

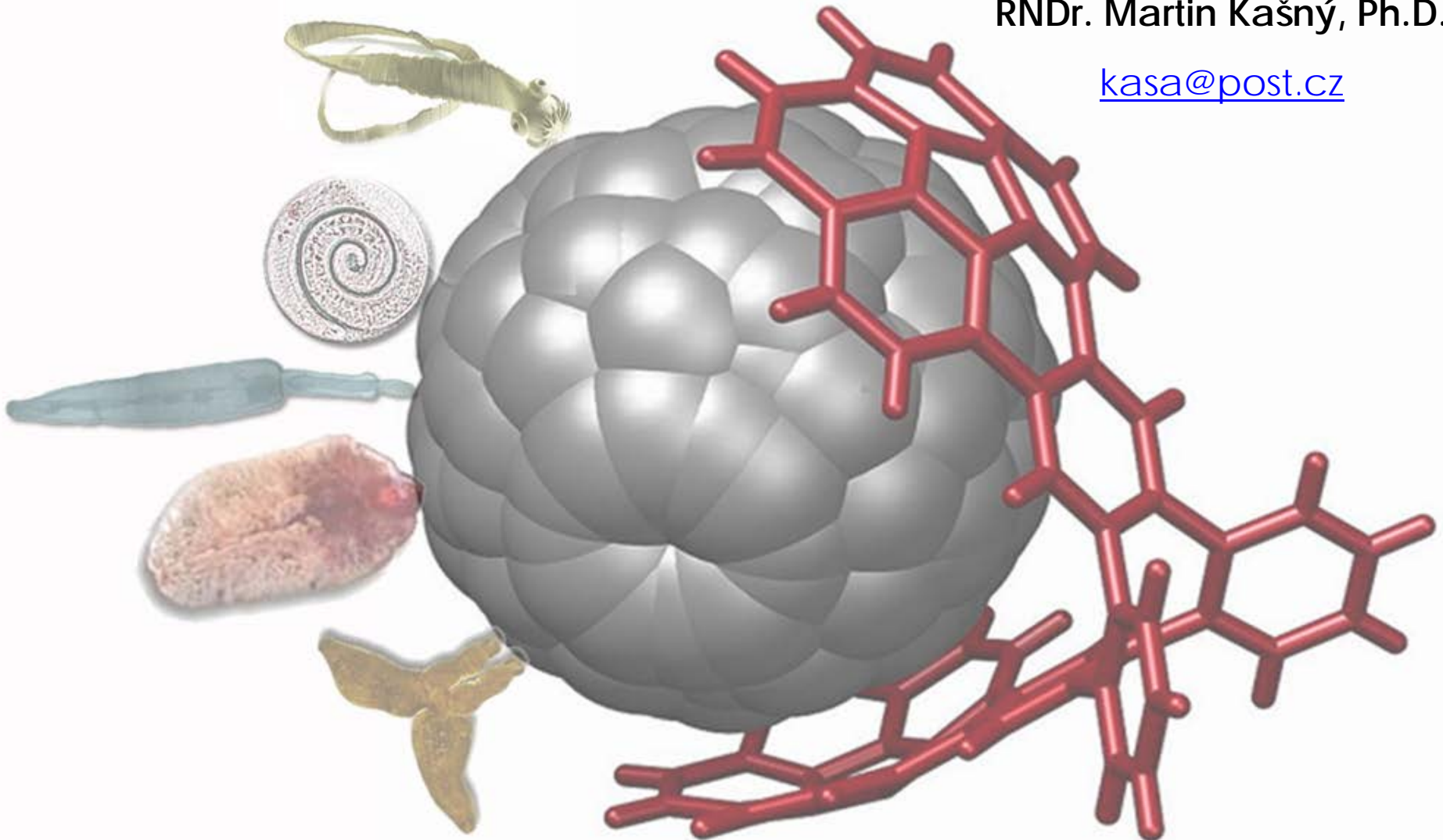
Molekulární a buněčné interakce parazita a hostitele

(Bi9474)

2016

RNDr. Martin Kašný, Ph.D.

kasa@post.cz



4.

HORMONY HOSTITELE a HELMINTI

The background of the slide features a composite illustration. On the left, there is a faint, light green snail. In the center, a large, translucent, greyish-blue spherical structure, possibly representing a cell or a parasite, is visible. To the right, a complex chemical structure with red and orange bonds and grey atoms is depicted. At the bottom left, a small, yellow, elongated microscopic organism is shown.

OBEČNĚ

jeden z prvních kroků v evoluci metazoi

mechanismy mezibuněčné komunikace

Homeostáze: komunikace nervového, imunitního a endokrinního systému

Zprostředkovatelské složky homeostáze: hormony, cytokiny a jejich receptory strukturně, a často i funkčně konzervativní u různých kmenů mnohobuněčných živočichů

- inzulín
- epidermální růstový faktor (EGF)
- fibroblastový růstový faktor (FGF)
- kostní morfogenní protein (BMP)
- a další (včetně lipofilních hormonů - např. steroidů)

Pozn. savčí inzulín a kostní morfogenní protein (BMP) se v experimentech vázaly na povrchové receptory s kinázovou aktivitou u *Drosophila melanogaster* a *Caenorhabditis elegans* (1994-95) => v přírodě se obvykle nestává, že bezobratlý přichází do styku s lidským inzulínem a dalšími biologicky aktivními látkami

ALE helminti ANO

schistosomy exprimují receptor pro inzulín (ale i pro thyreoidní a steroidní hormony)

mezi patogeny (viry, bakterie, protista) jsou helminti unikátní = jako mnohobuněční živočichové využívají mechanismy buněčné komunikace podobné hostitelům



DŮSLEDKY PATOLOGIE A HORMONY

Narušení hormonálních poměrů

- **zvýšení hodnot**

- **gastrin** (peptidový hormon, který hraje důležitou roli v regulaci funkcí gastrointestinálního traktu. Je produkován G-buňkami žaludeční a duodenální sliznice)

- některé střevní hlístice

- **enteroglukagon** (peptidový hormon odvozený z preproglukagonu. Jedná se o gastrointestinální hormon vylučovaný z slizničních buněk především tlustého střeva a v terminálním ileu)

- některé tasemnice ve střevě



- **snížení hodnot**

- **gastrin**

- některé střevní hlístice

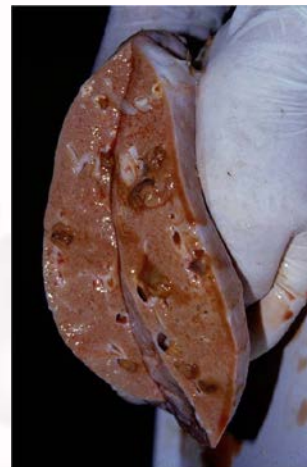
- **inzulín** (hormon produkováný B buňkami Langerhansových ostrůvků slinivky břišní, který snižuje hladinu cukru v krvi. Inzulin má opačnou funkci než glukagon, je tedy jeho antagonist.

- některé střevní hlístice

DŮSLEDKY PATOLOGIE A HORMONY

Sledování hormonálních stavů hostitele

Fasciola hepatica – dospělci ve žlučovodech – mobilní červi



• reakce na přítomnost gastrointestinálních hormonů

- cholecystikinové hormony

relaxace svěračů žlučového

stimulace kontrakcí žlučníku

průtok žluči se zvětšuje

zvyšují aktivitu acetabula

- motilin

motilita střeva

kontrakce svěračů ústí žlučového

průtok žluči se snižuje

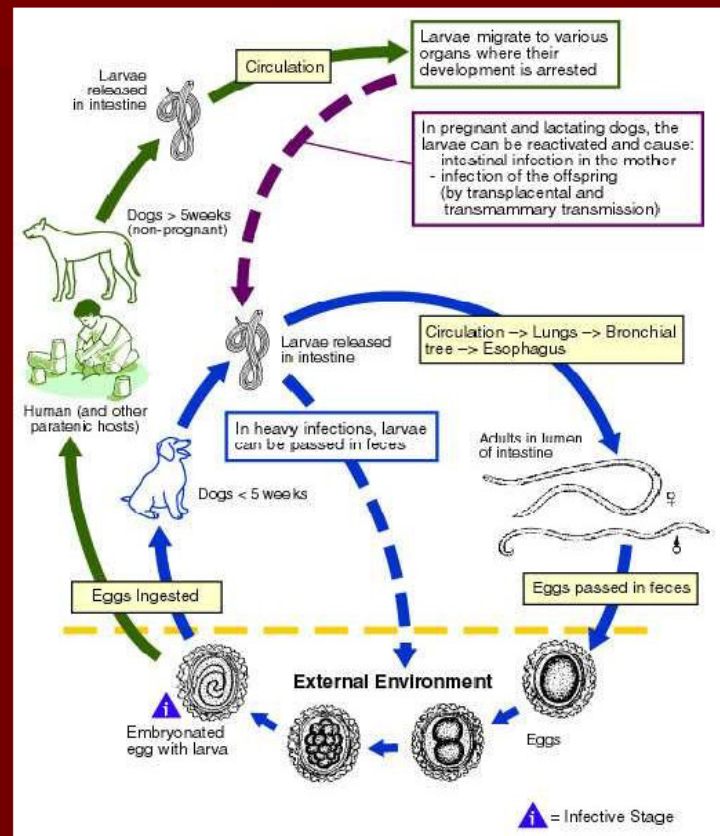
snižuje aktivitu acetabula



DALŠÍ ZAJÍMAVÉ MODELY

Sledování hormonálního stavu hostitele

- **Toxocara canis** (infekční larvy ve fenách)
 - migrace tělem dle hormonálního stavu – březosti
 - reaktivace larev
 - transplacentární či transmamární nákaza štěňat
 - amfiparateneze



DŮSLEDKY PATOLOGIE A HORMONY

Zásah do hormonálních stavů hostitele

Ovlivnění produkce hostitelských hormonů

- infekce platyhelminty

závažnější průběh u samic hostitelů

lepší vývoj červů u samic

testosteron má negativní vliv na vývoj červů

infekce může inhibovat aktivity hormonů, např. produkci testosteronu

Model: larvy (cysticerky) *Taenia crassiceps* v myši po infekci: změny v sexuální chování samců - cysticerky indukují snížení hladin testosteronu u samců

- dospělci ve střevě masožravců, MH - hlodavci



(Gaceta Biomédicas 2009)

Pozn. U helmintů gonochoristů - pohlaví hostitele je příčinou odlišné exprese některých genů - schistosomy

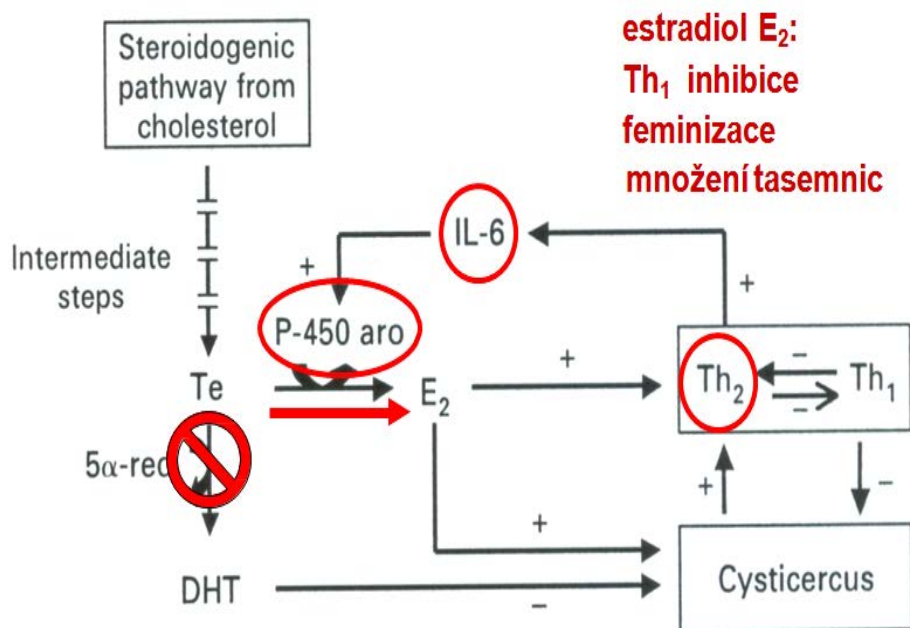
DŮSLEDKY PATOLOGIE A HORMONY

Blokování receptorů pro hostitelské hormony na cílových tkáních Ovlivnění produkce hostitelských hormonů

Model: *Taenia crassiceps*
mechanismus možného působení

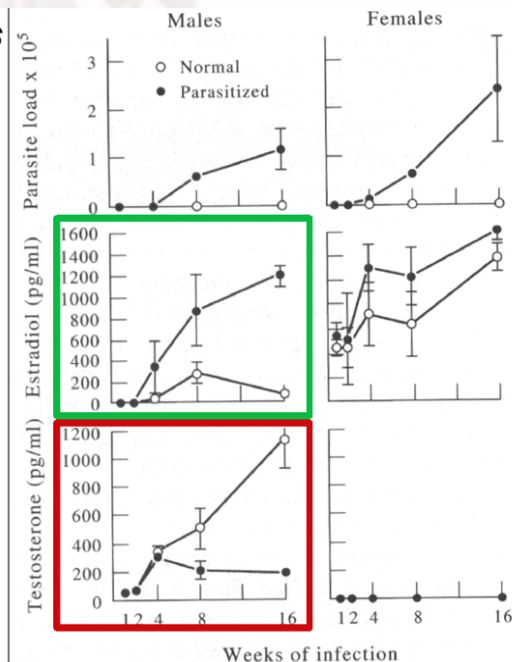
U obou pohlaví:
stimulace Th_2 (tasemnice je citlivá na Th_1 !)
IL-6 indukuje zvýšenou expresi

P-450 aromatázy odklon:
testosteron je přeměňován na estradiol dráha na
dihydrotestosteron blokována
snížena exprese 5 α -reduktázy



cysticerky *Taenia crassiceps*

- lepší vývoj v samicích myší
- estradiol urychluje růst tasemnic
- horší vývoj v samcích
- androgeny inhibují růst tasemnic
- feminizace samců
- zvýšená vnímavost k infekci
- lepší množení parazita
- **zvýšení hladiny sérového estradiolu více jak 200x**
- **pokles hladiny testosteronu o 90%**
- **poškození (indukce apoptózy) buněk testes (zárodečné buňky, Sertoliho buňky, Leydigovy buňky)**



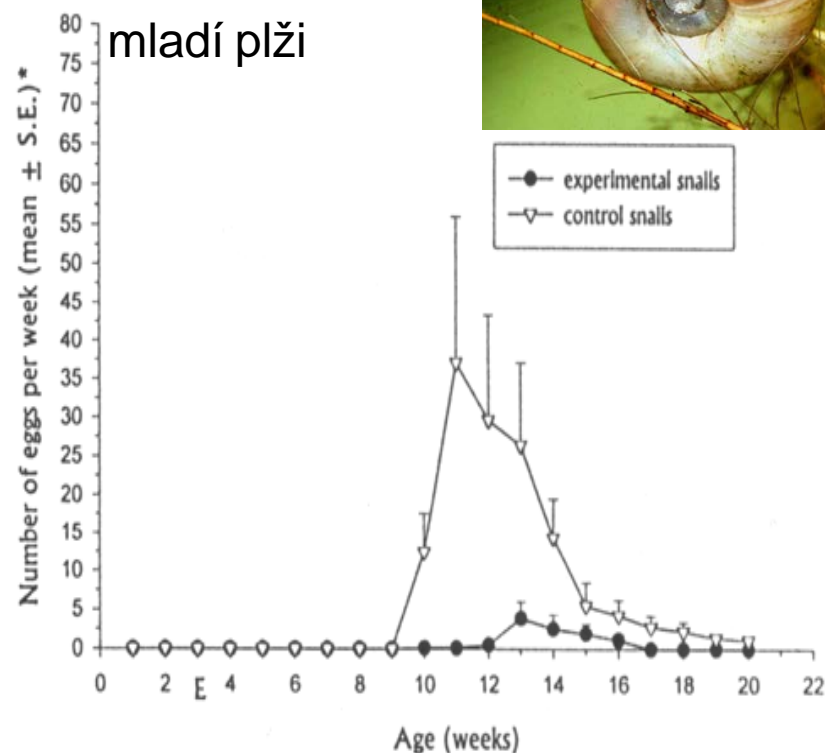
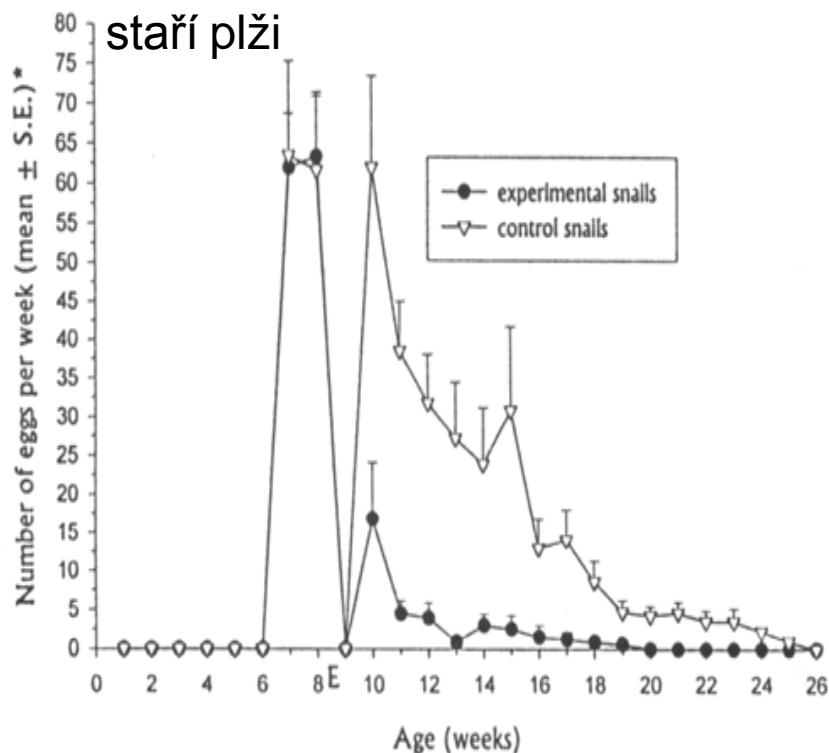
DŮSLEDKY PATOLOGIE A HORMONY

Blokování receptorů pro hostitelské hormony na cílových tkáních

Kastrace a gigantismus měkůšů při infekcích motolicemi

Model: *Schistosoma mansoni* x MH. *Biomphalaria glabrata*

Množství interakcí



DŮSLEDKY PATOLOGIE A HORMONY

Blokování receptorů pro hostitelské hormony na cílových tkáních

Kastrace a gigantismus měkkýšů při infekcích motolicemi

Model: *Trichobilharzia szidati* x MH. *Lymnaea stagnalis*

Množství interakcí:

produkce hormonů v centrálním nervovém gangliu -
endokrinní dorzální tělíska u nervového ganglia:

- **"dorsal body hormone"** (DBH)
 - stimulace samičího sexuální zrání
 - stimulace syntetické aktivity samičích přídatných sex. orgánů
 - stimulace růstu a zrání oocytů

neurosekreční kaudodorzální buňky nerv. ganglia

- **"caudo-dorsal cell hormone"** (CDCH) indukce ovulace a formování vajíček
- **"calfluxin"** (CaFl)
 - sekrece buněk bílkovinné žlázy (zvýšení vstupu Ca^{2+} iontů do mitochondrií)
 - je z téhož prekursoru jako CDCH

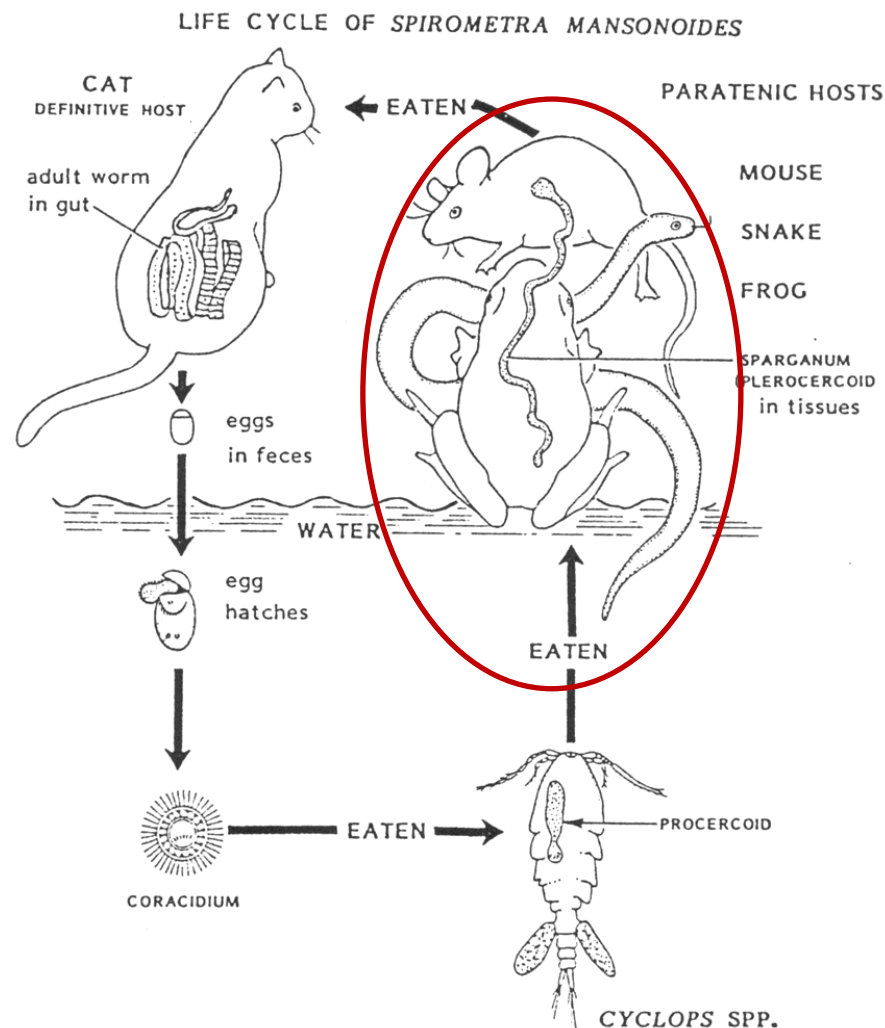
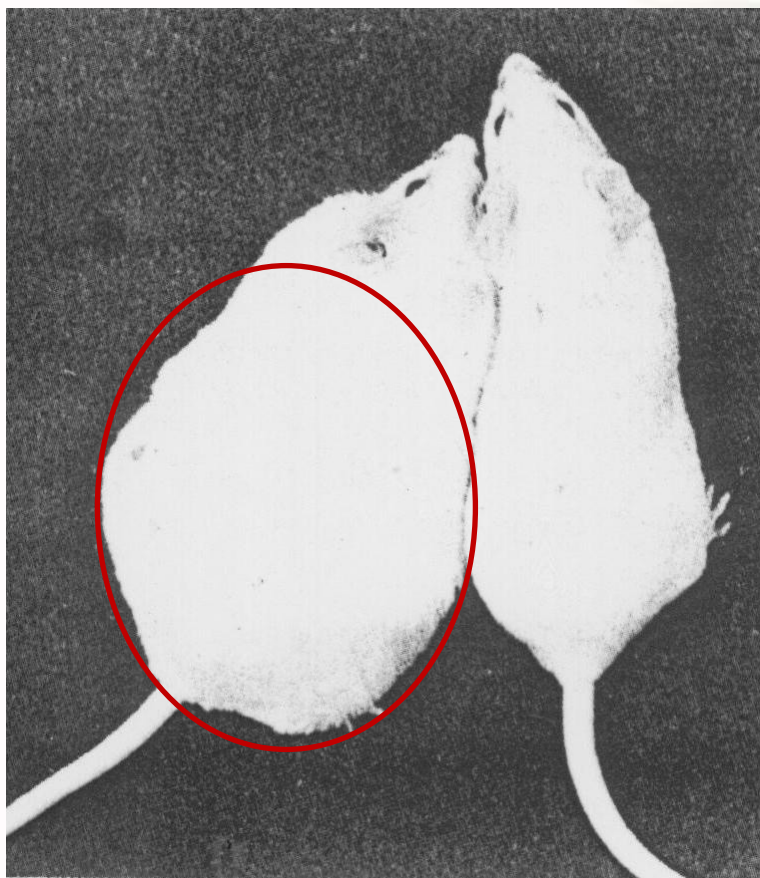


DŮSLEDKY PATOLOGIE A HORMONY

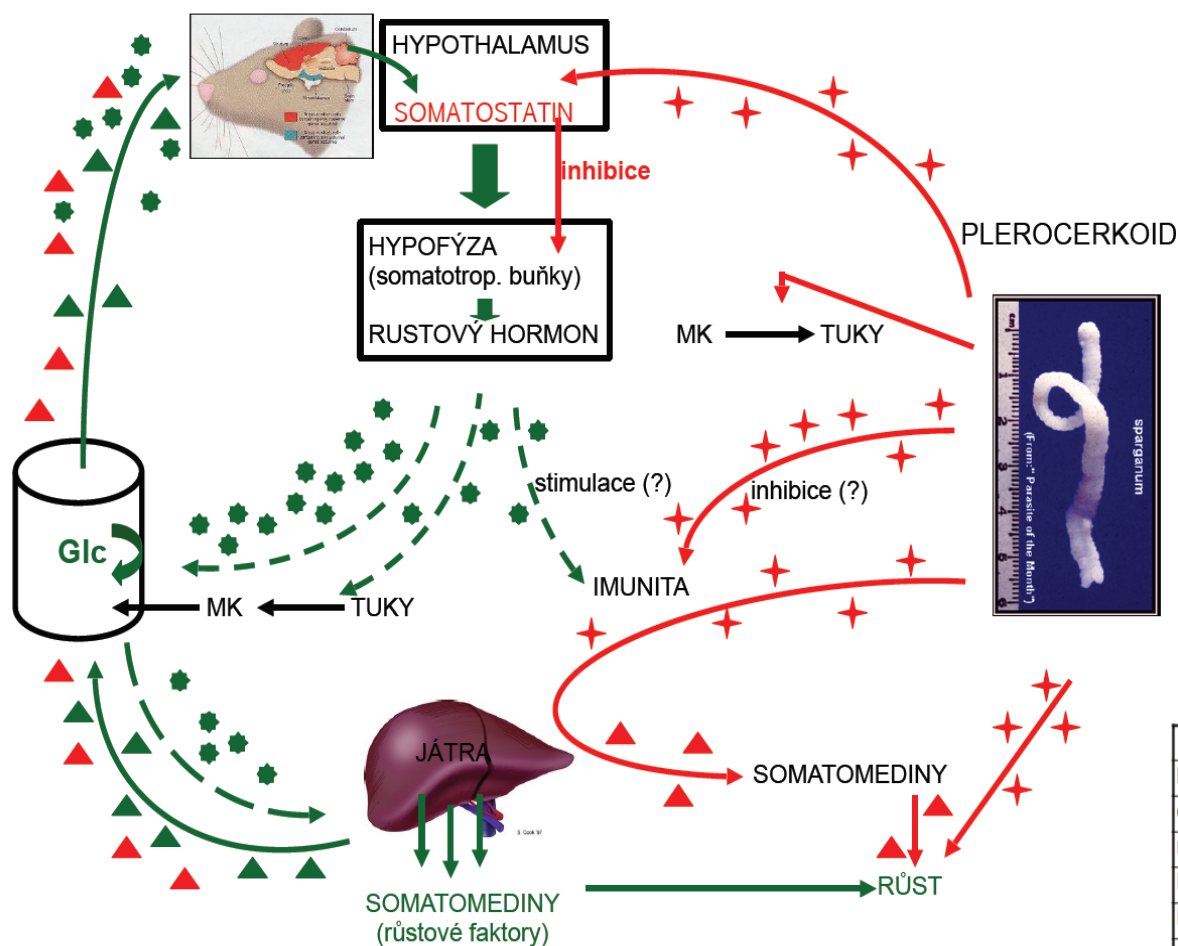
Produkce analogů hostitelských hormonů parazitem

plerocerkoidy *Spirometra mansonoides*

růst potkanů a myší
(69 týdnů p.i.; 8 larev podkožně; 69g vs. 39g)



podkožně; 69g vs. 39g)



Srovnání některých vlastností somatotropního hormonu a "plerocercoid growth factor"

	STH	PGF
hmotnost těla	zvyšuje	zvyšuje
délka těla	zvyšuje	zvyšuje
růst kostí	zvyšuje	zvyšuje
lipolytický účinek	ano	ne
lipogenní účinek	ne	ano
diabetogenní účinek	ano	ne

DALŠÍ ZAJÍMAVÉ MODELY

produkce analogů hostitelských hormonů či regulačních peptidů

- *Moniezia expansa*
 - mezičlankové žlázy
 - regulační peptid VIP (vasoactive intestinal polypeptide)
 - výjimečná lokalizace mimo nervovou soustavu helmintů
 - obdoba hostitelského peptidu
 - uvolňování vody do střeva napadeného hostitele
 - inhibice hladké svaloviny



Moniezia expansa
mature proglottids



(by P.W. Pappas and S.M. Wardrop)

DŮSLEDKY PATOLOGIE A HORMONY

Lidské schistosomy a hormony

- *Schistosoma mansoni*

hormony štítné žlázy – snížení hladiny – malí červi

- zvýšení hladiny - velcí červi s dřívějším kladením vajec,

- vyšší reprodukční kapacita než u normálních host.

