. brucei rhodesiense* a *T. brucei gambiense*. Hlavními rozdíly mezi poddruhy *T. brucei* jsou infektivita pro člověka a charakter onemocnění. Infekci provází horečka, anemie, záněty lymfatických uzlin, úbytek váhy a letargie. Trypanosomy často napadají CNS. Neléčené infekce jsou fatální. *T.b.gambiense* vyvolává chronické infekce, *T.b.rhodesiense* akutní.

Antigenní variabilita

Charakteristickým rysem lidské infekce je pravidelná fluktuace v hladině parazitemie (obr.5.2). Periodické vymizení trypanosom z oběhu souvisí s vývojem imunity k určitému variantnímu antigennímu typu (VAT). Průběžný vývoj těchto typů může být sledován *in vitro*. *In vivo* jsou trypanosomy, proti kterým se vytvořily Ab, odstraňovány z cirkulace, trypanosomy nového VAT nereagují s Ab a mohou se množit. Trypanosomy mají na svém povrchu glykoproteinový Ag (55-60 kDa), který představuje makromolekulární bariéru chránící plasmatickou membránu parazita. Tento gp je nezbytný pro přežití trypanosom v krevním řečišti, protože je jednak chrání před účinky komplementu, jednak představuje molekulární základ pro antigenní variabilitu.

Trypanosomy určitého VAT exprimují pouze jeden variantní specifický glykoprotein (VSG), který je cílem VAT-specifických Ab. Exprese odlišného VSG vede ke vzniku odlišného VAT, který není rozpoznáván stávajícími imunitními mechanismy.

Struktura VSG je detailně známa (obr. 5.3). Je tvořen peptidickým řetězcem o asi 500 AK ukotveným v plasmatické membráně glykofosfatidylinositolovou kotvou. Zatím co N-konec je vysoce variabilní, C-konec je konstantní, homologní pro různé VSG.

VSG plášť si trypanosomy podržují během krevní fáze vývoje, ve vektorovi ho ztrácejí. Stadia bez VSG jsou rychle lýzována komplementem.

Antigenní variabilita není indukována protilátkami (dochází k ní v imunosuprimovaném hostiteli nebo *in vitro*). Hlavní efekt Ab je eliminovat trypanosomy nesoucí předchozí VSG. Bylo prokázáno, že populace trypanosom v píku parazitemie sice obsahuje většinu jedinců jednoho VAT, ale je zde malé procento jedinců s jinými (novými) VAT. Jeden z nich potom převládne a stane se dominantním (obr. 5.4).

Antigenní variabilita není podmíněna mutacemi. Dá se to dokázat tím, že určité konkrétní VAT jsou exprimovány v časných fázích infekce a jiné (určité) v pozdějších stadiích chronické infekce. Jsou-li VAT klonovány a těmito klony infikováni jednotliví hostitelé, sekvence jednotlivých VAT v hostitelích jsou si podobné.

V genomu trypanosom jsou oddělené geny pro každý VSG. Těchto genů je několik set. Jsou nesený 20 velkými chromosomy a dalšími minichromosomy. V daném čase je exprimován jediný gen. Aby se exprimoval další z genů, musí být kopírován (jako expression-linked copy - ELC) do transkripčně aktivního expresního místa v chromosomální telomeře (genová konverse) (obr. 5.5). Existující ELC v tomto místě je ztracena nebo inaktivována a produkce nového VSG je zahájena transkripcí nahrazené ELC. Další ELC geny v telomerických ale spicích místech mohou být přepsány, jestliže se toto místo stane aktivním a staré místo se vypne. Další možností je přenesení genu do aktivního místa rekombinací. Přepínání genů není náhodné a mezi jednotlivými VAT je určitá hierarchie.

Mechanismy protektivní imunity

Neúčinnost imunity je dána antigenní variabilitou trypanosom. Imunita je závislá na protilátkách, které dokáží vyčistit určitý VAT z krve. Nejúčinnější jsou IgM Ab. Vysoká koncentrace a dlouhodobá produkce IgM ukazují na T nezávislou stimulaci B buněk epitopy opakujícími se na glykoproteinovém plášti trypanosom. K eliminaci trypanosom po navázání Ab dochází fagocytózou Kupfferovými buňkami jater. Komplement není potřeba, hlavně se uplatňuje FcR pro IgM. Buněčná imunita nemá významnější roli, snad pouze v lokalizované zánětlivé reakci v místě kousnutí mouchy.

Imunní modulace trypanosomami

Infekce trypanosomami vede k výrazné nespecifické supresi imunitního systému. Paradoxně je tato suprese provázena IgM hypergamaglobulinemií. Pouze část těchto Ab je specifická pro trypanosomy. Experimentálně bylo prokázáno, že tato infekce vede k polyklonální B aktivaci. MF z infikovaných zvířat mají supresorovou aktivitu, dochází k oslabení T buněčných funkcí.

6. Schistosomy

Schistosomy jsou ploší červi jejichž dospělá stadia žijí v krevních cévách savců a ptáků. Samčí a samiččí jedinci žijí v permanentních párech přičemž větší sameček nese samičku v podélné rýze. Životní cyklus zahrnuje vodní plže jako mezihostitele (obr. 6.1). Vajíčka jsou uvolňována z těla finálního hostitele ve stolici a moči v závislosti na druhu schistosomy. Po kontaktu s vodou se z nich líhne první larvální stadium - miracidium. Tato malá obrvena larva musí přijít do kontaktu s příslušným druhem vodního plže. Miracidium do něj pronikne, ztrácí obrvenou epidermis a mění se na sporocystu. Ve sporocystě se embryonální buňky permanentně dělí a transformují na druhou generaci sporocyst. V nich se vytvářejí další larvální stadia - cercarie. V tomto stadiu schistosomy výrazně zvyšují svůj reprodukční potenciál. U *S. mansoni* z jednoho miracidia vzniká 200 000 cercarií. Cercarie infikují finálního hostitele přímou penetrační kůží. Cercarie se přichytí k epidermis, odhodí ocásek a kombinací aktivního pohybu a sekrece enzymů prostupují přes epidermis do dermis. Během penetrace u nich dochází k výrazným změnám struktury a fyziologických vlastností vnější vrstvy - tegumentu. Schistosomuly (které jsou dalším stadiem) vyvíjejí mnohvrstevnou plasmatickou membránu a ztrácejí glykokalyx, takže už nemohou přežít ve vodě. Schistosomuly migrují krevními cestami do plic a odtud do jater. Po dalším vývoji se dospělí červi párují a putují do mezenterických cév nebo do okolí močového měchýře. Kompletní cyklus od uvolnění vajíček do plné sexuální zralosti trvá několik týdnů. Dospělí červi přežívají dlouhou dobu (5-6 let) a uvolňují velké množství vajíček (*S. mansoni* 300 za den, *S. japonicum* 3000 za den). Vajíčka jsou kladena do cév o malém průměru. Průchod přes tkáň do lumen střeva nebo měchýře je umožněn působením enzymů uvolňovaných z miracidíí, která se vyvíjejí ve vajíčkách.

Schistosomiasa.

Vyskytuje se v tropických a subtropických oblastech. Schistosomiasa postihuje 300 milionů lidí a je primárně způsobena třemi druhy *S. mansoni*, *S. japonicum* a *S. haematobium*. U prvních dvou druhů dospělí červi žijí v mezenterických cévách střeva, *S. haematobium* osidluje cévy kolem močového měchýře. Schistosomiasa je chronická zákeřná nemoc s dlouhodobou oslabující patologií.

Imunitní odpověď

Díky dlouhodobé parazitaci hostitele je imunitní odpověď různorodá. Počáteční penetrace kůže indukuje malou reakci, u opakovaných infekcí může být lokální hypersenzitivita (infekce člověka ptačími schistosomami, které se po průniku do kůže dále nevyvíjejí). První markantní imunitní odpověď je spojena s produkcí vajíček. Jde o silnou buněčnou imunitu, která vede k imunopatologickým změnám. Dospělí červi nejsou přímo patogenní, ale jsou silně imunogenní. Antigenní materiál je uvolňován z tegumentu, ze střeva a též metabolickými ději.

Protektivní imunita

Až v posledních letech bylo prokázáno, že se proti schistosomám vytváří protektivní imunita. Epidemiologické studie ukázaly, že si jedinci udržují nízkou hladinu infekce přesto, že jsou exponováni opakovaně infekci (obr. 6.2).

