Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra medicínské biologie

Vliv TNF-α na vývoj infekce *Encephalitozoon cuniculi* v peritoneálních makrofázích

Bakalářská práce

Zdeňka Jankovská

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

Školitel specialista: RNDr. Jiří Salát, PhD.

Jankovská Z., 2008: Vliv TNF-α na vývoj infekce *Encephalitozoon cuniculi* v peritoneálních makrofázích [Influence of TNF-α on the development of infection *Encephalitozoon cuniculi* in murine macrophages. Bc. Thesis, in Czech] – 38p., Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The influence of TNF-α on the infection of *Encephalitozoon cuniculi* in mouse peritoneal macrophages and PMJ2-R cell line has been studied. The number of *Encephalitozoon cuniculi* spores was counted in mouse peritoneal macrophages and PMJ2-R cell line after lysis. The activity of mouse peritoneal macrophages and PMJ2-R cell line was measured by nitric oxide production. The amount of TNF-α produced by mouse peritoneal macrophages and PMJ2-R cell line was determined by ELISA method (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

Tato práce byla financována grantem MSM 600 766 5801

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 16. 5. 2008

……

Zdeňka Jankovská

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala školitelům práce doc. RNDr. Janu Kopeckému, CSc.a RNDr. Jiřímu Salátovi, PhD. za odborné vedení, množství cenných rad a trpělivost, kterou mi po celou dobu vypracování této práce věnovali. Dále bych chtěla poděkovat kolektivu oddělení Imunologie parazitóz na Parazitologickém Ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za vytvoření příjemného pracovního prostředí, rodině za psychickou podporu a kamarádům za pomoc při finálních úpravách textu a jiných technických záležitostech.

Obsah

1 ÚVOD 6

1.1 Mikrosporidie 6

1.1.1 Taxonomie 6

1.1.2 Morfologie 7

1.2 Životní cyklus 8

1.2.1 Přenos na hostitele 9

1.2.2 Vystřelení pólového vlákna 9

1.2.3 Infekce hostitele 10

1.2.4 Vývoj infekce v hostitelské buňce 10

1.3 Šíření infekce 11

1.3.1 Mikrosporidióza 11

1.3.2 Mikrosporidióza u člověka 12

1.3.3 Léčba mikrosporidiózy 12

1.4 Tumor necrosis factor – alfa 12

1.4.1 *Toxoplasma gondii* – obecně 13

1.4.1.1 *Toxoplasma gondii* – působení TNF-α a IFN-γ 14

1.4.2 *Leishmania* -obecně 14

1.4.2.1 *Leishmania major* a TNF-α 14

1.4.3 *Trypanosoma cruzi* – obecně 15

1.4.3.1 *Trypanosoma cruzi* a TNF-α 15

1.4.4 Mikrosopridie a TNF-α 15

2 CÍLE PRÁCE 16

3 MATERIÁL A METODY 17

3.1 Spory *Encephalitozoon cuniculi* 17

3.1.1 Čištění spor *E. cuniculi* 17

3.2 Buněčná kultura PMJ2-R 18

3.3 Myší peritoneální makrofágy 18

3.4 Schéma vlastní studie 19
3.4.1 Vliv IFN-γ a TNF-α na buněčnou linii PMJ2-R 19
3.4.2 Vliv monoklonální protilátky anti-TNF- α na myší peritoneální makrofágy 19

3.5 Kvantifikace absolutního množství spor 19

3.6 Stanovení produkce oxidu dusnatého (NO) (Green a spol. 1982) 20

3.7 ELISA test – stanovení cytokinu TNF-α 20

3.8 TNF-α bioassay 21

3.9 Statistika 22

4 VÝSLEDKY 23

4.1 Vliv IFN-γ a TNF-α na růst populace *E. cuniculi* v buňkách PMJ2-R 23

4.2 Vliv infekce *E. cuniculi* a IFN-γ na produkci oxidu dusnatého (NO) v buňkách PMJ2-R 24

4.3 Vliv infekce *E. cuniculi,* TNF-α a IFN-*γ* na produkci TNF-α v buňkách PMJ2-R 26

4.4 Vliv infekce *E. cuniculi,* IFN-γ a anti-TNF-α protilátky na růst populace *E. cuniculi* v peritoneálních myších makrofázích 27

4.5 Vliv infekce *E. cuniculi,* IFN-γ a anti-TNF-α protilátky na produkci oxidu dusnatého (NO) v peritoneálních myších makrofázích 28

4.6 Vliv infekce *E. cuniculi,* anti-TNF-α protilátky a IFN-γ na produkci TNF-α v peritoneálních myších makrofázích 29

5 DISKUZE 30

6 SOUHRN 33

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 34

1 Úvod

1.1 Mikrosporidie

1.1.1 Taxonomie

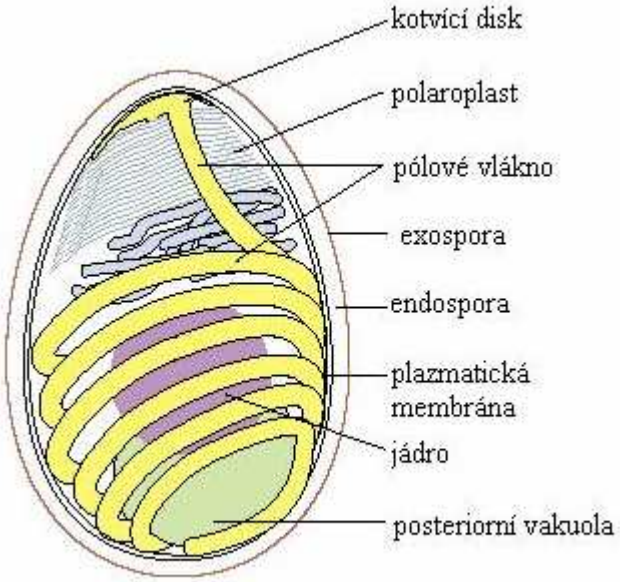
Mikrosporidie jsou malá, spory tvořící jednobuněčná eukaryota s obligátním intracelulárním parazitickým způsobem života a celosvětovým rozšířením (Vivarés a Méténier 2001). Řadí se do kmene Microspora v říši Fungi (Cavalier-Smith 1998). V roce 1857 byli tito parazité poprvé rozpoznáni jako patogeny housenky bource morušového (Nägeli 1857) a dlouho poté byli popsáni jako lidské patogeny a rozpoznáni i jako původci onemocnění v mnoha jiných hostitelích (Matsubayashi a spol. 1959). Tyto organismy infikují všechny hlavní skupiny zvířat a byly rozpoznány jako oportunní parazité člověka. Spory mikrosporidií jsou běžné ve vnějším prostředí a mikrosporidie choroboplodné pro člověka byly nalezeny ve vodních zdrojích (Weiss 2001). V současnosti známe více než 1200 druhů zařazených do 143 rodů, tato čísla porostou s objevy nových druhů (Wittner 1999), dělí se na dvě třídy *Haplophasea* a *Diplophasea* (Sprague a spol. 1992).

Tyto patogeny jsou pravými eukaryoty, mají typické eukaryotní jádro, endomembránový systém, cytoskelet, ale také vykazují molekulární a cytologické znaky připomínající prokaryota, zahrnující rysy přenosového aparátu, velikost a organizaci genomu, absenci mitochondrií, peroxisomů a typického Golgiho aparátu (Wittner 1999). Fylogenetické analýzy naznačují příbuznost kmene Mikrosporida s říší Fungi (Weiss 2001). Molekulárně fylogentické studie prokázaly přítomnost několika genů, zahrnujících mitochondriální Hsp 70 (heat-shock protein 70), α- a β-tubulin a elongační faktor genů mikrosporidií, které prokazují tuto příbuznost s říší Fungi (Wittner 1999).

1.1.2 Morfologie

Spora má silnou stěnu s exosporovou povrchovou vrstvou, endosporovou vrstvou uprostřed a pod ní umístěnou plazmatickou membránou. Unikátní infekční aparát se skládá ze tří částí: pólového vlákna, polaroplastu a posteriorní vakuoly (Vávra a Larsson 1999). Spory vytváří všechny známé druhy mikrosporidií (obr.1, Franzen 2004), spory mají vejčitý tvar a měří od 1μm do 40 μm (Canning a Lom 1986).

Pólové vlákno je u většiny mikrosporidií nitkovité a obvykle mnohem delší než spora. Běžně jsou viditelné tři oblasti: rovná přední část (někdy nazývaná manubrium) obvykle dlouhá jako jedna třetina délky spory, dále část, kde se vlákno ohýbá do strany a skoro se dotýká stěny spory a nakonec jeden nebo více závitů vlákna. Největší část vlákna je stočena v zadní polovině spory (Vávra a Larsson 1999),



obr.1: Schéma spory (Franzen 2004)

kde tvoří u rodu *Encephalitozoon* spp. po obvodu 5-7 závitů o průměru kolem 0,12 μm (Vivarés a Méténier 2001). Ve zralé spoře je pólové vlákno zakončeno do zvonovitého útvaru, v komplexu pólového vaku a kotvícího disku, který je umístěný blízko vrcholu spory. V tomto místě je stěna spory tenčí a při pučení se zde vytvoří trhlina, kterou je vystřeleno pólové vlákno (Vávra a Larsson 1999). Pólové vlákno je dlouhé 100 – 500 μm a spirálově stočené do 3 – 20 vrstev (Keohane a Weiss 1999).

Polaroplast je systém membrán ohraničený dutinami v přední části spory. U většiny mikrosporidií je to objemná struktura obklopující rovnou část pólového vlákna a končící na úrovni prvního závitu vlákna. Polovinu až třetinu spory zaujímá polaroplast, který ovšem nemusí být přítomen. V nezralé spoře má vznikající polaroplast nepravidelnou strukturu, zatímco polaroplast zralé spory je přísně organizovaná struktura, která má části tvarově různorodé a často vrstevnaté (Vávra a Larsson 1999).

Posteriorní vakuola je třetí částí vystřelovacího aparátu spory. Je to oblast v linii membrány s čirým nebo houbovitým obsahem, který je umístěn v zadní části spory. Ve světelném mikroskopu vypadá jako prázdná vakuola a je velmi různorodá ve tvaru a velikosti. U některých druhů mikrosporidií se tato vakuola nevyskytuje vůbec, naopak např. u mikrosporidií vyskytujících se u ryb může zabírat až polovinu objemu celé spory. Cytoplasma spory mikrosporidií obsahuje jedno nebo dvoujaderné jádro, přední kotvící disk, membránový lamelární polaroplast, který může obsahovat netradiční Golgiho aparát, polární vesikuly s mitochondriemi zvanými mitosomy. Dále obsahuje endoplazmatické retikulum, ribosomy a posteriorní vakuolu, která může fungovat jako peroxisom (Vávra a Larsson 1999).

Zralé spory mikrosporidií infikující savce jsou oválného až hruškovitého tvaru a jsou dlouhé 2,0 – 7,0 μm a široké 1,5 – 5,0 μm. Ve stádiu bujení mohou být kulatější a nepatrně větší. Pod světelným mikroskopem se zdají být opaleskující a zelené, podle histochemického barvení jsou Gram pozitivní a velmi kyselé (Didier, Snowden, Shadduck 1998). Jádro je pravé eukaryotní a vyskytuje se buď jako monokaryon (např. u rodu *Encephalitozoon*) nebo jako diplokaryon (např. u rodu *Nosema*) a to oválného nebo kruhovitého tvaru. Ve stádiích před vytvořením spory byla pozorována jadérka (Vávra a Larsson 1999). Velikost genomu mikrosporidií je 2,9 – 19,5 Mbp (Biderre a spol. 1995).