Receptory pro
hormony

produkce adenokortikotropního hormonu (=kortikotropin, ACTH)

prokázána přítomnost genu pro tento hormon zpracován peptidázou

enkefalináza) na povrchu imunitních buněk na α -melanocyty stimulující hormon (MSH)

MSH inhibuje hemocyty plžů či monocyty savců

Produkce
hormonů

- *Schistosoma japonicum*

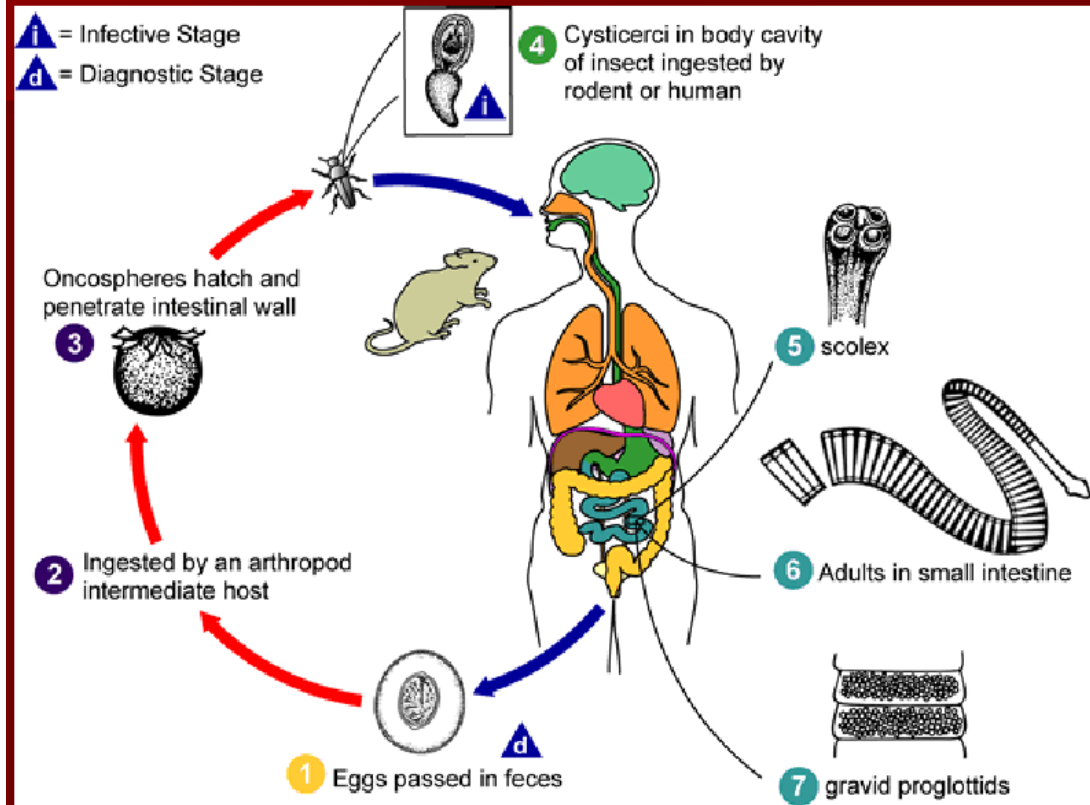
geny pro období savčích receptorů pro inzulin, progesteron, atd.

geny pro komponenty signálních drah po vazbě somatostatinu a hormonů štítné žlázy

Geny pro receptory a
signální kaskády

DALŠÍ ZAJÍMAVÉ MODELY

model *Hymenolepis diminuta* x *Tenebrio molitor*



u brouků infekce působí:

- tlumení fotofobních reakcí
- snížení reakce na agregační feromon
- snížení reakce samců na sexuální feromon samic
- snížení pohybové aktivity
- snížení produkce vajíček
- zpoždění kladení vajec
- redukce počtu vajec
- snížení životaschopnosti vajec

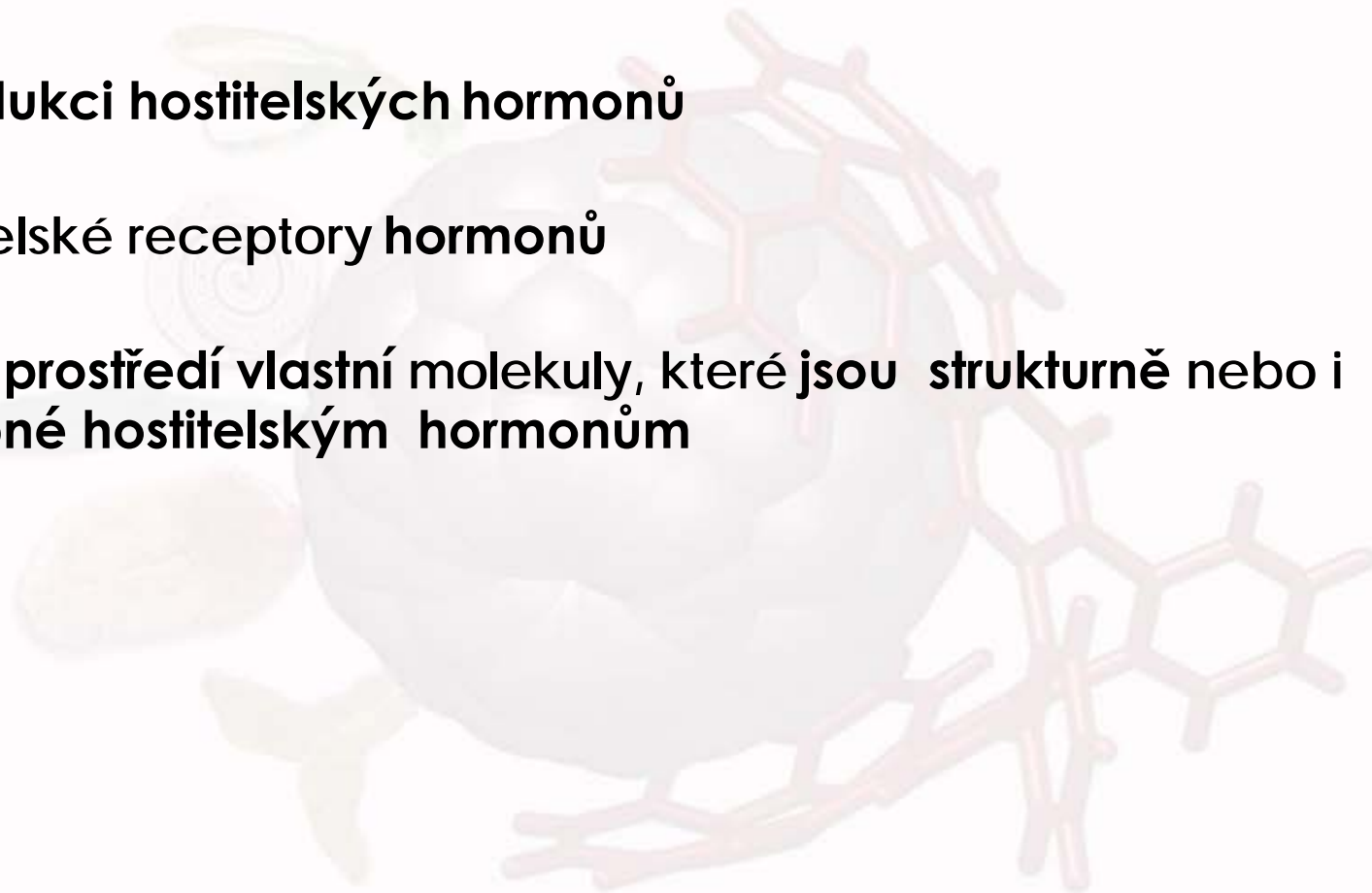
resorbce některých folikulů

zpomalení vývoje oocytů

blokáda vaječných receptorů pro vitelogenin

ZÁVĚR

- registrovat hladiny hostitelských hormonů
- exprimovat receptory pro tyto hormony
- ovlivňovat produkci hostitelských hormonů
- blokovat hostitelské receptory hormonů
- produkovat do prostředí vlastní molekuly, které jsou strukturně nebo i funkčně obdobné hostitelským hormonům

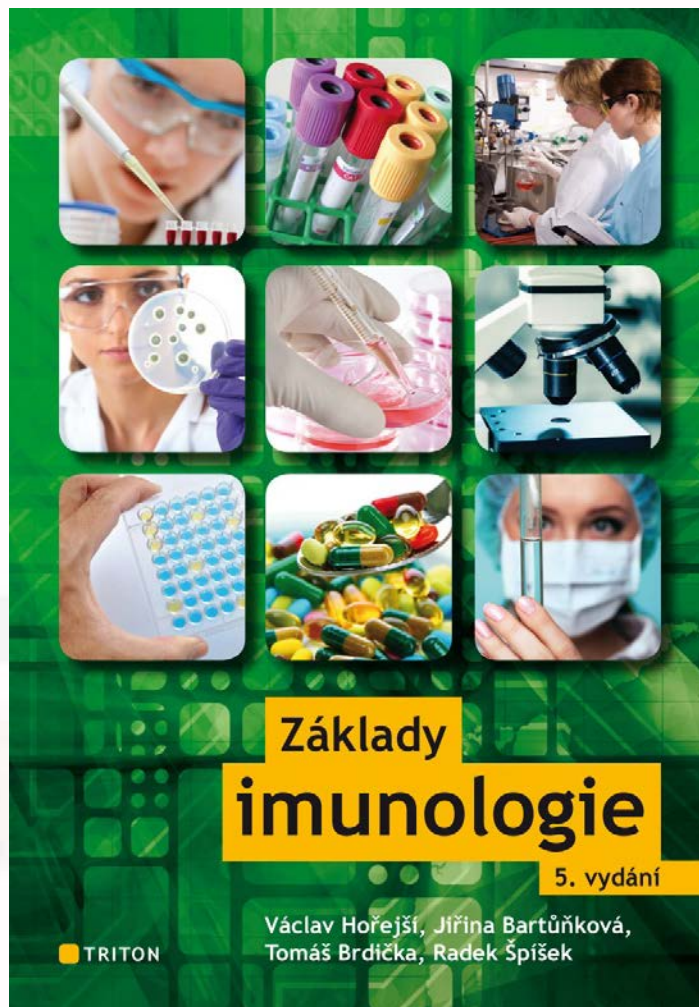


5.

INTERAKCE S IMUNITNÍM SYSTÉMEM HOSTITELE



DOPORUČENÁ LITERATURA



(2013)

IMUNITA

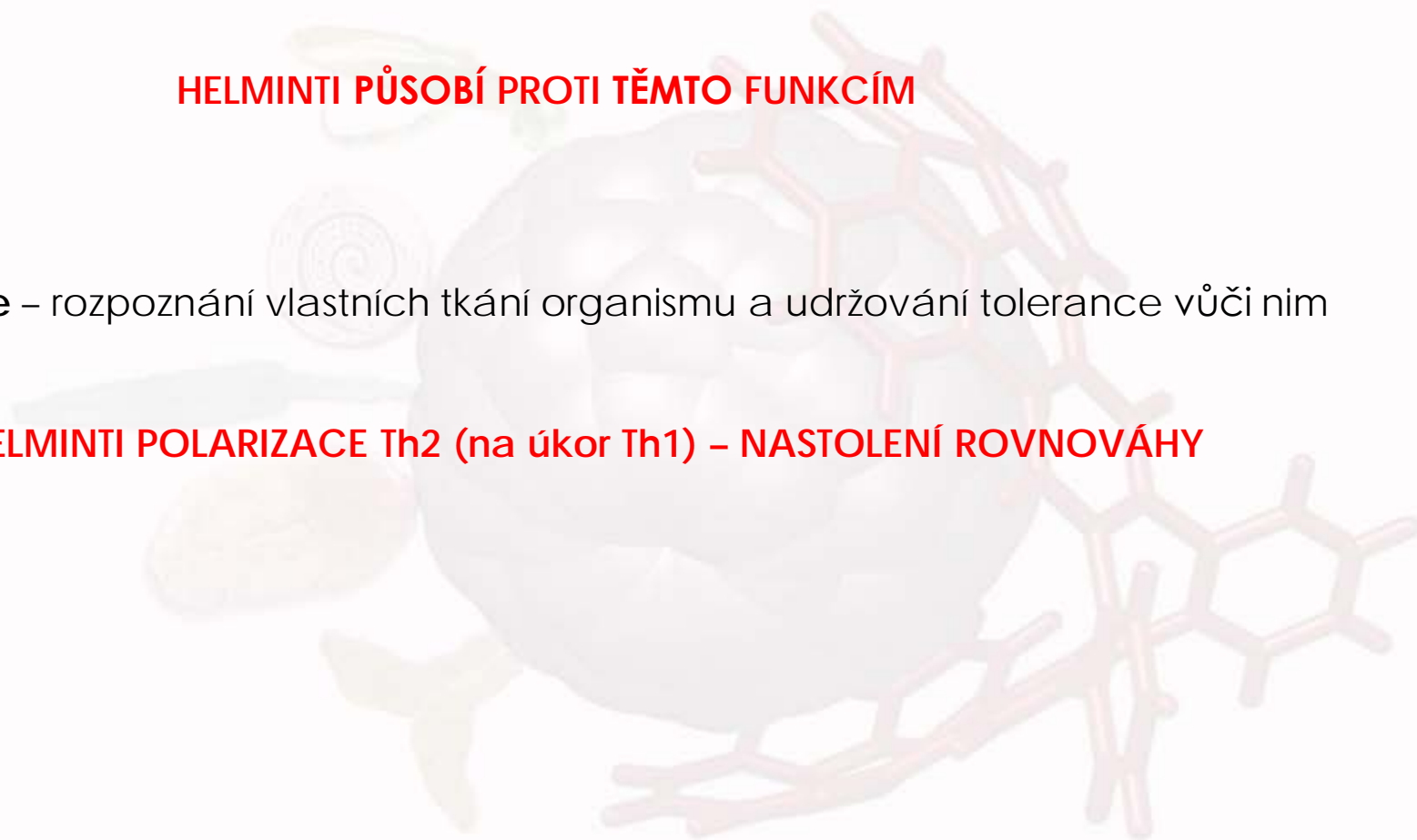
fce

- **obranyschopnost** – rozpoznání vnějších škodlivin a ochrana organismu proti patogenním mikroorganismům

HELMINTI PŮSOBÍ PROTI TĚMTO FUNKCÍM

- **autotolerance** – rozpoznání vlastních tkání organismu a udržování tolerance vůči nim

HELMINTI POLARIZACE Th2 (na úkor Th1) – NASTOLENÍ ROVNOVÁHY

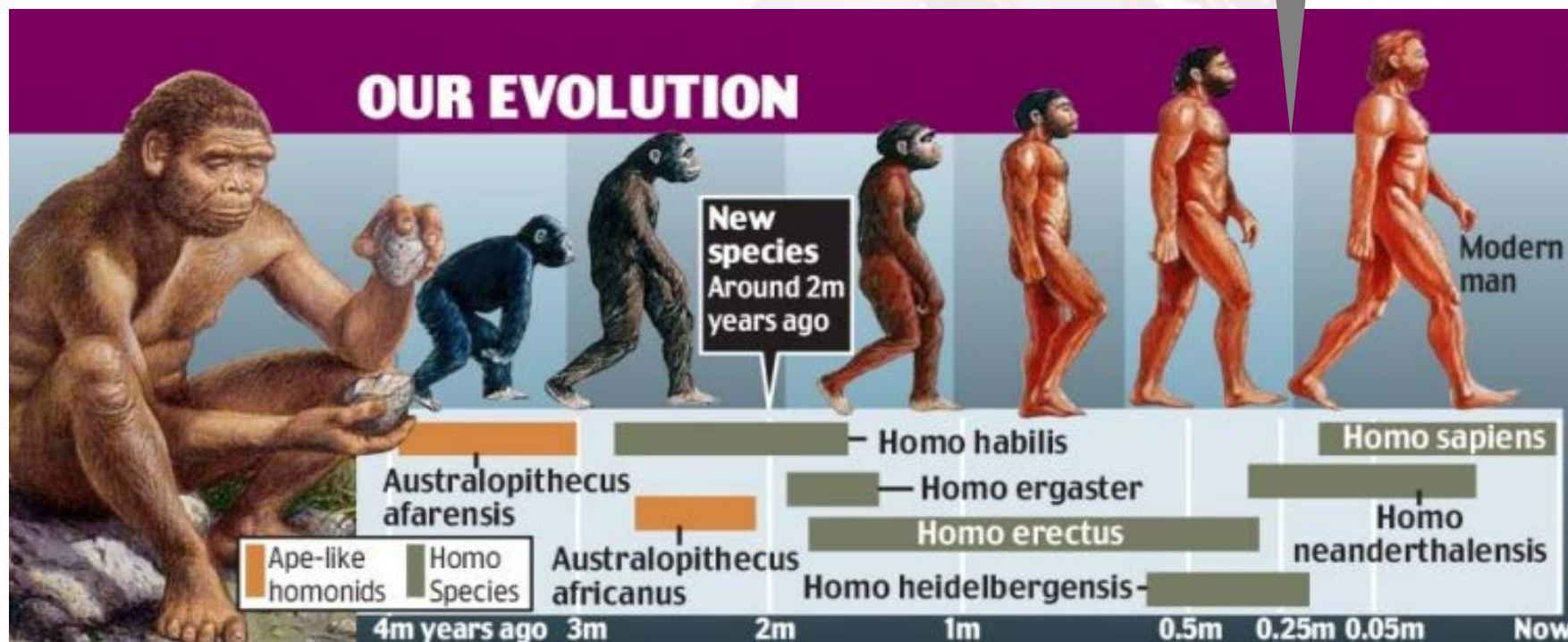


IMUNITA

Evoluce

Od počátku evoluce člověka, tedy přibližně 200 000 let, jsme parazitováni červy

OBOUSTRANNÁ ADAPTACE



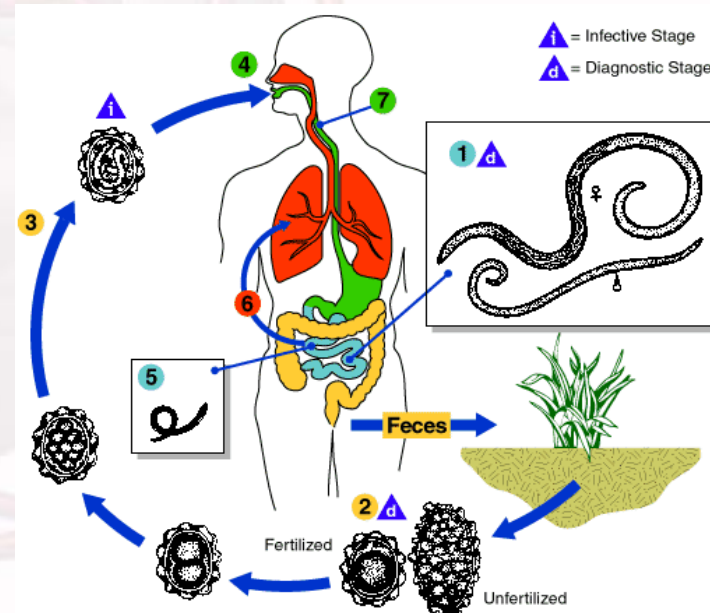
BARIÉRY

Překážky vstupu helmintů do organismu

- **Mechanické**
 - Kůže – helminti disponují nástroji k průniku a orientaci
 - Sliznice (hleny, slizy, mukus, obměna buněk) – obrana host. org., ale i zdroj živin pro helminty
- **Chemické**
 - mastné kys. Na kůži, enzymy – pepsin, nízké pH
- **Mikrobiální**
 - normální mikroflóra – zabránění přilnutí , produkce anipatogenních substancí

Ochranné funkce a reflexy (kýčání, kašel, zvracení, zrychlená střevní peristaltika) – někdy napomáhají přenosu helmintů

Ascaris lumbricoides



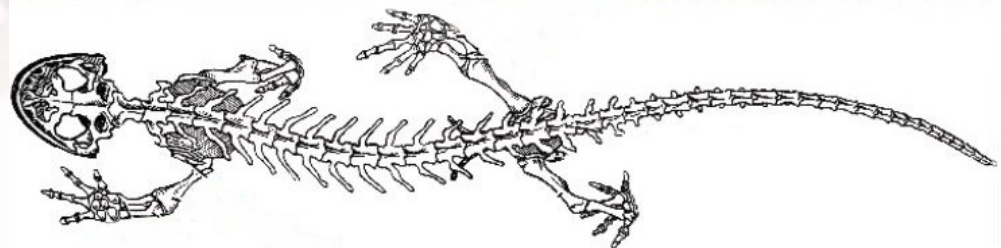
IMUNITA OBRATLOVCŮ

nespecifické mechanismy (neadaptivní, "vrozené")

- evolučně starší
- humorální faktory a buňky
- připraveny v těle předem
- širší spektrum účinnosti
- rychlá reakce (minuty) není
- imunologická paměť
- buněčné
 - fagocyty
 - NK buňky
- humorální
 - komplement
 - interferony
 - lektiny
 - jiné sérové proteiny

specifické mechanismy (adaptivní)

- evolučně mladší
- antigenně specifické
- aktivace až po setkání s antig.
- imunologická paměť
- buněčně zprostředkované mechanismy
 - především T-buněčné
- humorální mechanismy
 - protilátky



IMUNITA OBRATLOVCŮ

Nespecifické mechanismy buněčné imunity - FAGOCYTY

- Neutrofily (polymorfonukleáry) – proti původcům hnisavých infekcí (většina bakterií)

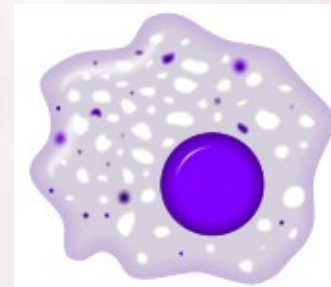


neutrofil

- Makrofágy – proti intracelulárně se množícím agens (intracelulární bakterie, viry)



monocyt



makrofág

IMUNITA OBRATLOVCŮ

Nespecifické mechanismy buněčné imunity – NK buňky

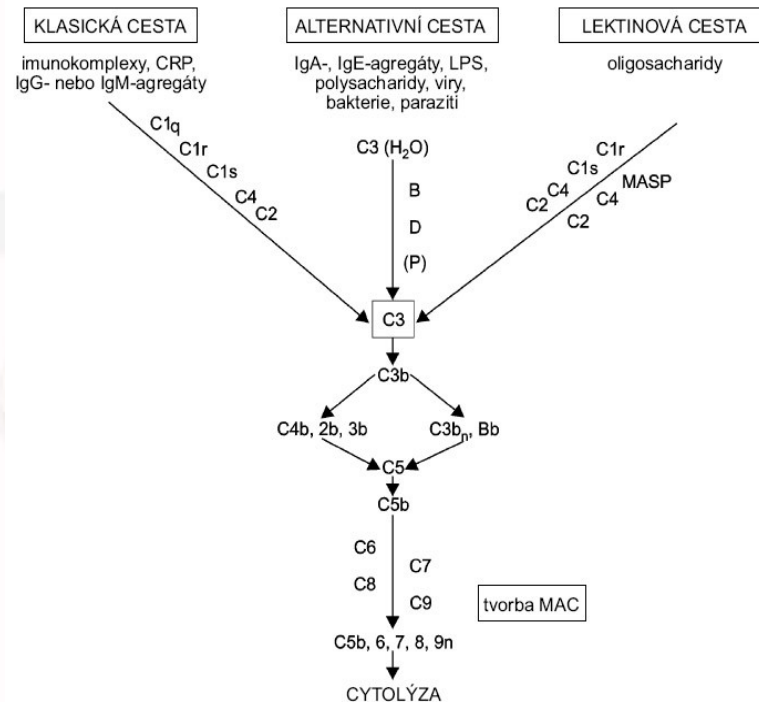
- z angl. *natural killers* – přirození zabíječi
- velké granulární lymfocyty
- obrana proti virovým infekcím



IMUNITA OBRATLOVCŮ

Nespecifické mechanismy humorální imunity – komplement

- systém bílkovin přítomných v krevním séru C1 – C9 (fragmenty a, b)
- aktivace klasickou, alternativní a lektinovou drahou
- kaskádový jev – produkt jedné reakce katalyzuje další reakci
- Význam: chemotaxe (C5a, C3a), anafylaxe (C3a, C5a), opsonizace (C3b), lýza buněk (membránový útočný komplex C5b6789)



IMUNITA OBRATLOVCŮ

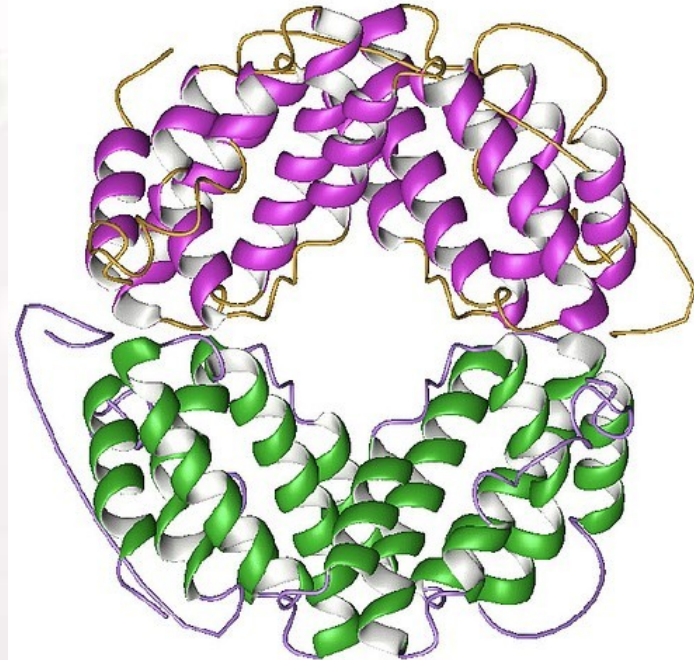
Nespecifické mechanismy humorální imunity – interferony

- univerzální účinek
- Význam: antivirový, antiproliferativní, imunomodulační účinek