U experimentálních modelových infekcí se vývoj imunity liší podle druhu hostitele. Smithers a Terry provedli v 60. letech základní pokusy s infekcí kočkodanů *S. mansoni*. Došli k těmto závěrům:

a/ opice byly schopné likvidovat většinu červů, kteří se vyvinuli z čelenžující infekce, ale nemohly eliminovat dospělé z původní infekce.

b/ imunita k infekci mohla být stimulována expozicí velkém množství atenuovaných (ozářených) cercarií nebo transplantací dospělých červů přímo do vaskulárního systému.

c/ imunita k reinfekci působila proti larválním stádiím. Protože mohla být stimulována dospělými červy, tato dvě stadia musí exprimovat společně Ag. Avšak dospělci nejsou postiženi imunitní odpovědí, která ničí larvy.

Pro tuto paradoxní situaci u opic navrhli v roce 1969 Smithers a Terry termín *concomitant immunity*.

Tito autoři provedli serii experimentů, kterými vysvětlili schopnost dospělých červů unikát imunitní kontrole (obr. 6.3).

Imunizovali opice myšími jaterními a slezinnými buňkami. Když do nich přenesli červy z opičích dárců, tito přežívali bez ohledu na to, zda byly opice imunizovány nebo ne. "Myší" červi přežívali po přenosu do normálních opic, ale potřebovali 6 týdnů na to, aby obnovili intenzitu kladení vajíček. V opicích imunizovaných myšími Ag většina "myších" červů hynula během 25 hod. Tato imunita fungující proti myším červům byla přenosná sérem a "myší" červi ztráceli citlivost k této imunitě po pasáži přes opice.

Z toho vyplývá, že červi získávají hostitelské Ag, které nesou na svém povrchu a které mohou způsobit, že červi nejsou rozpoznáváni jako cizí.

Tato zjištění byla podpořena i pokusy *in vitro* kdy schistosomy kultivované v médiu s lidskými erythrocyty získali glykolipidové Ag krvinek do svého tegumentu. Dnes je známo, že paraziti mohou mít ve svém tegumentu řadu hostitelských Ag včetně histokompatibilních Ag, imunoglobulinů atd. Tegument má FcR a komplementový (C1q) receptor a červi mohou syntetizovat molekulu podobnou hostitelskému alfa₂-makroglobulinu. Léky, které přímo poškozují tegument (praziquantel) zvyšují ochrannou úlohu protilátek. Kromě toho dochází k turnoveru složek tegumentu, který se urychluje po vazbě Ab nebo C .

Ikdyž jsou dospělí červi dobře chráněni před imunitou, mohou být poškozeni imunitní reakcí ve smyslu jejich přežití nebo snůšky vajíček. Nejdůležitějšími cíli pro imunitní mechanismy jsou však schistosomuly.

Schistosomuly mohou být udržovány *in vitro* po dlouhou dobu. Efektorové imunitní mechanismy působící proti larvám zahrnují kooperativní interakce mezi buňkami a Ab (obr. 6.4). Larvy mohou být též zabíjeny komplementem. Interakce efektorových buněk s opsonizovanými larvami se uskutečňuje přes Fc nebo C3b receptory, ale buňky mohou být samy vyzbrojeny Ab nebo Ab-Ag komplexy. Nedůležitější zabíječské buňky jsou v tomto případě eosinofily a MF.

Eosinofily se připojují ke schistosomulům přes Fc nebo C3b receptory. Mají také nízkofinální receptor pro IgE a používají tuto Ab k rozpoznání parazitárních Ag-ů. ADCC u krys je původně zprostředkována IgG2a Ab, pak převládá IgE Ab. IgG2a se také vážou na žírné buňky a ADCC prezentovaná eosinofily je v tomto případě zesílena uvolněním chemotaktického tetrapeptidu ECF-A (eosinofil chemotactic factor of anaphylaxis). Po adhezi eosinofilů na larvy (obr. 6.5) se sekreční granula akumulují v místě kontaktu se schistosomulou a fúzí do vakuol. Ty pak splývají s buněčnou membránou a obsah se vyleje na parazita. Granula obsahují enzymy jako peroxidázu a fosfolipázu B, které poškozují tegument. Dále obsahují hlavní basický protein

(MBP), který poškozují larvy ještě v 2×10^{-5} M koncentraci. Nejdříve dochází k poškození tegumentu, eosinofily potom aktivně pronikají tegumentem a odhalují pod ním ležící svaly. Zabíjení parazitů makrofágy probíhá dvěma mechanismy. Jeden je nespecifický, nezávislý na Ab a účastní se ho aktivované MF. Tato forma zabíjení zahrnuje produkci toxických metabolitů včetně NO. Další mechanismus je specifický a zahrnuje IgE. IgE v tomto případě neopsonizuje ale spíše vyzbrojuje MF v ADCC. Tripeptid treonin-lysin-prolin, který vzniká štěpením IgG molekul parazitárními enzymy, interferuje s IgE zprostředkovanou cytotoxicitou. Schistosomuly jsou citlivé k ADCC pouze mladé, později citlivost ztrácejí. Ztráta citlivosti souvisí s pozměněnou antigenitou, ale dochází i ke zvýšení odolnosti k poškození efektorovými mechanismy. Více než 90% povrchových epitopů schistosomul je spojeno s cukry. Tyto Ag skříženě reagují s AG vajíček a poskytují tak základ pro tzv. blokující Ab. Jiné skříženě reagují s dospělými stadii a jsou zahrnuty v *concomitant immunity*.

Imunoepidemiologické studie u lidí ukázaly korelaci mezi IgE odpovědí a rezistencí k reinfekci. Schistosomuly mohou být zabíjeny eosinofily, MF a destičkami v IgE zprostředkované ADCC. U krysy, které jsou dosti rezistentní k infekci dochází k destrukci parazitů v plicích. Imunita je T závislá, úlohu hrají izotypy IgE a IgG 2a a eosinofily. Nově byla objevena i úloha IgA v ADCC zprostředkované eosinofily.

Myš je na rozdíl od krysy citlivější k infekci schistosomami a vývoj parazita je zde dokončen. Protektivní imunitu lze navodit imunizací ozářenými cercariemi nebo schistosomuly. Indukovaná imunita je T-závislá a zahrnuje zejména CD4⁺ Th buňky. Efektorové mechanismy jsou ADCC (s IgG ale ne IgE) a aktivované MF. C asi nehraje roli. Hlavní imunitní reakce probíhá v plicích. Eosinofily a neutrofilové se účastní kožní odpovědi, MF jsou důležité v plicích. Pro plicní imunitu jsou nejdůležitější Th1 buňky, které aktivují MF produkcí IFN gama. Kromě toho produkují další cytokiny, které iniciují vývoj zánětlivých ložisek kolem larev.

Interference s imunitou

Serologické studie ukázaly, že imunitní status jedince závisí na rovnováze antiparazitárních izotypů IgG4 a IgE (obr. 6.6). IgG4 Ab blokuje eosinofily zprostředkovanou ADCC. Tyto Ab byly označeny jako blokující. *In vitro* bylo prokázáno, že IgM Ab proti určitým epitopům blokuje vazbu IgG izotypu, který funguje v ADCC.

Skříženě reagující blokující Ab proti Ag uvolňovaným z vajíček potlačují imunitu k invadujícím larválním stadiím.

Syntéza jednotlivých izotypů B buňkami je regulovaná T buněčnými cytokiny. Ukázalo se, že produkce vajíček schistosomami je spojena s přepnutím původní Th1 odpovědi na Th2 (obr. 6.7).

Imunopatologie

Schistosomiáza je jednou z infekcí, u které není patologie spojena s přímými aktivitami parazita, ale s imunitní a zánětlivou reakcí hostitele. Mezi imunopatologické symptomy patří dermatitida v místě průniku cercarií, akutní alergická fáze způsobená migrací parazitů do plic, nemoc z

imunních komplexů. Nejčastěji studované jsou imunopatologické změny v játrech spojené s infekcí *S. mansoni*.

