

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Parazitologie



Bc. Irena Parohová

**Parazitem indukovaná apoptóza u myší infikovaných neuropatogenní
schistosomou *Trichobilharzia regenti***

Parasite-induced apoptosis in mice infected with the neuropathogenic
schistosome *Trichobilharzia regenti*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Tomáš Macháček

Praha 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 10. 8. 2020

.....

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli Tomáši Macháčkovi za velkou trpělivost, pomoc a cenné rady během mého magisterského studia. Dále bych ráda poděkovala celému týmu helmintologické laboratoře za příjemné prostředí a pomoc v mých začátcích. Velký dík patří také naší studijní skupině DP, Miriam a Martinovi. V neposlední řadě bych ráda poděkovala i své rodině a druhé rodině z Košíř za podporu během mého studia.

Abstrakt

Helminti dokáží indukovat apoptózu u imunitních buněk hostitele, a tak potlačit či zmírnit imunitní odpověď. K indukci apoptózy však může docházet nejen u imunitních buněk hostitele, ale i u jiných buněk přítomných v infikovaných tkáních, což přispívá k patologii infekce. Schistosomy jsou známy jako efektivní imunomodulátoři schopní skrze indukci apoptózy zmírnit imunitní odpověď hostitele, což jim zajišťuje přežití v savčím hostiteli. V případě infekce myší ptačí neuropatogenní schistosomou *T. regenti* dochází k jejímu úhynu vlivem imunitní odpovědi hostitele. Tudíž se zdá, že nedokáže efektivně modulovat imunitní odpověď. Naopak parazitem indukovaná apoptóza u hostitelských buněk přítomných v tkáních infikovaných *T. regenti* může přispívat k patologii. Proto jsme se rozhodli ověřit, zda je *T. regenti* schopná u infikovaných myší indukovat apoptózu. Nejprve jsme pomocí TUNEL testu detekovali DNA fragmentaci v zasažených tkáních. To ukázalo, že v infikované kůži 8, 24 a 48 hodin po infekci a míše 14 dní po infekci dochází k DNA fragmentaci. Navíc jsme v míše díky analýze transkriptomických dat pozorovali zvýšenou míru exprese proapoptických genů. Tato pozorování naznačují možnou apoptózu hostitelských buněk vlivem *T. regenti* v infikovaných tkáních. Poté jsme s využitím průtokové cytometrie detekovali apoptózu buněk v lymfatických orgánech a u vybraných hostitelských buněk stimulovaných parazitárními antigeny. Výsledky těchto experimentů ukázaly zvýšené počty apoptických leukocytů ve slezině 14, 21 a 28 dní po infekci a tříselných lymfatických uzlinách 14 dní po infekci. Výsledky stimulací vybraných hostitelských buněk prokázaly pro-apoptický potenciál homogenátu schistosomul u lidských keratinocytů *in vitro*. V případě stimulací dalších buněčných linií a kultur nebyl prokázán pro-apoptický potenciál parazitárních antigenů *in vitro*. V souhrnu naše výsledky naznačují na možnou apoptózu hostitelských buněk spíše jako původce patologie než jako mechanismus imunomodulace.

Klíčová slova: apoptóza, *Trichobilharzia regenti*, mícha, kůže, slezina, lymfatické uzliny, průtoková cytometrie, TUNEL test

Abstract

Helminths are capable of induction of apoptosis in host immune cells and thus suppress or dampen the host immune response. Nevertheless, apoptosis can affect also other, non-immune cells present in the infected tissues which contributes to the pathology related to the infection. Schistosomes are known to be potent immunomodulators, able to dampen the immune response of the host through induction of apoptosis, which ensures their survival. In the case of mice infected with the avian neuropathogenic *T. regenti*, the host immune response is responsible for parasite elimination. Therefore it seems that *T. regenti* can not effectively alter the immune response. On the contrary, parasite induced apoptosis in host cells present in the tissues infected with *T. regenti* could contribute to pathology. Thus we decided to investigate if *T. regenti* is capable of induction of apoptosis in infected mice. Firstly, we used TUNEL assay to detect DNA fragmentation in infected tissues. We demonstrated that DNA fragmentation is present in the infected skin 8, 24 and 48 days post infection and spinal cord 14 days post infection. Moreover, the transcriptomic analysis of the infected spinal cords revealed up-regulated expression of pro-apoptotic genes. These observations indicate possible apoptosis of host cells due to the effect of *T. regenti* in the infected tissues. Then, we applied flow cytometry to analyze apoptosis of cells in lymphatic organs and selected host cells stimulated with parasite antigens. The results demonstrated the presence of apoptotic leukocytes in the spleen 14, 21 and 28 days post infection and in inguinal lymph nodes 14 days post infection. The results from stimulations of selected host cells demonstrated pro-apoptotic effect of schistosomula homogenate in human keratinocytes *in vitro*. In case of other cell lines and cultures, the pro-apoptotic effect of parasite antigens has not been proven *in vitro*. Taken together our results point to possible apoptosis of host cells due to the infection of *T. regenti* which is more likely related to tissue pathology than intentional immunomodulation.