IFN α

IFN β

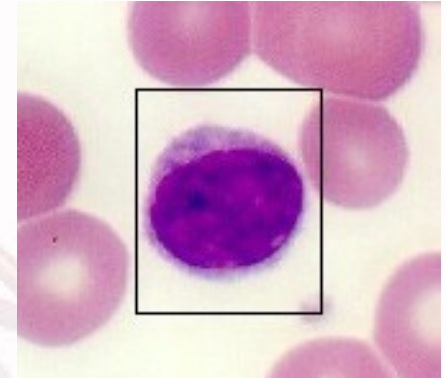
IFN γ



IMUNITA OBRATLOVCŮ

Specifické mechanismy buněčně zprostředkované imunity – T-lymfocyty

- kmenové buňky z kostní dřeně
- **T** dozrávání v **t**hymu



- **cytotoxické T buňky** (Tc) – zabíjejí antigenně změněné buňky (b. infikované viry)
- **pomocné T buňky** (Th) – produkují cytokiny, Th1 (aktivace makrofágů, intracelulární patogeny), Th2 (**aktivace B buněk, extracelulární patogeny**)
- **supresorové T buňky** (Ts) – tlumí imunitní reakci

IMUNITA OBRATLOVCŮ

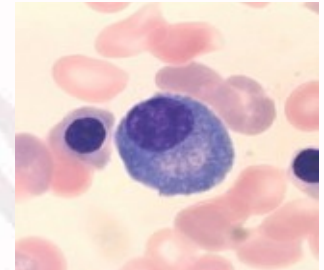
Specifické mechanismy buněčně zprostředkované imunity – B-lymfocyty

- **B** – u ptáků dozrávání ve Fabriciově **b**urse, u savců v kostní dřeni (**b**one marrow)

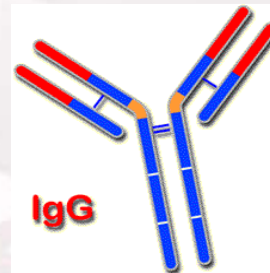
- lymfocyty B



plazmatické buňky



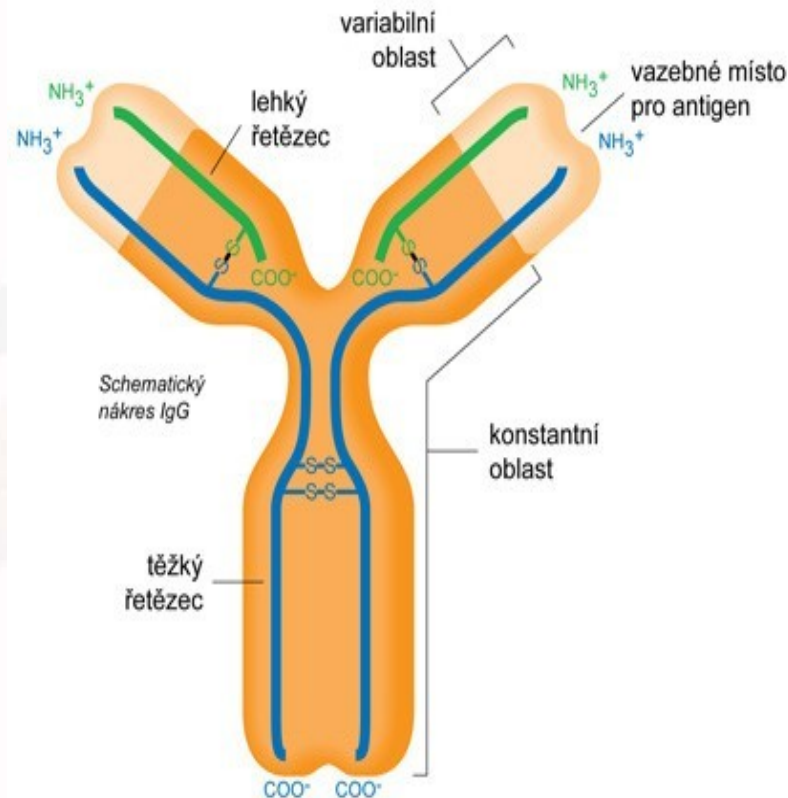
produkce protilátek (imunoglobulinů)



IMUNITA OBRATLOVCŮ

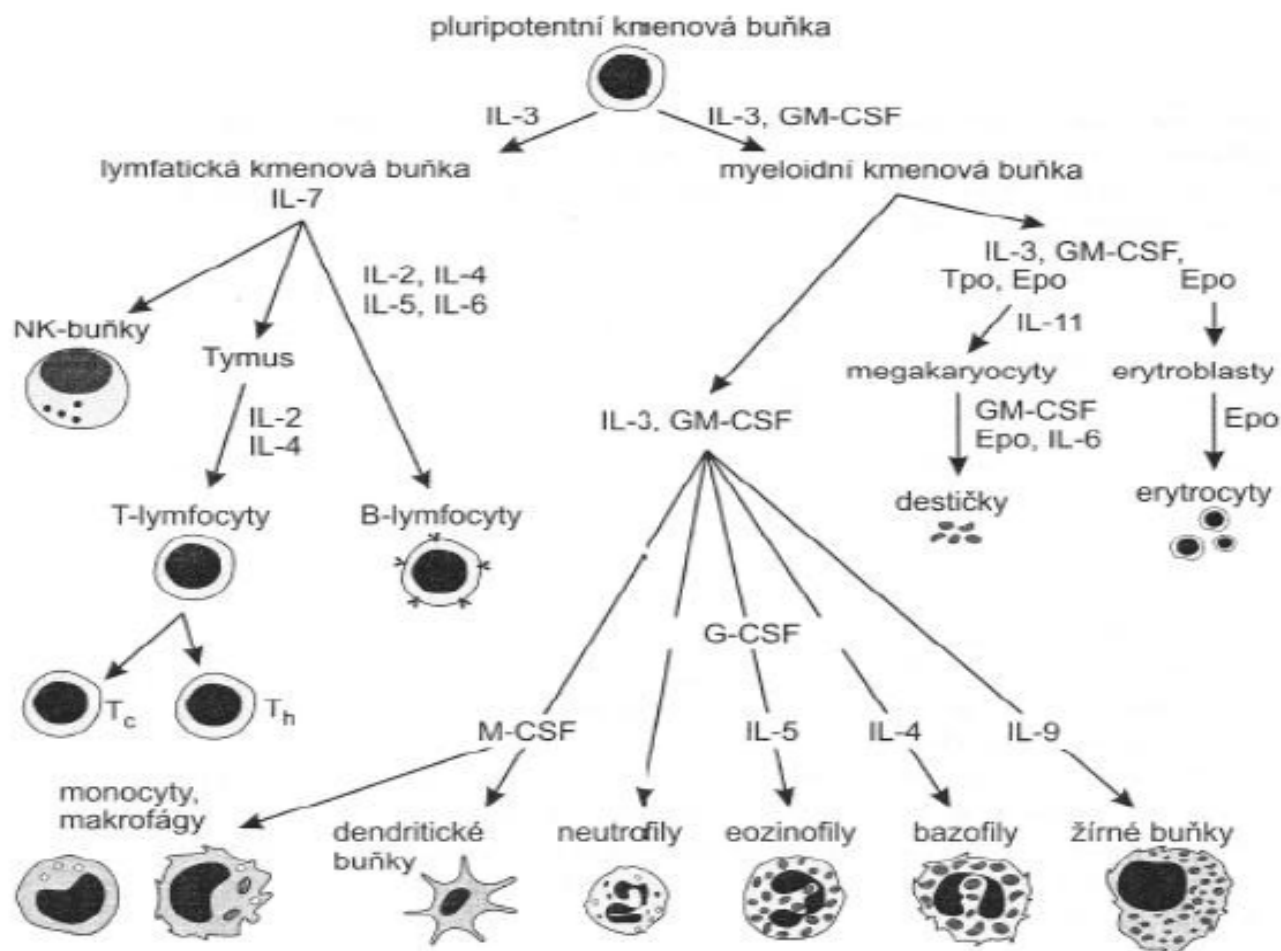
Specifické mechanismy humorální imunity – protilátky

- imunoglobuliny schopné specificky se vázat na antigen
- tvořeny plazmatickými buňkami (plazmocyty)
- třídy imunoglobulinů: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE



IMUNITA OBRATLOVCŮ

Obr. 7: Schéma krvetvorby. (hematopoéza – z kmenových buněk vznikají progenitorové buňky, které jsou nasměřované k diferenciaci na základní typy krevních buněk), (Toman 2000).



IMUNITA OBRATLOVCŮ

Specifické mechanismy humorální imunity – protilátky

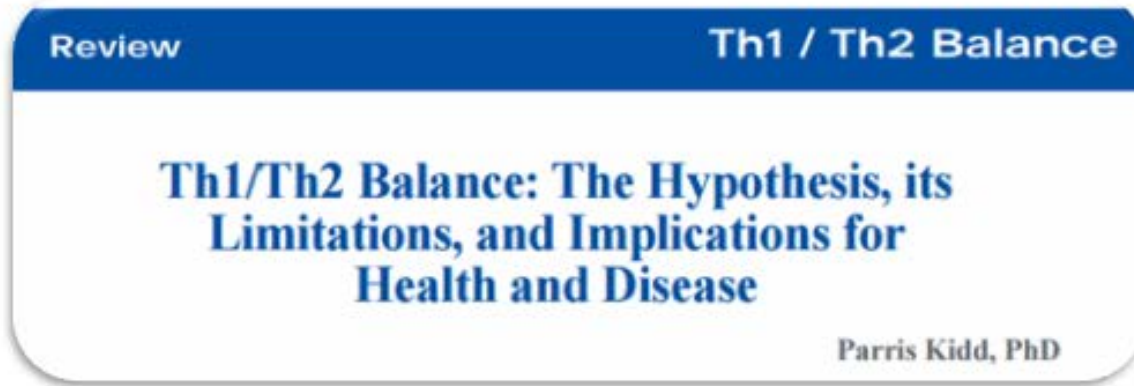
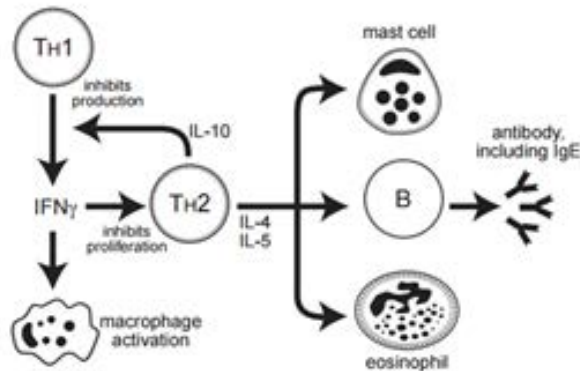
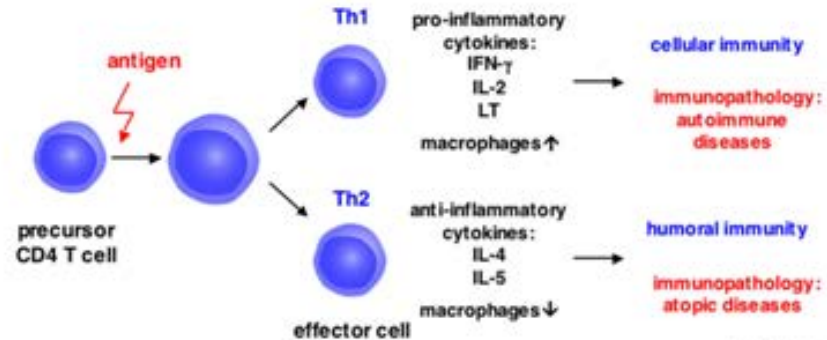


Figure 1. Textbook Representation of the Th1/Th2 Hypothesis



Adapted from: Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology (Fifth Edition). Philadelphia: Mosby, 1998.

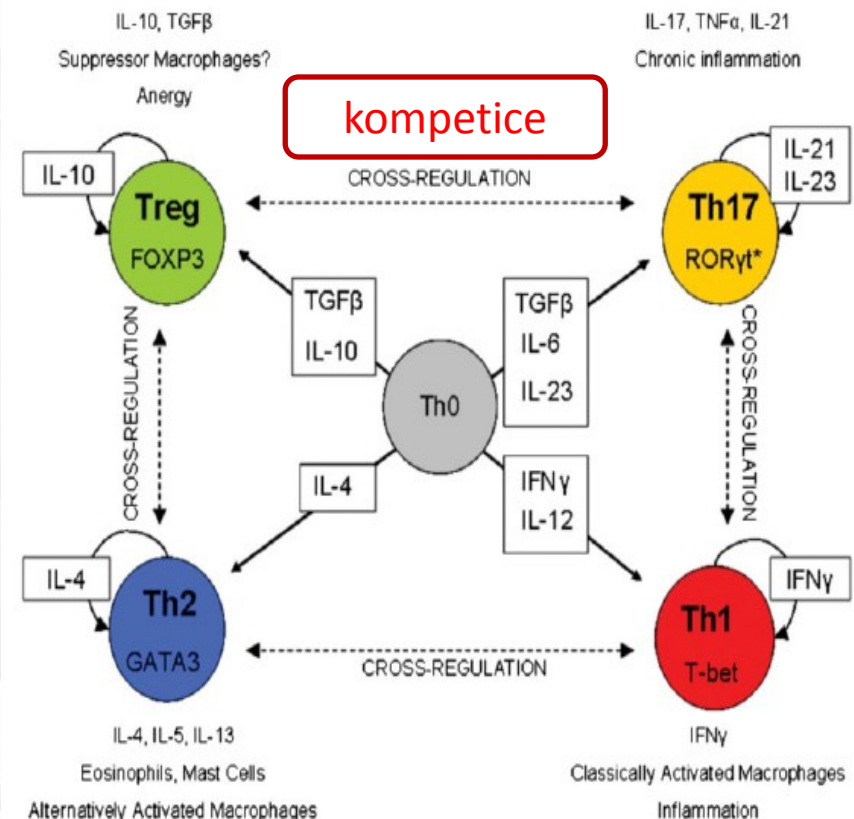
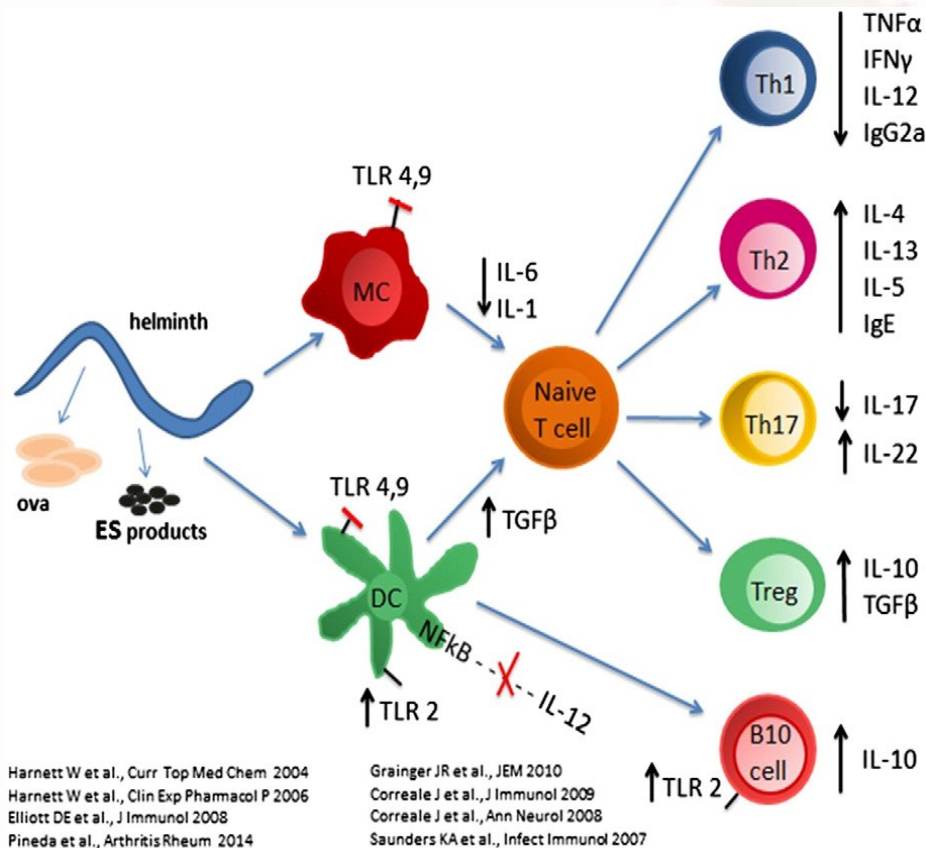
Th1 cells secrete the cytokine interferon-gamma and activate inflammatory pathways mainly via macrophage activation. Th2 cells secrete cytokines interleukin-4 and -5 that upregulate antibody formation via B cells, mast cells, eosinophils, and other pathways. Th1 and Th2 cells can cross-inhibit each other.



IMUNITNÍ SYSTÉM HOSTITELE A HELMINTI

Obecná charakteristika helmintóz z pohledu imunologie

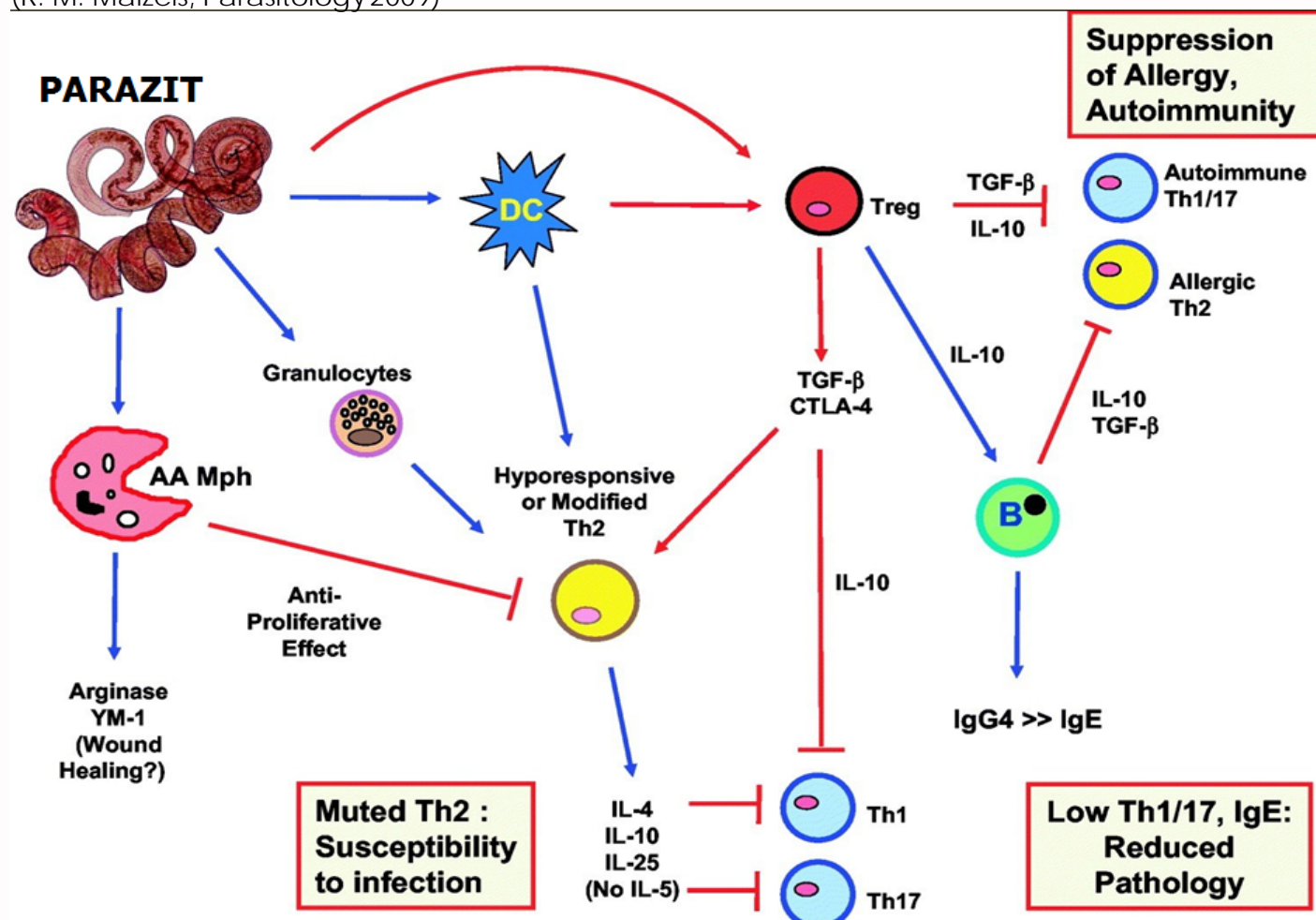
- CD4⁺ T lymfocyty
- polarizace imunitní odpovědi směrem **Th2/Treg** produkce
- protizánětlivých cytokinů, zejména **IL-10** rostoucí význam dalších buněk, např. bazofilů obvykle stimulace produkce **IgE a IgG4**



IMUNITNÍ SYSTÉM HOSTITELE A HELMINTI

Obecná charakteristika helmintóz z pohledu imunologie

(R. M. Maizels, Parasitology 2009)



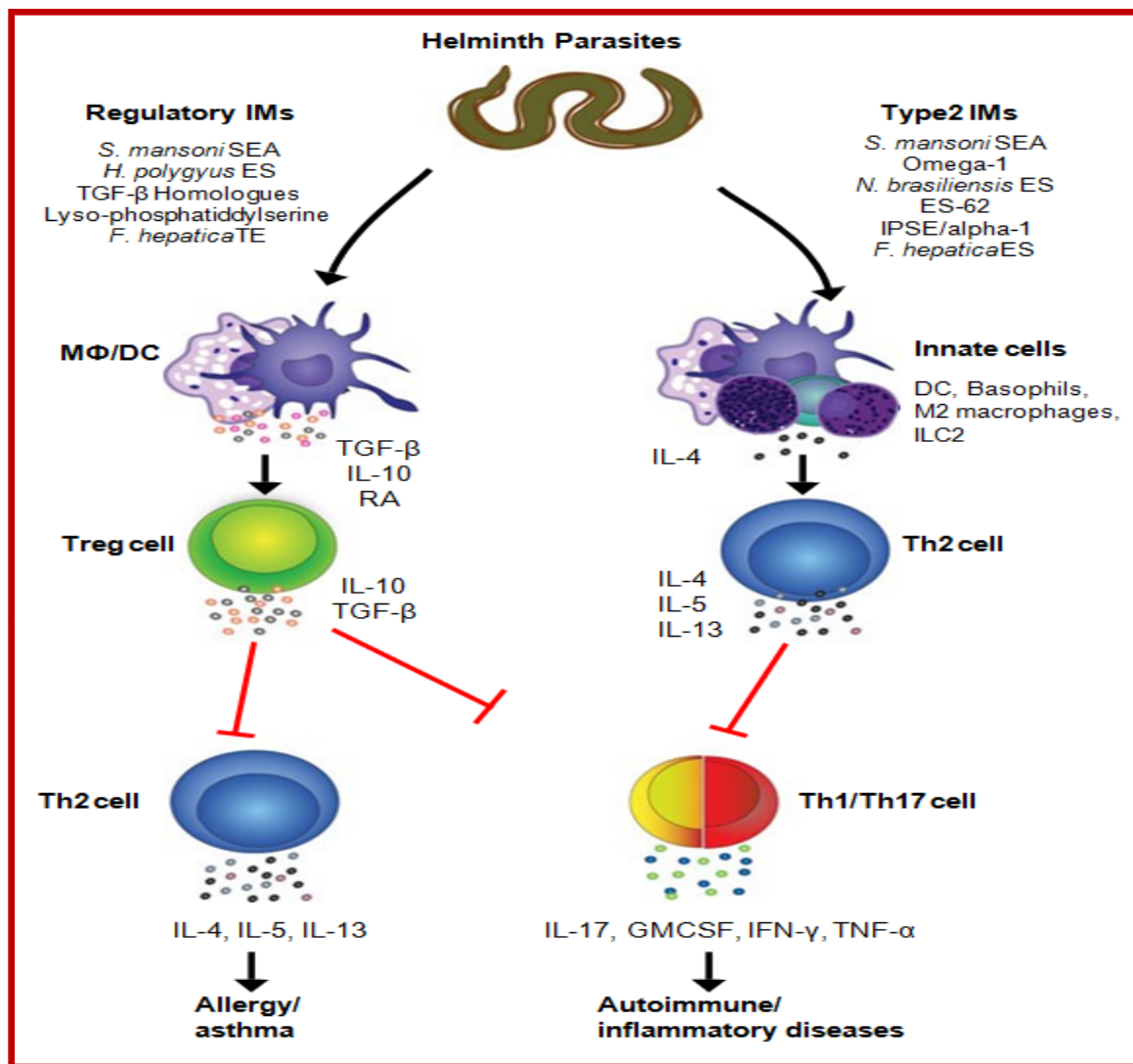
→ aktivační signál

→ regulační signál

— inhibice

IMUNITNÍ SYSTÉM HOSTITELE A HELMINTI

Obecná charakteristika helmintóz z pohledu imunologie



IMUNITNÍ SYSTÉM HOSTITELE A HELMINTI

vliv helmintů na virové a bakteriální infekce

osoby infikované helminty

- snížená odpověď (příp. neschopnost eliminace) na akutní virové infekce
hepatitis C, hepatitis B, infekce HIV
30% pacientů s HCV v akutní fázi se uzdravilo
všichni s HCV + *S. mansoni* přešli do chronické fáze hepatitidy
- výraznější projevy virových infekcí (patologie)
hepatitis C, hepatitis B, infekce HIV
- snížená odpověď na vakcinaci
záškrt, tetanus

Jak postupovat v budoucnosti?

Jak aplikovat vakcínu proti HIV, pokud bude vytvořena?

EFEKTOROVÉ MECHANISMY IMUNITY HOSTITELE

Digenea, Diplostomida, **př.** Schistosomatidae

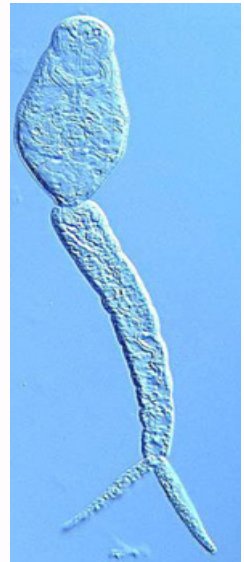
1. cercárie: glykokalyx, glykogen
vyhledání hostitele, např. podle teplotního gradientu
penetrace kůže = 1. kritický moment
ztráta ocásku, glykokalyx

2. schistosomula: migrace = 2. kritický moment:
srdce, plíce, játra

3. dospělec: kopulace v portálním systému,
druhově specifická definitivní lokalizace.
dlouhověkost, neúčinná imunita hostitele.

4. vejce

většina klinických projevů: granulomy,
narušení krevního oběhu a změny kolagenních struktur
uvolnění z tkání: lytické enzymy a trny
S. haematobium: záněty moč. měchýře, hydronefrosa,
sek. sterilita, přidružené infekce, indukce tvorby nádorů
S. mansoni: portální a pulmonální hypertenze,
hepatosplenomegalie, oesophageální varixy.
Různé typy hypersenzitivních reakcí, chronické mechanické dráždění



EFEKTOROVÉ MECHANISMY IMUNITY HOSTITELE

Digenea, Diplostomida, **př.** Schistosomatidae

• Mechanismus penetrace kůže z pohledu imunitní odpovědi

- Stimulace: kontakt s lipidy hostitele, ty lipázou cercárie na eikosanoidy (leukotrieny, prostaglandiny)
Prostaglandiny: vazodilatace, imunosuprese.
Leukotrieny: uvolnění obsahu acetabulárních žláz: hlavně serinové proteázy, elastázy.
- Štěpení-peptidázy: keratin, elastin, kolagen v dermis, odpovědné za odvržení glykokalyx.
Snažší nalezení kapiláry bez imunitní reakce
Specifita elastáz, katepsinů a jiných histolytických enzymů různých druhů.
- Penetrace do nespecifického hostitele.
opakovaně => nedokončí migraci
vznik hypersenzitivních reakcí
(zejména při předchozí senzibilizaci),
cercáriová dermatitida, "swimmers itch".