Všechna produkovaná vajíčka neodcházejí z hostitele, ale jsou onášena s krví do jater. U chronicky infikovaných hostitelů dlouhodobá expozice imunogenům uvolňovaným miracidiemi ve vajíčkách (SEA - soluble egg antigens) vyvolává DTH reakci a vajíčka se stávají základem granulomů. SEA jsou komplexem proteinů, glykoproteinů, cukrů a glykolipidů. Některé složky této směsi jsou rozpoznávány T buňkami, které hrají základní úlohu v iniciaci, vývoji a modulaci granulomu. Jde o Th buňky uvolňující cytokiny, což vede k akumulaci lymfocytů, MF, eosinofilů a dalších zánětlivých buněk kolem vajíček. Granulomy pak mají asi 400 um v průměru (obr. 6.8). Původní T buněčná odpověď zahrnuje Th1 buňky. TNF z MF aktivovaných touto reakcí je zodpovědný za iniciaci granulomu. Produkce SEA pak vede k vývoji Th2 buněk, které uvolňují IL-5 vedoucí k akumulaci eosinofilů. Buňky granulomů také produkují faktory stimulující aktivitu fibroblastů. Produkce kolagenu těmito buňkami vede k vývoji fibrózy v infikovaných játrech. Larvy ve vajíčkách obklopených granulomy jsou usmrceny, takže tvorba granulomů může být považována za obranný mechanismus, neboť chrání před hepatotoxiny uvolňovanými miracidiemi. U T deficientních myši dochází kolem vajíček k nekróze jaterní tkáně. Bylo zjištěno, že TNF produkovaný granulomy stimuluje uvolňování vajíček samičkami schistosom.

7. Gastrointestinální hlístice

Střevo obratlovců může být považováno za původní místo osídlené parazity. Přežití ve střevě umožňuje vysoký obsah živin a snadná cesta z hostitele. Střevní paraziti jsou nejčastější i když ne nejvíce patogenní. Životní cykly střevních hlístic jsou dosti různorodé (Fig 7.1). Jsou ubikvitárními parazity člověka a domácích zvířat a choroby, které způsobují jsou zřídka letální. Avšak infekce jsou dlouhotrvající, zeslabující a dochází při nich ke změnám struktury a funkce střeva.

Střevo nemůže být považováno za homogenní životní prostředí, podmínky se liší v různých oblastech střeva např. v lumen a mukóze. Velcí červi jako škrkavky musí žít v lumen střeva, ale měchovci nebo *Trichostrongylus* jsou úzce spojeni s mukózou. U některých druhů žijí v mukóze jen některá vývojová stádia, dospělí červi žijí v lumen střeva. *Trichinella spiralis* a *Trichuris* jsou lokalizováni intracelulárně, protože pronikají do epiteliálních buněk.

Imunitní odpověď střeva

Původně se myslelo, že paraziti žijící ve střevě jsou vlastně mimo tělo a proto nemohou být napadeni imunitními mechanismy pokud neporuší mukózu. Dnes se ví, že tato představa je nesprávná a že střevní paraziti mohou být terčem imunitní odpovědi.

Střevo představuje bránu pro vstup mnoha Ag z potravy, normální bakteriální flory i patogenů. Enterocyty tvořící epiteliální vrstvu představují fyzikální bariéru, ale umožňují záchyt a průnik Ag, který se zvyšuje v případě zánětu. Produkce cytokinů během zánětu vede k expresi MHC II Ag na enterocytech, což jim umožňuje prezentovat Ag. Ag zachycují též specializované buňky pokrývající Peyerovy plaky. I když je řada Ag enzymaticky štěpena existuje významný transport Ag do mukózy. Ag mohou být zachyceny v povrchovém hlenu. Pokud proniknou touto obrannou bariérou a vstoupí do krevního oběhu, jsou filtrovány fagocyty v játrech. Intestinální prezentace

antigenů může vést i k neodpovědnosti, což představuje způsob prevence nadbytečné imunologické aktivity.

Střevní imunoglobuliny

Hlavním izotypem na mukózním povrchu je dimerický IgA, který je sekretován přes enterocyty nebo přichází se žlučí. Podobně je přes mukózní epitel transportován IgM a zůstává funkční v lumen střeva. Pokud nedojde k zánětu, do lumen se dostane jen málo IgG. V případě zánětu je pohyb IgG do lumen označován jako patotopická potenciace. IgG molekuly však rychle podléhají proteolýze. Většina IgE v mukóze je vázána na žírné buňky.

Lymfocyty

Lamina propria obsahuje velké množství T i B lymfocytů. Z T lymfocytů jsou nejdůležitější CD4+. Je zde specializovaná populace tzv. intraepiteliálních lymfocytů, které nesou gama/delta receptor. Payerovy plaky jsou organizovanou lymfatickou tkání oddělenou od lumen střeva tzv. M buňkami, které zachycují a prezentují antigen. Peyerovy plaky hrají proto významnou roli v iniciaci odpovědi na Ag ve střevě. Podobně jako v jiných tkáních zde dochází k cirkulaci lymfocytů mezi mukózou Peyerovými plaky a drénujícími uzlinami.

Myeloidní buňky

Množství nelymfoidních efektorových buněk v mukóze vzrůstá během parazitární infekce. Jde o MF, eosinofily, neutrofilie, basofily a subpopulaci žírných buněk. Infiltrace mukózy těmito buňkami je řízena cytokiny z T buněk. Mediátory z myeloidních buněk hrají hlavní roli ve vývoji střevního zánětu. Ovlivňují strukturu a funkci střeva a množství a vlastnosti střevního hlenu. Působení různých imunitních a zánětlivých reakcí proti střevním červům je na Fig 7.2.

Protektivní imunita proti střevním hlísticím

Hlístice představují problém pro imunitní systém, protože jsou pohyblivé a ochráněné pevnou kutikulou (Fig 7.3). Kutikula je antigenní i imunogenní a může být poškozena imunitními mechanismy, ale zdá se že reakce proti kutikule není významná pro protektivní imunitu. Spíše je protektivní imunita zaměřena proti Ag uvolňovaným z těla červa.

Poznatky o mechanismech protektivní imunity byly čerpány zejména z modelových infekcí laboratorních zvířat. Spontánní vyléčení má imunologickou podstatu a je závislé na T buňkách, Ag specifická imunitní reakce není jediným mechanismem vypuzení červa, zánět hraje též důležitou úlohu. Fig 7.4 ukazuje, že chronická infekce ovčí *Haemonchus contortus* byla vyléčena superinfekcí larválními stádii. Toto vyléčení bylo spojeno s výraznými zánětlivými změnami ve střevě a zvýšenými hladinami histaminu v krvi.

Imunita k hlísticím rodu *Nippostrongylus*

Účast časně přecitlivělosti na vypuzení červa byla studována na modelu infekce krys červem *Nippostrongylus brasiliensis*. Infekce vyvolá výrazné zvýšení IgE a mukózních žírných buněk (zřejmě T regulace preferující nespecificky IgE). Existují tři hypotézy:

1. Uvolněné aminy přímo poškozují červa.
2. Zánět provázející hypersenzitivitu vytváří nevhodné podmínky pro přežití červa.
3. Vaskulární a epiteliální permeabilita, indukovaná aminy, umožňuje vzestup specifických IgG Ab do lumen střeva.

Byla prokázána korelace mezi hladinou serinových proteáz uvolňovaných z žírných buněk a úbytkem počtu červů (Fig 7.5).

Pokusy na myších ukázaly, že IgE Ab nejsou nezbytné pro vypuzení červů (myši se zablockovanou tvorbou normálně vypudily červy), ale mohou toto vypuzení způsobit. Zdá se, že jestliže tento mechanismus nefunguje, uplatní se jiný. Ten je založen na zmnožení pohárkových buněk jako reakci na T buněčnou imunitní odpověď a indukci biochemických změn hlenu což vede k vypuzení červa.

Imunita k Trichinelle

Spontánní vyléčení z trichinelózy trvá u myši a krys 10-15 dnů. Vypuzení červa je spojeno s výraznými zánětlivými změnami ve střevě, infiltraci žírných buněk do mukózy, atrofii vilů a hyperplasií krypt a zvýšenou peristaltikou.

Důkazy podporující význam zánětu:

1. Suprese zánětu brání spontánnímu vyléčení.
2. Zánětlivé změny vyvolané trichinelou vedou k vypuzení i jiných červů ze střeva.

Vypuzení červy přežívají a mohou být transplantováni do jiného hostitele.