1.2 Životní cyklus

Životní cyklus mikrosporidií je vcelku rozdílný: jednoduché životní cykly jsou dokončeny v jediném hostiteli, zatímco složité cykly vyžadují několik hostitelů s účastí více než jedné generace parazitů, které produkují různé typy spor s rozdílnou morfologií (Cali a Takvorian 1999). U většiny druhů skupiny Mikrosporidia má proces rozmnožování dvě části, v počáteční fázi vegetativního rozmnožování (merogonie) vznikají dceřinné buňky meronti, tato fáze se může opakovat a nebo pokračuje druhou fází (sporogonie), jejímž výsledkem je produkce spor (Vávra a Larsson 1999). Životní cykly mikrosporidií zahrnují vertikální i horizontální přenos a parazitují na širokém poli obratlovců i bezobratlých hostitelů. Horizontální přenos je charakteristický vysokou parazitickou zátěží a spojený se schopností vyvolat onemocnění. Naproti tomu vertikální přenos je charakteristický nízkou virulencí, která vedla k potlačení této zajímavé přenosové cesty. Vertikální přenos mikrosporidií může také způsobit zabíjení samců nebo feminizaci jejich hostitele, s následky pro poměr a stabilitu hostitelů. Dunn a Smith (2001) objevili důkaz o vertikálním přenosu

u obou skupin hostitelů, obratlovců i bezobratlých a usoudili, že je to běžná nebo možná dokonce všudypřítomná přenosová cesta u těchto organismů (Dunn a Smith 2001).

1.2.1 Přenos na hostitele

Díky mateřskému vodnímu prostředí je přenos obvykle uskutečněn prostřednictvím fekálně-orální cesty. Proto jsou počátečním místem infekce střevní epiteliální buňky (Southern 2007). Spolknutí nebo vdechnutí infekčních spor hostitelem je přirozeným způsobem nákazy *E. cuniculi* (Cox a spol. 1979). Transplacentální přenos byl prokázán u králíků, myší, psů, koní a opic (Canning a Lom 1986). Mezi další možné způsoby nákazy patří přímá oční infekce, infekce ve svalech a infekce močových cest (Weber a Bryan 1994).

1.2.2 Vystřelení pólového vlákna

Spory mohou *in vitro* vystřelit v důsledku řady fyzikálních a chemických podnětů - zahrnujících změny pH, dehydrataci a následnou rehydrataci, zvýšení osmotického tlaku, přítomnost kationtů nebo aniontů nebo po vystavení ultrafialovému záření nebo peroxidu (Keohane a Weiss 1999). Prvním příznakem vystřelení spory je její zvětšení a specifické zvětšení posteriorní vakuoly a polaroplastu (Lom a Vávra 1963). Poté je obsah spory vytlačen vystřeleným pólovým vláknem (Keohane a Weiss 1999).

To vše je výsledkem zvýšení osmotického tlaku, jak tento proces probíhá není zatím známo (Undeen a Frixione 1990). Spory jsou obklopeny aquaporiny, které specificky transportují vodu přes plasmatickou membránu a díky transmembránovým sodnodraselným kanálům regulují průtok vody přes membránu (Frixione a spol. 1997). Během vystřelení pólového vlákna a vytlačení infekční sporoplasmy s polaroplastem ze spory zůstává kolem spory původní plasmatická membrána a z polaroplastu se kolem vyloučené sporoplasmy vytvoří nová plasmatická membrána (Weidner a spol. 1984). K vystřelení pólového vlákna je nutná změna pH v okolním prostředí mikrosporidie z kyselo-neutrálního na zásadité. Nutná je také přítomnost vápenatých iontů, ty se váží na buněčnou stěnu a plazmatickou membránu, a polyaniontů, to jsou např. polyglutamát a hlen (Pleshinger a Weidner 1985). Jiným možným podnětem pro celý proces aktivace spory je degradace trehalosy na glukosové monomery, to významně zvýší počet rozpustných molekul vně spory a vede k importování velkého množství vody a průvodnímu zvýšení osmotického tlaku (Undeen a Vander Meer 1994).

1.2.3 Infekce hostitele

Pólové vlákno slouží jako unikátní aparát pro přenos infekce probodnutím přilehlé hostitelské buňky, čímž naočkuje sporoplasmu přímo do buňky a v podstatě funguje jako injekce (Keohane a Weiss 1999). Infekce začíná vystřelením spory. Pólové vlákno je aktivováno příslušným podnětem, je vyvráceno ze spory a během tohoto procesu se otočí dovnitř, jako prst u rukavice a vytvoří trubici, kterou je vytlačován obsah spory (Vávra a Larsson 1999).

Infekce hostitelské buňky může být také způsobena fagocytózou vystřeleného pólového vlákna do invaginované rýhy membrány hostitelské buňky (Schottelius a spol. 2000). Jedná se o přímou fagocytózu celé neaktivované mikrosporidie nebo vstup vystřeleného pólového vlákna spolu s infekční sporoplasmou (Schottelius a spol. 2000, Bigliardi a Sacchi 2001, Couzinet a spol. 2000). Jakým způsobem je stále nejasné (Franzen 2005).

Spolu s unikátním způsobem, jakým spora infikuje buňku, jsou spory *E. cuniculi* schopny vstoupit do hostitelské buňky fagocytózou neprofesionálně fagocytující buňky (Couzinet a spol. 2000). Bylo prokázáno, že způsob infekce buňky aktinodependentní fagocytózou je u infekce *E. cuniculi* více než 10x častější než probodnutí buněčné membrány hostitelské buňky pólovým vláknem (Franzen a spol. 2005).

1.2.4 Vývoj infekce v hostitelské buňce

Hostitelská buňka je infikována poté, co je do ní vstříknuta sporoplasma ze spory. Ze sporoplasmy dozrávají v hostitelské buňce meronti. Meront se po období růstu a dělení rozdělí na dvě dceřinné buňky, merozoity. Meronti i merozoiti jsou morfologicky stejní: kulaté nebo mírně nepravidelné buňky, kryté jedinou cytoplazmatickou membránou, podle druhu obsahují jednu nebo více buněčných komponent a mají buď jediné veliké jádro nebo diplokaryon. Meronti mají několik volných ribosomů, atypický Golgiho aparát a endoplazmatické retikulum je málo vyvinuté nebo ještě není vytvořeno. Meronti procházejí několika typy buněčných dělení, které mohou probíhat buď binárním mitotickým dělením (rody *Nosema*, *Encephalitozoon*), nebo se jádro opakovaně mitoticky dělí bez cytokineze a dává tak vzniknout mnohojaderným merogoniálním plazmodiím, ta se následně rozdělí na jednotlivé meronty (rody *Enterocytozoon*, *Pleistophora*). Poté vzniknou z merontů sporonti, kteří mají na rozdíl od předchozího stádia vývoje elektrodenzní povrch a mají již vyvinuté endoplazmatické retikulum. Sporonti se dělí ve stejném počtu dělení jako meronti příslušného rodu, produktem konečného dělení je sporoblast. Sporoblast je konečné stadium, které

dozrává a vzniká z něho spora. Toto vývojové stádium mikrosporidií již obsahuje částečně vzniklý vystřelovací aparát (Vávra a Larsson 1999).

Pohlavní rozmnožování bylo pozorováno u mikrosporidií jen velmi zřídka. Procesy nejsou úplně známy, byly pouze popsány z pozorování ve světelném a elektronovém mikroskopu. Poprvé byl celý proces pozorován u parazitického moskyta rodu *Amblyospora* Hazardem a Brookbankem v roce 1984. Ve stádiu meronta probíhá místo mitózy meioza, vzniklé stádium splyne s jinou buňkou, která také vznikla meiozou. Tento vývoj může probíhat volně v cytoplasmě hostitelské buňky nebo jako např. u *Encephalitozoon* spp. odděleně od cytoplazmy hostitelské buňky v parazitoforní vakuole. Meronti přiléhají k cytoplazmatické membráně ohraničující parazitoforní vakuolu. Při přeměně na sporonty se oddělují od membrány, sporoblasty a zralé spory jsou umístěny volně v centru parazitoforní vakuoly (Vávra a Larsson 1999).

1.3 Šíření infekce

Mikrosporidií mohou být napadeny různé typy buněk: počáteční napadení peritoneálních makrofágů mikrosporidií *E. cuniculi* je často doprovázeno chronickou infekcí v mozku, ledvin a jiných orgánů (Vivarés a Méténier 2001). Běžným příznakem při nákaze mikrosporidiózou je zbytnění hostitelské buňky a zvýšení jejího metabolismu, který zahrnuje zvýšení počtu jader, zvětšení chromozomů a endoplazmatického retikula (Didier a Bessinger 1999). Hostitelská buňka nakonec praskne a zralé spory se uvolní do okolí. Zralé spory vytvářejí dvě generace, první generace spor má tenkou buněčnou stěnu a infikuje z ještě živé hostitelské buňky okolní buňky, mikrosporidiová infekce se tedy šíří po těle hostitele. Spory druhé generace mají silnou buněčnou stěnu a neaktivované se dostávají ze zničených hostitelských buněk do okolního prostředí prostřednictvím tělních exkretů hostitele nebo jsou po jeho smrti uvolněny do okolí (Vávra a Larrson 1999).

1.3.1 Mikrosporidióza

Mikrosporidióza je obzvláště rozšířená mezi rybami a hmyzem (Didier a Weiss 2006). První případ mikrosporidiové infekce u člověka byl popsán v roce 1959 (Matsubayashi a spol. 1959). Střevní mikrosporidióza je rozpoznávána jako významná příčina oportunních infekcí u pacientů s oslabenou imunitou, obzvláště u nemocných AIDS (Ferreira a spol. 2001).

1.3.2 Mikrosporidióza u člověka

Mikrosporidie, které jsou schopny infikovat člověka musí být schopné množení při teplotě napadeného orgánu nebo tkáně. Mezi rody, které to dokáží, patří *Enterocytozoon, Encephalitozoon, Nosema, Vitaforma, Pleistophora, Trachypleistophora a Brachiola*. Tyto mikrosporidie představují vážná až život ohrožující nebezpečí pro imunodeficientní pacienty (Didier a Bessinger 1999). Střevní mikrosporidióza je pravděpodobně častou příčinou nevysvětlitelných chronických průjmů u pacientů nemocných AIDS a je spojena se sníženou absorpcí D-xylozy (Molina a spol. 1993). U pacientů s AIDS se dále objevují po infekci *E. cuniculi* nefritidy, pneumonitidy, sinusitidy, peritonitidy a hepatitidy s granulomatózní jaterní nekrózou (Didier a spol. 2000).

1.3.3 Léčba mikrosporidiózy

Infekce mikrosporidiemi rodu *Encephalitozoon* je možné terapeuticky léčit albendazolem. Oční infekce lze léčit propamidin isothionátem (Nohýnková a Vávra 1996). Molina a spol. (2000) pozorovali terapeutické účinky fumagilinu podávaného perorální cestou HIV pozitivním pacientům, kteří byli nakaženi *Enterocytozoon bieneusi* (Molina a spol. 2000).

1.4 Tumor necrosis factor – alfa

Tumor necrosis factor alfa (TNF-α) je zánětlivý cytokin s mnoha účinky. Hraje důležitou roli v patofyziologii mnoha nemocí. Je rozpoznáván ve dvou různých formách, tyto dvě formy TNF vykazují různou stabilitu. (Bemelmans, van Tits, Buurman 1996).

TNF-α je cytokin z nadčeledi TNF, který působí jako hlavní prostředník při zánětu a obranné regulaci. Tento cytokin je produkován několika typy buněk, především však makrofágy (Tracey and Cerami 1990) a to jako odpověď na prozánětlivý stimul v podobě bakteriálního lipopolysacharidu. Je produkován jako transmembránový protein, který funguje na povrchu buňky nebo pokud je rozštěpen specifickou metaloproteinasou, tak je uvolněn z povrchu buňky jako rozpustný homotrimer. TNF-α je vázán na povrchu buňky receptory - TNF receptor I (TNFRI) a TNFRII (Zhang, Tracey 1998). TNF-α zprostředkovává signály cílovým buňkám prostřednictvím dvou homodimerických receptorů: TNF receptor I (známým také jako TNFRI, CD120a, p55 nebo p60) a TNF receptoru II (známého také jako TNFRII, p75, p80 nebo CD120b). Oba TNF receptory jsou prvním typem transmembránových glykoproteinů a členy TNFR super rodiny stejně jako receptory nervových růstových faktorů (Schall a spol. 1990). TNF-α byl poprvé izolován Carswellem a spol. v roce 1975 při studiu

hemoragických nekróz nádorů vyvolaných endotoxinem. Sérum z myší léčených endotoxinem obsahovalo substanci (tumor necrosis faktor), která napodobovala tumor nekrotizující působení samotného endotoxinu. Sérum pozitivní na TNF je stejně účinné jako endotoxin samotný způsobující nekrózu sarkomu Meth A a jiných transplantovaných tumorů. Bylo prokázáno, že TNF není zbytkový endotoxin, ale je to faktor uvolněný z hostitelské buňky. Objev TNF poskytl více zřetelný a odůvodněný význam pro nepřímé působení endotoxinu, jmenovitě, že endotoxin zapříčiňuje příjem faktoru hostitelem, který je toxický pro tumor. TNF i endotoxin působí proti stejným typům tumorů a ve stejné fázi jejich růstu (Carswell a spol. 1975).