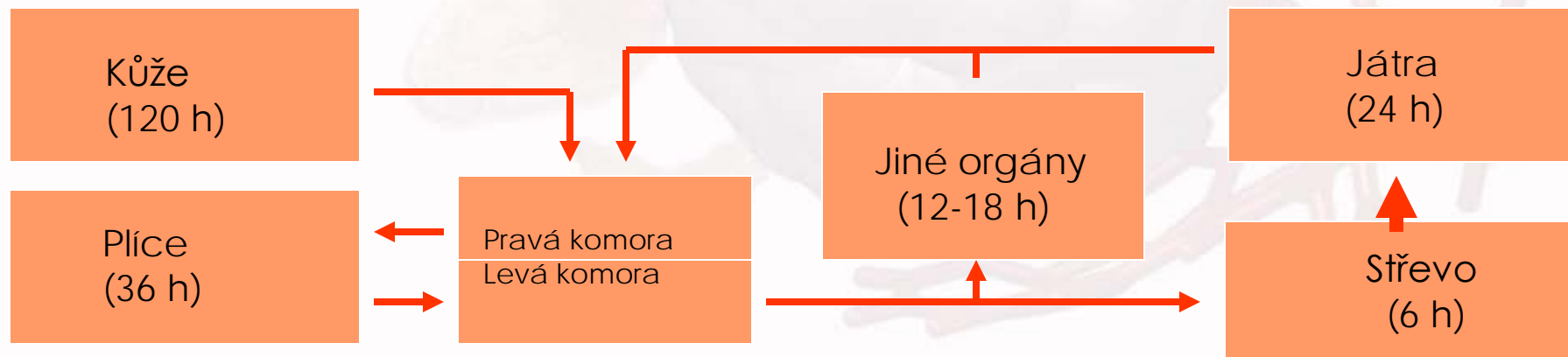
EFEKTOROVÉ MECHANISMY IMUNITY HOSTITELE

Digenea, Diplostomida, **př.** Schistosomatidae

- **Nespecifická** (nesterilní imunita, konkomitantní) - limituje superinfekci.
 - jen částečná, u starších lidí nahrazena im. sterilní.
- **Specifická** (sterilní imunita) - vyvíjí se velmi pomalu,
 - reinfekce běžné do 10 let, po 15 roce vzácné.
 - nejvíce infikovaná věková kategorie 10-15 let.
 - rychleji se sterilní imunita vyvíjí při častějším
 - styku s infekcí (v endemických oblastech).

Imunita proti larválním stádiím

Imunitní reakce může efektivně zničit schistosomuly ve dvou fázích :
při průniku **kůží** a při migraci **plicemi**. Souvisí s poločasem zdržení v orgánech



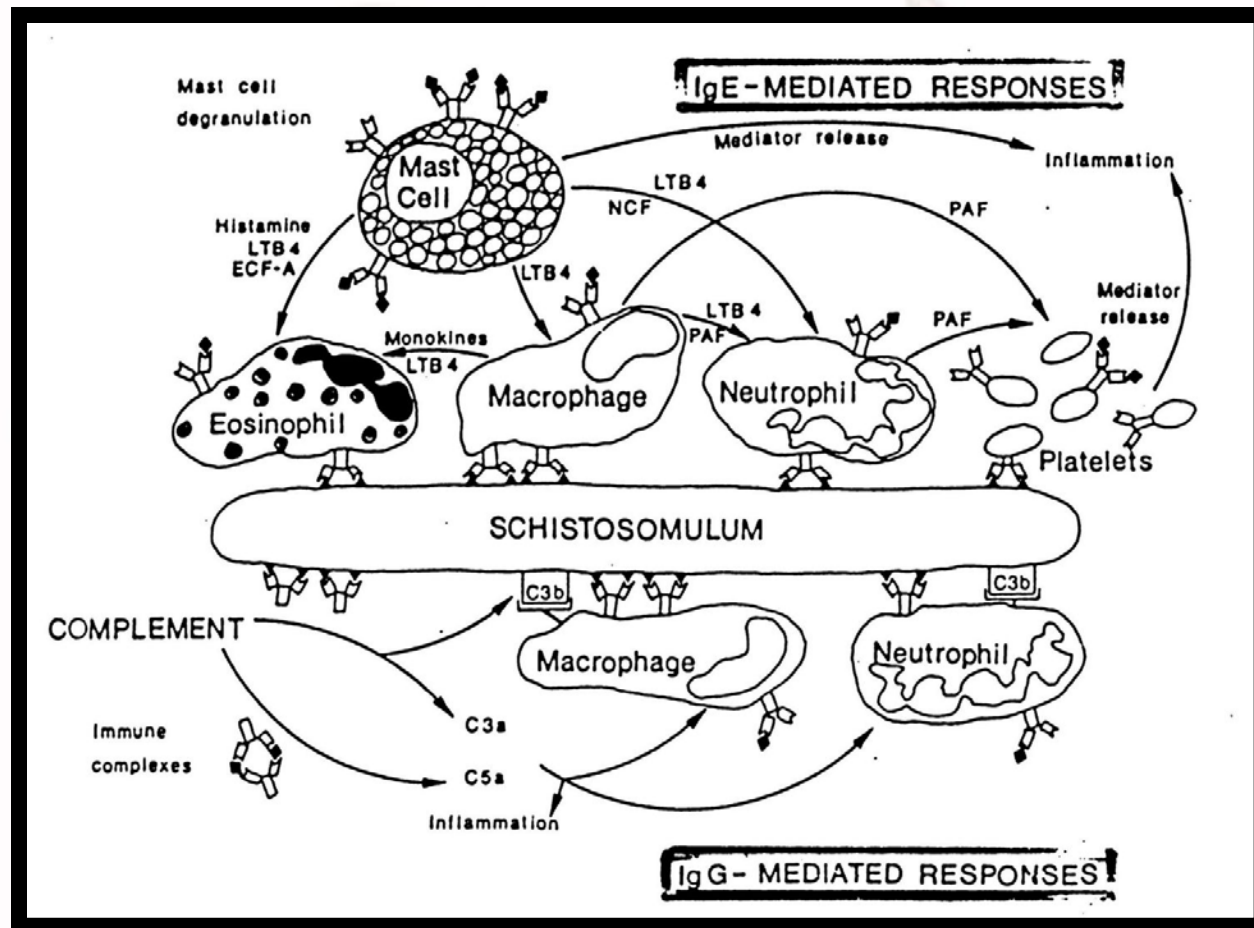
EFEKTOROVÉ MECHANISMY IMUNITY HOSTITELE

Digenea, Diplostomida, **př.** Schistosomatidae

Kožní fáze imunitní odpovědi

Efektorové buňky: eosinofily, neutrofily, makrofágy

Efektorové protilátky: IgE, IgG

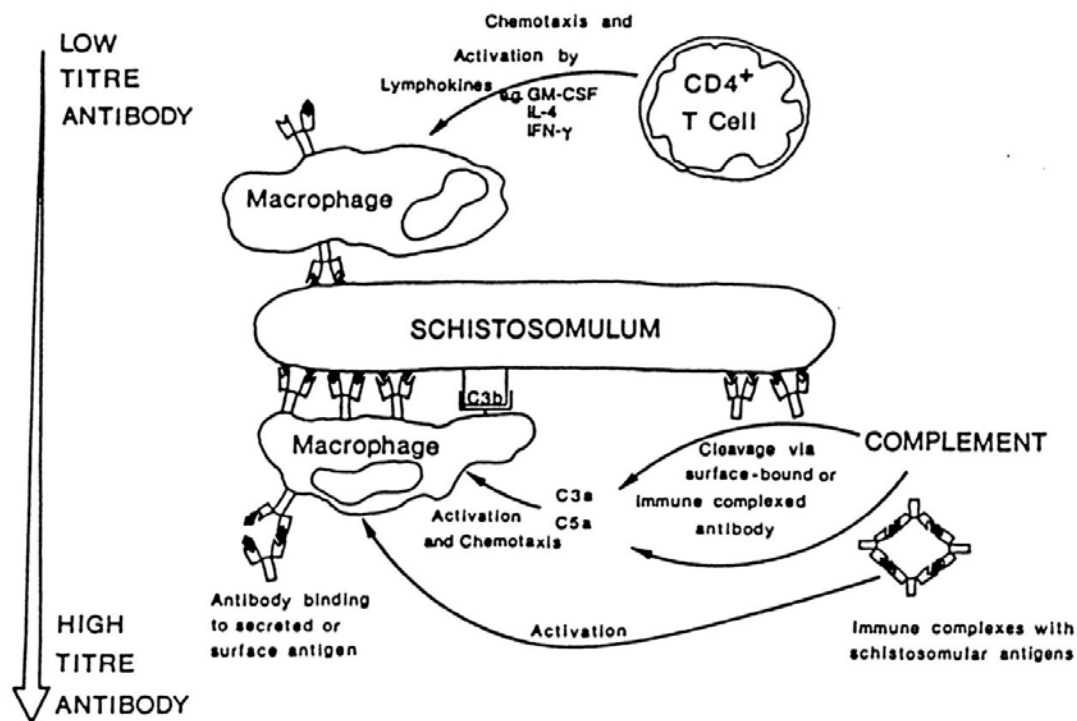


EFEKTOROVÉ MECHANISMY IMUNITY HOSTITELE

Digenea, Diplostomida, **př.** Schistosomatidae

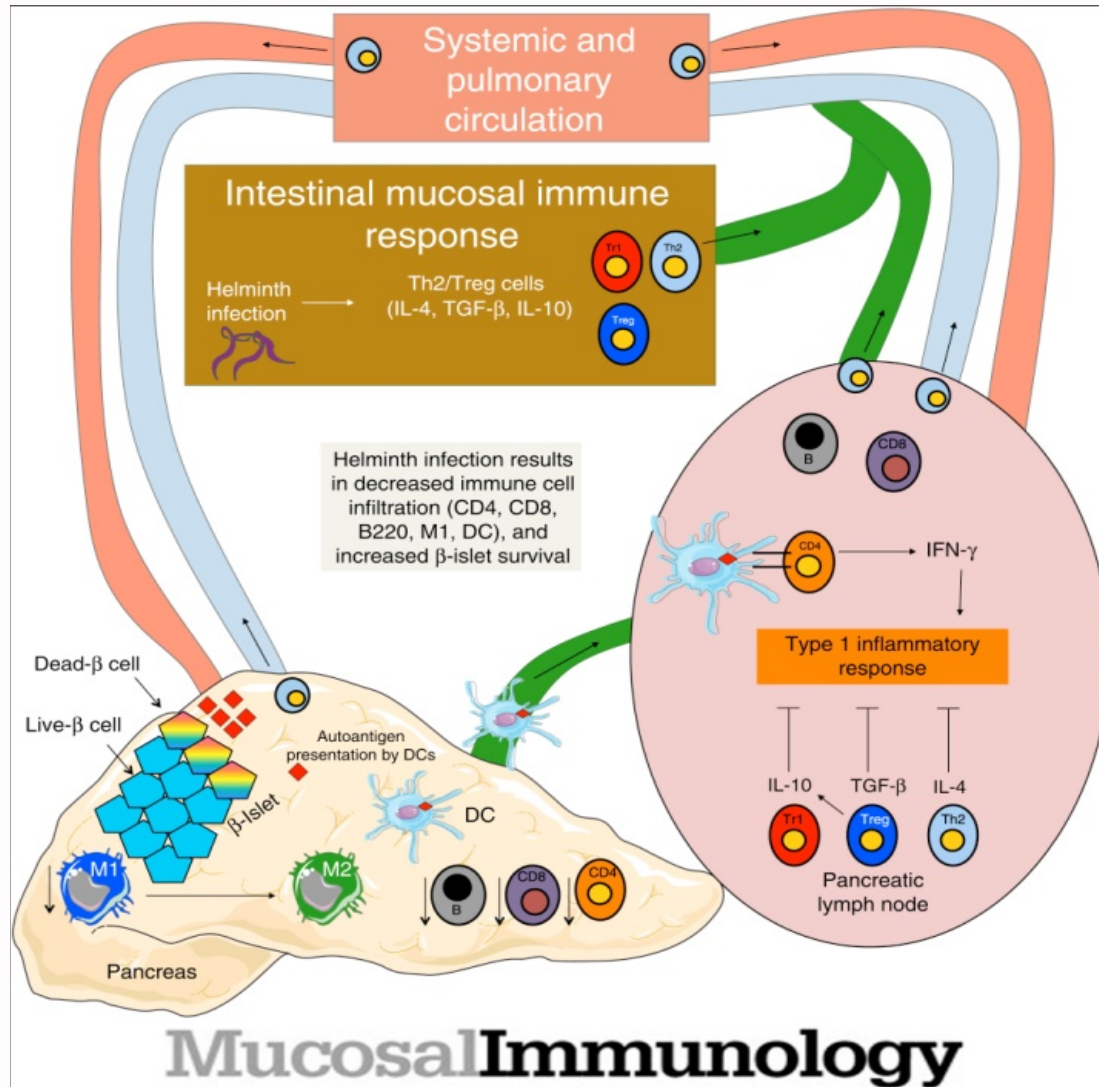
Plicní fáze imunitní odpovědi

Efektorové buňky: makrofágy, kooperace s T-lymfocyty či IgG



Náchylnost laboratorních modelů dána imunitním systémem
 myš: citlivá k první infekci, nízké titry Ab, klíčové T-lymfocyty
 potkan: imunní vůči 1. infekci, vysoká tvorba Ab a komplementu
 člověk: oba mechanismy, záleží na koncentraci Ab

EFEKTOROVÉ MECHANISMY IMUNITY HOSTITELE



Intestinal helminths trigger immune regulatory cells that can inhibit type 1 diabetes and associated inflammation. Intestinal helminth infection stimulates the development of a potent **type 2** immune response in the pancreatic lymph node associated with decreased islet beta cell-specific interferon gamma (IFN- γ) producing **Th1** cells and an increase in interleukin (IL)-4, transforming growth factor beta (TGF- β), and auto antigen-specific T cells producing **IL-10**. We propose that this may occur because the helminth-induced immune microenvironment in this draining lymph node alters dendritic cell (DC) activation such that these auto-antigen presenting cells now favor the development of regulatory Tr1 cells instead of inflammatory Th1 cells. We propose that this effect dampens the stimulus provided by IFN- γ that would otherwise promote the development of an inflammatory response leading to invasive insulitis and destruction of islet beta cells. It should be noted that in this context the spleen may also be an important source regulatory cell populations and cytokines.

EFEKTOROVÉ MECHANISMY IMUNITY HOSTITELE

Digenea, Diplostomida, **př.** Schistosomatidae

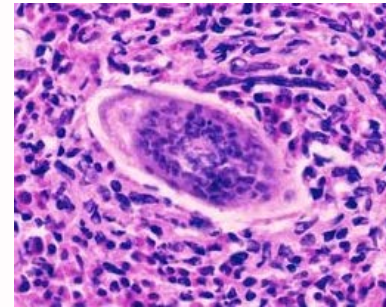
• schistosomula

Klíčová buňka = makrofág

Aktivující lymfocyty Th1 produkují klíčové interleukiny IL2 a IFN (záněť)

V kožní fázi efektorovými buňkami mastocyty, eosinofily a neutrofily.

Komplement: chemotaxe eosino- a neutrofilů, přímá cytotoxicita



Různorodá funkce protilátek:

Blokující IgM, IgG4 v rané fázi a u mladších (hlavně proti cukerným epitopům)

Protektivní efektorové IgE, IgG1, IgG2 a IgG3, v pozdějších fázích (namířeny proti povrchovým proteinům schistosomul)

Protektivní imunita = vysoké hladiny specifického IgE

Ale: nebezpečí vysokých hladin nespecifických protilátek IgE (obsadí receptory mastocytů, eosinofilů a makrofágů), nebezpečí nespecifických reakcí => autoproti látky a komplikace autoimunitního charakteru.

člověk

vlastnosti protilátek IgG

% celkového IgG

vazba komplementu

vazba na makrofágy

IgG1

67

++

++

IgG2

24

+

--

IgG3

6

+++

++

IgG4

3

--

--

EFEKTOROVÉ MECHANISMY IMUNITY HOSTITELE

Digenea, Diplostomida, **př.** Schistosomatidae

• vajíčka

autoimunitní stavy: podobné cukerné epitopy s hostitelem

Granulomy:

ochrana hostitele před toxickým účinkem X patologie - fibrózy

Indukce specifickými antigeny vajíček, přes T-lymfocyty

Cukerné epitopy, zkřížená reakce s cercáriemi a časnými schistosomulami

Reinfekce zvýší tvorbu granulomů

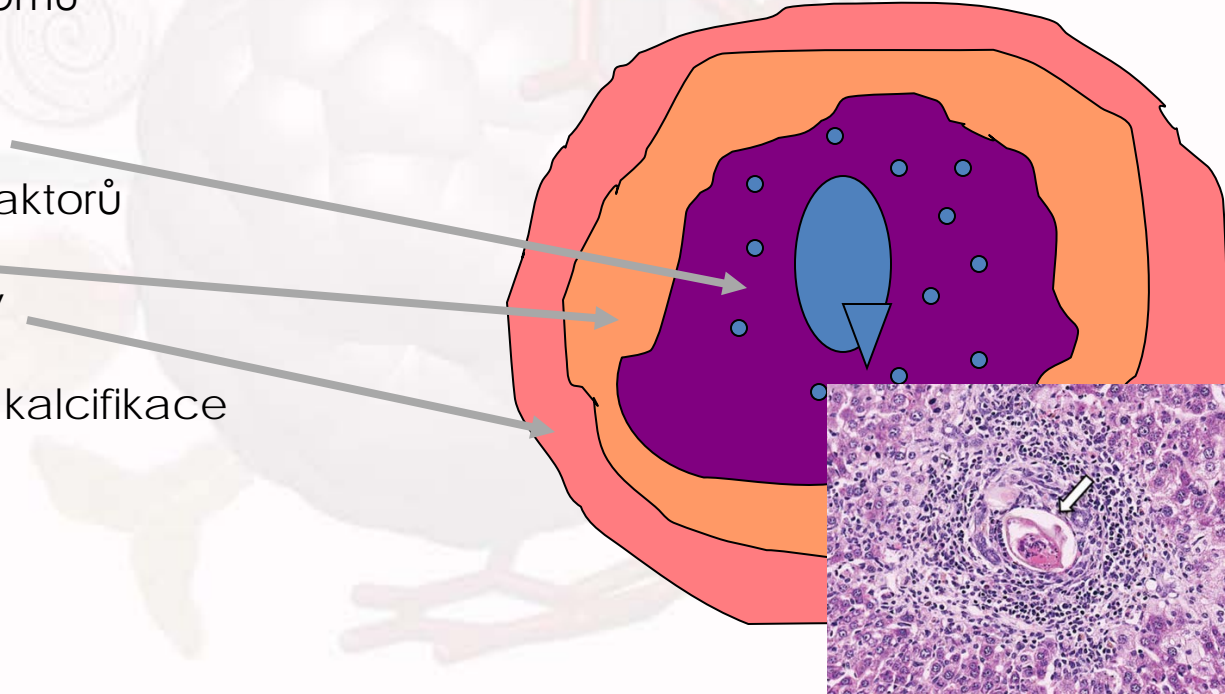


Schéma granulomu:

Většina buněk makrofágy,
produkce chemotaktických faktorů

eosinofily a neutrofily
lymfocyty, plazmatické buňky

nahrazováno fibroblasty, pak kalcifikace



EFEKTOROVÉ MECHANISMY IMUNITY HOSTITELE

Digenea, Diplostomida, **př.** Schistosomatidae

- **Vznik granulomů a patologické změny**

fibrogeneze: migrace fibroblastů, růst, produkce extracel. Matrix. Ovlivněno TNF a dalšími cytokiny

většinou reverzibilní x těžké fibrózy (asi geneticky dáno)
esophageální varixy, polypy, hepato + splenomegalie,
plicní a portální hypertenze
?nádorová onemocnění?

Imunomodulace antigeny vajec: Th1 (INF, IL2 indukující tvorbu granulomů) se sníží, Th2 (IL4, IL5, IL10) se zvýší (im. deviace), vede k redukci granulomů, tvorbě IgE a eosinofilii

Subpopulace lymfocytů mají opačnou roli, než při odpovědi proti larvám.
U granulomů aktivace Th1 nežádoucí.

Ale: přítomnost vajec a Th2 odpověď inhibuje produkci INF a IL2, které jsou důležitými faktory protektivní imunity proti schistosomulám.

EFEKTOROVÉ MECHANISMY IMUNITY HOSTITELE

Mechanism	Diseases	Helminths	References	
Th1 to Th2 shift	RA	<i>Acanthocheilonema vitae</i>	[33–37,77]	
	MS	<i>Trichinella spiralis</i>	[16,80]	
	GD	<i>Schistosoma mansoni</i>	[50]	
	T1DM	<i>Trichinella spiralis</i>	[42]	
		<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	[42,43]	
		<i>Litomosoides sigmodontis</i>	[44]	
		<i>Schistosoma mansoni</i>	[47–49,81]	
Th17 downregulation	MS	<i>Trichinella spiralis</i>	[16,80]	
		<i>Taenia crassiceps</i>	[61]	
		<i>Trichinella pseudospiralis</i>	[62]	
	IBD	<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	[60]	
Th22 upregulation	RA	<i>Acanthocheilonema vitae</i>	[67]	
	IBD	<i>Trichuris trichiura</i>	[68]	
Tregs expansion	RA	<i>Fasciola hepatica</i>	[79]	
	MS	<i>Trichinella spiralis</i>	[80]	
		<i>Schistosoma mansoni</i>	[82]	
		<i>Litomosoides sigmodontis</i>	[44,45]	
	T1DM	<i>Schistosoma mansoni</i>	[49,81]	
		IBD	<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	[74]
			<i>Trichinella spiralis</i>	[76,83]
	<i>Schistosoma mansoni</i>		[75]	
	B10 cells expansion	RA	<i>Acanthocheilonema vitae</i>	[94,95,98]
MS		<i>Schistosoma mansoni</i>	[82]	
		<i>Acanthocheilonema vitae</i> ,	[99]	
		<i>Brugia malayi</i> , <i>Nippostrongylus brasiliensis</i> , <i>Onchocerca volvulus</i>		

RA—rheumatoid arthritis; MS—multiple sclerosis; GD—Graves' disease; T1DM—type 1 diabetes mellitus; IBD—inflammatory bowel disease.

6.

ÚNIKY

A faint, stylized background illustration featuring a snail on the left and a complex chemical structure on the right, both rendered in a light, semi-transparent style.

ÚNIKY - MECHANISMY

- adaptace povrchových membrán
- molekulární maskování
- molekulární mimikry
- odlučování povrchu
- inhibice imun. reakcí
- stimulace imunitních reakcí



ÚNIKY - MECHANISMY

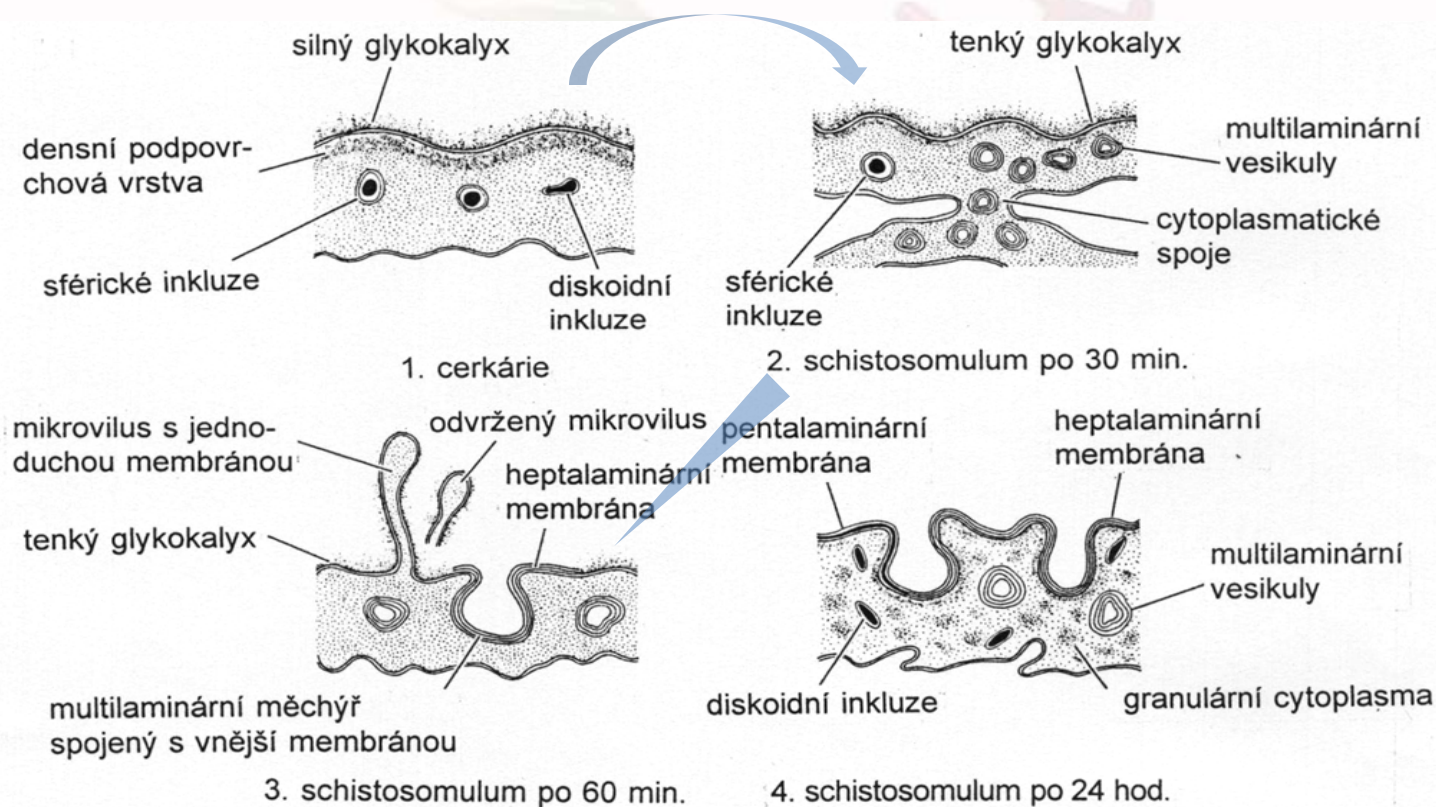
• adaptace povrchových membrán

dvojmembrána dospělých schistosom (tzv. membranokalyx)

redukováný glykokalyx

vnitřní membrána – klasická funkce

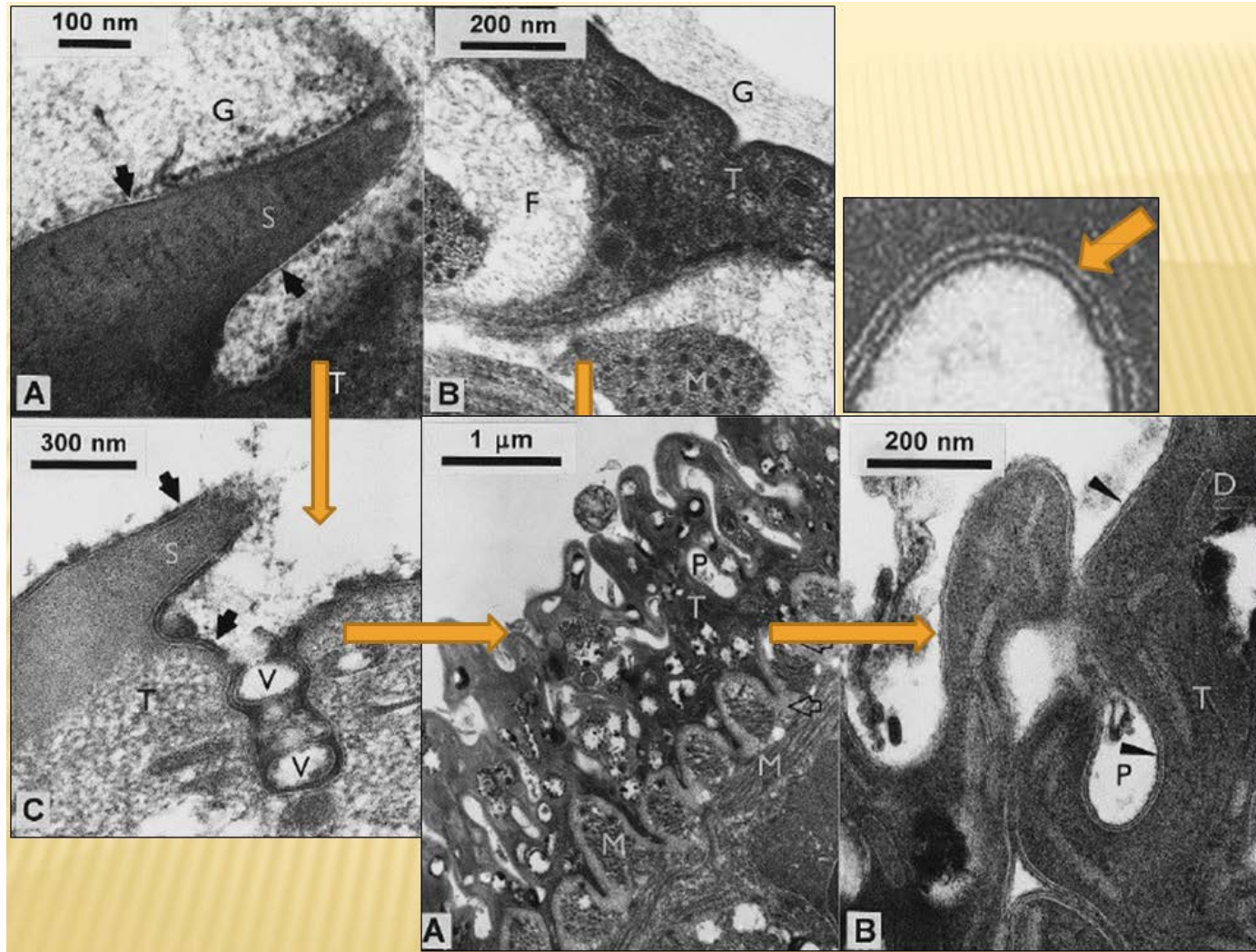
vnější membrána – ochranná funkce



ÚNIKY - MECHANISMY

- adaptace povrchových membrán**

dvojmembrána dospělých schistosom (tzv. membranokalyx)