Zánětlivé změny závisí na lokální aktivitě Th2 buněk, které si vyvíjí v lamina propria a v drénujících lymfatických uzlinách. Tyto buňky interagují s myeloidními buňkami na základě produkce cytokinů, které působí jak lokálně, tak centrálně (endokrinně) a řídí tvorbu a diferenciaci buněčných subpopulací, které infiltrují střevní stěnu. Úloha žírných buněk ve vypuzení červů je podpořena těmito důkazy:

1. U „nude“ myši a myši, které nemohou indukovat mastocytózu, perzistují červi déle než u normálních myši.
2. Vypuzení červů koreluje se zvýšeným množstvím žírných buněk v mukóze a s uvolněním specifických proteináz.
3. Blokování vývoje žírných buněk brání vypuzení červa. (Tab 7.2)

Vývoj mastocytózy závisí na uvolnění řady cytokinů, hlavně IL-3 a IL-9. IL-9 je tvořen Th2 lymfocyty, které jsou charakteristické pro trichinelózu.

IgG a IgA Ab interferují s růstem a reprodukcí červů, ale nezpůsobují jejich přímé vypuzení.

Primární infekce trichinelou zanechává silnou imunitu, která u krys vede k vypuzení červů během 24 hodin. Jedno z vysvětlení je zachycení larev v hlenu, zabránění přístupu ke sliznici a vypuzení larev peristaltikou. Interakce IgE Ab na žírných buňkách s parazitárními Ag působí elektrofyziologické změny v epiteliích mukózy, což vede ke změnám transmembránového potenciálu, toku iontů a pohybu vody. Dalším následkem je změna sekrece hlenu pohárkovými buňkami.

Antigeny zahrnuté v imunitě

Oesophagus (jícen) trichinel je obklopen řetězcem velkých cylindrických buněk, stichocytů. Celá struktura se nazývá stichosom (Fig 7.6). Cytoplasma stichocytů obsahuje granula vázaná na membránu, která jsou uvolňována do lumen oesophagu a ústním otvorem ven. Uvolňování těchto granulí je spojováno s průnikem parazita epitelem a s přijímáním potravy. Materiál stichosomálních granulí je vysoce imunogenní a může vyvolat odpověď, která redukuje růst a plodnost červů a vede k urychlení jejich vypuzení.

Schéma imunitních a zánětlivých reakcí iniciovaných infekcí *Trichinella spiralis* je na Fig 7.7.

Infekční larvy přecházejí ze žaludku do tenkého střeva a rychle pronikají epiteliální vrstvou mukózy, Stichosomální Ag vyvolávají T buněčnou odpověď v lamina propria a drénujících uzlinách. T buňky a B blasty migrují zpátky do střeva přes ductus thoracicus. Uvolnění T

buněčných cytokinů zahazuje zánětlivé změny, které mění mukózní prostředí a indukují infiltraci dalších buněk (zejména žírných). Kombinace změny prostředí, poškození červa mediátory zánětu a interakce Ab se stichosomálními produkty snižuje životnost červů a nakonec vede k jejich odstranění peristaltikou.

Chronické infekce

U lidí způsobují střevní nematodi chronické infekce s téměř neexistující imunitou. Řada infekcí domácích zvířat je též chronických, i když zde nějaká imunita existuje. Pro vývoj imunity jsou důležité věk, zdravotní stav, výživa. Důležitá je i dávka parazita použitá k infekci. V přírodě je hostitel průběžně vystavován malým infekčním dávkám, což vede k ustavení perzistentní infekce i v případě, kdy velká jednorázová dávka parazita vede k samovyléčení. Infekce malými dávkami opakovaně vede k vývoji perzistentní infekce i u imunních krys (Fig 7.8). Červi jsou zakrnělí a méně plodní, ale přežívají. Tento způsob infekce dovoluje červům adaptovat se i imunnímu prostředí – stávají se méně imunogenní a citliví k imunitním mechanismům.

Infekce některých kmenů myši (C57Bl) hlísticí *Heligmosomoides polygyrus* vede k perzistenci dospělých červů ve střevě. Přesto infekce vyvolá signifikantní imunitní odpověď, která může být za určitých podmínek protektivní. U jiných kmenů myši jsou dospělí červi vypuzeni mnohem rychleji (Fig 7.9).

Ukázalo se, že zatímco larvální stadia mohou vyvolat protektivní imunitu, dospělí červi nějakým způsobem interferují s vývojem nebo expresí imunity. To bylo potvrzeno pokusy, kdy byly myši imunizovány ozářenými larvami (Fig 7.10). Ukázalo se, že pokud byly myši infikovány jenom larvami, vyvinuly imunitu, pokud byly do myši nejprve implantovány dospělí červi a pak byly tyto myši infikovány larvami, imunita se nevyvinula.

Mechanismus suprese je nejasný. Dochází k nespecifické imunosupresi, která je spojena s potlačenou prezentací Ag makrofágy a výskytem supresorických T buněk. Červi zřejmě sekretují faktory alterující T buněčnou odpověď. Cytokinová analýza u citlivých a rezistentních kmenů myši k infekci *Heligmosomoides polygyrus* ukázala, že rezistentní kmeny produkují více IL-3 a IL-9 než kmeny senzitivní.

U parazita myši *Trichuris muris* dokáží dospělí červi přepnout Th2 odpověď na Th1, což vede k vývoji perzistentní infekce. To však platí jen pro některé kmeny myši.

8. Hlístice, které invadují tkáň

Život nematodů mimo střevo vyžaduje adaptaci v reprodukční biologii. Jedním z řešení je produkce stadií - cyst nebo vajíček, které zůstávají infekční ve tkáních po smrti hostitele, nebo když je hostitel sněden. U filarií je tento problém řešen zahrnutím krevsajícího členovce jako mezihostitele do životního cyklu (obr. 8.1). Samičky rodí živá embrya - mikrofilarie, které cirkulují v krvi a akumulují se v kůži. Členovec, který je nasaje s krví, vytváří prostředí, ve kterém se vyvíjejí v infekční formy, které jsou vneseny do nového hostitele při dalším sání krve. Lymfatické filariosy, které způsobují *Wuchereria bancrofti* a *Brugia malayi* jsou přenášeny komáry.

Původce onchocerkosy *Onchocerca volvulus* je přenášena muchničkami.

Další červi z této skupiny jsou přenášeni členovci včetně klíšťat a roztočů.

U některých druhů filarií ex-je úzký vztah mezi chováním parazita a vektora, které směřuje k optimalizaci záchytu mikrofilariálních stadií. Tato stadia jsou přítomna v krvi pouze omezenou dobu dne nebo noci, kdy vektor nejvíce sají na hostiteli. Např. u *Wuchereria bancrofti* jsou mikrofilarie v periferní krvi hodinu nebo dvě kolem půlnoci, kdy komáři sají na hostiteli. Po zbytek času larvy zůstávají v orgánech hluboko v těle, zvláště v plicích.

Filarie jsou zodpovědné za některé velmi důležité parazitární choroby lidí a vyskytují se tam, kde jsou vhodné podmínky pro vývoj mezihostitelů. Jde o chronické infekce charakterizované vysokou morbiditou spíše než mortalitou. Patologické změny postihují lymfatický systém a kůži. Dochází k otokům a zánětům lymfatických uzlin, někdy k blokadě lymfatických cév. U onchocerkosy dochází k největším změnám kůže a k postižení oka, které může končit slepotou. U onchocerkosy působí patologické změny mikrofilarie, u druhů žijících v lymfatických cestách jsou nebezpečnější dospělí červi. Mnohé změny spojené s filariosami mají imunopatologickou podstatu s hypersenzitivními reakcemi. Ne všechny filariosy mají těžký průběh, řada z nich je benigních s velmi málo klinickými příznaky.

Vzhledem k biologii těchto parazitů ex-je intimní kontakt mezi parazitem a imunitním systémem. Parazitární Ag jsou dostupné hostiteli a paraziti mohou být snadno napadeni imunitním mechanismy hostitele. Zdálo by se, že imunitní systém představuje v tomto případě efektivní bariéru proti těmto parazitům, ale není tomu tak. Filarie jsou nejen velcí a úspěšní paraziti (infikováno asi 300 milionů lidí), ale dospělí červi žijí v hostiteli až 15 let. Toto dlouhé přežívání je o to zajímavější, když si uvědomíme, že infekce vyvolá silnou imunitní odpověď, charakterizovanou zvýšenou hladinou IgE a výraznou eosinofilií.