Podskupina cytokinových mediátorů patřící do rodiny tumor necrosis faktorů způsobuje apoptózu, probíhající přes receptory a signální dráhy. Je možné, že většina autoimmuních nemocí je výsledkem prvotního defektu apoptózy. Takovéto defekty mohou způsobovat nadprodukci TNF a dalších pro-apoptotických cytokinů (Beutler a Bazzoni 1998).

Receptory typu 1 a 2 pro tumor necrosis factor (TNF) jsou exprimovány na většině typů buněk a jsou aktivovány vazbou TNF nebo lymphotoxinu-β. TNF receptor zprostředkující imunitní reakci je zásadně důležitý v patogenezi a kontrole různých infekcích způsobených bakteriemi, viry, prvoky a houbami (Schlüter a Deckert 2000).

Ukázalo se, že většina orgánů v těle může být ovlivněna TNF-α a že tento cytokin slouží mnoha funkcím, mnohým z nich dosud plně nerozumíme. Cytokin má obojí, růst povzbuzující i zastavující funkci a zdá se, že má také samoregulující vlastnosti. TNF-α například navozuje proliferaci neutrofilů během zánětu, ale také ovlivňuje apoptózu neutrofilů při navázání na TNF-R55 receptor (Murray a spol. 1997). TNF-α je odpovědný za spuštění imunitního procesu při rozvoji protozoálních infekcích medicínského významu (*Toxoplasma gondii, Leishmania major, Trypanosoma cruzi, Plasmodium spp.*). Při pokusech na experimentálních myších s vypnutými geny, byl prokázán možný příznivý účinek TNF-α při ochraně hostitele proti těmto infekcím (Derouich-Guergour a spol. 2001).

1.4.1 *Toxoplasma gondii* – obecně

T. gondii je protozoální parazit obvykle kontrolovaný imunitním systémem hostitele, výsledkem je chronická infekce bez symptomů, která je zachována ve skrytých cystách. Ve stádiích se sníženou imunitou jako je např. AIDS způsobuje vážná onemocnění, o kterých se předpokládá, že jsou prvotně způsobeny obnovenou aktivací dříve prokázané chronické infekce, ve výsledku diferenciací bradyzoitů, uvolněním tachyzoitů z cyst a pomnožením parazita (Frenkel 1988).

1.4.1.1 *Toxoplasma gondii* – působení TNF-α a IFN-γ

TNF je produkován jako odpověď na *i.p*. infekci málo virulentním druhem *T. gondii* ME49 (Johnson 1992). TNF-α v kombinaci s IFN-γ zprostředkovává imunitní odpověď hrající významnou roli v rezistenci hostitele proti toxoplazmóze (Sibley a spol. 1991, Johnson 1992). Endogenní TNF-α je zapotřebí pro projev aktivovaných makrofágů *in vivo* s anti-toxoplazmózovou aktivitou, která je zprostředkována oxidem dusnatým. IFN-γ poskytuje spolu s TNF-α ochranu proti toxoplazmóze (anti-toxoplazmatický efekt), tato aktivita je blokována protilátkami proti TNF-α (Langermans a spol. 1992).

Zánětlivý proces je charakterizován infiltrací $CD4^+$, $CD8^+$ lymfocytů a makrofágů a je spojený se zvýšenou produkcí mRNA kódujících TNF-α a IFN-γ. Ukázalo se, že stejně jako T-buňky jsou i TNF-α a IFN-γ rozhodující látky, které kontrolují parazitární infekci. Infekce *T. gondii* snižuje hladinu TNF membránových receptorů a má vliv i na hladinu TNFR1 a TNFR2 mRNA. Pokusy *in vitro* prokázaly, že změna TNFR při infekci *T. gondii* závisí na typu buňky. Žijící parazité kontrolují produkci rozpustné formy TNFR1 – tento mechanismus může mít vliv na roli TNF-α při toxoplazmóze. Přežití parazita v lidských buňkách *in vitro* vyžaduje nevyváženost mezi TNF-α a jeho receptorem (Derouich-Guergour a spol 2002).

1.4.2 *Leishmania* -obecně

Druhy *Leishmania* jsou obligátní intracellulární parazité makrofágové-dendritické buněčné linie. K zahájení úspěšné parazitární infekce si musí zajistit vstup do makrofága a také vydržet nebo přelstít jeho „smrtící“ nebo degradační funkce. Na přežití chronické infekce musí parazit také rozvrátit doplňkové-makrofágové-buněčné aktivity a narušit vývoj protektivní imunity (Alexander a spol. 1999).

1.4.2.1 *Leishmania major* a TNF-α

Injekce TNF-α do léze s infekcí *Leishmania major* u myší značně snížila růst léze. TNF-α aktivuje makrofágy k zabíjení leishmanií *in vitro*, z toho vyplývá, že TNF-α hraje významnou roli při zprostředkování ochrany hostitele proti kožní leishmaniose. Ochranná role TNF-α pozorovaná Liewem a spol. (1990) byla prokázána schopností aktivovat makrofágy k ničení leishmanií. Přesný mechanismus aktivace není znám. TNF-α není detekovatelný ve znatelném množství v séru nebo supernatantu ze slezinné kultury myší s leishmaniózou (Liew a spol. 1990). Imunologická schopnost hostitele kontrolovat infekci *L. major* je zprostředkována buňkami. Buňky produkují velké množství IFN-γ, který aktivuje makrofágy k produkci oxidu dusnatého a díky tomu kontroluje replikaci *L. major* (Green a spol. 1990).

TNF-α má ochrannou funkci spolu s působením IFN-γ při zprostředkování zabíjení parazita (Liew a spol. 1990).

1.4.3 *Trypanosoma cruzi* – obecně

T. cruzi je protozoální bičíkovec parazitující v krvi, který způsobuje Chagasovu chorobu. Tato choroba je velkým problémem veřejného zdraví v latinské Americe. *In vitro* i *in vivo* infikuje parazit celou řadu buněk, které mají jádro, patří mezi ně i makrofágy (Silva a spol. 1991). Kontrola lidské i experimentální infekce je závislá na specifické odpovědi imunitního systému, kterého se účastní T-buňky, aktivita NK buněk a produkce protilátek (Rottenberg a spol. 1988).

1.4.3.1 *Trypanosoma cruzi* a TNF-α

TNF-α spolu s IFN-γ mohou pomáhat při mechanismu, který vede k odstranění parazita a chrání před úmrtím v akutní fázi onemocnění (Lima a spol. 1997). Makrofágy aktivované IFN-γ produkují po infekci *T. cruzi* TNF-α, tento cytokin zřejmě hraje roli ve zvýšené produkci oxidu dusnatého (NO). Mechanismus zabití parazita je závislý na biosyntéze NO.

1.4.4 Mikrosopridie a TNF-α

Po infekci makrofágů sporami mikrosporidií se zvýšilo množství TNF-α, IFN-γ a IL-10, ale nebyla pozorována přímá úměra mezi hladinou TNF-α a IFN-γ a počtem pozorovaných intracelulárních spor mikrosporidií (Franzen a spol. 2004).

2 Cíle práce

- zhodnotit vliv TNF-α na replikaci *Encephalitozoon cuniculi* v peritoneálních makrofázích myší C57BL/6 *in vitro*

- zhodnotit vliv TNF-α na replikaci *Encephalitozoon cuniculi* v buňkách PMJ2-R *in vitro*

3 Materiál a metody

3.1 Spory *Encephalitozoon cuniculi*

Pro pokusy byly použity spory *E. cuniculi* kmene EC2, které byly získány izolací z jater myší SCID.

3.1.1 Čištění spor *E. cuniculi*

Spory *E. cuniculi* byli získány izolací z jater infikovaných SCID myší (AnLab s.r.o. Praha), které byly chovány za standardních podmínek ve zvěřinci PaÚ AV ČR v Českých Budějovicích. Myši byly krmeny komerční směsí (TOP-VELAZ Praha) a napájeny vodou *ad libitum*. Každá z myší byla infikována intraperitoneálně (*i.p.*) dávkou ($1x10^7$ spor *E.cuniculi* ve 100 μl sterilního PBS). K úhynu SCID myší v důsledku infekce *E. cuniculi* docházelo 13.-21. den po *i.p.*infekci.

Po úhynu nebo usmrcení myši byla vyjmuta játra, která byla umístěna do sterilní deionizované vody se 4% antibiotik (SIGMA Cell Culture Antibiotic Antimycotic). Pro kontrolu příčiny úhynu myši byl proveden nátěr z peritonea. Vzorek byl fixován roztokem metanolu a acetonu v poměru 1:1, nabarven Uvexem po dobu 10 minut a dobarven pomocí Evansovy modře po dobu 20 - 30 sekund. Pod fluorescenčním mikroskopem byl u všech infikovaných SCID myší prokázán úhyn v důsledku infekce *E. cuniculi*.

Játra byla v původním roztoku s antibiotiky rozetřena přes sítko pomocí pístu vyjmutého z injekční stříkačky v Petriho misce. Získaný materiál byl pomocí Pasteurovy pipety přenesen do centrifugační zkumavky a stočen při 980 g po dobu 25 minut. Po odstranění supernatantu bylo k peletu přidáno 5 ml sterilního PBS se 4% antibiotik (200 μl). Zbytky jaterních buněk byly rozbity pomocí inzulinové injekční stříkačky (Braun Německo), nasátím a rychlým opětovným vystříknutím. Do směsi bylo přidáno dalších 10 ml sterilního PBS spolu s 15 ml percolu (Sigma), percol byl vysterilizován protlačením přes antibakteriální filtr (0,22μm Milex GP). Purifikované spory byly následně čištěny na percolovém gradientu. Získaná směs spor a zbytků jaterních buněk byla zcentrifugována při 980 g po dobu 45 minut. Po odstranění supernatantu byl sediment promyt deionizovanou vodou pomocí centrifugace při 1280 g po dobu 20 min. Spory byly přeneseny do 15 ml deionizované vody se 4% antibiotiky (SIGMA Cell Culture Antibiotic Antimycotic), uchovávány při 4°C.

3.2 Buněčná kultura PMJ2-R

PMJ2-R je buněčná makrofágová linie získaná transformací makrofágů myší C57BL virem J2. Buňky částečně adherují.

Buněčná linie PMJ2-R byla kultivována v mediu RPMI (PAA Laboratories) s 5% bovinního fetálního séra (BOFES), 1% antibiotik (SIGMA Cell Culture Antibiotic Antimycotic) a 1% glutaminu.

Pro pokusy byly použity buňky v množství 40 tis. na jamku 96 jamkového mikrotitračního panelu (TPP, Switzerland) v 0,2 ml media. Stejné množství buněk bylo použito jak pro pokusy na měření produkce oxidu dusnatého, tak při pokusech s počítáním spor. Při obou pokusech bylo použito medium RPMI s 5% BOFES, 1% antibiotik (SIGMA Cell Culture Antibiotic Antimycotic) a 1% glutaminu. Mikrotitrační panel s PMJ2-R byl uchováván při 37°C s 3,5% CO_2.