ÚNIKY - MECHANISMY

• molekulární maskování

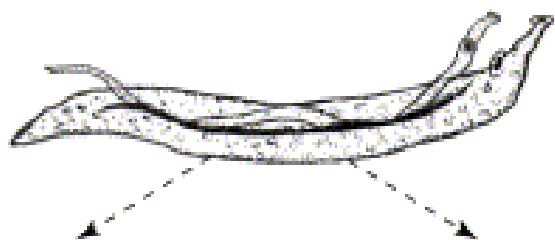
Vazba molekul hostitele, exprese receptorů pro tyto molekuly

- maskování se regulačními proteiny hostitele = inhibice komplementu

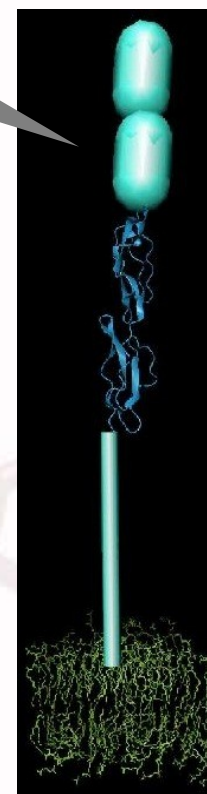
Schistosoma mansoni – vazba DAF

DAF (CD55, „delay/decay accelerating factor“ = regulační protein vázaný glykofosfatidylinositol kotvou na lidské erytrocyty, inaktivuje C3 konvertázu komplementu

- vazba Fc konců IgG
receptorem je paramyosin
paramyosin - protein svalů bezobratlých, u schistosom ale výskyt i v povrchovém tegumentu



- MHC class I
- Complement C3
- IgG
- Surface receptor



model DAF s ukotvením v cytoplasmatické membráně

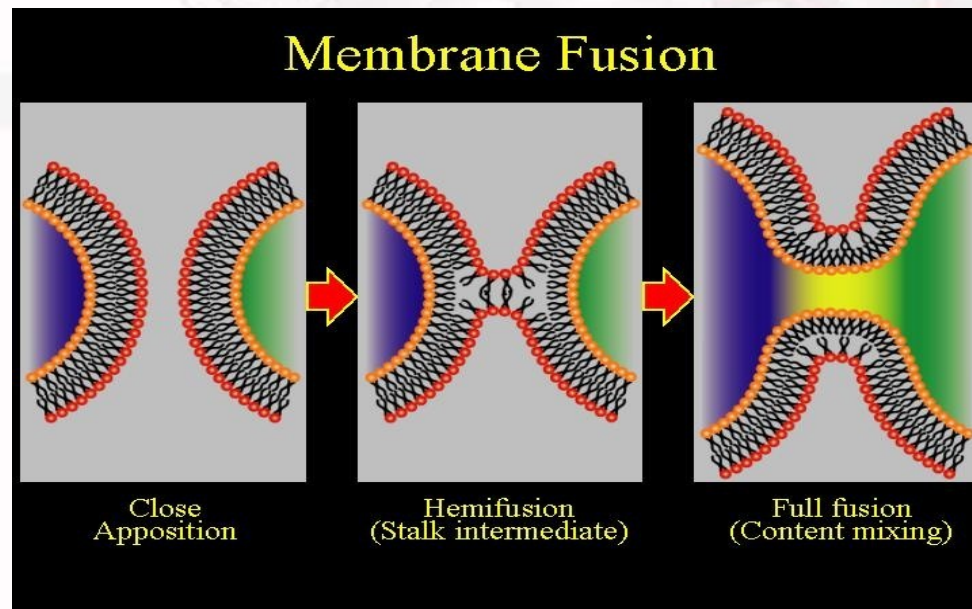
ÚNIKY - MECHANISMY

- **molekulární maskování**

Fúze s membránami hostitelských buněk

lysofosfatidylcholin

- fuzigen
lyze buněk adherovaných na povrch (erytrocyty, neutrofilů)
(splývání membrán schistosom s erytrocyty a neutrofilů)
- efektorový účinek eosinofilů
na povrchu i v granulích – fosfolipázy
štěpení lysofosfatidylcholinu



ÚNIKY - MECHANISMY

• molekulární mimikry

syntéza hostiteli podobných či totožných molekul

- **Lewis X antigen** - trisdacharid(3-fucosyl-N-acetyl-lactosamin)

stádiově specifický embryonální antigen

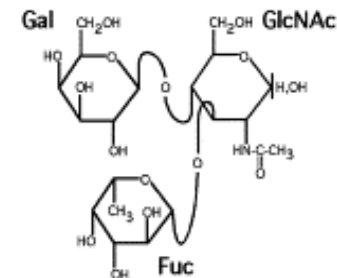
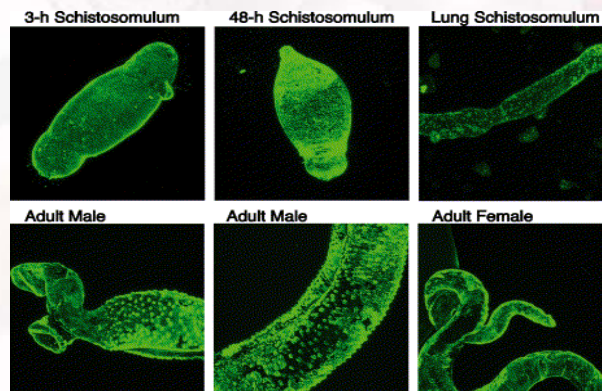
exprimovaný na glykoproteinech, glykolipidech a proteoglykanech různých lidských buněk
jeho výskyt je třikrát častější na glykoproteinech než na glykolipidech

- Lewis X antigen - schistosomy

epitop, který je sdílen mezi *S. mansoni* a jejím hostitelem – mimikry před im. systémem hostitele
byl detekován na tegumentu cercárií, schistosomul a dospělců

-u pacientů se schistosomózou – sérové protilátky (IgG, IgM) proti Lewis-X

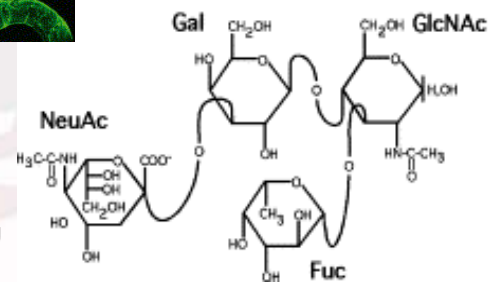
Expres Lewis X – schistosomy, stádia



Lewis x
(Le^x)

- **E-selektiny na povrchu schistosom**

lektiny hostitele s významnými funkcemi v obraně
ligandem je sialovaný (= tetrasacharid) Lewis-X hostitele
u schistosom ontogeneticky regulovaná exprese selektinů



Sialyl Lewis x
(sLe^x)

ÚNIKY - MECHANISMY

• odlučování povrchu

Vysoká rychlost obměny u schistosom

- glykoproteiny a glykolipidy svlékány s poločasem 12-14 hod.
- současné zvětšení povrchu růstem parazita asi o 100%/1 den



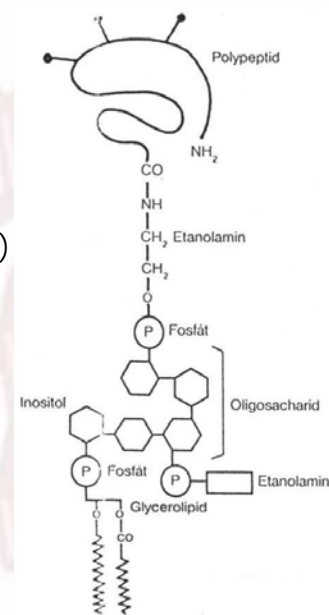
svlékání Ag u *Trichobilharzia* sp.

Parazitární peptidázy

- odštěpování/degradace navázaných protilátek
- tvorba anti-IgG
- změněné IgG blokující makrofágy

Parazitární fosfolipázy → GPI (glykofosfatidylinositol) kotva proteinů (schistosomy)

- odvržení rozpoznávaného antigenu+Ab
- imunní komplexy



ÚNIKY - MECHANISMY

• inhibice imunitních reakcí

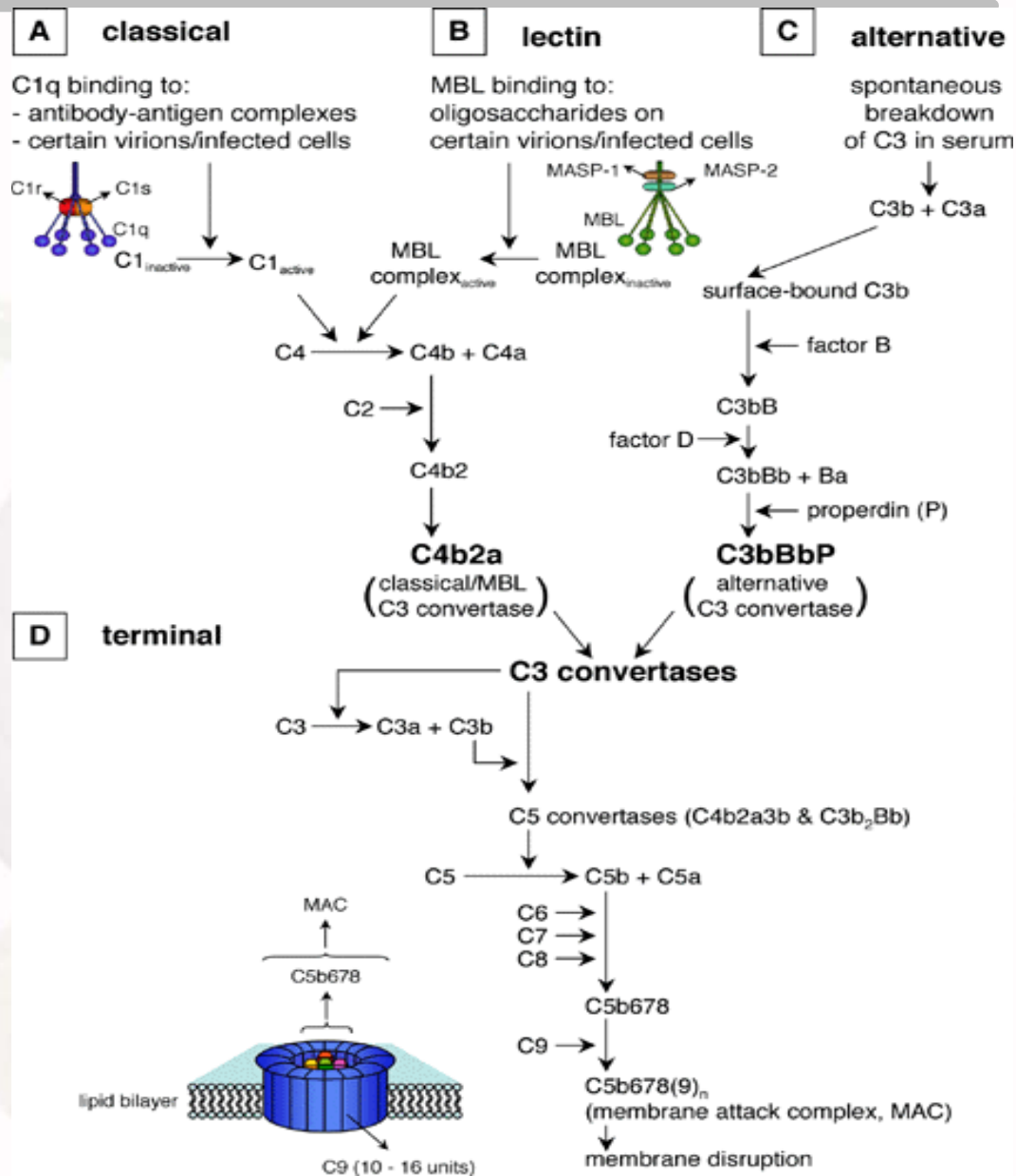
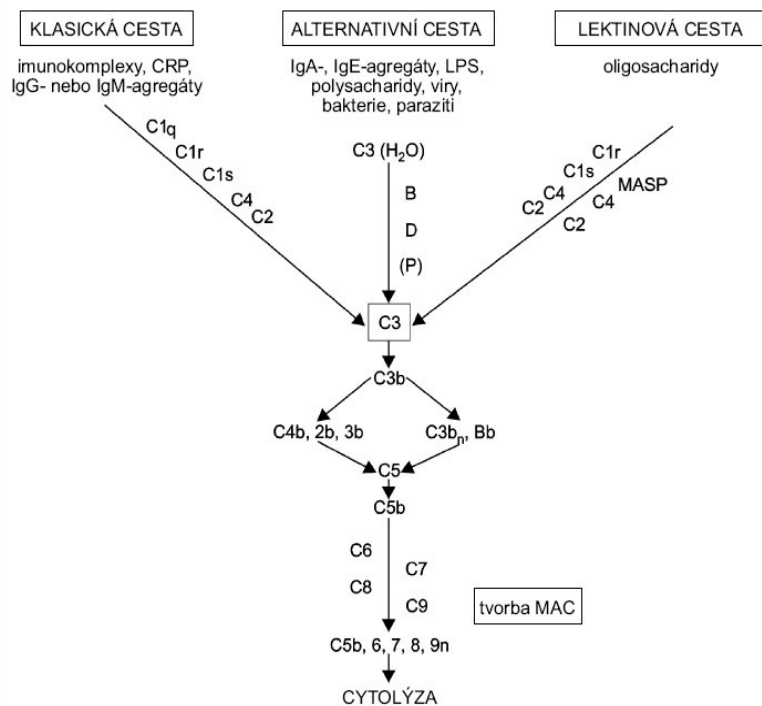
- zásah do komplementu

- zásah do buněčných aktivit

- apoptóza buněk

(inhibitory buněčných aktivit

(inhibitory peptidáz, buněčných receptorů, atd.)



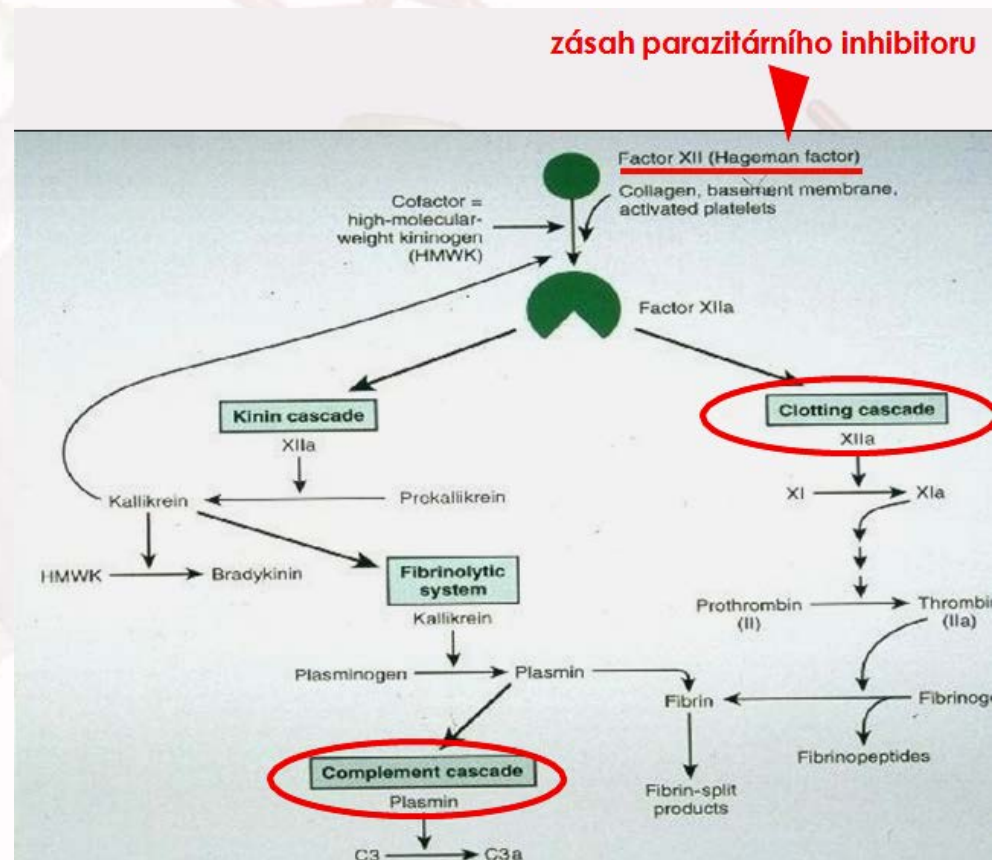
ÚNIKY - MECHANISMY

• inhibice imunitních reakcí zásah do komplementu

- produkce inhibitoru Hagemanova faktoru XII filáriemi

H. f. po kontaktu s parazitem spouští aktivaci komplementu

fce - H. f. spouští také koagulaci krve



ÚNIKY - MECHANISMY

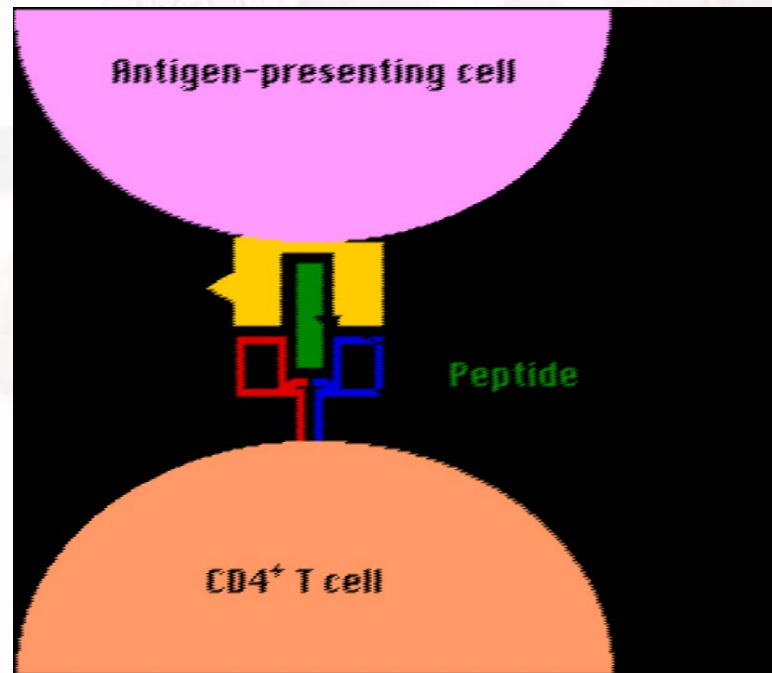
- **inhibice imunitních reakcí**

zásah do komplementu i zásah do buň. aktivit. – inhibitory peptidáz hostitele

- indukce lymfocytární apoptózy $CD4^+$ T buněk filáriemi

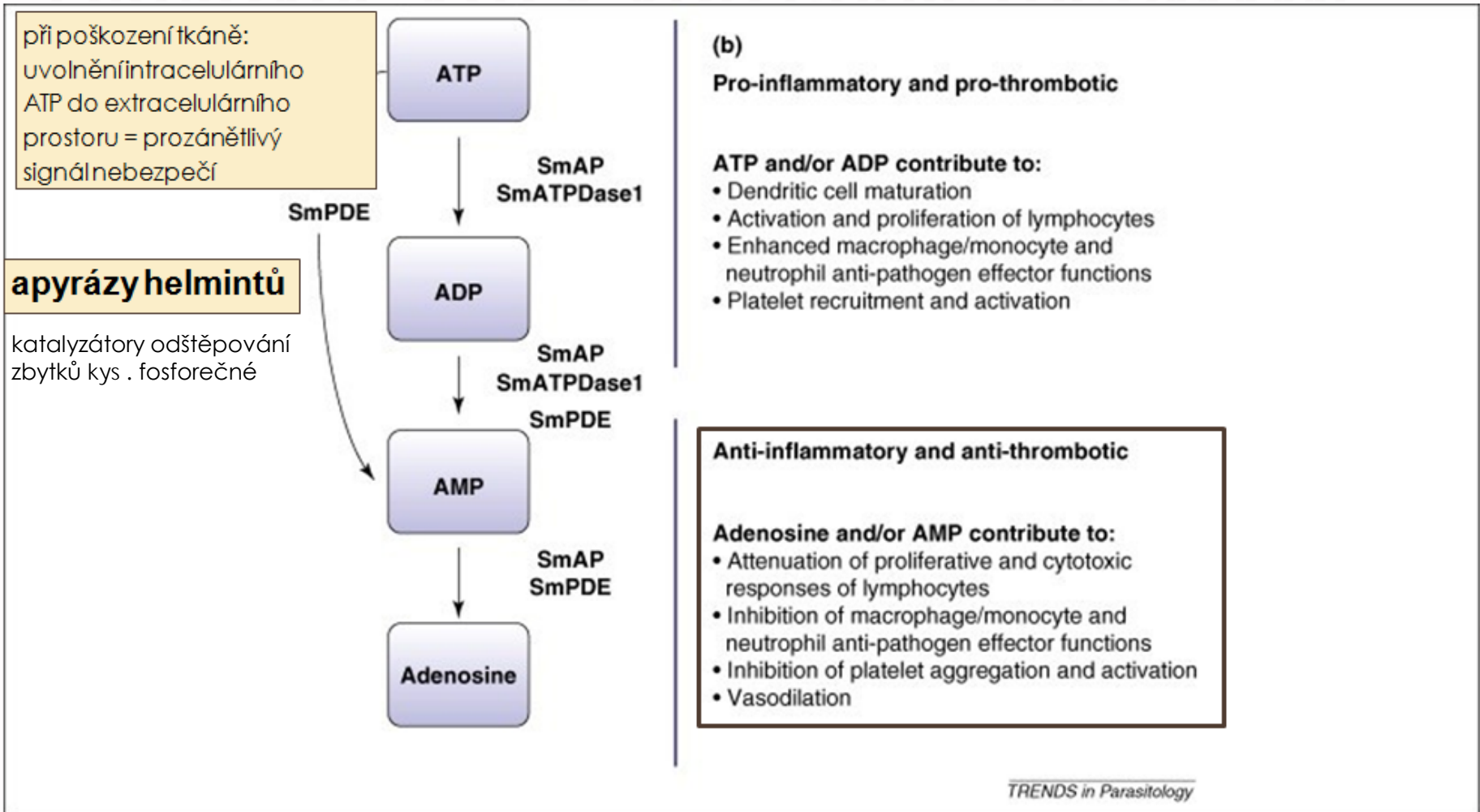
- produkce SMAF apoptózového faktoru schistosomami – apoptóza $CD4^+$ a $CD8^+$
(eliminace obrany proti larvám v kůži)

indukce apoptózy hostitelských buněk i jinými helminty (motolice, tasemnice i hlístice)



ÚNIKY - MECHANISMY

• důsledky apoptózy

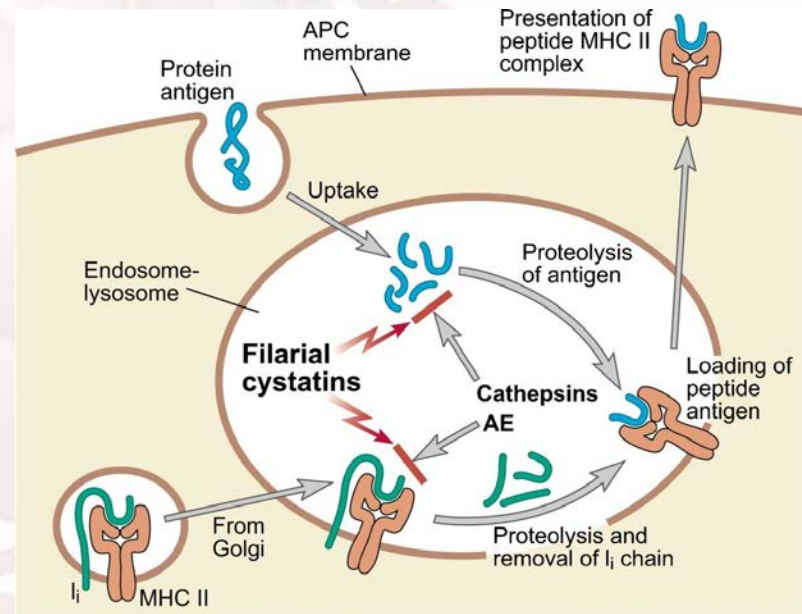


ÚNIKY - MECHANISMY

• inhibice imunitních reakcí

zásah do buněčných aktivit

- cystatiny
inhibitory cysteinových peptidáz
snížená prezentace antigenu v MHC-II komplexu
snížená stimulace T buněk
- antigen prezentující buňky s MHC-II glykoproteiny:
dendritické b.
monocyty
makrofágy
B lymfocyty



IMUNITNÍ SYSTÉM BEZOBRATLÝCH

Obecné vlastnosti obranného systému

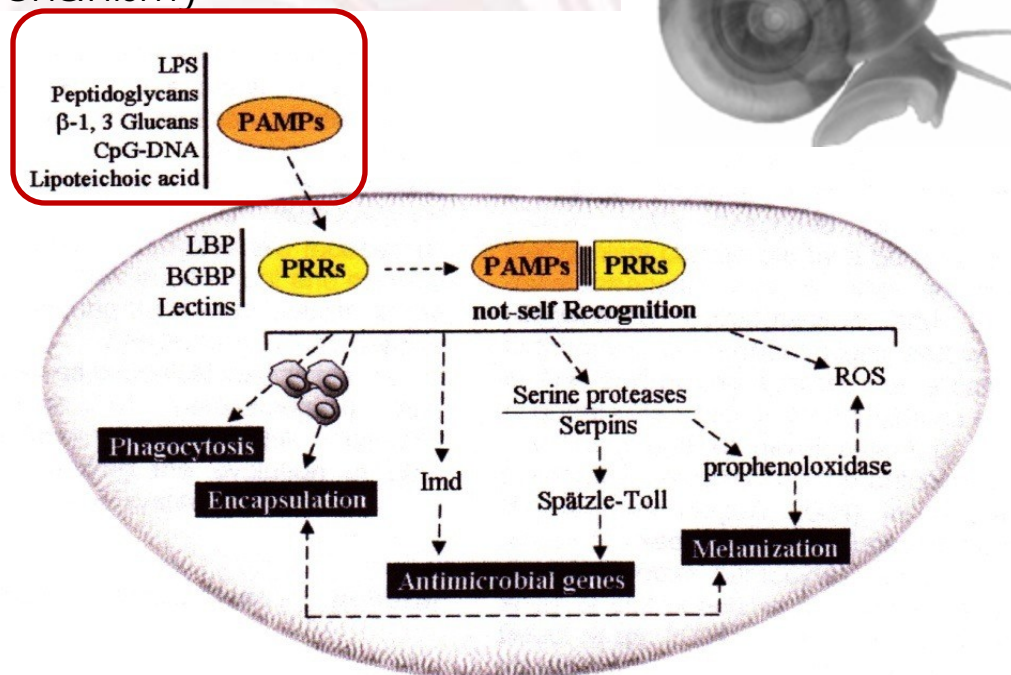
- absence genů pro "pravé" imunoglobulíny
- není klonální selekce antigenně příslušných lymfocytů
- chybí adaptivní imunita MHC a prezentace
- zpracovávání antigenů chybí
- chybí dlouhodobá a vysoce specifická imunitní paměť
- "spolehnutí se" na vrozené imunitní mechanismy

2 principy:

„**pattern recognition molecules**“

„**pathogen-associated molecular patterns**“

(lipopolysacharid, peptidoglykan,...)