Protektivní imunita

Chronicita filarios znamená, že protektivní odpověď chybí, nebo je slabá, nebo že se červi dokážou vyhnout imunitní reakci snížením imunogenity nebo supresí imunity. Důkazy protektivní imunity u lidí jsou nepřímé a pocházejí z epidemiologických pozorování. Hladina infekce se snižuje s věkem a v endemických oblastech jsou parazitologicky negativní jedinci, kteří jsou v imunologických testech s parazitárními Ag pozitivní. Studie *in vitro* prokázaly, že infekce indukuje produkci Ab, které mohou být cytotoxické pro parazitární stadia. Imunitní odpověď proti filariím se studuje na modelových infekcích laboratorních zvířat parazity příbuznými lidským. Efektivní imunita vede k smrti dospělých červů, ztrátě jejich plodnosti, vymizení mikrofilarií z oběhu, nebo zábraně vývoje jednotlivých stadií. Tam, kde se imunita nevyvíjí, není hostitel schopen bránit rozvoji primární infekce, nebo infekcí následujících (obr.

8.2). Imunita, pokud se vytvoří, je závislá na T buňkách. Nahé myši a krysy jsou citlivé k infekcím, ke kterým jsou normální zvířata rezistentní.

Odpověď proti mikrofilariím

Bylo prokázáno, že infekce vede k produkci Ab proti mikrofilariální pochvě nebo kutikule u mikrofilarií bez pochvy (obr. 8.3). Tyto Ab mohou být detegovány imunofluorescencí nebo na základě jejich schopnosti zprostředkovat adhezi buněk. Výskyt Ab proti mikrofilariím koreluje lépe s rezistencí k infekci než Ab proti dospělým červům. ADCC zprostředkovaná těmito Ab vede k zabítí larev.

Mikrofilarie mohou být zabíjeny řadou Ab a efektorových buněk (obr. 8.4). Úloha buněk v tomto procesu byla prokázána pokusem, kdy larvy *Acanthocheilonema viteae* byly umístěny do porézní komůrky a implantovány do imunních křečků. Když byla velikost pórů 0,3 μm , buňky nemohly proniknout do komůrky a larvy přežily. Když byla velikost pórů 3-5 μm , buňky pronikaly do komůrky a larvy byly zabity během 24 hodin. Stejně výsledky byly dosaženy, když byly larvy preinkubovány s IgM frakcí imunního séra, umístěny do komůrky s 3 μm póry a implantovány do neimunních křečků.

Úloha IgM Ab byla potvrzena *in vivo* užitím mutantního kmene, neschopného tvořit IgM Ab. Mechanismus zabíjení mikrofilarií byl studován i na různých kmenech myši. U Balb/c mikrofilarie přežívají více než 200 dnů, u C57Bl/10 mizí za 50-75 dnů (obr.8.5). Oba kmeny myši se liší schopností produkovat antiparazitární IgM, Ab z Balb/c myši mají nižší afinitu k Ag mikrofilarií, proto jsou méně účinné v ADCC. Přenos imunního séra z C57Bl do Balb/c s mikrofilariemi způsobil rychlý pokles mikrofilaremie, ale pak se hladina mikrofilarií vrátila zpět, což ukazuje na defekt v dalším mechanismu potřebném pro eliminaci mikrofilarií (obr. 8.6).

Detailní studie zabíjení mikrofilarií *Acanthocheilonema viteae* pomocí ADCC na krysím modelu ukázaly, že primárně se reakce účastní Ab izotypu IgE, která funguje jako opsonin. Prvním typem buněk, které adherují jsou eosinofily, které jsou v úzkém kontaktu s kutikulou a degranulují na její povrch. Pak se vrstva materiálu uvolněného z buněk zvedne a adherují MF ve velkém množství. Ty pak uvolňují lysosomální materiál. V tomto stadiu je kutikula viditelně poškozena a vnitřní tkáň začíná lýzovat.

Je důležité, že Ab schopné fungovat v ADCC se objevují až ve stadiu mikrofilaremie. Podobně je tomu u lidí, ale je otázkou proč se tyto Ab vyskytují v krvi tak pozdě. Může to být následkem imunosuprese, nebo mikrofilarie ztěžují rozpoznání změnou svých povrchových Ag nebo získáváním povrchových molekul hostitele. Bylo zjištěno, že povrchové molekuly čerstvě vylíhlých mikrofilarií se liší od starších larev. Larvy některých druhů mají na svém povrchu sérový albumin hostitele.

Odpověď proti infekčním larvám a dospělcům

Epidemiologické studie ukázaly, že v endemických oblastech jsou v populacích exponovaných infikovaným vektorům jedinci, kteří jsou parazitologicky negativní a mají nebo nemají klinické příznaky. To ukazuje na určitou rezistenci nebo na vývoj imunity proti dospělcům, kteří se pak nemohou reprodukovat.

Existují důkazy, že subadultní vývojová stadia filarií mohou být postižena imunitní reakcí. Např. L3 *Brugia pahangi* jsou u imunních koček zabíjeny před vstupem do hostitelových lymfatických drah. Ozářené larvy L3 byly úspěšně použity k vakcinaci opic proti *Brugia malayi*.

Nepřímé důkazy svědčí pro imunitu proti dospělým červům. U infekce krys *Acanthocheiloema vieae* dospělí červi umírají mnohem dříve, než zmizí mikrofilarie z krve. U křečků zase mikrofilarie mizí, což je způsobeno neschopností dospělých červů produkovat larvy v důsledku jejich poškození imunitou. U infikovaných hostitelů jsou prokazovány Ab proti vnitřním Ag dospělých červů, které nejsou dostupné před smrtí červa.

Dosud nebyla zodpovězena otázka, zda v endemických oblastech ex-je kompletní imunita proti filariím. Studie na Nové Guinei ukázaly, že ikdyž byli někteří jedinci v oblasti endemické pro *Wuchereria bancrofti* amikrofilaremičtí a asymptotičtí, byli serologicky pozitivní na Ag dospělých červů a tyto Ag přímo obsahovali v cirkulaci.

Imunomodulace a imunopatologie u filarióz

Diverzita odpovědi hostitele na infekci filariemi je na obr. 8.7. Na jedné straně jsou jedinci parazitologicky negativní a imunologicky pozitivní, na druhé těžce infikovaní se sníženou imunitní odpovědí (částečně tolerantní). Obě skupiny vykazují malou nebo žádnou patologii, zatím co další skupinu, která je amikrofilaremičtá, provází těžká patologie spojená se záněty a ucpáním lymfatických cest (elefantiasa) a silnou buněčnou a Ab odpovědí. Čtvrtá kategorie je spojena s přehnanou odpovědí a může vést k vývoji abnormálních příznaků jako je tropická plicní eosinofilie (TPE). Zdá se, že tato diverzita závisí na genetických faktorech hostitele a na faktorech prostředí na jedné straně a na parazitologických faktorech zahrnujících úroveň, frekvenci a dobu expozice k infekci.

Charakteristická odpověď na infekci filariemi zahrnuje eosinofilii a zvýšenou hladinu IgE. Tyto složky přispívají k ochraně ale mohou též fungovat v imunopatologii (obr 8.8). Jejich zvýšené hladiny jsou typické pro TPE. Jedinci s lymfatickou patologií, kteří jsou amikrofilaremičtí, mají vyšší hladiny IgE a IgG než jedinci asymptotičtí a mikrofilaremičtí. Ti mají specifické Ab IgG4 isotypu, který kompetitivně blokuje na IgE závislou alergickou odpověď, protože váže Ag v tkáňových tekutinách dříve, než se dostanou k IgE molekulám na žírných buňkách či basofilech (paralela se schistosomami). IgE, IgG4 i eosinofilie jsou závislé na Th2 subpopulaci produkující IL-4 a IL-5. Mikrofilaremičtí jedinci mají redukovanou T buněčnou odpověď na Ag filarií, zatím co jedinci s elefantiasou jsou vysoce odpovídaví. Neschopnost odpovědět na Ag může odrážet interferenci s Th1 funkcí v důsledku změny v prezentaci Ag, odpovědi na IL-2 nebo produkci IL-10. Jedinci s aktivní infekcí mají potlačenou produkci IFN gama (obr. 8.9). Suprese Th1 aktivity koreluje se vzrůstem Th2 funkce, což vede k produkci IgG4, IgE a eosinofilii. Odlišné hladiny IgG4 a IgE u různých skupin jedinců musejí odrážet jemnější vliv na Th2 funkci, protože oba isotypy jsou Th2 dependentní. Intenzita a charakter imunitní odpovědi proti jednotlivým stadiím filarií ovlivňuje patologii filarióz.