3.3 Myší peritoneální makrofágy

Makrofágy byly získány z inbredního myšího kmene BALB/c (AnLab s.r.o., Česká republika), myši byly chovány ve zvěřinci PaÚ AV ČR v Českých Budějovicích za standardních podmínek. Myši byly napájeny vodou *ad libitum* a krmeny komerční směsí (TOP-VELAZ Praha, Česká republika). Výplach peritonea byl proveden po humánním usmrcení myši pomocí 5 ml chlazeného RPMI-1640. Pomocí Bürkerovy komůrky byl spočítán počet leukocytů a následně určen počet makrofágů. Objem makrofágů ve výplachu byl spočítán jako 25% z celkového počtu leukocytů, jedná se o standardní procentuální zastoupení makrofágů v myším peritoneu (údaj byl získán předchozím měřením na průtokovém cytometru). Do pokusů bylo nasazováno 40 tis. makrofágů na jamku, tj. při počítání spor i při měření produkce oxidu dusnatého, na 96 jamkovém mikrotitračním panelu (TPP, Switzerland). Po kultivaci 24 hodin při 37°C s 3,5% CO_2 byly neadherované buňky odstraněny promytím kromě adherovaných makrofágů, které zůstaly přisednuté na panelu. Promytí bylo dvakrát opakováno.

Myší peritoneální makrofágy byly kultivovány v mediu RPMI s 5% BOFES, 1% antibiotik (SIGMA Cell Culture Antibiotic Antimycotic), 1% gentamicinu a 1% glutaminu v termostatu s 3,5% CO_2.

3.4 Schéma vlastní studie

3.4.1 Vliv IFN-γ a TNF-α na buněčnou linii PMJ2-R

Buňky PMJ2-R byly na začátku pokusu infikovány sporami *E. cuniculi* v poměru 1:3. Při kvantifikaci spor i při měření produkce oxidu dusnatého, byla použita infekční dávka 120 tis. spor *E. cuniculi* na 40 tis. buněk. Spolu s infekcí bylo do jamek skupin, ve kterých byl sledován vliv interferonu gama (IFN-γ), přidáno 100 U IFN-γ (R&D-systems)/ml media. K další skupině jamek s infekcí bylo přidáno 100 U TNF-α (Prospec-Tany TechnoGene LTD.)/ml media. Do poslední skupiny testovaných jamek byla přidána kombinace 100 U IFN-γ/ml media spolu se 100 U TNF-α/ml media. Kvantifikace spor *E. cuniculi* a produkce oxidu dusnatého byla zjišťována v časových intervalech 24, 48 a 72 hodin po infekci.

3.4.2 Vliv monoklonální protilátky anti-TNF- α na myší peritoneální makrofágy

Myší makrofágy získané výplachem peritonea byly infikovány sporami *E. cuniculi* v poměru 1:3. Při kvantifikaci spor i při měření produkce oxidu dusnatého, byla použita infekční dávka 120 tis. spor *E. cuniculi* na 40 tis. makrofágů. Spolu s infekcí bylo do jamek skupin, ve kterých byl sledován vliv interferonu gama (IFN-γ), přidáno 100 U IFN-γ (R&D-systems)/ml media. K další skupině jamek s infekcí bylo přidáno 0,6 µg/ml protilátky proti tumor necrosis faktoru alfa (anti-TNF-α) na jamku. Do poslední skupiny testovaných jamek byla přidána kombinace 100 U IFN-γ (R&D-systems)/ml media spolu s anti-TNF-alfa protilátkou 0,6 µg/ml (BD Biosciences Pharmingen). Kvantifikace spor *E. cuniculi* a produkce oxidu dusnatého byla zjišťována v časových intervalech 24, 48 a 72 hodin po infekci.

3.5 Kvantifikace absolutního množství spor

Z jednotlivých jamek mikrotitračního panelu byl odsát celý objem media v jamce do mikrozkumavky. Zbylé buňky na dně panelu byly lyzovány roztokem 50 µl 2M NaOH v deionizované vodě a 50 µl 0,1% SDS (Osserman a Lawlor 1966). Jamka s lyzovacím roztokem byla důkladně promíchána a poté byl lyzovací roztok odsát a přidán do mikrozkumavky s mediem. Do jamky bylo přidáno 100 µl deionizované vody na vypláchnutí, voda byla také přidána do mikrozkumavky. Po důkladném promíchání obsahu mikrozkumavky bylo spočítáno absolutní množství spor *E. cuniculi* pomocí Bürkerovy komůrky.

3.6 Stanovení produkce oxidu dusnatého (NO) (Green a spol. 1982)

Při stanovení produkce NO je měřena koncentrace NO^{2-} a NO^{3-} v mediu. Jedná se o nepřímou metodu stanovení (Iwamoto a spol. 1999).

Z každé měřené jamky bylo odebráno 50 μl media, celý objem byl přenesen do nového panelu. V prázdné řadě panelu byla provedena titrace s koncentrací v první jamce 0,1mM $NaNO_2$. Ředěním dvojkovou řadou v příslušném kultivačním mediu byly získány následující koncentrace, které byly použity pro vytvoření kalibrační křivky. Do každé z jamek se vzorky i do kalibrační řady bylo přidáno 50 μl Griessova činidla. Griessovo činidlo se skládá z 1% roztoku sulfonylamidu v 30% kyselině octové a z 0,1% roztoku N-(naphthyl)-ethylendiaminedihydrochloridu v 60% kyselině octové, oba roztoky byly smíchány v poměru 1:1. Po přidání Griessova činidla byla deska inkubována 15 minut při laboratorní teplotě. Absorbance byla měřena na spektrofotometru (Labsystems Multiskan MCC/340) při vlnové délce 540 nm. Ze získané kalibrační křivky byly odvozeny hodnoty produkce oxidu dusnatého v jednotlivých vzorcích.

3.7 ELISA test – stanovení cytokinu TNF-α

K určení množství cytokinu TNF-α byla použita 96-jamková mikrotitrační destička (Nunc F Maxisorp).

Na dno každé jamky v mikrotitračním panelu byla navázána záchytná protilátka o koncentraci 5 μg/ml fosfáto-sodného pufru (3,6g 0,1M Na_2HPO_4 x 12 H_2O + 1,6g 0,1M NaH_2PO_4) v objemu 50 μl na jamku a destička byla inkubována přes noc při 4°C ve vlhké komůrce. Druhý den byly jamky 2x promyty promývacím roztokem PBS + 0,5% Tween 20 a do jamek bylo vneseno 200 μl blokovacího roztoku (10% PTS v PBS), panel byl inkubován 2 hodiny při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce. Po uplynutí inkubační doby byl z jamek odstraněn blokovací roztok a jamky byly opět 2x promyty promývacím roztokem. Do určených jamek bylo přidáno 50 μl testovaných vzorků a jako standard bylo použit rekombinantní TNF-α v celkovém objemu 50 μl v 10% PTS v PBS. Standard byl ředěn dvojkovou řadou z 10ng/ml až na koncentraci téměř shodnou s koncentrací v čistém mediu, které bylo použito v poslední jamce kalibrační řady jako negativní kontrola. Výsledky z titrace standardu byly použity pro sestavení kalibrační křivky na určení koncentrace TNF-α ve vzorcích. Panel byl umístěn do vlhké komůrky a uložen k inkubaci přes noc při 4°C. Třetí den byly jamky 4x promyty promývacím roztokem a poté byla do jamek vnesena biotynylovaná protilátka o koncentraci 2 μg/ml 10% PTS v PBS v objemu 50 μl na jamku.

Panel byl inkubován 45 minut při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce. Poté byl 6x promyt promývacím roztokem. Dále byl do jamek vnesen streptavidin v poměru 1:1000 v 10% PTS v PBS v celkovém objemu 100 µl na jamku, panel byl inkubován 30 minut při laboratorní teplotě ve vlhké komůrce. Následně byl 8x promyt PBS + 0,5% Tween 20 a do jamek bylo přidáno 100 µl substrátového roztoku (10 ml fosfocitrátového pufru pH 5 (1,84 g Na_2HPO_3 x 12 H_2O + 0,51 g $C_6H_8O_7$ x H_2O ve 100 ml deionizované vody) + 4 mg OPD (Sigma) + 4 µl H_2O_2). Panel byl uložen do tmy při laboratorní teplotě, po vyvinutí barevné reakce po přibližně 20 – 30 minutách byla barevná reakce zastavena 2M H_2SO_4, 100 µl na jamku. Absorbance byla měřena na spektrofotometru (Labsystems Multiskan MCC/340) při vlnové délce 490 nm.

3.8 TNF-α bioassay

Metoda slouží ke kvantifikaci TNF-α. Buňky L929, patřící do buněčné linie myších fibroblastů, v přítomnosti aktinomycinu D senzitivně reagují na TNF-α a díky jeho působení hynou apoptózou. Touto metodou byla ověřena účinnost testovaného TNF-α.

Buňky L929 byly pěstovány v mediu MEM (PAA Laboratories) + 5% Bofes (Sigma) + 1% ATB (SIGMA Cell Culture Antibiotic Antimycotic) + 1% glutaminu (Sigma). Buněčná suspenze byla získána uvolněním adherovaných buněk po odmytí zbytkového média pomocí sterilního PBS přidáním verzen-trypsinu (Sigma). Poté bylo do kultivační lahvičky přidáno 5 ml media, buňky byly spočítány v Burkerově komůrce. Nasazeno bylo 40 000 buněk L929 ve 200 µl na jamku do 96 jamkového mikrotitračního panelu (TPP, Switzerland) a buňky byly inkubovány přes noc při 37°C a 1,5% CO_2.

Druhý den bylo odsáto všechno medium a přidáno 50 µl nového media. Do jedné skupiny jamek byl přidán testovaný TNF-α (Prospec-Tany TechnoGene LTD.) v koncentraci 8ng/ml v 50 µl na jamku. Do další skupiny jamek byl přidán standardní myší TNF-α (BD Biosciences) v koncentraci 8ng/ml v 50 µl na jamku. Obsah těchto jamek byl naředěn dvojkovým ředěním, v poslední sledované jamce byla koncentrace testovaného i standardního myšího TNF-α 0,03125 ng/ml. Do všech jamek s vyředěným TNF-α bylo přidáno 50 µl aktinomycinu D o koncentraci 8 µg/ml. Do kontrolních jamek byl přidán čistý TNF-α, testovaný i standardní. Další kontrolní skupina jamek obsahovala čisté medium s buňkami L929 a poslední kontrolní skupina jamek obsahovala buňky L929 ovlivněné aktinomycinem D. V posledním kroku byly jamky, které obsahovaly čisté medium s buňkami a jamky s testovaným a standardím TNF-α doplněny 50 µl čistého media, ve výsledku

obsahovaly všechny jamky 100 µl na jamku. Mikrotitrační panel byl inkubován přes noc při 37°C a 1,5% CO_2.

Třetí den byl odsát supernatant a všechny jamky byly promyty 200 µl 0,9% NaCl. Po odsátí bylo do všech jamek přidáno 50 µl krystalové violeti a mikrotitrační panel byl inkubován 10 minut při laboratorní teplotě. Violeť byla poté vymyta pod proudem tekoucí vody, voda z jamek byla vyklepnuta a jamky se nechaly vyschnout na vzduchu. Po zaschnutí jamek bylo do každé z nich přidáno 100 µl metanolu a byla změřena absorbance na spektrofotometru (Labsystems Multiskan MCC/340) při vlnové délce 595 nm.