IMUNITNÍ SYSTÉM BEZOBRATLÝCH

Hemocyty

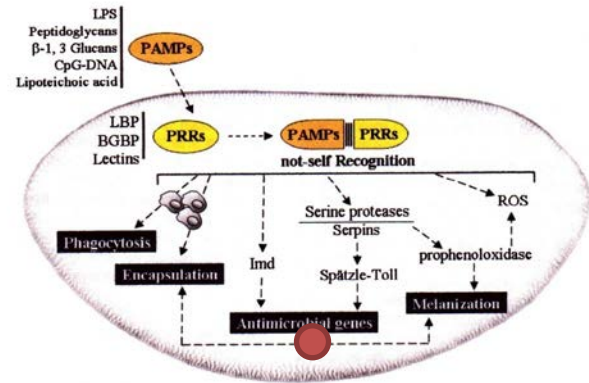
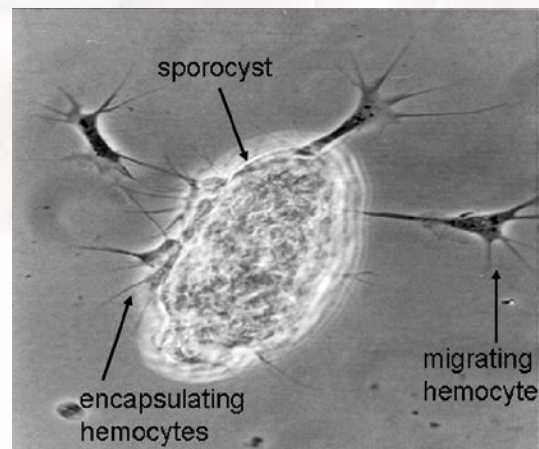
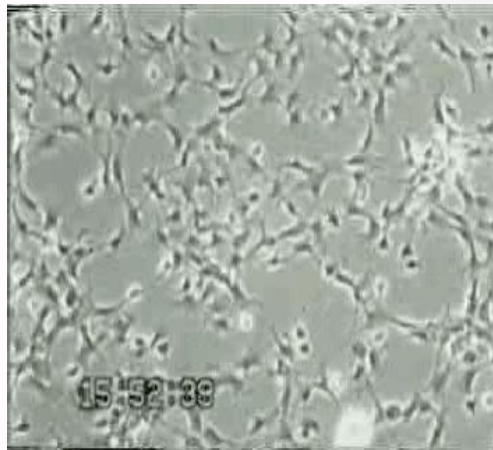
hemocyty – hemocel

celomocyty – celom

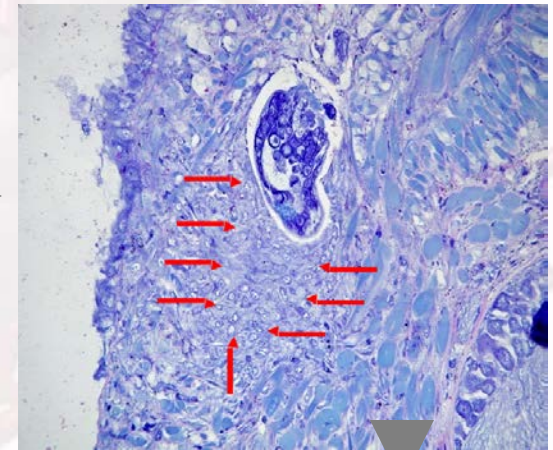
fagocytární aktivita

hemocyty rezistentních a vnímavých populací se liší v produkci H_2O_2

- Buněčná enkapsulace



Enkapsulace larvy motolice po průniku do "rezistentního" plže



melanizace

IMUNITNÍ SYSTÉM BEZOBRATLÝCH

molekulární maskování larev schistosom

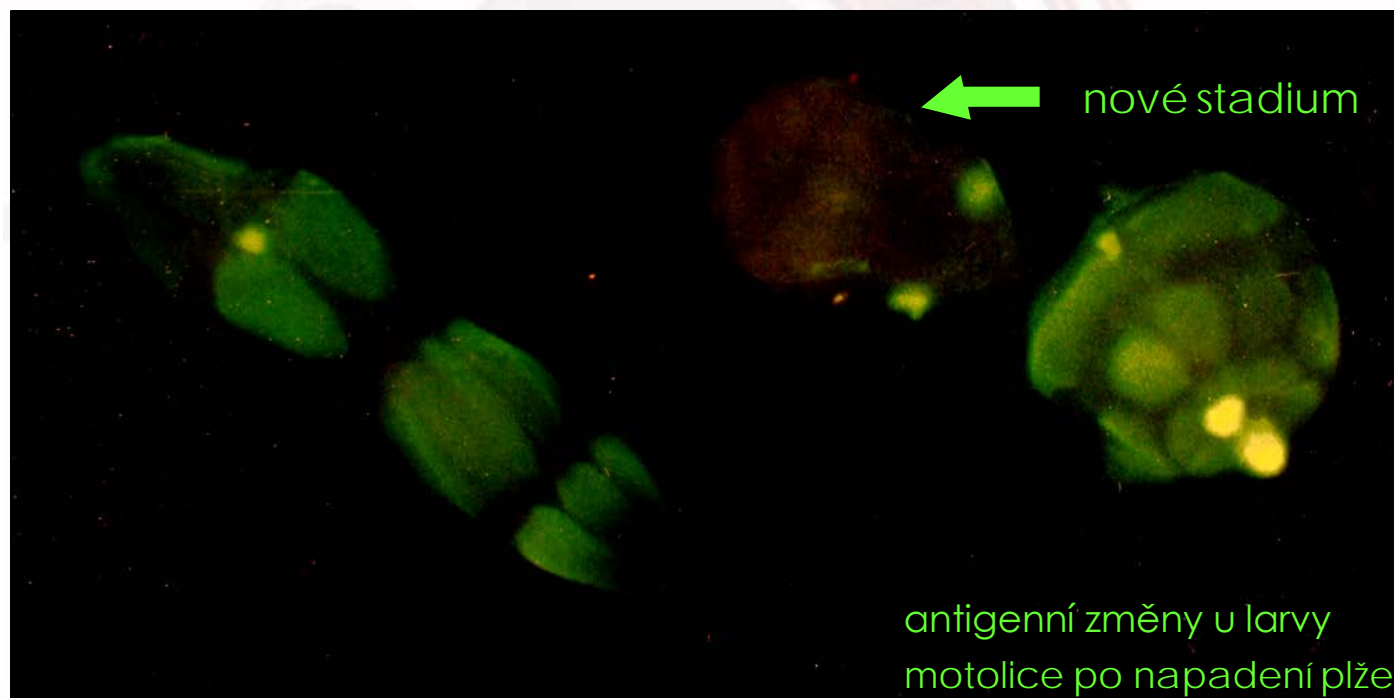
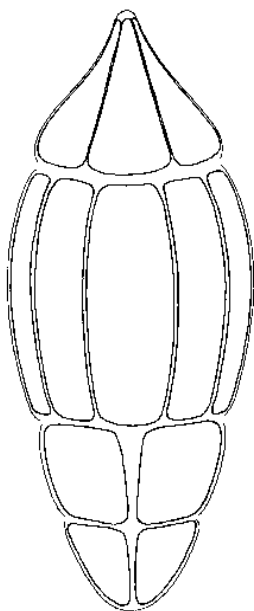
vazba hemoglobinu

vazba aglutininů, lektinů

molekulární mimikry

exprese molekul podobných mezihostiteli

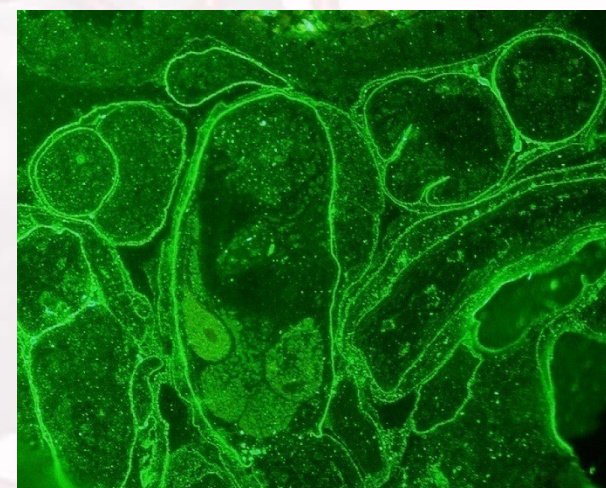
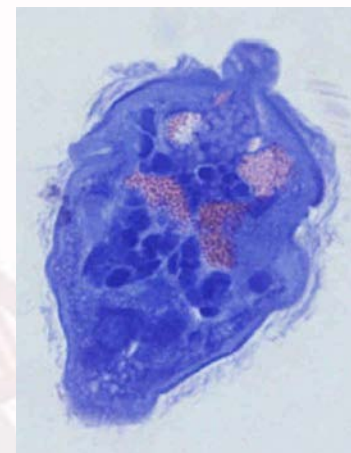
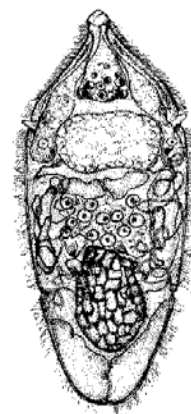
např. sekvenčně: velká podobnost tropomyosinu plžů *Biomphalaria glabrata* s tropomyosinem larev *Schistosoma mansoni*



IMUNITNÍ SYSTÉM BEZOBRATLÝCH

Schistosoma mansoni polymorfní muciny (SmPoMucs)

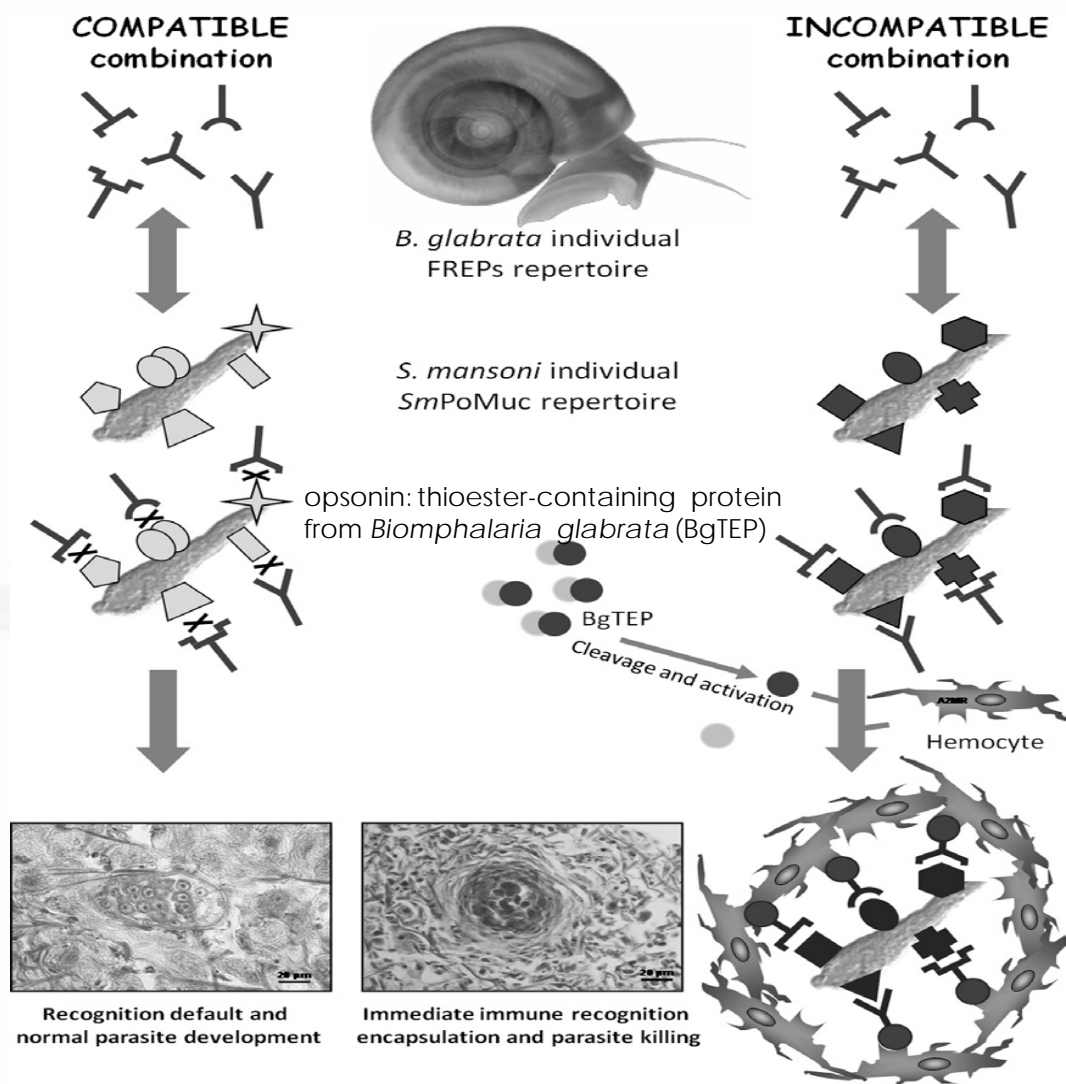
- prokázány proteomickými technikami v r. 2008 jako klíčové molekuly určující kompatibilitu s vektorem=plžem
- součást E-S produktů a povrchu, glykosylovány
- každá larva exprimuje unikátní sadu SmPoMucs odvozenou od několika genů, časté rekombinace, individuální regulace tvorby, vysoký stupeň polymorfismu



penetrační žlázy miracidíí povrch sporocyst uvnitř plžů

IMUNITNÍ SYSTÉM BEZOBRATLÝCH

Schistosoma mansoni polymorfní muciny (SmPoMucs)



VAKCÍNY

- **proti lidským helmintům neexistuje**
- proti zvířecím - ojediněle pokrok *T. ovis* (1989-1996)
 - larvální cestodózy
 - *Dictyocaulus viviparus*

Plicnivky jsou parazitické hlístice, pro něž je charakteristické, že dospělí jedinci těchto červů se lokalizují v průdušnicích, průdušinkách, samotných plicních sklípcích nebo plicních cévách.



Image for illustration only.
Supplied as single dose

VAKCÍNY

Digenea, Diplostomida, **př.** Schistosomatidae

• **Imunoprofylaxe: vývoj vakcíny – proč?**

snížená citlivost a rezistence na chemoterapeutika,
problémy biol. boje: ničení šneků (molluscidy, molluscivorní ryby, predátorští plži)

• **Požadavky na účinnou a bezpečnou vakcínu**

1. nevzbuzovat reakce proti vejcům. ne cercáriemi a cukernými epitopy
2. umožnit rozvoj Th2 a zmenšení granulomů okolo vajec.
3. indukovat tvorbu protilátek i aktivovat CD 4+ T lymfocyty
4. vyvolat co nejrychlejší a přitom co nejdelší rezistenci (x chemoterapie).
Zničit schistosomuly dříve než dokončí migraci.
Urychlit vývoj protektivní imunity v časném věku. Ideální vakcinační schéma.

• **Možné postupy při vývoji vakcíny**

1. identifikovat povrchové Ag, proti nimž namířeny protilátky rezistentních hostitelů
(GP 25 = hlavní imunogen dospělců *S. mansoni*)
2. vakcinovat homogenátem, hledat nejimunogennější antigeny
(povrchový GP 18 a paramyosin). ale: imunogenní nemusí být protektivní
3. vytvořit protektivní monoklonální protilátky a identifikovat příslušný Ag (membránové glykoproteiny GP 38 a 200).
4. nalézt "Achillovu patu", specifický a nezbytný enzym parazita
Nevýhodou malá imunogenita. Glutathion-S-transferázy (P 28 a P 26).

VAKCÍNY

Digenea, Diplostomida, **př.** Schistosomatidae

- **Vývoj vakcíny**

S. mansoni (Sm): lab. modely fungují různě, myš x potkan x člověk

S. japonicum (Sj), *S. bovis* (Sb): testy s přirozenými hostiteli: ovce,
kozy, skot (Sj i Sb), prasata (Sj)

ozářené cercárie: UV vyvolá u cercárií změny glykokalyxu,
zvýší se imunogenicita povrchu na transformujících se schistosomulách

- **Kandidáti na vakcínu:** Izolované a rekombinantní proteiny:

A. **enzymy:** málo imunogenní, ale nezbytné pro parazita

B. **membránové Ag:** vysoce imunogenní

C. **paramyosin**

VAKCÍNY

Digenea, Diplostomida, **př.** Schistosomatidae

- A. **glutathion-S-transferáza** (GST, např. Sm28, Sj28, Sj26, Sh28, Sb28) detoxifikační a antioxidační enzym, neutralizuje ROS. Zvyšuje rozpustnost hematinu ve střevě schistosom a předchází tvorbě krystalů a "zácpě". Rekombinantní: snížení plodnosti, líhnivosti vajec, mortalita schistosomul jen u některých modelů. Různé schisto úspěšně u myší, domácích zvířat.

Lidi: Sh28-GST – testování v Nigeru a Senegal.

glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenasa (Sm37),
triosofosfát isomeráza (Sj28):

úspěch v hlodavčích modelech s izolovanými proteiny a pasivním přenosem rezistence pomocí MAb. efekt na mortalitu i plodnost.

asparaginylní peptidasa (cysteinová proteáza, Sm23): ve střevě, degradace hemogl. U myší úspěch DNA vakcíny (x úseky podobné lidským prot.)

- B. **SJ23**: integrální protein membrány schistosomul (a dospělců)
rekomb. prot. i DNA vakcína. U ovčí, skotu ap., efekt na přežití i plodnost

- C. **paramyosin**

myofibrilární protein bezobratlých, recentně: je i na povrchu plicních stádií.
Izolovaný i rekombinantní (Sm97, Sj97): silná protektivní imunita myší, ovčí i opic.
Zvýšení mortality migrujících stádií, snížení plodnosti dospělců.

A mnoho dalších....

VAKCÍNY

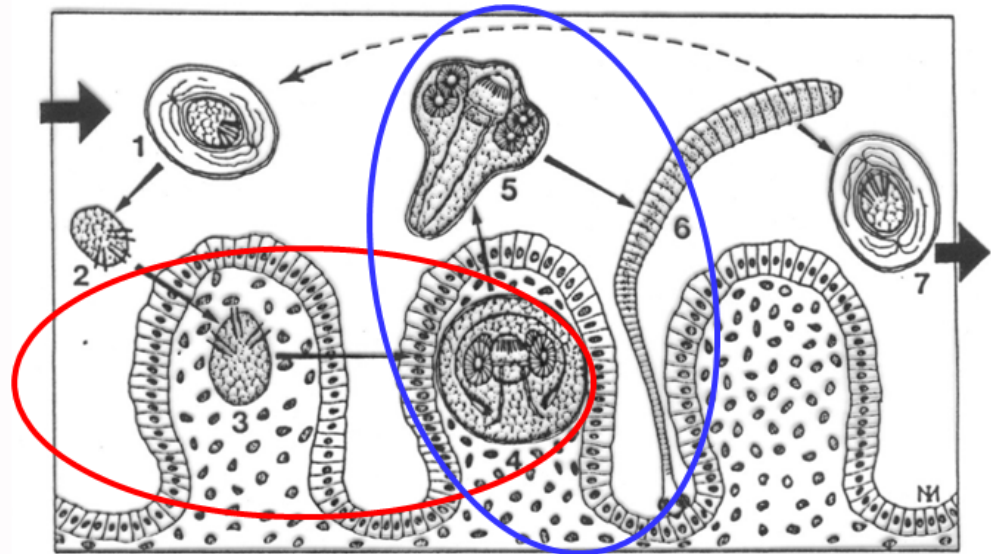
Cestoda, Cyclophyllidea, **př.** Hymenolepididae

• *Hymenolepis nana*

Stadiově specifické antigeny – imunita proti nim

cizopasník tenkého střeva lidí
délka až 8 cm

nejčastější cestodóza - 50 mil. lidí
mezihostitelem hmyz - cysticerkoid



Hymenolepis nana - imunologické interakce

infekce myši vajíčkem s larvou 1 (zkrácený cyklus)

→ imunita k reinfekci larvou 1 (za několik dní)

→ imunita k reinfekci larvou 2 (za 2 týdny)

infekce myši cysticerkoidy = larvou 2 (tradiční cesta)

→ imunita k reinfekci larvou 2 (za asi 10 dní)

→ žádná imunita vůči larvám 1

VAKCÍNY

Cestoda, Cyclophyllidea, **př.** *Taenia saginata*, *Taenia ovis*, *Echinococcus granulosus*,

Stadiově specifické antigeny – imunita proti nim

Povrchové molekuly larev 1
Atenuované larvy

rekombinantní antigeny jako základ vakcín

90-100% efekt u *Taenia ovis* v ovcích, *Taenia saginata* ve skotu a *Echinococcus granulosus* v ovcích
u jiných skupin helmintů takovou protekci neznáme

Table 1. Host-protective recombinant oncosphere antigens of taeniid cestodes

Species	Antigens	Homologue ^a	Protection ^b	Reference
<i>Taenia ovis</i>	To45W	45W	94%	Johnson <i>et al.</i> 1989
	To45S	45W	87%	Lightowlers <i>et al.</i> 1996 ^c
	To16	16k	92%	Harrison <i>et al.</i> 1996
	To18	18k	99%	
<i>Taenia saginata</i>	TSA-9	45W ^c	99%	Lightowlers <i>et al.</i> 1996 ^b
	TSA-18	18k ^c	99%	
<i>Echinococcus granulosus</i>	EG95	EG95	96–100%	Lightowlers <i>et al.</i> 1996 ^a
<i>Echinococcus multilocularis</i>	EM95	EG95	83%	Gauci <i>et al.</i> 2002
<i>Taenia solium</i>	TSOL18	18k	100%	Flisser <i>et al.</i> 2004
	TSOL45	45W	97%	
<i>Taenia multiceps</i>	Tm16	16k	100 ^d	Gauci <i>et al.</i> 2008
	Tm18	18k	100 ^d	

^a Homology group was assigned based on a high level of amino acid identity between antigens with reference to the first antigen of the group to be characterized.

^b Protection reflects the optimum level achieved in vaccination and challenge infection trials.

^c Results of vaccination trials using the TSA-9 and TSA-18 antigens together.

^d Based on mortality following challenge infection.

Modified from Lightowlers (2006).

(Jabbar a kol., Parasitology 2010)

- T. ovis* šlo o první fungující vakcínu proti parazitovi (1989-1996)**

[Vet Parasitol. 2003 Jul 25;115\(2\):83-123.](#)

Vaccination against cestode parasites: anti-helminth vaccines that work and why.

[Lightowlers MW¹](#), [Colebrook AL](#), [Gauci CG](#), [Gauci SM](#), [Kynqdon CT](#), [Monkhouse JL](#), [Vallejo Rodriguez C](#), [Read AJ](#), [Rolfe RA](#), [Sato C](#).



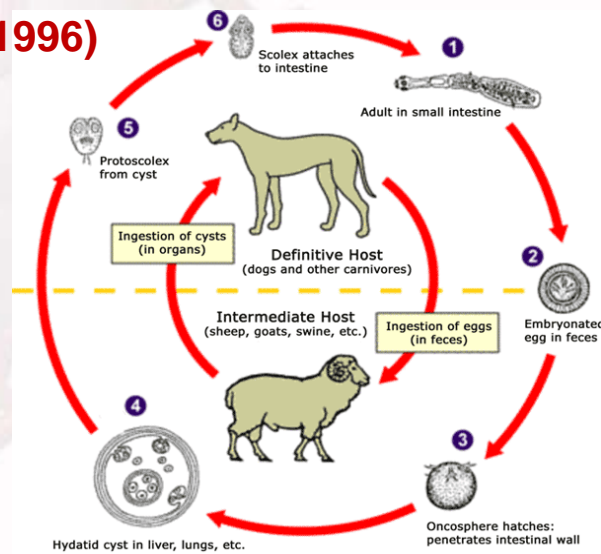
Pergamon

International Journal for Parasitology, Vol. 26, No. 8/9, pp. 819-824, 1996
Copyright © 1996 Australian Society for Parasitology. Published by Elsevier Science Ltd.
Printed in Great Britain
0020-7519/96/00068-9

Vaccination Against Cestode Parasites

M. W. LIGHTOWLERS

Molecular Parasitology Laboratory, The University of Melbourne, Princes Highway,
Werribee, Victoria, 3030 Australia



CIVILIZAČNÍ CHOROBY

- **zánětlivá onemocnění střev**

- původ zřejmě v neadekvátní imunitní odpovědi na přirozenou střevní mikroflóru, autoimunitní procesy
- např. Crohnova nemoc, ulcerózní kolitida (asi 2 mil. lidí v USA a Evropě)



Další onemocnění spojená s cílenou destrukcí tkání chronickými zánětlivými reakcemi (lymfocytární):

- astma
- roztroušená skleróza (skleróza multiplex)
- diabetes 1. typu (autoimunita)

- stále častější onemocnění v civilizovaných zemích
- mnohdy imunosupresivní nebo invazivní léčba
- **vzácně v zemích s častým výskytem helmintóz**
- „hygiene hypothesis“

HYGIENE HYPOTHESIS

Od počátku evoluce člověka, tedy přibližně 200 000 let, jsme parazitováni červy.

V průběhu 80. let minulého století byla formulována tzv. **hygienická hypotéza**, jež předpokládá, že nižší kontakt člověka s patogeny může být příčinou stále častěji se objevujících „**Immune mediated diseases**“, kam patří **autoimunitní onemocnění** (idiopatické střevní záněty, roztroušená skleróza, diabetes 1. typu, revmatoidní artritida aj.) a **alergie** (tj. hypersenzitivní reakce). Frekvence rozvoje alergií souvisí se zlepšením životních podmínek a nižším vystavením patogenům v dětství. Prokázalo se tak, že v rodinách, kde je více sourozenců, a tudíž nižší hygiena mezi nimi, je mnohem menší výskyt alergických potíží než u dětí, které s ostatními vrstevníky nemají kontakt (Strachan, 1989).

Tato teorie byla dál rozvíjena. Děti s vyšším socioekonomickým statusem, které žijí v čistém prostředí a menších domácnostech, jsou v dospělosti náchylnější k rozvoji střevních chronických zánětů (Crohnova nemoc). Souvisí to pravděpodobně přehnanou reakcí na infekční agens, se kterým se setkali až později v životě (Gent et al., 1994).