U filarií rodu *Onchocerca* je patologie spojena výlučně s mikrofilariemi, které zpočátku vyvolávají hypersenzitivní reakce v kůži vedoucí k dermatitidě. Kůže je infiltrována žírnými buňkami, eosinofily, lymfocyty, plasmatickými buňkami a makrofágy. V pozdějších fázích dochází k neodpovídavosti na parazitární Ag, avšak degenerativní změny v kůži pokračují.

Antigeny filarií

Imunologicky aktivní molekuly uvolňované červy zahrnují jednak Ag, jednak imunomodulační molekuly. Řada z nich byla identifikována a klonována, ale jejich funkce je většinou neznámá. Některé mají transportní nebo sekreční úlohu, jiné mohou chránit před obrannými mechanismy hostitele. Jeden z hlavních povrchových Ag všech druhů napadajících lymfatické dráhy je gp 29.

Jde o enzym glutathion peroxidázu, která může fungovat jako antioxidační enzym a chránit povrch červa před mediátory uvolňovanými z bílých krvinek. Tento gp se plně exprimuje až po vstupu do savčího hostitele, takže se může jednat o adaptivní odpověď umožňující přežití v novém prostředí (obr. 8.10).

Ex-je vysoký stupeň skřížené reaktivity mezi Ag různých filarií. Buďto mají tyto molekuly důležité metabolické funkce, nebo jsou to vysoce konzervované molekuly jejichž funkcí je potlačení protektivní imunity hostitele.

9. Imunita proti ektoparazitům

Suchozemští obratlovci jsou hostiteli řady ektoparazitických členovců. Infestace těmito parazity může vyvolat patologické příznaky poškozením kůže nebo systémovým účinkem, ale daleko důležitější je to, že fungují jako vektory patogenů od helmintů až po viry. Existuje velká variabilita v době kontaktu ektoparazita s hostitelem. Zákožka svrabová žije celý život na hostiteli, komáři, u nichž parazitují pouze samičky, jsou s hostitelem pouze ve sporadickém kontaktu při sání krve.

Ektoparaziti přicházejí do kontaktu pouze s kůží, která představuje jedinou bariéru, kde se proti nim uplatňují imunitní mechanismy. Kůže je velmi dobře vybavena pro indukci imunitní odpovědi. Její rozsáhlá vaskularizace umožňuje přístup buněčným i humorálním efektorům. Přítomné buňky obsahující aminy rychle reagují na poškození kůže a jejich degranulace vede ke zvýšené infiltraci dalších buněčných populací. Je zde populace dendritických Langerhansových buněk prezentujících Ag, injikovaný do kůže ektoparazity.

Většina ektoparazitů injikuje do rány antikoagulační faktory bránící srážení krve, histolytické enzymy, vazoaktivní aminy a toxiny. Proteiny obsažené ve slinách jsou potentními imunogeny a vyvolávají silnou imunitní reakci často hypersenzitivní povahy. Účinek této odpovědi závisí na délce sání. Proto byla imunitní odpověď na sání ektoparazitů studována zejména u klíšťat.

Imunitní odpověď na sání klíšťat

Všechna klíšťata parazitují a mnoho z nich přenáší významné patogeny člověka a hospodářských zvířat (obr. 9.1). U některých klíšťat sají všechna vývojová stadia na jednom hostiteli, u jiných druhů na dvou nebo třech hostitelích. Sání tzv. tvrdých klíšťat je dlouhodobý proces, který může trvat několik dnů. Ústní část je přizpůsobena k proniknutí kůží a sání krve (obr. 9.2). Sání předchází produkce slin a cementu, který slouží k "ukotvení" klíštěte v kůži (obr. 9.3). Antigenní materiál obsažený v těchto sekretech perzistuje v kůži několik dnů a může být identifikován na povrchu Langerhansových buněk. Dokonce u naivních hostitelů vyvolá sání klíštěte výraznou zánětlivou reakci, která však nezabrání dokončení sání. U imunních hostitelů je reakce na sání rychlá a může mu zcela zabránit. Klíště hyne vyhladověním a vyschnutím.

Imunita ke klíšťatům z čeledi *Ixodidae* byla prokázána už v roce 1939 Tragerem u morčat. Z empirických pozorování byla dlouho známa imunita k sání klíšťat u skotu. Morčata se stala experimentálním modelem, na kterém byla imunita hodnocena podle procenta klíšťat, která úspěšně dokončila sání a podle váhy nasátých klíšťat (obr. 9.4).

Účinná dlouhotrvající imunita proti klíšťatům se vyvíjí rychle a je patrná už týden po zahájení sání. Na imunním hostiteli klíšťata nemohou sát, špatně se svlékají, nebo mohou uhynout vyschnutím během 24 hodin. Imunitní odpověď k infestaci je velmi citlivá. Pokusy ukázaly, že 48 hod. sání jedné dospělé samice na morčeti indukovalo téměř kompletní imunitu k následné infestaci 200 larev. To dále ukazuje, že imunita nebyla specifická pro jedno vývojové stadium. Imunita není lokální a uplatňuje se proti klíšťatům sajícím na různých místech těla hostitele. K přenosu imunity dochází jak sérem, tak imunními lymfocyty.

Když klíšťata sají na naivním hostiteli, prvními buňkami, které infiltrují místo sání jsou neutrofilů, po nich basofilů, žírné buňky a eosinofilů. Význam basofilů a žírných buněk závisí na hostiteli. Morčata, králíci a hovězí dobytek obsahují hodně basofilů, u myši převažují žírné buňky. Sání klíšťat může vyvolat degranulaci těchto buněk již při první infestaci. Ag uvolňované sajícími klíšťaty jsou zpracovány Langerhansovými buňkami a prezentovány T buňkám, které zahajují zánětlivou a protilátkovou odpověď. Produkované IgG1 a IgE Ab se váží na buňky

obsahující aminy, Ag-Ab komplexy mohou aktivovat komplement. Primární odpověď není dostatečně rychlá, aby postihla sající klíště. Ale u imunního hostitele je velmi rychlá. U imunních morčat sání vede k akumulaci basofilů a menší infiltraci eosinofilů. Tkáňové basofily v reakci na klíštěcí Ag-y degranulují a jejich vasoaktivní mediátory vyvolají otok v místě sání (obr. 9.5). Tato reakce brání sání klíšťat. Histamin a 5-hydroxytryptamin (serotonin) inhibují sání a produkci slin a histamin způsobuje úhyn klíšťat. Tyto efekty mohou být nepřímým důsledkem změn lokálního prostředí, ale je také možné, že tyto mediátory působí přímo na klíště. Odpověď na sání klíšťat na imunním hostiteli je charakterizována jako kožní basofilní hypersensitivní reakce, ve které hrají basofily centrální úlohu. Rezistence hostitele může být zablokována injekcí specifického antiséra proti basofilům nebo pomocí antihistaminik. Naproti tomu je zesílena injekcí histaminu do místa sání. Klíšťata obsahují ve svých slinách látky, které blokují účinky histaminu.

Význam buněk obsahujících aminy v rezistenci proti klíšťatům byl prokázán i na myším modelu, kde hrají významnější úlohu žírné buňky (obr. 9.6). W/W^V myši, kterým chybí žírné buňky, měly významně sníženou imunitu proti klíštěti *Haemaphysalis longicornis* a tato imunita mohla být restaurována rekonstitucí myší buňkami kostní dřeně, což vedlo k obnovení populace žírných buněk v kůži. Ochrany proti klíšťatům mohlo být u těchto deficientních myší dosaženo i přímou injekcí žírných buněk kultivovaných *in vitro* do místa sání klíštěte (obr. 9.7). Úloha žírných buněk v rezistenci byla primárně závislá na IgE protilátkách.

Kromě buněk obsahujících aminy jsou zřejmě v rezistenci proti klíšťatům významné i eosinofily, které se akumulují v místě sání. Podání antiséra proti eosinofilům morčatům snížilo rezistenci proti klíšťatům na polovinu. Eosinofily uvolňují mediátory schopné poškozovat tkáň parazita a jejich cytotoxická aktivita je zvýšena za přítomnosti faktorů (ECF-A tetrapeptidy) uvolňovaných z basofilů a žírných buněk.