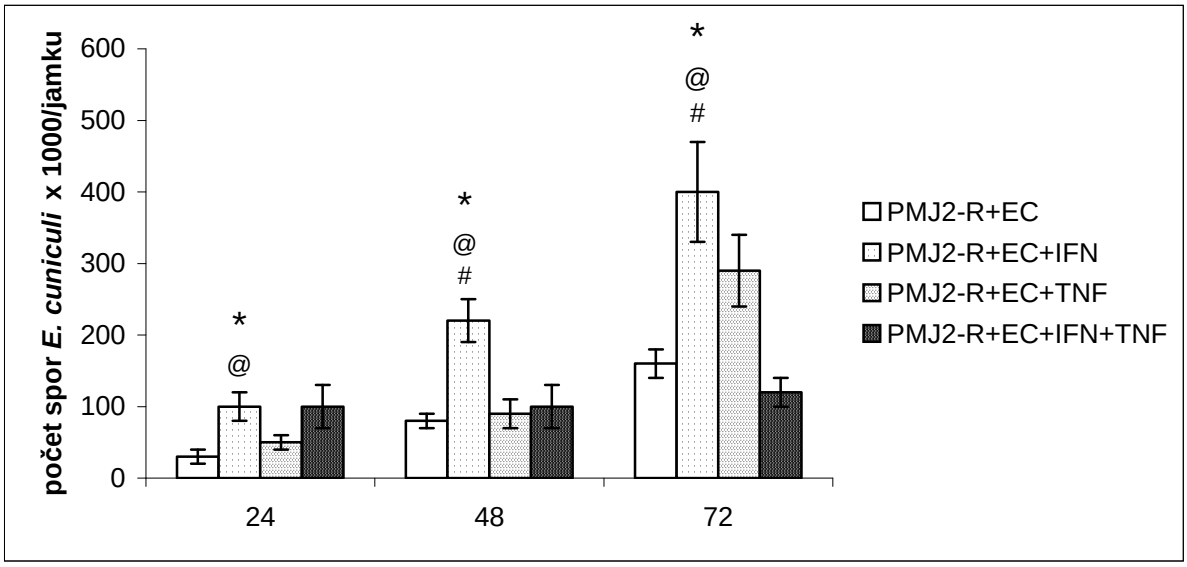
3.9 Statistika

Rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly porovnávány analýzou variance (jednocestná ANOVA) v programu STATISTIKA 7.0.

4 Výsledky

4.1 Vliv IFN-γ a TNF-α na růst populace *E. cuniculi* v buňkách PMJ2-R

Nejrychlejší růst populace *E. cuniculi* byl pozorován ve skupině, kde byl přidán IFN- γ. 24 hodin po infekci nedosáhl počet spor infekční dávky, byl o 20 tis. spor/jamku nižší, tj. 100 tis. spor/jamku. 48 hodin po infekci se počet spor zvýšil na 220 tis./jamku, nárůst pokračoval i 72 hodin po infekci a počet spor na jamku dosáhl 400 tis./jamku. Ve skupině ovlivněné TNF-α byl počet spor 24 i 48 hodin po infekci nižší než infekční dávka a to 50 tis. spor/jamku a 90 tis. spor/jamku a 72 hodin po infekci došlo k významnému zvýšení počtu spor na 290 tis. spor/jamku. Oproti tomu ve skupině ovlivněné jak IFN-γ, tak TNF-α byl počet spor 24 i 48 hodin po infekci 100 tis. spor/jamku a 72 hodin po infekci dosáhl počet spor infekční dávky 120 tis. spor/jamku. V kontrolní skupině, která obsahovala pouze buňky PMJ2-R infikované *E. cuniculi* docházelo k mírnému nárůstu populace *E. cuniculi*. 24 hodin po infekci bylo napočítáno 30 tis. spor/jamku, po 48 hodinách byl počet spor 80 tis. spor/jamku a 72 hodin po infekci přesáhl počet spor infekční dávku, napočítáno bylo 160 tis. spor/jamku.



obr. 2: Vliv IFN-γ a TNF-α na růst populace *E. cuniculi* v buňkách PMJ2-R

Každý časový interval byly vyhodnoceny tři vzorky pro danou skupinu. V grafu jsou vyneseny průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou. PMJ2-R = buněčná linie PMJ2-R (40 tis. buněk/jamku), EC = infekce *E. cuniculi* (120 tis. buněk/jamku), IFN = 100 U IFN-γ/ml media, TNF-α = 100 U TNF-α/ml media

* statisticky významný rozdíl oproti skupině PMJ2-R + EC, @ statisticky významný rozdíl oproti skupině PMJ2-R + EC + TNF-α, # statisticky významný rozdíl oproti skupině PMJ2-R + EC + TNF-α + IFN-γ ($P<0,05$).

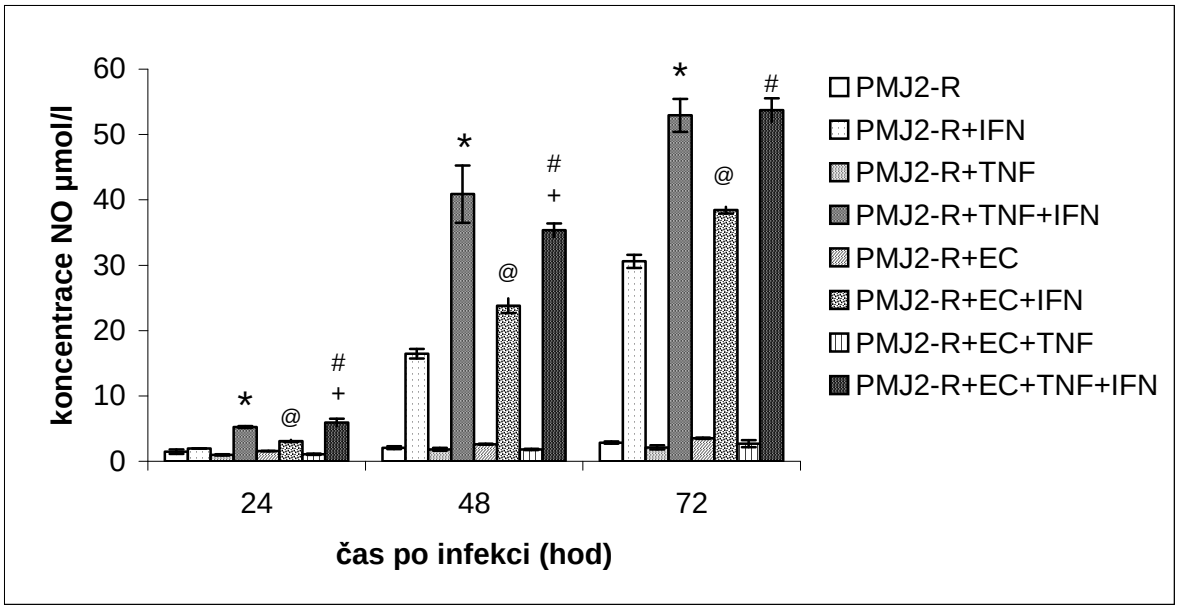
4.2 Vliv infekce *E. cuniculi* a IFN-γ na produkci oxidu dusnatého (NO) v buňkách PMJ2-R

IFN-γ v kombinaci s TNF-α, samotný IFN-γ i infekce *E. cuniculi* výrazně zvyšují produkci oxidu dusnatého (NO).

24 hodin po infekci byla naměřena zvýšená koncentrace NO u skupiny, kde byly v mediu samotné buňky PMJ2-R spolu s TNF-α a IFN-γ (5,25 μmol/l). Infekce *E. cuniculi* spolu s IFN-γ zvýšila koncentraci NO 24 hodin po infekci (3,10 μmol/l), ve skupině kde byl k *E. cuniculi* přidán IFN-γ spolu s TNF-α byla naměřena koncentrace 5,92 μmol/l.

Po 48 hodinách inkubace se prokazatelně zvýšila koncentrace NO v skupině buněk PMJ2-R s IFN-γ (16,45 μmol/l). Koncentrace NO ve skupině, kde byly buňky PMJ2-R spolu s TNF-α a IFN-γ se zvýšila na 40,87 μmol/l. Ve skupinách, kam byl k buňkám PMJ2-R přidána infekce *E. cuniculi* se zvýšila koncentrace NO po přidání IFN-γ na 23,79 μmol/l a ve skupině, kam byl přidán IFN-γ spolu s TNF-α, na 35,36 μmol/l.

V posledním sledovaném intervalu po inkubaci 72 hodin pokračovalo zvyšování koncentrace NO, ve skupině, kde byly v mediu samotné buňky PMJ2-R spolu s IFN-γ na 30,59 μmol/l, u samotných buněk PMJ2-R v mediu s IFN-γ a TNF-α na 52,93 μmol/l. U buněk PMJ2-R infikovaných *E. cuniculi* se po přidání IFN-γ zvýšila koncentrace NO na 38,42 μmol/l a v poslední sledované skupině, kam byl přidán IFN-γ a TNF-α, na 53,72 μmol/l.



obr.3: Vliv IFN-γ, TNF-α a infekce *E. cuniculi* na produkci NO v buňkách PMJ2-R

Každý časový interval byly vyhodnoceny tři vzorky. V grafu jsou vyneseny průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou. PMJ2-R = buněčná linie PMJ2-R (40 tis. buněk/jamku), EC = infekce *Encephalitozoon cuniculi* (120 tis. buněk/jamku), IFN = 100 U IFN-γ/ml media, TNF-α = 100 U TNF-α/ml media

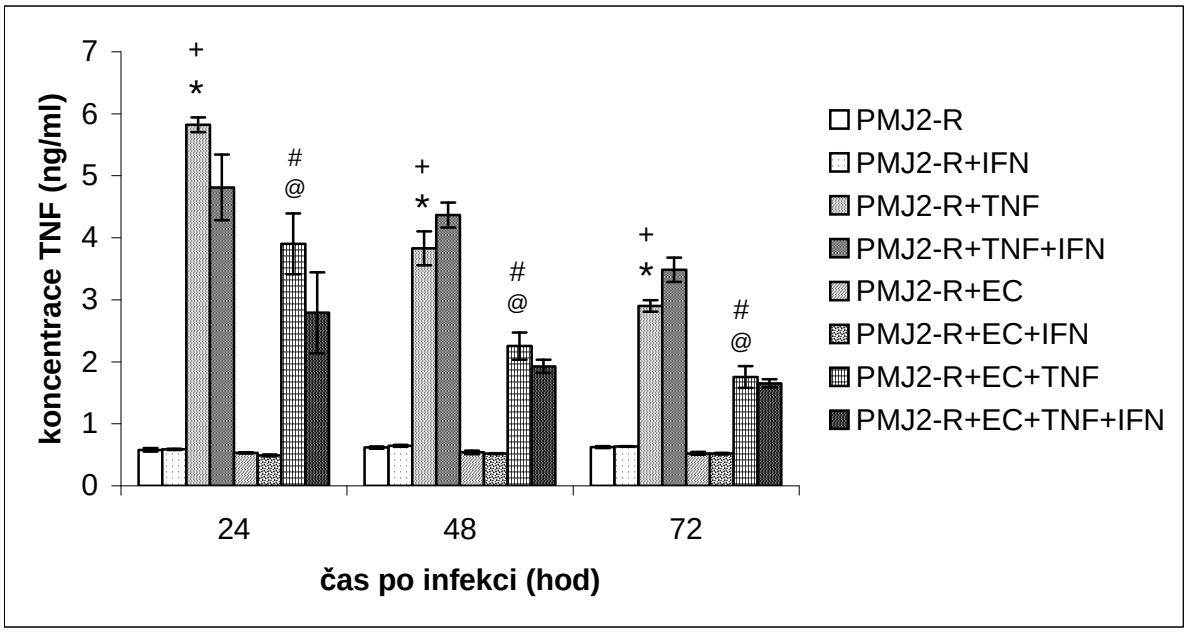
* statisticky významný rozdíl oproti skupině PMJ2-R + IFN-γ, @ statisticky významný rozdíl oproti skupině PMJ2-R + IFN-γ, # statisticky významný rozdíl oproti skupině PMJ2-R + EC+ IFN-γ, + statisticky významný rozdíl oproti skupině PMJ2-R + TNF-α + IFN-γ ($P<0,05$).

4.3 Vliv infekce *E. cuniculi*, TNF-α a IFN-γ na produkci TNF-α v buňkách PMJ2-R

Vyšší množství TNF-α byla zjištěna ve skupinách, kam byl přidán samotný TNF-α i ve skupinách, kam byl přidán TNF-α spolu s IFN-γ v případech infikovaných i neinfikovaných buněk.

V prvním časovém intervalu 24 hodin byla u samotných buněk v mediu s TNF-α naměřena koncentrace TNF-α 5,82 ng/ml a u skupiny s kombinací TNF-α a IFN-γ 4,81 ng/ml. U buněk, které byly infikovány *E. cuniculi* se zvýšila koncentrace TNF-α na 3,9 ng/ml u skupiny, kam byl přidán TNF-α a u skupiny s TNF-α a IFN-γ na 2,79 ng/ml. U ostatních skupin byla koncentrace TNF-α téměř totožná a to mezi 0,49 – 0,58 ng/ml. Hladiny koncentrací se u těchto skupin víceméně shodovaly po všechny sledované časové intervaly 24, 48 i 72 hodin.