OLD FRIENDS HYPOTHESIS

Od „hygiene hypothesis“ se pomalu upouští.

V dnešní době se od termínu hygienická hypotéza upouští a začíná se o této problematice mluvit jako o „**old friends hypothesis**“ (Rook et al., 2003). Vzájemné vztahy mezi člověkem a různými mikroorganismy přetrvávaly dostatečně dlouho na to, aby se mezi nimi ustanovila evoluční závislost.

Hygienická hypotéza tvrdí, že jsme pro náš imunitní systém příliš čistí a to vede k rozvoji imunitně zprostředkovaných onemocnění. „Old friends hypothesis“ nám ale vysvětluje, že příčinou rozvoje imunitně zprostředkovaných onemocnění je eradikace organismů, na kterých jsme evolučně závislí. Řešením však není navrácení se ke způsobu života jeskynního muže. Můžeme se totiž pokusit nalézt mechanismus, kterým naši „staří přátelé“ regulují imunitní systém a **využít toho v boji** s autoimunitními onemocněními.

AUTOIMUNITNÍ ONEMOCNĚNÍ

Th1, Th2, Th17

Autoimunitní onemocnění jsou onemocnění způsobená reakcí proti antigenům vlastního těla, neboli autoantigenům. Původ může být v Th1 imunitní odpovědi, Th2 imunitní odpovědi a v posledních letech nově objevené Th17 imunitní odpovědi (Harrington et al., 2005).

CD4⁺ T buňky se rozdělují na dva podtypy Th1 a Th2 (Mosmann et al., 1986). Tyto buňky mají odlišnou funkci a jinou produkci cytokinů. Th1 buňky podporují zánětlivou imunitní reakci, která je typická pro autoimunitní onemocnění.

Th1 imunitní odpověď spolupracuje s makrofágy a její aktivita je potvrzena přítomností některých základních regulátorů imunitního systému - interleukinů. Zde se konkrétně jedná o interleukin-12 (IL-12) a dále pak interferon-gamma (IFN- γ).

Th2 imunitní odpověď je založena na tvorbě protilátek, které pomáhají B-lymfocytům v boji s extracelulárními parazity, tzv. protizánětlivá imunitní reakce.

Navíc Th1 a Th2 jsou antagonisté a navzájem tlumí svoji aktivitu.

Poslední nově objevené pomocné buňky nezávislé na Th1 a Th2 se nazývají Th17 (Harrington et al., 2005, Park et al., 2005). Jsou spojeny s produkcí IL-17 a IL-23. Zjišťuje se, že se podílí na rozvoji onemocnění, u kterých se původně myslelo, že souvisí s Th1 (např. Crohnova nemoc).

Autoimunitní onemocnění se rozvine v případě, že je narušena rovnováha udržující toleranci k vlastním tkáním. Až na výjimky, kdy je autoimunitní onemocnění způsobeno jedním genem (např. autoimunitní polyendokrinopatie (Aaltonen & Björnses, 1999), má většina původ ve více genech a také faktorech (tzv. onemocnění multifaktoriálního původu). Znamená to tedy, že člověk musí mít pro rozvoj onemocnění určitý genetický základ, ale propuknutí nastane až na základě různých environmentálních vlivů.

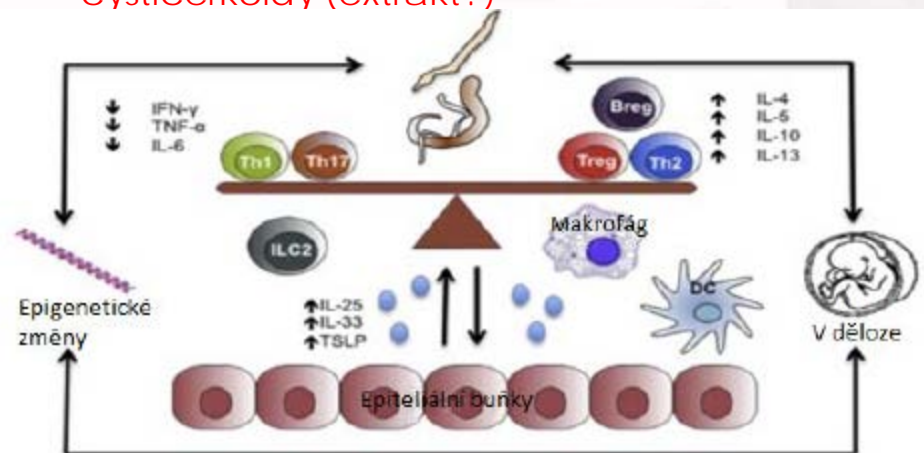
Neexistuje na ně terapie vedoucí k trvalému vyléčení, ale pozitivně reagují na terapii helminty.

TERAPIE HELMINTY

Polarizace ve prospěch Th2

Z důvodu závažných vedlejších účinků klasické terapie a nevléčitelnosti onemocnění se začalo pátrat po alternativní léčbě. V roce 2003 se objevila možnost terapie pomocí helmintů (Summers et al., 2003). Předpokládá se, že helminti mají několik možností jak ovlivnit imunitní systém (Weinstock, 2012). Jsou schopni způsobit změny v hostitelově těle, které vedou k aktivaci regulačních T buněk. Tyto buňky tlumí imunitní odpověď a zvyšují produkci regulačních molekul jako například protizánětlivého IL-10 a transformujícího růstového faktoru- β (TGF- β), který kontroluje proliferaci a diferenciaci většiny buněk. Dále pak působí na regulační dendritické buňky a makrofágy. Jejich namnožením se zabrání přepnutí na Th1 imunitní odpověď, která pak v těle vede k zánětlivé reakci. Většina helmintóz souvisí s Th2 imunitní odpovědí. Zároveň způsobují změny bakteriálního složení střevního mikrobiomu. Helminti jsou schopni ovlivnit výskyt přibližně 13% rodů střevních bakterií a asi 26% všech metabolických drah ve střevech (Li et al., 2012). Při léčbě chronických průjmů u makaků (*Macaca mulatta*) bylo prokázáno, že infekce hlísticí *Trichuris suis* mění složení střevních bakterií z těch, které převažují při zánětu, na ty které se běžně vyskytují ve zdravém jedinci (Broadhurst et al., 2012).

Helminti testovaní pro terapii *Trichuris suis* – podání vajíček, *Necator americanus* – nízký počet larev (např. 10 – dobrá tolerance), *Schistosoma mansoni* – extrakt z vajíček, *Hymenolepis diminuta* – cysticerkoidy (extrakt?)



Modulace imunitního systému helminty (Khan & Fallon, 2013, upraveno)

Helminti působí na epiteliální buňky a tím způsobují produkci IL-25, IL-33 a thymového stromálního lymfopoetinu (TSLP). Vše působí na lymfoidní buňky typu 2 (ILC2), které vedou k produkci IL-4, IL-5 a IL-13. Výsledkem je Th2 odpověď. Při helmintóze je v těle zvýšené množství regulačních B buněk (Breg), které produkují IL-10 a zároveň mohou přes T buňky (Treg) působit imunosupresivně. Spolu s dendritickými buňkami (DC) a makrofágy tlumí Th1 a Th17 buňky, které souvisí s počáteční zánětlivou reakcí. Díky evoluční regulaci mohou helminti ovlivnit imunitní odpověď stejně jako různé epigenetické regulace a klíčové vývojové etapy v životě (v děloze a raném dětství)

AUTOIMUNITNÍ ONEMOCNĚNÍ

Terapie helminty – *Trichuris suis* (zvířecí parazit)

- zvířecí druhy nepřežívají v člověku delší dobu, musí být aplikováno opakovaně
- doba jeho pobytu ve střevě však dostatečná pro stimulaci požadovaných reakcí

INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

Trichuris suis therapy in Crohn's disease

R W Summers, D E Elliott, J F Urban Jr, R Thompson, J V Weinstock

Gut 2005;54:87–90. doi: 10.1136/gut.2004.041749

See end of article for authors' affiliations

Correspondence to:
Dr R W Summers, James A Clifton Center for Digestive Diseases, Department of Internal Medicine, University of Iowa Roy J and Lucille A Carver College of Medicine, 200 Hawkins Drive, Iowa City, IA 52242, USA; robert-summers@uiowa.edu

Revised version received 28 March 2004
Accepted for publication 9 April 2004

Background: Crohn's disease is common in highly industrialised Western countries where helminths are rare and uncommon in less developed areas of the world where most people carry worms. Helminths diminish immune responsiveness in naturally colonised humans and reduce inflammation in experimental colitis. Thus exposure to helminths may help prevent or even ameliorate Crohn's disease.

Aims: The aim of the study was to determine the safety and possible efficacy of the intestinal helminth *Trichuris suis* in the treatment of patients with active Crohn's disease.

Patients: Twenty nine patients with active Crohn's disease, defined by a Crohn's disease activity index (CDAI) ≥ 220 were enrolled in this open label study.

Methods: All patients ingested 2500 live *T suis* ova every three weeks for 24 weeks, and disease activity was monitored by CDAI. Remission was defined as a decrease in CDAI to less than 150 while a response was defined as a decrease in CDAI of greater than 100.

Results: At week 24, 23 patients (79.3%) responded (decrease in CDAI > 100 points or CDAI < 150) and 21/29 (72.4%) remitted (CDAI < 150). Mean CDAI of responders decreased 177.1 points below baseline. Analysis at week 12 yielded similar results. There were no adverse events.

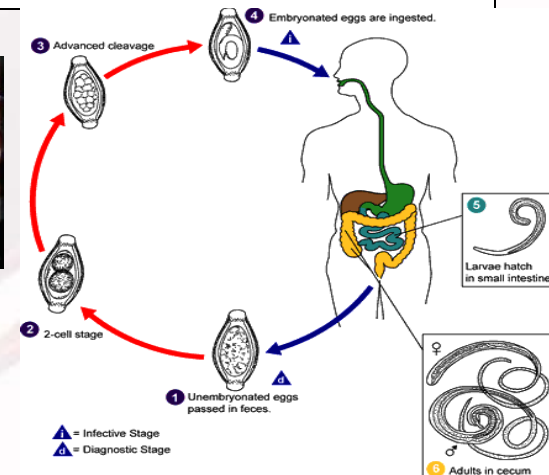
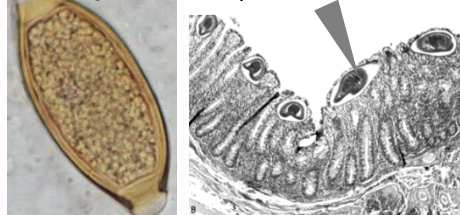
Conclusions: This new therapy may offer a unique, safe, and efficacious alternative for Crohn's disease management. These findings also support the premise that natural exposure to helminths such as *T suis* affords protection from immunological diseases like Crohn's disease.

In summary, *T suis* is well tolerated and appears efficacious for Crohn's disease in this open label trial. Helminths probably inhibit intestinal inflammation by mechanisms different from current medications. Helminths may offer an easy to administer alternative or supplement to currently available therapeutic agents. These results justify a double blind controlled clinical trial. Furthermore, these results support the hypothesis that helminthic exposure provides protection against some immune mediated inflammatory disease like Crohn's disease.

stichosom



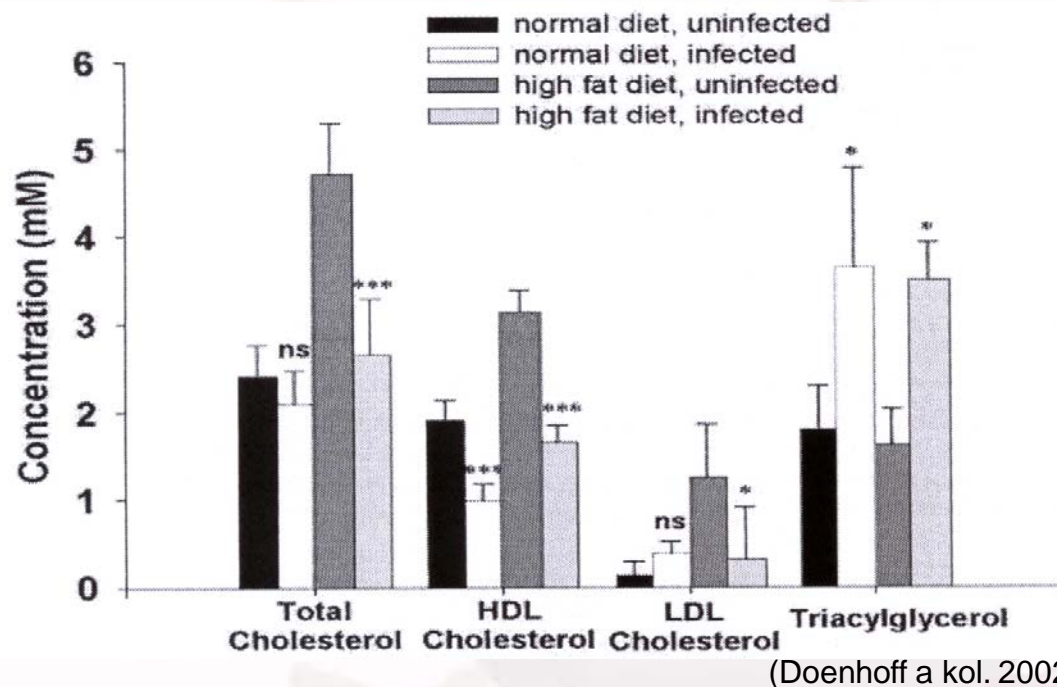
vajíčko dospělci ve střevě



TERAPIE HELMINTY

Schistosoma mansoni

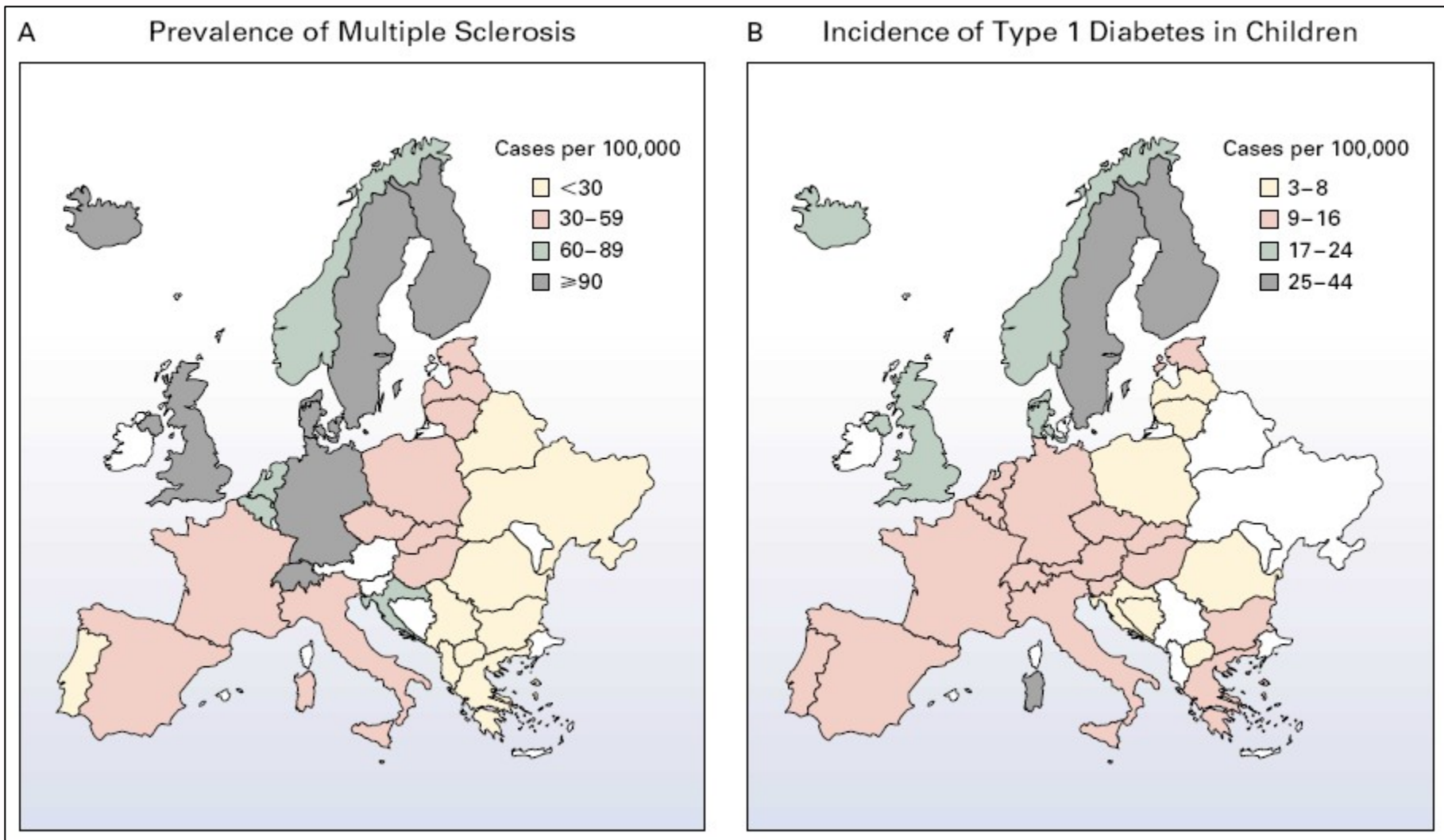
- ateroskleróza
 - vyšší hladiny cholesterolu
 - ukládání tukových látek ve stěnách cév, zužování cév



LDL (low density lipoprotein)
VLDL (very low density lipoprotein)

- hypotézy:
 - 2002: schistosomy nesyntetizují cholesterol a vychytávají LDL pomocí specifických receptorů (receptory prokázány)
 - 2007: vajíčka schistosom stimuluji snížení celkového cholesterolu a příjem LDL makrofágy; příliš neovlivňují tvorbu aterogenních plaků

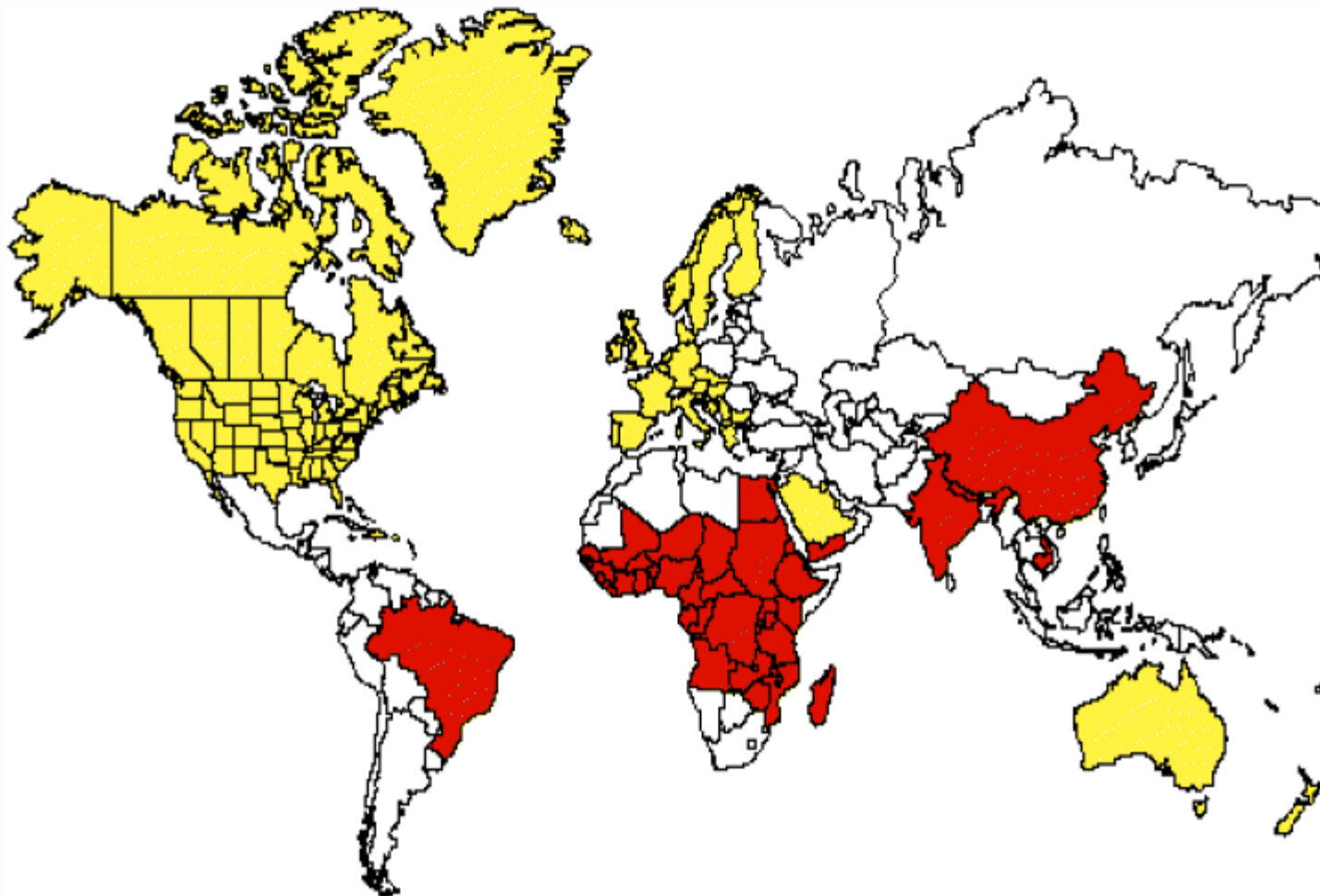
Rozšíření roztroušené sklerózy a diabetu 1. typu v Evropě



(The New England Journal of Medicine 2002)

AUTOIMUNITNÍ ONEMOCNĚNÍ

Inverzní korelace výskytu diabetes 1. typu a infekčních chorob (filarióza, lepra, onchocerkóza, schistosomóza, trachom, "soil-transmitted helminths")



EFEKTOROVÉ MECHANISMY IMUNITY HOSTITELE

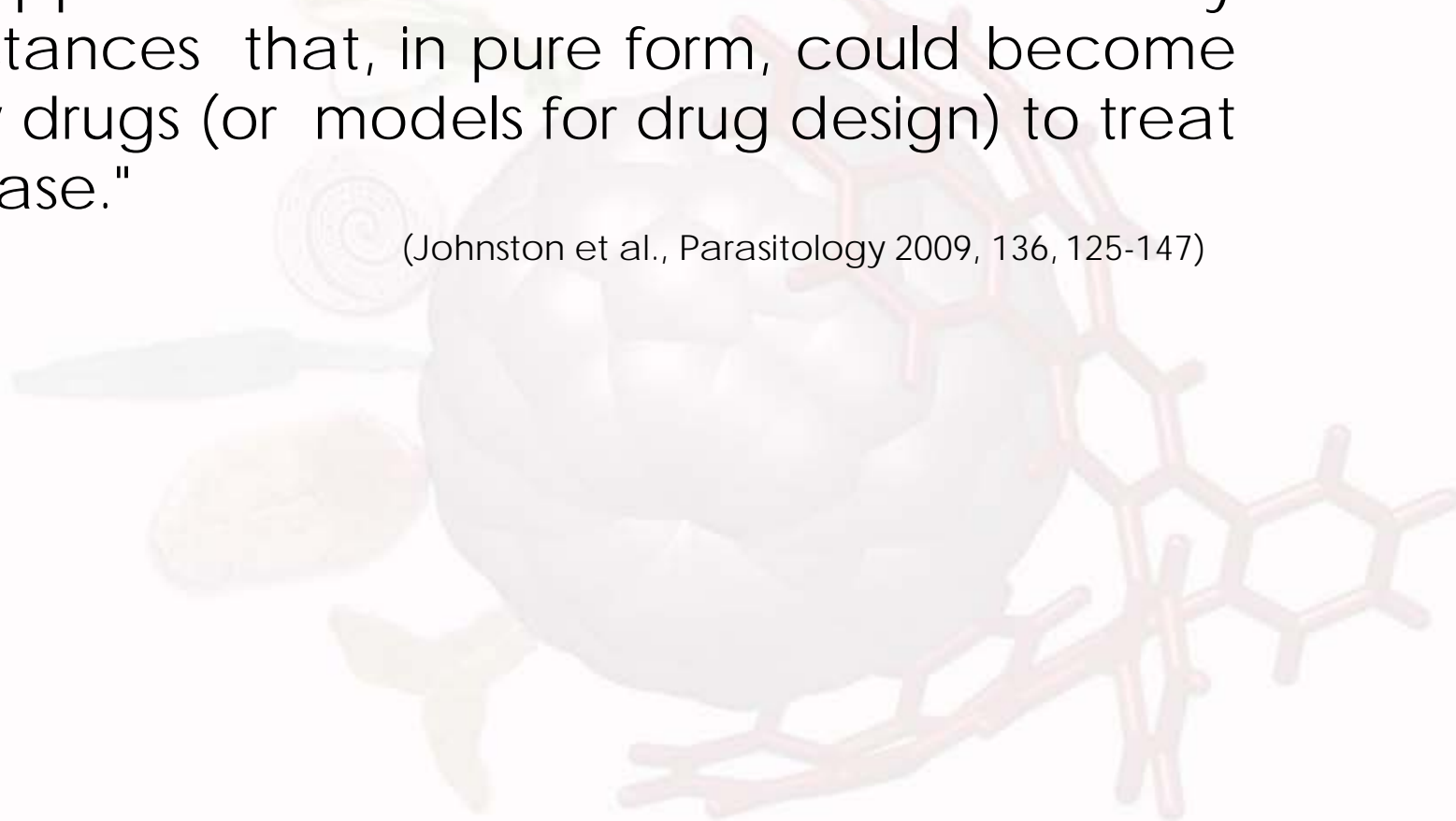
Mechanism	Diseases	Helminths	References
Th1 to Th2 shift	RA	<i>Acanthocheilonema vitae</i>	[33–37,77]
	MS	<i>Trichinella spiralis</i>	[16,80]
	GD	<i>Schistosoma mansoni</i>	[50]
	T1DM	<i>Trichinella spiralis</i>	[42]
		<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	[42,43]
		<i>Litomosoides sigmodontis</i>	[44]
Th17 downregulation	MS	<i>Schistosoma mansoni</i>	[47–49,81]
		<i>Trichinella spiralis</i>	[16,80]
		<i>Taenia crassiceps</i>	[61]
		<i>Trichinella pseudospiralis</i>	[62]
	IBD	<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	[60]
Th22 upregulation	RA	<i>Acanthocheilonema vitae</i>	[67]
	IBD	<i>Trichuris trichiura</i>	[68]
Tregs expansion	RA	<i>Fasciola hepatica</i>	[79]
	MS	<i>Trichinella spiralis</i>	[80]
		<i>Schistosoma mansoni</i>	[82]
		<i>Litomosoides sigmodontis</i>	[44,45]
	T1DM	<i>Schistosoma mansoni</i>	[49,81]
		<i>Heligmosomoides polygyrus</i>	[74]
		<i>Trichinella spiralis</i>	[76,83]
B10 cells expansion	RA	<i>Schistosoma mansoni</i>	[75]
		<i>Acanthocheilonema vitae</i>	[94,95,98]
	MS	<i>Schistosoma mansoni</i>	[82]
		<i>Acanthocheilonema vitae</i> ,	[99]
		<i>Brugia malayi</i> , <i>Nippostrongylus brasiliensis</i> , <i>Onchocerca volvulus</i>	

RA—rheumatoid arthritis; MS—multiple sclerosis; GD—Graves' disease; T1DM—type 1 diabetes mellitus; IBD—inflammatory bowel disease.

ZÁVĚR

"It is our view that parasitic helminths are an untapped source of immunomodulatory substances that, in pure form, could become new drugs (or models for drug design) to treat disease."

(Johnston et al., Parasitology 2009, 136, 125-147)



FILÁRIE

Lymfatické filariozy:

asi 120 milionů lidí, 2/3 v Číně, Indii a Indonezii a Pacifiku.
Wuchereria bancrofti - 100 milionů v tropech celého světa.
Brugia malayi (hlavně Indie a Čína) a B. timori (Sundy).