Klíštěcí antigeny a imunita

V přirozených podmínkách je imunita hostitele proti klíštěti namířena proti antigenům slin. Experimentálně bylo prokázáno, že hovězí dobytek a morčata mohou být imunizováni hrubými homogenáty klíšťat. Podobné ochrany bylo dosaženo imunizací Ag-y pouze ze střeva klíštěte (obr. 9.8). Charakter imunity indukované těmito Ag je odlišný od přirozené imunity. Dospělá klíšťata, která sála na imunizovaných zvířatech měla těžce postižené střevní buňky a tohoto poškození mohlo být dosaženo i u klíšťat, která sála sérum nebo Ig z vakcinovaných zvířat. Komplement nebyl třeba. Tyto pokusy vedly k nové strategii vakcinace proti klíšťatům využívající místo antigenů slin tzv. *skryté* antigeny střeva.

Ikdyž klíšťata poškozují skot sama o sobě, jejich význam tkví v přenosu důležitých patogenů, např. *Babesii* a *Theilerií*. Existují velmi zajímavé vztahy mezi hostitelem, parazitem a vektorem. U jednotlivých plemen hovězího dobytka existují geneticky determinované odlišnosti v imunitní reaktivitě na sání klíšťat (např. *Bos indicus* - zebu je rezistentnější než *Bos taurus* - evropská plemena). Rezistence ke klíšťatům vede k rezistenci k přenosu patogenů. Na druhé straně *Babesie* mají silný imunosupresivní účinek na hostitele což zase vede k těžší infestaci klíšťaty. Tímto způsobem tento parazitický prvek optimalizuje své přežití a šíření.

Imunomodulační účinky klíštěcích slin

Podobně jako řada endoparazitů se i klíšťata snaží uniknout imunitním mechanismům hostitele. Sliny klíšťat obsahují kromě faktorů inhibujících hemostázu i faktory imunosupresivní. Sliny

klíštěte *Ixodes scapularis* inhibovaly aktivaci alternativní dráhy komplementu a bránily fagocytóze a dalším funkcím neutrofilů. Byla prokázána i suprese NO stimulovanými makrofágy. Lymfocyty z myší infestovaných klíšťaty měly sníženou odpovídavost na T mitogeny, odpovídavost na B mitogeny byla nezměněna. Extrakt ze slinných žlaz klíštěte *Dermacentor andersoni* výrazně inhiboval produkci IL-1 a TNF alfa makrofágy stimulovanými LPS a IL-2 a IFN gama lymfocyty stimulovanými ConA. Docházelo k supresi jak imunoregulačních, tak efektorových funkcí imunitního systému. Sání klíšťat poškozovalo schopnost vývoje primární imunitní odpovědi na thymus-dependentní antigeny.

Tato imunosuprese se nepochybně primárně vyvinula jako adaptace klíšťat usnadňující dlouhodobé sání na hostiteli. Ukazuje se však, že imunosuprese hostitele je zneužívána patogeny, přenášenými klíšťaty (viz obr. 9.1).

P.A. Nuttall popsala tzv. slinami aktivovaný přenos některých arbovirů mezi společně sajícími klíšťaty. Když injikovala virus do morčat společně s extraktem ze slinných žlaz (SGE) klíšťat, infikovalo se 10x více klíšťat sajících na těchto zvířatech než v případě, kdy byl virus inokulován bez SGE. Vyšetření kožních excisí u zvířat na kterých sála společně infikovaná a neinfikovaná klíšťata ukázalo, že virus se množil v místech, kde sála infikovaná, ale i neinfikovaná klíšťata, ale nemnožil se v místech, kde klíšťata nesála. To ukazuje, že místo sání klíštěte vytváří vhodnější podmínky pro replikaci viru než okolní kůže.

Vzhledem k tomu, že k slinami aktivovanému přenosu viru klíšťové encefalitidy (TBE) dochází v poměrně krátkém období společného sání klíšťat, musí případná imunosuprese ovlivnit nespecifické mechanismy protivirové imunity, které fungují v časných fázích infekce. Bylo prokázáno, že SGE z klíšťat *Ixodes ricinus* potlačuje indukci interferonu v lymfoidních i nelymfoidních buňkách hostitele, přičemž tento IFN může být indukován dvouvláknovou RNA, LPS nebo virovou infekcí. SGE též částečně potlačil aktivaci NK buněk *in vitro* pomocí LPS i jejich cytotoxickou aktivitu. Infekce myších buněk virem TBE za přítomnosti SGE výrazně urychlila replikaci viru v časných fázích infekce. To může souviset se supresí indukce IFN v těchto buňkách.

Podobná situace byla posána u přenosu borelií mezi společně sajícími klíšťaty (obr. 9.9). Opakovaná infestace jednoho místa kůže, na kterém sály infekční nymfy, neinfikovanými larvami vedla k postupnému zvyšování procenta infikovaných larev, což může souviset se stupňující se lokální imunosupresí.

10. Vakcíny proti parazitům

Ikdyž použití chemoterapie k léčbě parazitóz mělo velký efekt, vznik a vývoj rezistence k chemoterapii podpořil vývoj antiparazitárních vakcín. Po dlouhou dobu byla jediná komerčně dostupná vakcína proti *Dictyocaulus viviparus* (DICTOL) aplikovaná kravám.

Problémy bránící vývoji vakcíny proti dalším parazitům jsou:

- chybějící znalosti o mechanismu protektivní imunity u dané infekce
- neznalost protektivních Ag
- neschopnost produkovat tyto Ag v dostatečném množství
- nemožnost efektivně vakcinovat v polních podmínkách
- neschopnost uspokojit komerční požadavky.

Vakcína proti *Dictyocaulus viviparus*

Dictyocaulus viviparus je strongyloidní nematod, který vyvolává těžké a někdy fatální plicní onemocnění krav (obr. 10.1). Dobytek se infikuje larvami 3. stadia z kontaminované pastvy. Larvy migrují ze střeva, aby ukončily svůj vývoj v plicích. Patologii způsobují červi žijící v bronchiolech, v nichž indukují těžkou zánětlivou reakci, která blokuje průchod vzduchu do plic. Vývoj vakcíny umožnil vhodný laboratorní model. Na morčatech bylo prokázáno, že zatím co patologie byla způsobena dospělými červy v plicích, imunita mohla být indukována larvami během jejich vývoje do 4. stadia. Ozáření L3 larev dávkou 40 krad umožnilo vývoj imunogenních stadií, ale vedlo k uhynutí pozdějších stadií a tím zabránilo vývoji nemoci (obr. 10.2). Experimentálně bylo prokázáno, že ozářené larvy poskytly dobrou ochranu dobytka před přirozenou infekcí.

Komerční použití vakcíny bylo umožněno výskytem larev ve stolici infikovaných krav. Vakcína se podává dobytku orálně před vypuštěním na pastvu. Dávají se 2 dávky po 1.000 ozářených larev 3-4 týdny od sebe. Ochrana převyšuje 90%.

Atenuované vakcíny

DICTOL je příkladem empirické vakcíny. V době jeho vývoje se nic nevědělo o protektivních Ag. Od doby vývoje této vakcíny byla připravena řada podobných atenuovaných vakcín, ale žádná nebyla tak úspěšná jako DICTOL. Např. atenuovaná vakcína proti měchovci *Ancylostoma caninum* poskytla dobrou ochranu proti patologickým důsledkům infekce u psů, ale imunizace nevedla ke kompletní rezistenci. Přítomnost larev ve stolici vakcinovaných psů vedla ke stažení vakcíny, která byla nahrazena anthelmintiky.

Atenuované vakcíny používané k imunizaci domácích zvířat jsou na obr. 10.3. U lidí je tento přístup neakceptovatelný pro riziko vedlejších účinků, selhání vakcíny a možnost neúplné atenuace.