Stejný trend, i když ve snižujících se koncentracích, byl pozorován v časových intervalech 48 i 72 hodin.



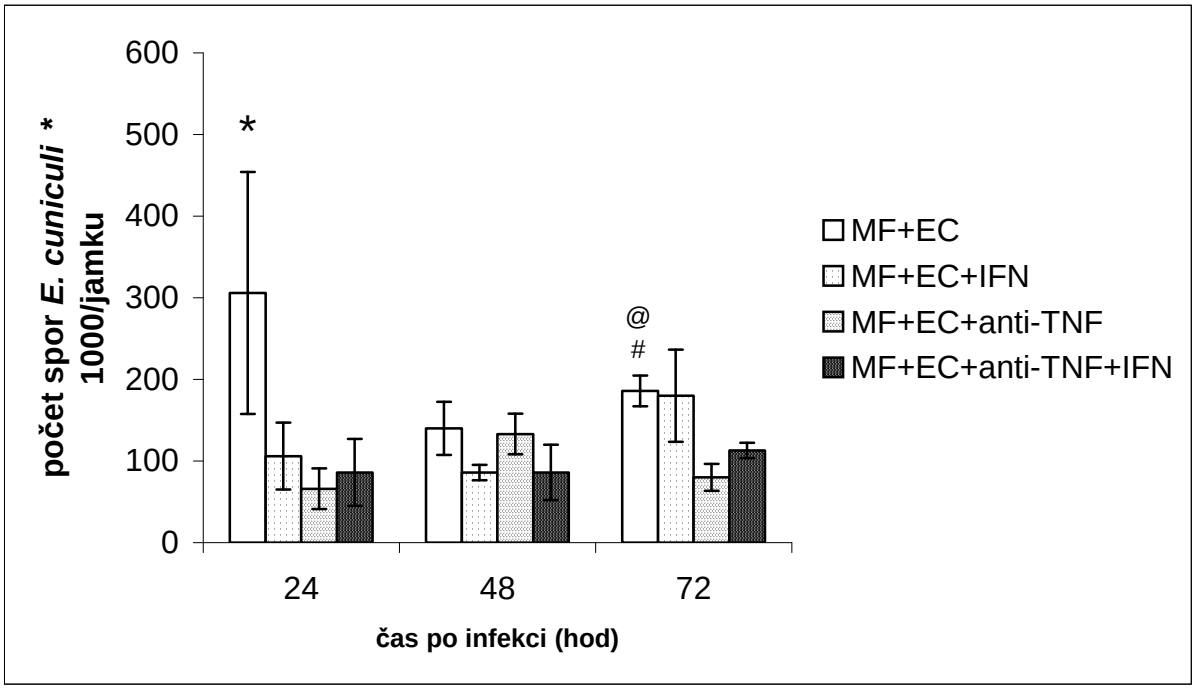
obr. 4: Vliv infekce *E. cuniculi*, TNF-α a IFN-γ na produkci TNF-α v buňkách PMJ2-R

Každý časový interval byly vyhodnoceny tři vzorky. V grafu jsou vyneseny průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou. PMJ2-R = buněčná linie PMJ2-R (40 tis. buněk/jamku), EC = infekce *E. cuniculi* (120 tis. buněk/jamku), IFN = 100 U IFN-γ/ml media, TNF-α = 100 U TNF-α/ml media

+ statisticky významný rozdíl oproti skupině PMJ2-R, * statisticky významný rozdíl oproti skupině PMJ2-R + TNF-α + IFN-γ, @ statisticky významný rozdíl oproti skupině PMJ2-R + EC, # statisticky významný rozdíl oproti skupině PMJ2-R + EC + TNF-α + IFN-γ ($P<0,05$).

4.4 Vliv infekce *E. cuniculi*, IFN-γ a anti-TNF-α protilátky na růst populace *E. cuniculi* v peritoneálních myších makrofázích

Zvýšený počet spor na jamku oproti infekční dávce byl pozorován v časovém intervalu 24 hodin po infekci pouze u skupiny, kam nebyly přidány žádné cytokiny a to 306 tis./na jamku. 48 hodin po infekci byl pozorovaný nárůst počtu spor oproti infekční dávce u skupiny s infikovanými makrofágy 140 tis. na jamku a ve skupině, kde byly infikované makrofágy ovlivněny anti-TNF-α protilátkou na 133 tis. na jamku. V posledním sledovaném časovém intervalu 72 hodin po infekci byl zvýšený nárůst počtu spor sledován u skupiny infikovaných makrofágů v samotném mediu a to na 186 tis./jamku. Druhým pozorovaným zvýšením oproti infekční dávce byl počet spor u skupiny, kde byly makrofágy infikované sporami *E. cuniculi* ovlivněny IFN-γ a to na 180 tis./jamku.



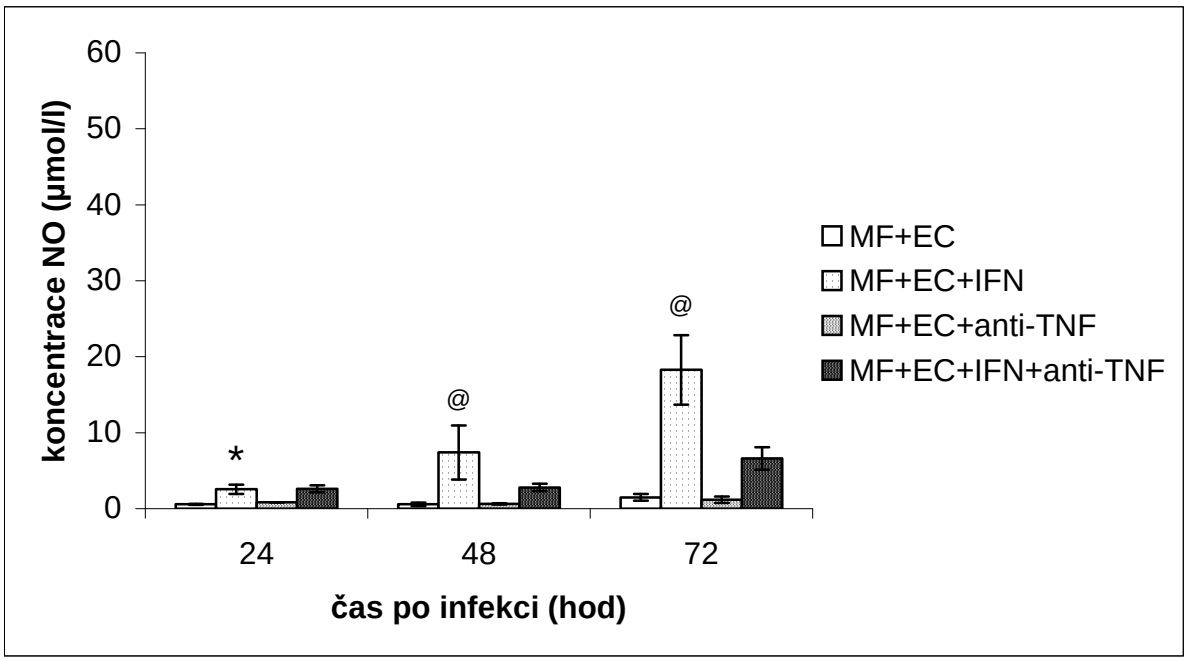
obr. 5: Vliv IFN-γ a anti-TNF-α protilátky na růst populace *E. cuniculi* v peritoneálních myších makrofázích

Každý časový interval byly vyhodnoceny tři vzorky. V grafu jsou vyneseny průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou. MF = myší peritoneální makrofágy (40 tis. buněk/jamku), EC = infekce *E. cuniculi* (120 tis. buněk/jamku), IFN = 100 U IFN-γ/ml media, anti-TNF-α protilátka = 0,6μg/ml media

* statisticky významný rozdíl oproti ostatním skupinám v časovém intervalu 24 hodin, @ statisticky významný rozdíl oproti skupině MF + anti-TNF-α, # statisticky významný rozdíl oproti skupině MF + EC + IFN-γ + anti-TNF-α ($P<0,05$).

4.5 Vliv infekce *E. cuniculi,* IFN-γ a anti-TNF-α protilátky na produkci oxidu dusnatého (NO) v peritoneálních myších makrofázích

Vyšší naměřená koncentrace oxidu dusnatého (NO), oproti ostatním skupinám, byla se zvyšujícím se trendem pozorována u skupiny, kde byly infikované makrofágy ovlivněny IFN-γ, 24 hodin po infekci 2,56 μg/l, 48 hodin po infekci 7,39 μg/l a 72 hodin po infekci 18,26 μg/l. U skupiny s infikovanými makrofágy ovlivněnými kombinací IFN-γ a anti-TNF-α protilátky byla naměřená koncentrace NO 24 hodin po infekci 2,16 μg/l, 48 hodin po infekci 2,78 μg/l a 72 hodin po infekci došlo k výraznějšímu zvýšení naměřené koncentrace NO na 6,16 μg/l. V ostatních sledovaných skupinách nebyla pozorována zvýšená produkce NO.



obr. 6: Vliv infekce *E. cuniculi,* IFN-γ a anti-TNF-α protilátky na produkci oxidu dusnatého (NO) v peritoneálních myších makrofázích

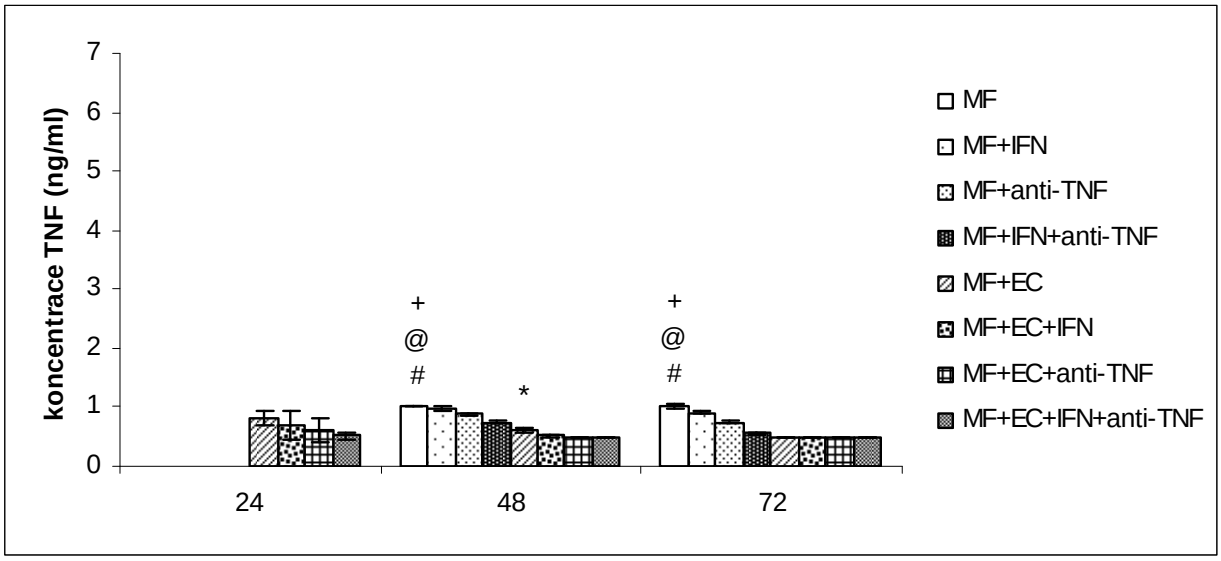
Každý časový interval byly vyhodnoceny tři vzorky. V grafu jsou vyneseny průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou. MF = myší peritoneální makrofágy (40 tis. buněk/jamku), EC = infekce *E. cuniculi* (120 tis. buněk/jamku), IFN = 100 U IFN-γ/ml media, anti-TNF-α protilátka = 0,6μg/ml media

* statisticky významný rozdíl oproti skupinám MF + EC a MF + EC + anti-TNF-α, @ statisticky významný rozdíl oproti ostatním skupinám v časovém intervalu 48 i 72 hodin ($P<0,05$).