Onchocerca volvulus: kožní filarióza

20 milionů lidí v trop. Afrika (a J. Amerika).

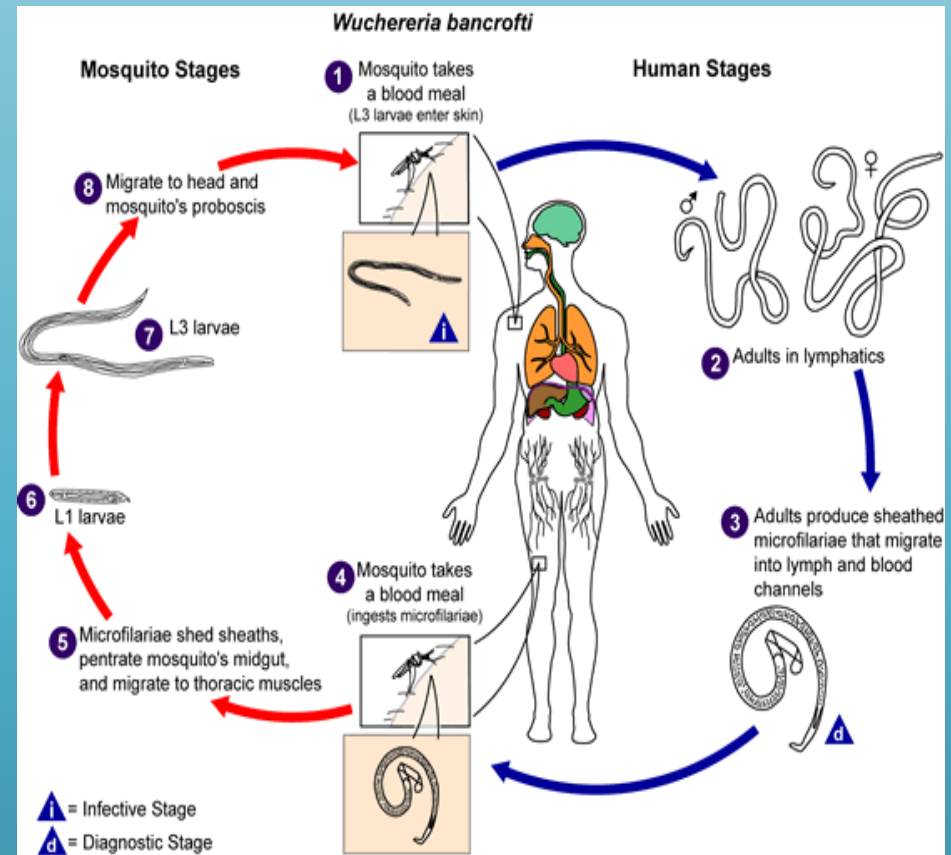
Společné rysy onemocnění:

chronické, dlouhodobé (červi 5-15 let)
dlouhá prepatentní periodu (9-18 měsíců),
opakované a kumulující se infekce
většina infikovaných asymptomatictí nosiči,
u symptomatických pacientů ne smrt, ale těžké poškození
trpí více muži

Lymfatické filariozy

mikrofilárie týdny v krvi,
vyplavují se do periferní krve.
V komárovi max. asi 20 larev,
proto i hostitel s málo mikrofiláriemi
dobrým zdrojem nákazy
Po 8-14 dnech v labiu L3 (asi 1 mm).

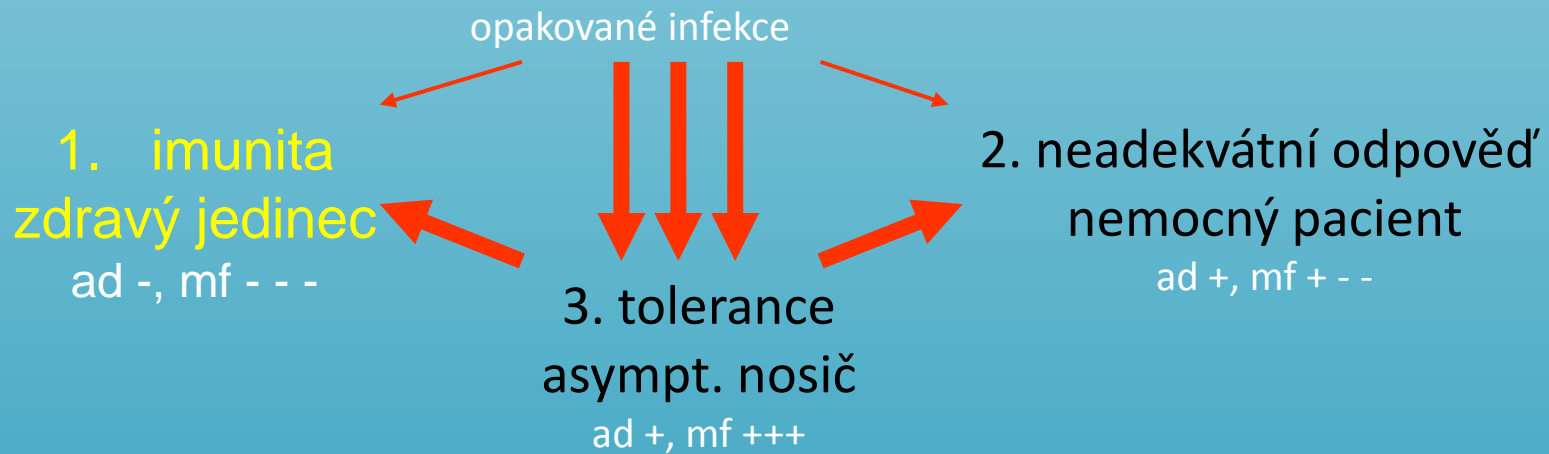
Wuchereria + - výhradně u člověka,
nemá rezerv. hostitele (antropozoa).
Přenašeči nejčastěji Culex,
někde též Aedes a Anopheles.



Brugia může mít rezervoárové hostitele, patentní nákazy se vyvíjejí v
některých opicích, kočkách, psech, fretkách a pískomilech. Přenos nejčastěji
Mansonia.

Prevalence vzrůstá do 20. roku, pak pokles, vliv protektivní imunity

Tři skupiny osob infikovaných lymfatickými filariemi



1. protektivní imunní jedinec: nemá mikrofilárie a netrpí symptomy.
2. neadekvátní autoimunitní a hyperreaktivní imunitní odpověď:
akutní symptomy: horečky a záněty
chronické symptomy: edémy, elefantiáza
málo Mf v krvi.
3. tolerantní bezsymptomatickými nosiči, hodně Mf
nejčastější případ

Příznaky onemocnění u lymfatických filarióz ad2: pacienti s hyperreaktivní odpovědí

Část příznaků dospělí červi:

lokální zánět, edémy, dilatace lymfatických cév, lymfatické léze, ztlustění stěn lymfatických cév a jejich fibrózu. Postupně může dojít k lymfostázám a obstrukcím v lymfatických cévách s následnou elefantiázou.

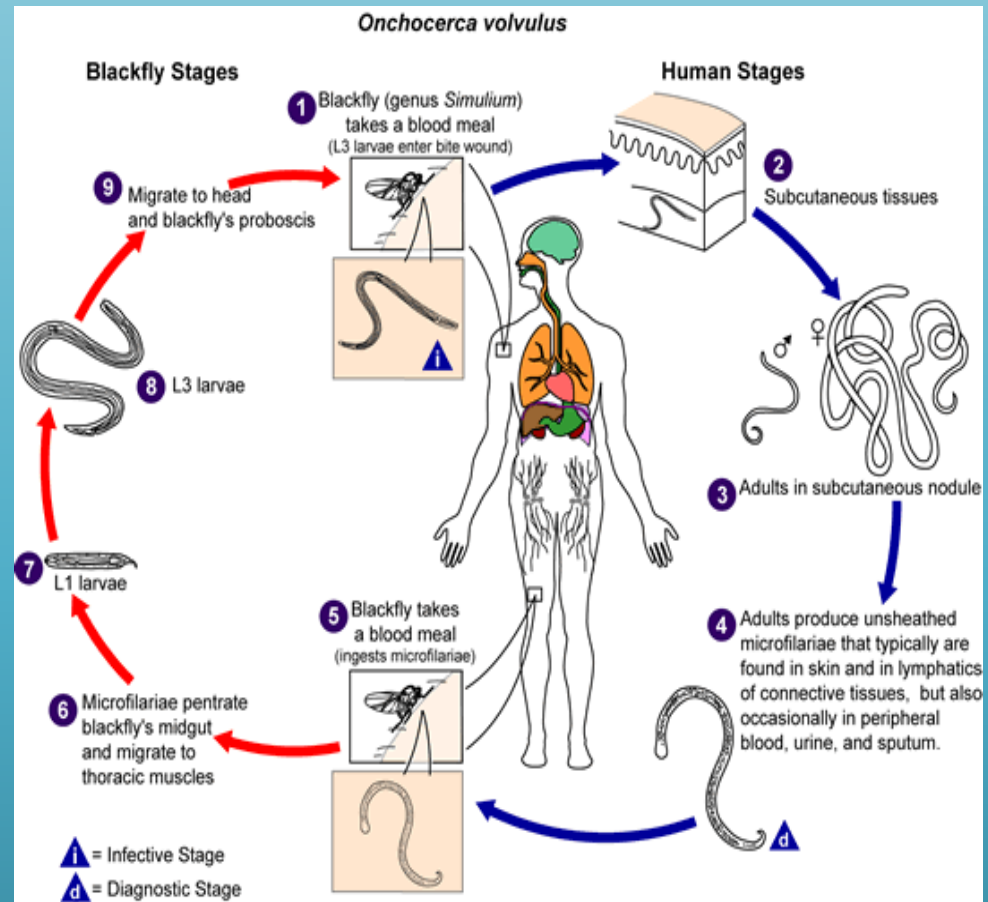
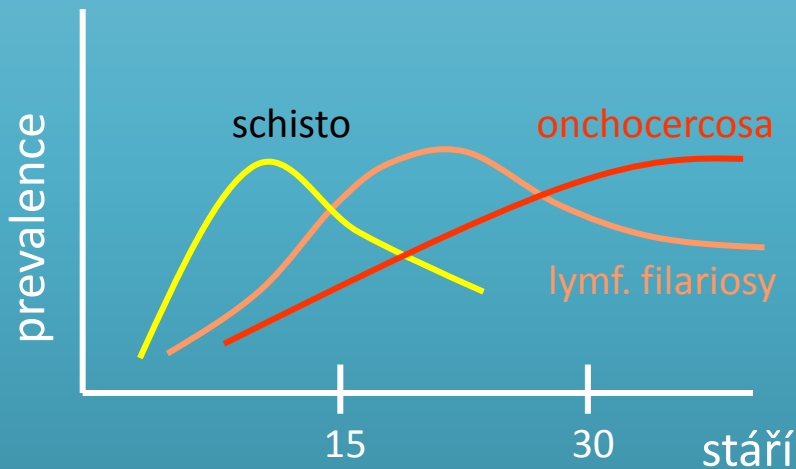
část mikrofilárie:

Cytotoxická hypersenzitivní reakce zprostředkované protilátkami (ADCC) ničí mikrofilárie, do oběhu se uvolňuje řada Ag. a alergenů parazita.

Syndrom tropické pulmonální eosinofilie, extrémní hladiny IgE, eosinofilů, hypersenzitivita proti mf, které zachyceny v plicích. Astmatické problémy.

Onchocerca volvulus

mf v poživu dermis, Simulium
promořenost stoupá s věkem



V hyperendem. oblastech 100% osob nad 30-40 let, symptomy následují.
 Pouze 2-3 % osob imunní? nedochází k vytvoření protektivní imunity
 (obdobně u *Mansonella ozzardi*).

Tři možnosti klinické prezentace u onchocerkóz:

1. imunní jedinci – vzácní
2. generalizovaná forma: nejčastější případ
minimální zánět,
mnoho živých mf, relativně malé podkožní noduly s dospělci,
většinou doprovázena částečnou konkomitantní imunitou
: pomalá akumulaci infekcí
x při odléčení nárůst akumulace mnohem rychlejší
3. chronická hyperaktivní forma: velká místní zánětlivá reakce,
„sowda“
dermatitida, smrcení mf (0 nebo minimum mf)
velké podkožní noduly s dospělci
patologický stav

Příznaky onemocnění u onchocerkózy

Hlavním patogenní agens = mikrofilárie

opakované místní záněty, hypersenzitivní reakce, poškození a ztenčení podpůrné tkáně kůže, tenká a vrásčitá pokožka, visí v záhybech, narušení pigmentové vrstvy (leopardí kůže).

Oční forma: pošk. rohovky.

antigeny červů navozují autoimunitní stavy, např. protilátky pacientů reagují zkříženě s antigeny oční a nervové tkáně

Dospělci *O. volvulus* v nodulech = granulomech, dobré kapilární zásobení, ne nekroza.



Wuchereria a Onchocerca: problémy s adekvátními modely

dlouhověkost

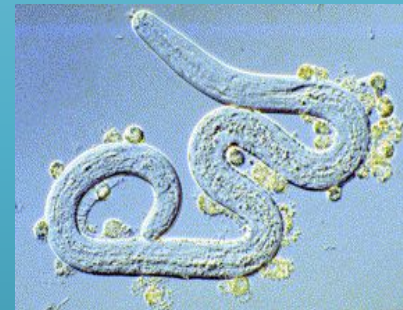
dlouhodobost pathogeneze

problém s počítáním dospělců

počet mf není úměrný počtu dospělců

chov přenašečů a získávání L3

implantace L3 v „difuzních komůrkách“



Model	hostitel	přirozeně	studovaná stádia	dobu
Brugia	hlodavci, kočky	- +	(všechny)	týdny
O. volvulus	šimpanz	+ -	Mf	1-2 roky
O. lienalis, ochengi	skot	+	Mf, ad	0,5-1 rok
O. lienalis, volvulus	myš	--	L3, L4	1-3 týdny
Acanthocheilonema	pískomil	+	všechny	1-30 týdnů

Obranné mechanismy filárií: 1

1. **antigenní variabilita stádií** (Onchocerca i lymfatické filarie):
Ag L3 odlišné od Ag dospělců. Ab nereagují zkříženě mezi stádii.
2. **maskování** (lymfatické): vážou Ag krevních skupin, albumin a blokující protilátky podtřídy IgG4. Destrukce Fc fragmentu navazaných Ab pomocí proteáz.
3. **mimikry** = homologie s Ag hostitele (lymfatické):
Hlavní povrchový Ag u L4 v kutikule = glutathion peroxidáza (GP29).
Homologní s lidskou glutathion peroxidázou.
Konzervován u všech filárií rodů Wuchereria, Brugia i Loa.

Obranné mechanismy filárií: 2

4. **antioxidativní enzymy** a reparace kutikuly: glutathion-peroxidáza GP 29 i hlavním antiox. enzymem, odstraňuje radikály a asi i opravuje dityrosinové spoje mezi povrchovými proteiny.

5. **polyklonální aktivace lymfocytů**. U všech **fosforylcholin**, povrchový Ag vyvolávající vysokou Ab odpověď, která není protektivní ("decoy antigen"). spolu s jinými Ag: hypergamaglobulinemie, imunní komplexy ap.

6. **imunomodulace a inhibice hemostáze** (lymfatické)
prostaglandiny štěpené z lipidů imunosupresivní,
spolu s dalšími inhibují agregaci a degranulaci destiček.
Výsledek: umožňuje opakované infekce a zabraňuje
patogenním stavům.

Hlavní typy účinku imunitní odpovědi na filarie

A: proti L3, nezasahuje Mf a dospělé filárie (anergie):

ideální protektivní imunita,

časté u lymfatických filarióz, vzácné u onchocerkózy

není doprovázena patologickými stavy

Protektivní imunita se vyvíjí řadu let, třeba opakované expozice.

Většinou imunita jen částečná (70-95%), konkomitantní (nesterilní) proti superinfekci, v praxi méně uchycených dospělců, často jsou poškozeni či málo plodní

B. proti Mf, dospělci nezasaženi a dál produkují Mf

typické pro **onchocerkózu**, patologické stavy - **sowda**

C: proti dospělcům , nezasahuje Mf, ty přežívají. Málo časté

Efektorové mechanismy

Eosinofily: 1. uvolnění proteinů z granulí,
2. kyslíkovými radikály
u nosičů (generalizovaná onchocerkóza),
většinou jen eliminují mrtvé mf
u sowdy přehnaná odpověď



makrofágy, neutrofilý, mastocyty: opět zejména u zánětů vedoucích k
chronické lymf. filarióze (elefantiáza) a u sowdy

Ab a komplement: cytotoxická hypersenzitivní reakce (ADCC) ničí mikrofilárie,
ale i zdroj patolog. stavu

Mf citlivé na ROS: ničeny převážně v plicích: astmatické příznaky

reakce eosinofilů a ostatních leukocytů souvisí s Th odpovědí
hyperreaktivní Th1 a Th2 odpověď je nebezpečná

Různorodá funkce protilátek

IgE: smrt parazitů, ale i patologie (trop. pulmonální eosinofilie, sowa ap)

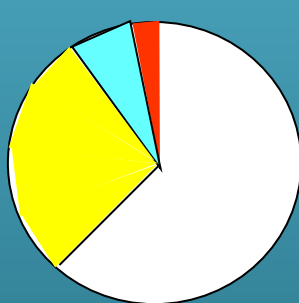
Koncentrace IgE je u různých stavů onemocnění reciproční k IgG.

relativně nejméně IgE u tolerantních nosičů

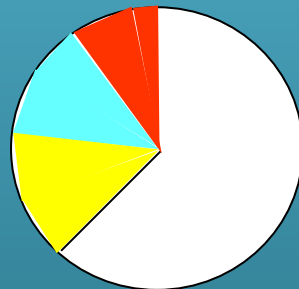
chroničtí pacienti třicetkrát vyšší poměr IgE/IgG, než tolerantní nosiči.

IgG různých podtříd (viz schisto): zásadní změny IgG4 během onemocnění

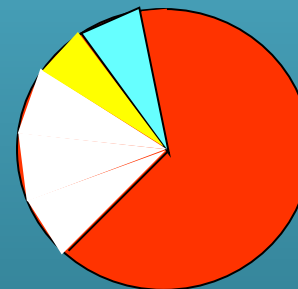
Vlastnosti protilátek IgG	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
% celkového IgG u „normálů“	67	24	6	3
vazba komplementu	++	+	+++	--
vazba na makrofágy	++	--	++	--



normál



chronik



nosič

IgG4
u tolerantních nosičů
okolo 65 %.

Změna klinického stavu při filariózách

Tři klinické skupiny: 1. protektivní imunní,
2. neadekvátní hyperreaktivní odpověď
3. tolerantní bezsymptomatictí nosiči

Obráz onemocnění mění !!!!!

z tolerantních nosičů se mohou stát symptomatictí pacienti (vznik hypersenzitivního stavu), nebo imunní jedinci. Častější u lymfatických.



Změna v Th odpovědi

Nosiči: specifická imunotolerance (anergie)

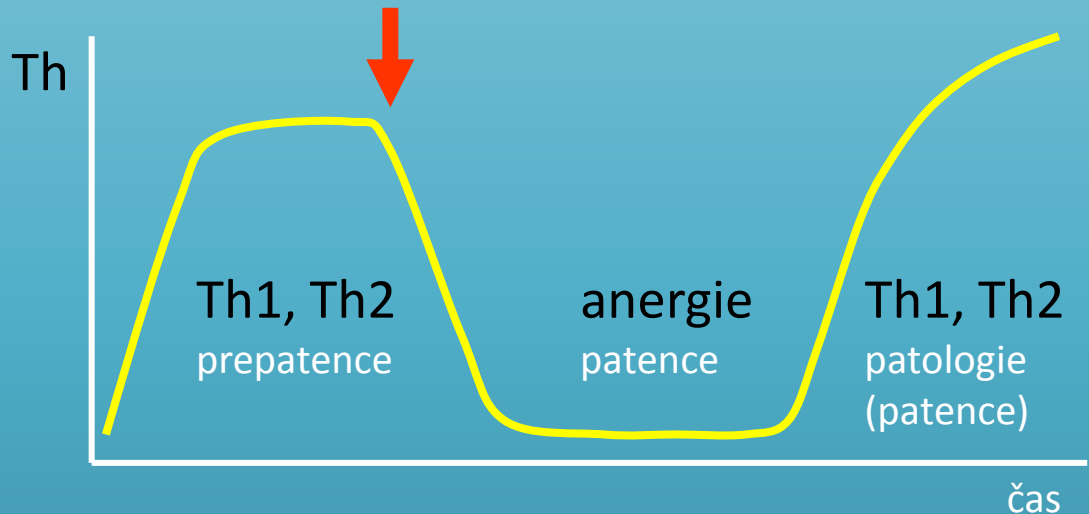
u lymfatických filarióz i onchocerkózy

Týká se různých stádií (mf i ad)

Časově souvisí s patencí = objevením **mikrofilárií** (lidé, šimpanzi, skot).

Umožňuje přežívání
ad a Mf

Její přerušení vede
k hypersenzitivním stavům



Před a po anergii produkce Th1 a Th2: indukovány asi různými Ag
Th1 proti symbiontům (Wolbachia), Th2 proti cukerným epitopům helminta

Vliv neonatální tolerance?

Domorodci vyšší Th2, nižší lymph. proliferace, nižší patologie
než přistěhovalci, prevalence ale stejná. Mláďata dostávají Ag v mléce?

Za stav anergie je zodpovědná Th3 odpověď

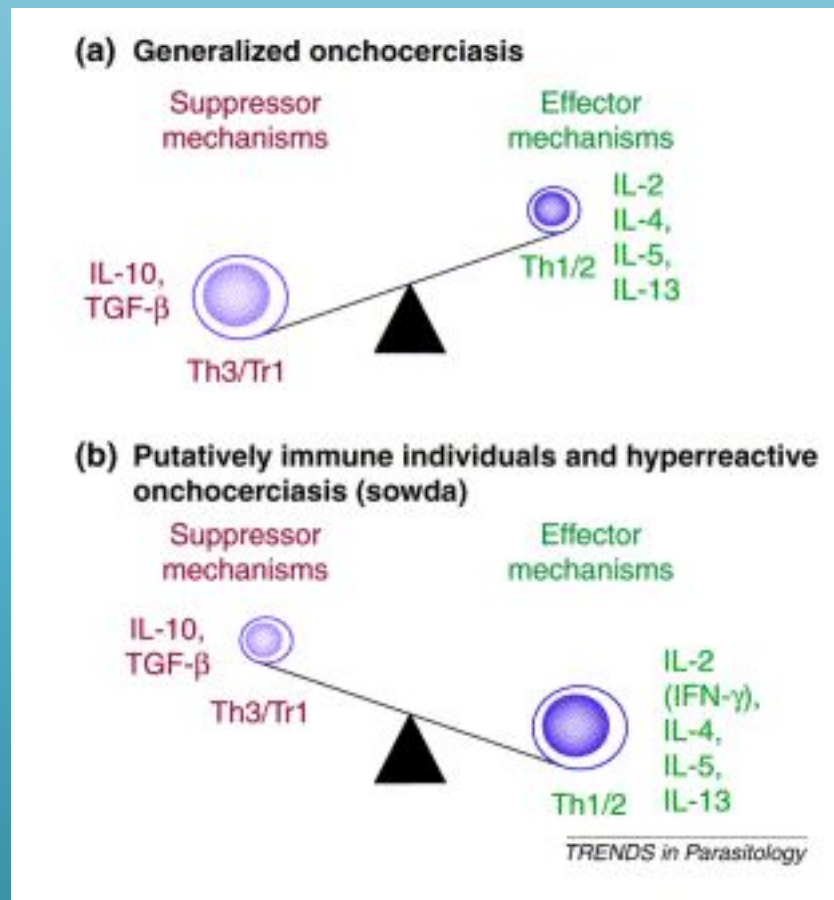
u generalizované onchocerkóze (GEO)
asi platí i pro nosiče u lymfatických

Imunitní stav při anergii:

produkce Th1: IL-2, IFN (víc než u GEO)
zároveň i Th2: IL-5 jako u imunních
navíc vysoké hladiny IL-10 a TGFb
transforming-growth factor: suprese Th
IL-10: suprese Th2 alergických reakcí

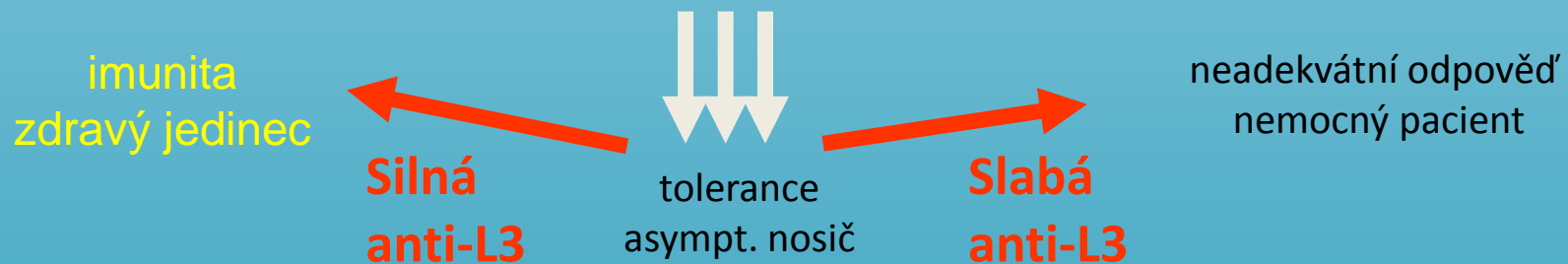
IL10 a TGFb typické pro supresorové
T lymfocyty Th3 = T regulatory1 (Tr1),
jejich marker CTLA-4 (cytotoxic-T-
lymphocyte-associated antigen 4)
také velmi zvýšen u nosičů
produkcí IL-10 se uplatňují i některé AP buňky

Proč Th3 začne: asi díky různým Ag signálům. Ale proč skončí?



Nestabilita tolerantního stavu a nebezpečí imunopatologie

Přerušení asymptomatického stavu = znovuobjevení imunitní odpovědi.
Pravděpodobnost vzrůstá s dobou infekce.



Záleží na momentální síle **anti- L3** odpovědi

1. Vyvinuta dostatečná anti-L3: blokáda nové infekce, vyhynutí dospělců.
(Trvá neodpovídatost vůči mf a dospělců). Běžnější u lymfatických
2. Slabá anti-L3 imunita: dospívání dalších infekcí a kontinuální produkce mikrof.: záněty, hypersenzitivita, chronické onemocnění, patologie.

Vývoj anti L3 dlouhodobý, třeba opakované infekce. Příčiny změny?
Jak dlouho se udrží i v nepřítomnosti antigenu? Migrace osob?

Vakcina proti filariózám

požadavek: dlouhotrvající imunita k L3, nevyvolat patologii (adulti, Mf)

Typy používaných antigenů:

1. ozářené infekční larvy (XL3), nelze mrtvé (exkretory/secretory antigen)

v různých lab. modelech nejméně 90% protekce

zkřížená protekce mezi druhy i rody

příklad: *Onchocerca*: úspěch u myší, krav,

ale u šimpanzů jen částečně

zkřížená imunita mezi druhy: *O. volvulus* a *O. ochengi*:

crossprotekce na *O. volvulus* u lidí imunizovaných L3 *O. ochengi*

2. rekombinantní antigeny. v myších modelech rekombinantní antigeny

obdobné výsledky jako XL3

: L3-specifické Ag

: antiox. enzymy: GP29, SOD, GST

: paramyosin,

: skryté antigeny: střevní epitel

(obdoba Bm86 u klíšťat a H11 u *Hemonchus*).

Příklad vývoje vakcíny proti filariózám: *Onchocerca volvulus*

Navrhovaný
postup

současný stav:
asi 15 rekombinantních
proteinů vyvolávajících
částečnou protekci

perspektiva:
multivalentní vakcíny