Moderní antiparazitární vakcíny

V poslední době byl dosažen pokrok v porozumění imunitním interakcím mezi parazitem a hostitelem. V případě leishmaniasy, malárie, schistosomiasy, filariasy byla identifikována stadia citlivá k imunitní odpovědi, byly definovány efektorové mechanismy a byly analyzovány regulace těchto mechanismů. Podobně bylo ukázáno, proč je imunita někdy neúčinná nebo proč má patologické důsledky. Tyto znalosti umožňují zamýšlet se nad selektivní stimulací

jednotlivých elementů imunitní odpovědi, spíše než užít celkovou stimulaci antiparazitární odpovědi. Správné použití definovaných Ag a jejich vhodná prezentace by měly umožnit vyhnout se takové odpovědi, která chrání parazita a minimalizovat patologické vedlejší účinky.

Antigeny, které vyvolávají protektivní imunitní odpověď

Přehled metod, které přispěly k jejich identifikaci:

- *separační techniky* (PAGE v kombinaci s imunoblotingem, izoelektrická fokusace, kapalinová chromatografie)
- *monoklonální protilátky* (izolace specifických Ag, screening rekombinantních expresních systémů)
- *techniky značení* (značení parazitárních Ag izotopy, značenými Ab nebo lektiny)
- *T proliferční techniky* (T buněčná odpověď k Ag je měřena proliferací nebo produkcí lymfokinů)
- *imunoepidemiologické techniky* (detailní přehledy populací umožňující korelovat charakter rozpoznávání Ag s určitým typem rezistence).

Tyto metody umožňují identifikovat Ag-y rozpoznávané hostitelem. Ale ty mají často malý význam pro protektivní imunitu. Proto je využívána alternativní strategie imunizace tzv. skrytými antigeny (často Ag střeva parazitů), se kterými hostitel nepřijde do styku, ale které mohou být cílem uměle indukované odpovědi.

Produkce antigenního materiálu

Z antigenů prezentovaných živými parazity hostitelům je jen málo těch, které stimulují protektivní odpověď. Proto musí být protektivní Ag izolovány z velkého množství materiálu. Např. 1,2 kg klíšťat *Boophilus microplus* je třeba k přípravě 100 mg protektivního Ag. To je jeden z důvodů, proč byla snaha používat živé atenuované parazity, kteří jsou i více imunogenní než z nich připravené antigeny. Avšak u některých parazitů jsou příslušná vývojová stadia nedostupná.

Alternativním přístupem je užití *in vitro* technik (úspěšné u *Plasmodium falciparum* nebo u krevních trypanosom).

Perspektivní cestou je získání protektivních Ag rekombinantní DNA technologií nebo chemickou syntézou.

Expresí eukaryotní DNA v kvasinkách nebo hmyzích buňkách umožňuje připravit příslušné proteiny v glykosylované podobě. Existují dva základní přístupy: cDNA knihovny nebo genomické knihovny. Selektce rekombinant se pak provádí pomocí prob s komplementární sekvencí nebo podle produktů pomocí MAb nebo polyklonálních sér z parazitovaných hostitelů. Nebo se připraví oligonukleotidy na bázi známé AK sekvence a příslušná DNA sekvence se zmnoží pomocí PCR.

Imunizace v polních podmínkách

Určitým omezením je potřeba ochránit geneticky heterogenní populaci hostitelů před heterogenní populací parazitů. Zkušenosti s definovanými peptidy z circumsporozoitového Ag plasmodií ukázaly, že u hostitelů byla genetická restrikce v rozpoznávání těchto peptidů (některým

jedincům chyběly MHC II Ag schopné prezentovat tyto peptidy). Tento problém může být překonán použitím koktailu peptidů nebo vazbou peptidů na imunogenní nosiče. Vakcína musí též být účinná proti všem členům heterogenní parazitární populace. Dalšími problémy v endemických oblastech je snížená účinnost vakcinace u již infikovaných osob a podvýživa.

Obecnými problémy je získávání peněz na vakcinační programy a zabezpečení vakcinace v tropických oblastech (uložení v chladu atd.). Výhodné jsou jednorázové (one-shot) vakcíny. Perspektivní je užití rekombinantních vektorů (virus vakcinie, *Salmonella*). Dalším problémem je užití adjuvancií u lidí, což může být v budoucnu obejito inkorporací genů pro cytokiny do rekombinantních vektorů.

Vývoj vakcín proti jednotlivým parazitům

Obecné schéma vývoje molekulární antiparazitární vakcíny je na obr. 10.4.

Malárie

Všechna stadia mohou být cílem vakcínou indukované imunity, ale největší pozornost byla věnována sporozoitům a merozoitům.

Vakcíny použité ve studiích na primátech a lidech byly založeny na CS antigenu. Tyto studie ukázaly problémy s vakcínou jejímž základem je poměrně malý peptid. Ukázalo se, že příslušná peptidická sekvence se liší u různých kmenů *P. falciparum*, ale rozpoznání epitopů tohoto peptidu bylo restringováno MHC a část jedinců na vakcinaci neodpověděla. Hlavním problémem užití této vakcíny je to, že sporozoity jsou imunitním mechanismům exponovány po krátkou dobu a uniknutí pouze malého počtu stačí k zahájení infekce. Jako perspektivní se jeví vakcíny proti exoerytrocytárním stadiím, např. stimulujících CTL odpověď proti parazitárním Ag na hepatocytech.

Vakcíny proti erytrocytárním stadiím zahrnují parazitární Ag na krvinkách, Ag uvolněné při prasknutí erytrocytů nebo Ag na merozoitech. Ab proti Ag na krvinkách působí aglutinaci a zesilují fagocytózu. Kromě toho tyto Ab brání adhezi infikovaných erytrocytů k endoteliím, čímž omezují patologii a zvyšují možnost záchytu ve slezině.

Největší pozornost byla věnována Ag na merozoitech. Dobré výsledky byly dosaženy s antigenem SPf66, chemicky syntetizovaným polypeptidem, nesoucím sekvence jak sporozoitů, tak merozoitů (obr. 10.5).

Dalšími přístupy je imunizace molekulami zodpovědnými za patologii, nebo získání imunity proti sexuálním stadiím, což brání úspěšnému vývoji parazita v komárech. Nezbytnost použití adjuvancií by měla být vyřešena integrací příslušného genu do salmonel, což zajišťuje kontinuální prezentaci Ag imunizovanému jedinci.

Schistosomiasa

U dobytka byla atenuovaná vakcína získaná ozářením larev úspěšně užita k imunizaci proti *Schistosoma bovis*. Avšak získaná imunita nebyla kompletní a ve vakcinovaných zvířatech se vyvíjeli dospělí červi schopní produkovat vajíčka.

Hlavním kandidátem vakcíny u lidí je glutathion S tranferáza (GST), enzym, který chrání parazita proti poškození kyslíkovými radikály. Existuje vysoká homologie mezi GST v rámci čeledi, což

umožňuje skříženou protekci. Klonované nebo syntetické GST byly úspěšně použity k imunizaci hlodavců a primátů proti *S. mansoni* (obr. 10.6). a dobytka proti *S. bovis*. Experimenty ukázaly, že vakcína indukuje IgE a IgA Ab, které jsou zahrnuté v ADCC mediované eosinofily, IgA přímo napadá dospělé červy a snižuje jejich plodnost.

Gastrointestinální nematodi

Existují dva přístupy při vývoji molekulárních vakcín.

1. parazitární Ag, se kterými hostitel normálně přichází do styku
2. skryté antigeny.

Nejlepších výsledků bylo dosaženo s 2. skupinou antigenů. Ovce byly úspěšně imunizovány proti infekci *Haemonchus contortus* contortinem, což je polymerní protein pokrývající mikrovili střeva parazita. Obr. 10.7 ukazuje výsledky imunizace ovcí příbuzným proteinem H 11.

Klíšťata

Dobytěk přirozeně exponovaný klíšťatům vyvíjí imunitu založenou na hypersenzitivní reakci na antigeny slin. Ale vakcinace těmito antigeny neposkytuje dobrou protekci. Alternativní přístup byl užít při vakcinaci proti *Boophilus microplus*. Šlo o vakcinaci tzv. skrytými antigeny z klíštěcího střeva. Protilátky proti těmto Ag nasáté s krví výrazně poškozují střevní buňky. Vakcinace krav těmito Ag celkově snížila reprodukci klíšťat přes jednu generaci o 90%. Protektivní Ag ve střevě klíštěte byl identifikován (označení Bm86) a připraven rekombinantní. Vakcína je nyní registrovaná pro rutinní užití. Obr. 10.8 ukazuje časové schéma vývoje této vakcíny.