4.6 Vliv infekce *E. cuniculi,* anti-TNF-α protilátky a IFN-γ na produkci TNF-α v peritoneálních myších makrofázích

Samotné makrofágy v mediu bez infekce *E. cuniculi* produkují TNF-α v koncentraci 1,02 ng/ml, ve skupině, kde byly makrofágy ovlivněny IFN-γ byla také naměřena zvýšená koncentrace TNF-α (0,96 ng/ml). Takřka stejný trend byl v těchto sledovaných skupinách naměřen v časovém intervalu 48 i 72 hodin. Ve skupině neinfikovaných makrofágů, kam byla přidána anti- TNF-α protilátka, byla naměřena koncentrace TNF-α 0,88 ng/ml. V poslední skupině neinfikovaných makrofágů, která byla ovlivněna kombinací anti-TNF-α protilátky a IFN-γ , byla naměřena koncentrace TNF-α 0,75 ng/ml. Velmi podobný trend koncentrace TNF-α byl naměřen v obou sledovaných intervalech 48 i 72 hodin.

V prvním sledovaném intervalu 24 hodin po infekci makrofágů sporami *E. cuniculi* byla naměřena koncentrace TNF-α 0,82 ng/ml. U skupiny ovlivněné IFN-γ byla koncentrace TNF-α 0,69 ng/ml, po přidání anti-TNF-α protilátky byla koncentrace 0,62 ng/ml a v kombinaci anti-TNF-α protilátky a IFN-γ 0,52 ng/ml. Ve dvou následujících časových intervalech byly koncentrace naměřeného TNF-α téměř totožné a pohybovaly se v rozmezí 0,59 – 0,48 ng/ml.



obr. 7: Vliv infekce *E. cuniculi,* anti-TNF-α protilátky a IFN-γ na produkci TNF-α v peritoneálních makrofázích

Každý časový interval byly vyhodnoceny tři vzorky. V grafu jsou vyneseny průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou. MF = myší peritoneální makrofágy (40 tis. buněk/jamku), EC = infekce *E. cuniculi* (120 tis. buněk/jamku), IFN = 100 U IFN-γ/ml media, anti-TNF-α protilátka = 0,6μg/ml media

* statisticky významný rozdíl oproti skupině MF + EC + IFN-γ, + statisticky významný rozdíl oproti skupině MF + IFN-γ, @ statisticky významný rozdíl oproti skupině MF + anti-TNF-α, # statisticky významný rozdíl oproti skupině MF + anti-TNF-α + IFN-γ ($P<0,05$).

5 Diskuze

V pokusech bylo potvrzeno, že v buňkách PMJ2-R infikovaných *E. cuniculi*, které byly aktivované IFN-γ dochází k výraznému zvýšení počtu spor oproti neaktivované skupině. Tím byly potvrzeny již dříve známé výsledky Jelínka (2007) o vlivu IFN-γ na šíření infekce *E. cuniculi* v buňkách PMJ2-R. Infekce vstupuje do hostitelských buněk fagocytózou (Franzen a spol. 2005), která může být právě IFN-γ zvýšena. V případě buněk PMJ2-R aktivovaných IFN-γ bylo zjištěno zvýšené množství vyprodukovaného NO oproti neaktivovaným skupinám. Nicméně koncentrace NO naměřená u buněk PMJ2-R, které byly ovlivněny IFN-γ, a počet spor, které byly zjištěny v této skupině, jasně ukazuje na fakt, že zvýšená produkce NO negativně neovlivňuje růst populace *E. cuniculi*. Nepodařilo se ovšem prokázat srovnatelnou koncentraci vyprodukovaného NO u stejně ovlivněných skupin buněk PMJ2-R a peritoneálních myších makrofágů, což se dá vysvětlit rozdílným počtem buněk, které byly nasazeny v jamce.

Vliv TNF-α na růst populace *E. cuniculi* v buňkách PMJ2-R byl následující, 24 i 48 hodin po infekci byl počet detekovaných spor pod hranicí infekční dávky, avšak 72 hodin po infekci došlo k výraznému nárůstu počtu spor. Tento fakt může být způsoben omezenou fagocytární aktivitou buněk PMJ2-R a s tím spojeným pomalým šířením infekce. Ve skupinách, kde byly infikované buňky PMJ2-R ovlivněny kombinací IFN-γ a TNF-α dosáhl počet spor množství, které bylo srovnatelné s vloženou infekční dávkou až 72 hodin po infekci. Tento výsledek by mohl být podložen navrženými modely na léčbu nebo regulaci replikační schopnosti protozoálních infekcí, jak již bylo popsáno výše podle názorů Langermanse a spol. (1992), který podobný trend sledoval u infekce *T. gondii* po podání kombinace těchto cytokinů. Je ovšem možné, že tento výsledek byl ovlivněn apoptózou buněk, která nastala po přidání TNF-α i po kombinaci obou cytokinů (IFN-γ a TNF-α). Ve druhé sledované skupině, kde docházelo k výrazně menšímu nárůstu počtu spor byl zároveň v kontrolní skupině buněk PMJ2-R, které nebyly infikované *E. cuniculi*, pozorován výrazný úhyn neinfikovaných buněk, ovlivněných pouze IFN-γ a TNF-α. Z tohoto faktu tedy usuzuji, že pomalá replikace spor *E. cuniculi* mohla být způsobena i snížením počtu cílových hostitelských buněk, které mohly být infikovány *E. cuniculi*, a že kombinace cytokinů IFN-γ a TNF-α působí buněčnou smrt bez ohledu na to zda působí na infikované nebo zdravé buňky. Přímo na buněčné linii PMJ2-R nebyl tento jev pozorován, avšak Suk a spol. (2001) pozorovali buněčnou smrt u krysích asterocytů po přidání prozánětlivých cytokinů IFN-γ

a TNF-α a lipopolysacharidu (LPS) . Samotné cytokiny na apoptózu buněk neměly žádný vliv, avšak při kombinaci alespoň dvou uvedených byla buněčná smrt pozorována i u zcela zdravých buněk. Martins a spol. (1998) potvrdili v pokusech prováděných *in vivo* na myších BALB/c, že NO produkovaný aktivovanými makrofágy (IFN-γ a TNF-α) hraje roli v umělém vyvolání apoptózy během akutní fáze experimentální infekce *T. cruzi*. K šíření mikrosporidiové infekce může docházet uvnitř hostitelské buňky aniž by došlo k aktivaci proteinu p53 zodpovědného za apoptózu infikované buňky (Aguila a spol. 2006).

U skupin, kde byly buňky PMJ2-R neinfikované i infikované *E. cuniculi* ovlivněny přidáním TNF-α se výrazně zvýšila koncentrace samotného TNF-α, vzestup koncentrace TNF-α byl zaznamenán i ve skupině ovlivněné TNF-α spolu s IFN-γ. Mnohonásobné zvýšení koncentrace TNF-α oproti přidané dávce může být způsobena navázáním tohoto TNF-α na povrchový receptor akceptorové buňky, což zřejmě vede k další produkci TNF-α. Další možností, jak si vysvětlit toto zvýšení množství TNF-α ve sledovaných skupinách, je rozklad původní trimerické formy TNF-α na jeho monomery. I buňky neovlivněné TNF-α produkovaly tento cytokin, i když pouze ve velmi malém množství na hranici detekovatelnosti.

Dalším cílem mé práce bylo sledovat vliv TNF-α na množení *E. cuniculi* v myších peritoneálních makrofázích. Tento cytokin z nadčeledi TNF působí jako hlavní prostředník při zánětu a obranné regulaci. TNF-α je produkován především makrofágy (Tracey a Cerami 1990), tento fakt se podařilo prokázat i v mé bakalářské práci, avšak naměřené koncentrace TNF-α byly velmi nízké, což mohlo být způsobeno zřejmě nedostatečným množstvím nasazených makrofágů. Z tohoto důvodu byla také sledována produkce TNF-α u neinfikovaných makrofágů pouze v časových intervalech 48 a 72 hodin. U infikovaných makrofágů se mi nepodařilo prokázat zvýšenou produkci TNF-α, pravděpodobně z již výše uvedeného důvodu (obr. 7).

Růst populace *E. cuniculi* po přidání anti-TNF-α protilátky nebyl oproti očekávání pozorován (obr. 5). Očekávání vycházela z výsledků, které byly získány při pokusech s IFN-γ a TNF-α u dalších patogenů. Spolupůsobení těchto cytokinů je schopné regulovat replikaci parazitů *T. gondii* (Langermans a spol. 1992), *L. major* (Liew a spol. 1990) i *T. cruzi* (Lima a spol. 1997). Anti-TNF-α protilátka je schopna blokovat tuto regulaci a parazit se může téměř neomezeně množit v hostitelské buňce, jak bylo prokázáno u *T. gondii* (Langermans a spol. 1992). Ačkoliv přidání exogenního TNF-α nezvyšuje trypanocidní aktivitu IFN-γ *in vitro*, léčba resistentních C57BI/6 myší monoklonální anti-TNF-α protilátkou zvyšuje mnohonásobně zmnožení parazita a mortalitu hostitele (Silva a spol. 1995).

Nepodařilo se mi přímo potvrdit, že u infikovaných makrofágů ovlivněných IFN-γ dochází k prokazatelnému snížení počtu spor *E. cuniculi* (Didier 1995, Jelínek 2007). Ovlivnění infikovaných makrofágů IFN-γ bylo potvrzeno změřením produkce NO, jehož koncentrace je u aktivovaných makrofágů infikovaných sporami *E. cuniculi* výrazně vyšší než u neaktivovaných makrofágů (obr. 5). Franzen a spol. (2004) prokázali, že produkce NO se u infikovaných a neinfikovaných makrofágů téměř neliší, což nebylo v mé práci potvrzeno, jelikož z důvodu nedostatku makrofágů nebyly nasazeny skupiny bez infekce. Při infekci myších peritoneálních makrofágů sporami mikrosporidií není produkován oxid dusnatý (NO) (Franzen a spol. 2004), tento výsledek se shoduje s mými pokusy, při kterých jsem měřila produkci NO (obr. 6). Didierová (1995) prokázala, že infikované makrofágy ovlivněné TNF-α neprodukují výrazně vyšší množství NO, stejného výsledku jsem dosáhla i ve svých pokusech (obr. 6). Počet spor přesáhl množství odpovídající infekční dávce až 72 hodin po infekci (obr. 5), tento fakt mohl být opět způsoben nedostatečným počtem makrofágů, které by mohly být napadeny infekcí *E. cuniculi*, pomalým šířením infekce nebo zničením raných vývojových stádií *E. cuniculi* během lýzování buněk.

TNF-α může hrát protektivní úlohu při ochraně hostitele proti mikrosporidiové infekci, pravděpodobně v důsledku apoptotického působení na hostitelské buňky, což by naznačovaly výsledky z pokusů prováděných na buněčné linii PMJ2-R. Z výsledků, které byly pozorovány u myších peritoneálních makrofágů nelze jednoznačně určit vliv cytokinů na množení parazita.

6 Souhrn

1. Podařilo se prokázat antimikrosporidiový účinek TNF-α u buněčné linie PMJ2-R. Zejména v kombinaci v TNF-α, s IFN-γ docházelo k potlačení množení E. cuniculi v těchto buňkách.
2. Samotné buňky PMJ2-R jsou schopné vyprodukovat malé množství TNF-α, i pokud jsou ovlivněny IFN-γ
3. Aktivované buňky PMJ2-R po přidání TNF-α, jsou schopné zvýšené produkce tohoto cytosinu
4. Pomocí blokování TNF-α anti-TNF-α protilátkou se nepodařilo prokázat význam tohoto cytokinu v množení *E. cuniculi* v případě myších peritonálních makrofágů.

7 Seznam použité literatury

Aguila del C., Izquierdo F., Granja A. G., Hurtado C., Fenoy S., Fresno M., Revilla Y. 2005: *Encephalitozoon* microsporidia modulates p53-mediated apoptosis in infected cells. Int. J. Parasitol. 36: 869-876

Alexander J., Satoskar A. R., Russel D. G. 1999: Commentary: *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. J. Cell Sci. 112: 2993-3002

Bemelmans M. H. A., van Tits L. J. H., Buurman W. A. 1996: Tumor necrosis factor. Crit. Rev. Immun. 16: 1–11

Beutler B., Bazzoni F. 1998: TNF Apoptosis and Autoimmunity: A Common Thread? Blood Cells, Molecules, and Diseases 24: 216-230

Biderre C., Pagés M., Méténier G., Canning E. U., Vivarés CH. P. 1995: Evidence for the smallest nuclear genome (2.9 Mb) in the microsporidium Encephalitozoon cuniculi. Molec. and Biochemic. Parasitol. 74: 229-231

Bigliardi E., Sacchi L. 2001: Cell biology and invasiopn of the microsporidia. Microbes Infect. 3: 373-379

Cali A., Takvorian P. M. 1999: Developmental morphology and life cycles of the Microsporidia. V: The Microsporidia and Microsporidiosis (Wittner M, Weiss LM): 85 - 228, Washington D.C. Press. American Society for Microbiology

Canning E. U. 1997: Microsporida. Kreier JP Parasitic protozoa Academic Press New York; 4: 155

Canning E. U., Lom J. 1986: The microsporidia of vertebrates. Academic Press New York, p.289

Carswell E. A., Old L. J., Kassel R. L., Green S., Fiore N., Wiliamson B. 1975: An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72: 3666-3670

Cavalier-Smith T. 1998: A revise six kingdom system of life. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 73: 203–266

Couzinet S., Cejas E., Schittny J., Deplazes P., Weber R., Zimmerli S. 2000: Phagocytic uptake of *Encephalitozoon cuniculi* by nonprofessional phagocytes. Infect. Immun. 68: 6939- 945

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

Derouich-Guergour D., Aldebert D., Vigan I., Jouvin-Marche E., Marche P. N., Aubert D., Ambroise-Thomas P., Pelloux H. 2002 *Toxoplasma gondii* infection can ragulate the expression of tumour necrosis factor-α receptors on human cells in vitro. Parasite Immun. 24: 271-279

Derouich-Guergour D., Brenier-Pinchart M. B., Ambroise-Thomas P., Pelloux H. 2001: Tumor necrosis factor α receptors: role in the physiopathology of protozoan parazite infections. Int. J. Parasit. 31: 763-769

Didier E. S. 1995: Reactive nitrogen intermediates implicated in the inhibition of *E. cuniculi* (phylum microspora) replication in murine peritoneal macrophages. Parasite Imunn. 17: 405-412

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

Didier E. S., Didier P. J., Snowden K. F., Shadduck J. A. 2000: Microsporidiosis in mammals. Microbes and Infect. 2: 709–720

Didier E. S., Snowden K. F., Shadduck J. A. 1998: Biology of Microsporidian Species Infecting Mammals. Advances in Parasit. 40: 283-320

Docker M. F., Kent M. L., Hervio D. M. L., Khattra J. S., Weiss L. M., Cali A., Devlin R. H. 1997: Ribosomal DNA Sequence of ***Nucleospora salmonis*** Hedrick, Groff and Baxa, 1991 (Microsporea: Enterocytozoonidae): Implications for Phylogeny and Nomenclature. J. Eukaryot. Microbiol. 44: 55-60

Dunn A. M., Smith J. E. 2001: Microsporidian life cycles and diversity: the relationship between virulence and transmission. Microbes and Infection 3: 381-388

Ellerin T., Rubin R. H., Weinblatt M. E. 2003: Infections and Anti-Tumor Necrosis Factor α Therapy. Arthritis and Rheumatism 48: 3013–3022

Franzen C. 2004: Microsporidia: how can they invade other cells? Trend. Parasitol. 20: 275–279

Franzen C. 2005: Microsporidia: how can they invade cells? Folia Parasitol. 52: 36-40

Franzen C., HartmannP., Salzberger B. 2004: Cytokine and nitric oxide responses of monocyte-derived human macrophages to microsporidian spores. Exp. Parasitol. 109: 1-6

Franzen C., Müller A. 1999: Cryptosporidia and Microsporidia – Waterborne Diseases in the Immunocompromised Host. Diagn. Microbial. Infect. Dis. 34: 245-262

Franzen C., Müller A. 2001 Microsporidiosis: human diseases and diagnosis. Microbes Infect. 3: 389–400

Franzen C., Müller A., Hartmann P., Salzberger B. 2005: Cell invasion and intracellular fate of *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia). Parasitol. 130: 285-292

Frenkel J. K. 1988: Pathophysiology of toxoplasmosis. Parasitol. Today 4: 273-278

Frixione E., Ruiz L., Cerbón J., Undeen A. H. 1997: Germination of *Nosema algerae* (Microspora) Spores: Conditional Inhibition by D_2O, Ethanol and Hg^{2+} Suggests Dependence of Water Influx upon Membrane Hydration and Specific Transmembrane Pathways. J. Eukaryot. Microbiol. 44: 109-116

Gazzinelli R. T., Brézin A., Li Q., Nussenblat R. B., Chan Ch.-Ch. 1994: *Toxoplasma gondii*: Acquired Ocular Toxoplasmosis in the mUrine Model, Protective Role of TNF-α and IFN-γ. Exp. Parasitol. 78: 217 - 229

Green S. J., Mellouk S., Hoffman S. L., Meltzer M. S., Nacy C. A. 1990: Cellular mechanisms of nonspecific immunity to intracellular infection: cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from L-arginine by macrophages and hepatocytes. Immun. Lett. 25: 9-15

Iwamoto J., Morin III F. C., Inaba M., Gorfien S. F., Battista P. J. 1999: Direct measurment of nitric oxide from ovine endothelium cultured in endothelian-SFM. Focus 16: 31-33

Johnson L. L. 1992: A Protective Role for Endogenous Tumor Necrosis Factor in *Toxoplasma gondii* infection. Infect. Immun. 60: 1979-1983

Keohane E. M. , Weiss L. M. 1999: The structure, function, and composition of the microsporidian polar tube. In: The Microsporidia and Microsporidiosis (Wittner M, Weiss LM): 196-224, Washington D.C. Press, American Society for Microbiology

Khan I. A., Moretto M. 1999: Role of Gamma Interferon In Cellular Immune Response against Murine *Encephalitozoon cuniculi* Infection. Infect. Immun. 67: 1887-1893

Langermans J. A. M., Van Der Hulst M. E. B., Nibbering P. H., Van Furth R. 1992: Endogenous Tumor Necrosis Factor Alpha Is Required for Enhanced Antimicrobial Activity against *Toxoplasma gondii* and *Listeria monocytogenes* in Recombinant Gamma Interferon-Treated Mice. Infect. Immun. 60: 5107-5112

Liew F. Y., Parkinson C., Millott S., Severn A., Carrier M. 1990: Tumor necrosis factor (TNFα) in leishmaniasis. I. TNFα mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. Immun. 69: 570-573

Lom J., Vávra J. 1963: The mode of sporoplasm extrusion in microsporidian spores. Acta Protozool. 1: 81–92

MacDonald T. T., Hutchings P., Choy M.-Y., Murch S., Cooke A. 1990: Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single cell level in normal and inflamed human intestine. Clin. Exp. Immun. 81: 301–305

Martins G. A., Cardoso M. A. G., Aliberti J. C. S., Silva J. S. 1998: Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Immun. Lett. 63: 113-120

Mathis A. 2000: Microsporidia: emerging advances in understanding the basic biology of these unique organisms. Int. J. Parasitol. 30: 795-804

Matsubayashi H., Koike T., Mikata I., Takei H., Hagiwara S. 1959: A case of Encephalitozoon-body infection in man. AMA Arch. Pathol. 67: 181-187

Molina J. M., Sarfati C., Beauvais B., Lémann M., Lesourd A., Ferchal F., Casin I., Lagrange P., Modigliani R., Derouin F. a spol. 1993: Intestinal microsporidiosis in human immunodeficiency virus-infected patients with chronic unexplained diarrhea: prevalence and clinical and biologic features. J. Infect. Dis. 167: 217–221

Murray J., Barbara J. A. J., Dunkley S. A., Lopez A. F., Van Ostade X. Condliffe A. M., Dransfield I., Haslett Ch., Chilvers E. R. 1997: Regulation of Neutrophil Apoptosis by Tumor Necrosis Factor-α: Requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of Apoptosis In Vitro. Blood 7: 2772 - 2783

Niederkorn J. Y., Brieland J. K., Mayhew E. 1983: Enhanced Natural Killer Cell Activity in Experimental Murine Encephalitozoonosis. Infect. Immun. 41: 302-307

Osserman E. F., Lawlor D. P. 1966: Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia. J. Exp. Med. 124: 921-952

Pleshinger J., Weidner D. 1985: The microsporidian invasion tube. Discharge activation begins with pH-triggered Ca^{2+} influx. J. Cell Biology 100: 1834 – 1838

Rottenberg M. Cardoni R. L., Andersson R., Segura E. L., Orn A. 1988: Role of T Helper/Inducer Cells as well as Natural Killer Cells in Resistance to *Trypanosoma cruzi* Infection. Scandinavian J. Immun. 28: 573–582

Schall T. J., Lewis M., Koller K. J., Lee A., Rice G. C., Wong G. H. W., Gatanaga T., Granger G. A., Lentz R., Raab H., Kohr W. J., Goeddel D. 1990: Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. Cell 61: 361-370

Schlüter D. , Deckert M. 2000: The divergent role of tumor necrosis factor receptors in infectious diseases. Microbes Infect. 2: 1285-1292

Schmidt E. C., Shadduck J. A. 1983: Murine Encephalitotoonosis Model for Studying the Host-Parasite Relationship of a Chronic Infection. Infect. Immun. June: 936-942

Schmidt E. C., Shadduck J. A., 1984: Mechanisms of resistance to the intracellular Protozoan *Encephalitozoon cuniculi* in mice. J. Immun. 133: 2712-2719

Sibley L. D., Adams L. B., Fukutomi Y., Krahenbuhl J. L. 1991: Tumor necrosis factor-alpha triggers antitoxoplasmal activity of IFN- gamma primed macrophages..J. Immun. 147: 2340–2345

Silva J. S., Vespa G. N. R., Cardoso M. A. G., Aliberti J. C. S., Cunha F. Q. 1995: Tumor Necrosis Factor Alpha Mediates Resistance to *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice by Inducing Nitric Oxide Production in Infected Gamma Interferon-Activated Macrophages. Infect.Immun. 63: 4862-4867

Snowden, K.F., Shadduck, J.A. 1999: Microsporidia of higher vertebrates. V: The Microsporidia and Microsporidiosis (Wittner M, Weiss LM): 393-419, Washington D.C. Press. American Society for Microbiology

Sprague V., Bencel J. J., Hazard E. I. 1992: Taxonomy of phylum *Microspora*. Crit. Rev. Microbiol. 18: 285-395

Udeen A. H., Frixione E. 1990: The Role of Osmotic Pressure in the Germination of *Nosema algerae* Spores. J. Eukaryot. Microbiol. 37: 561–567

Vávra J., Larsson R. 1999: Structure of the Microsporidia. V: The Microsporidia and Microsporidiosis (Wittner M., Weiss L. M.), Washington D.C. Press

Vávra J., Undeen A. H. 1970: *Nosema algerae* n. sp. (Cnidospora, Microsporida) a Pathogen in a Laboratory Colony of *Anopheles stephensi* Liston (Diptera, Culicidae). J. Eukaryot.Microbiol. 17: 240-249

Weber R., Bryan R. T., Schwartz D. A., Owen R. L. 1994: Human microsporidial infections. Clin. Microbiol. Rev. 7: 426-461

Weidner E., Byrd W., Scarborough A., Pleshinger J., Sibley D. 1984: Microsporidian Spore Discharge and the Transfer of Polaroplast Organelle Membrane into Plasma Membrane. J. Eukaryot. Microbiol. 31: 195-198

Wittner M. 1999: Historic perspective on the microsporidia: Expanding horizont. In: The Microsporidia and Microsporidiosis (Wittner M., Weiss L. M.): Washington D.C. Press, American Society for Microbiology