Key words: apoptosis, *Trichobilharzia regenti*, spinal cord, skin, spleen, lymph nodes, flow cytometry, TUNEL test

Obsah

Seznam zkratk	1
1. Úvod	4
2. Literární úvod	5
2.1. Apoptóza	5
2.1.1. Vnitřní cesta aktivace	6
2.1.2. Vnější cesta aktivace	7
2.1.3. Perforin/Granzym cesta aktivace	8
2.1.4. Metody detekce apoptózy	9
2.2. Helminty indukovaná apoptóza	13
2.2.1. <i>Schistosoma</i> spp.	13
2.2.2. <i>Fasciola hepatica</i>	16
2.2.3. <i>Taenia</i> spp.	19
2.2.4. <i>Echinococcus</i> spp.	21
2.2.5. <i>Trichinella spiralis</i>	23
2.2.6. Filárie	25
2.2.7. Další helminti	27
2.3. <i>Trichobilharzia regenti</i>	33
3. Materiál a metodika	35
3.1. Pufry média a roztoky	35
3.2. Modelový organismus a experimentální infekce	37
3.2.1. <i>Trichobilharzia regenti</i>	38
3.2.2. Náhodní hostitelé a jejich infekce	38
3.3. Bioinformatická analýza	39
3.4. První část <i>in vivo</i> experimentů: fragmentace DNA v kůži a míše	39
3.4.1. Transkardiální perfuze	40
3.4.2. Zpracování tkáně a zhotovení kryořezů	40
3.4.3. TUNEL test	40
3.5. Druhá část <i>in vivo</i> experimentů: apoptóza v lymfatických orgánech	41
3.5.1. Získ splenocytů a lymfatických uzlin	41
3.6. <i>In vitro</i> experimenty	42
3.6.1. Příprava antigenu	42
3.6.2. Buněčné kultury použité při stimulačních <i>in vitro</i> experimentech	43
3.6.3. Stimulace buněk	46
3.7. Příprava vzorků z <i>in vivo</i> a <i>in vitro</i> experimentů pro průtokovou cytometrii	46
3.8. Měření <i>in vitro</i> experimentů na průtokovém cytometru	47

3.9. Statistika	47
4. Výsledky.....	49
4.1. Bioinformatická analýza	49
4.2. <i>In vivo</i> experimenty	50
4.2.1. TUNEL test.....	50
4.2.2. Průtoková cytometrie	55
4.3. <i>In vitro</i> experimenty	58
4.3.1. Průtoková cytometrie	58
5. Diskuze	67
6. Závěr.....	78
7. Seznam literatury	79
8. Přílohy	88
8.1. Bioinformatická analýza	89
8.2. Gatovací strategie	91
8.3. Splenocyty z infikovaných myší <i>T. regenti</i>	100
8.4. Stimulace a restimulace splenocytů	101

Seznam zkratek

AIF	z angl. apoptosis inducing factor
Akt	proteinkináza B
Apaf-1	z angl. apoptosis protease activating factor 1
APP	z angl. amyloid precursor protein
Bad	z angl. Bcl-2 antagonist of death
Bag	z angl. Bcl-2 associated anthanogene
Bak	z angl. Bcl-2 antagonist killer
Bax	z angl. Bcl-2 associated X protein
Bcl-w	z angl. Bcl-2 like 2 protein
Bcl-X	z angl. Bcl-2 like1
Bcl-XL	z angl. Bcl-2 related protein, long isoform
Bcl-XS	z angl. Bcl-2 related protein, short isofom
Bcl-2	z angl. B cell lymphoma 2
Bcl-10	z angl. B cell lymphoma protein 10
Bid	z angl. BH3 interacting domain death agonist
Bik	z anl. Bcl-2 interacting killer
Bim	z angl. Bcl-2 interacting protein
Blk	z angl. Bik like killer protein
BME	Eaglovo bazální médium, z angl. Basal medium Eagle
Bnip1	z angl. Bcl-2 interacting protein 1
BpA	antigen sekretovaný <i>B. pahangi</i>
CAG	cerkariální antigen
CAD	z angl. caspase activated DNase
CNS	centrální nervová soustava
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DISC	z angl. death inducing complex
DC	dendritické buňky, z angl. dendritic cells
DMEM	z angl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dpi	dní po infekci
DR5	z angl. death receptor 5
DUSP1	z angl. dual specifity protein phosphatase 1
EgKI-1	Kunitz typ proteázový inhibitor z onskoféry <i>E. granulosus</i>
ELISA	z angl. enzyme-linked immuno sorbent assay
EM	elektronová mikroskopie
ERK	z angl. extracellular signal-regulated kinases
ERS	stres endoplazmatického retikula, z angl. endoplasmic reticulum stress
ES-L1	exkrečně-sekreční molekuly produkované svalovými larvami
ESP	exkrečně-sekreční produkty
FACS	z angl. fluorescent activated cell sorting
FADD	z angl. Fas associated death domain
Fas	z angl. first apoptosis signal
Fas-L	Ligand pro Fas
FBS	fetální bovinní sérum

Gadd45	z angl. growth arrest and DNA damage inducible
GATA-3	z angl. GATA binding protein 3
HaCaT	linie lidských keratinocytů
HcEF-1 α	elongačním faktor α <i>H. contortus</i>
Hco-gal-m	galektin <i>H. contortus</i>
HF	z angl. hydatid fluid
Hff	linie lidských fibroblastů (z angl. human foreskin fibroblasts)
hpi	hodin po infekci
IAP	z angl. inhibitor of apoptosis
ICC	imunocytochemie
ID	identifikační kód
IFN- γ	Interferon γ
IHC	imunohistochemie
IL	interleukin
JNK	c-Jun N-terminální kinázy
Jurkat	linie lidských T lymfocytů
MF	metacestodí faktor
Mf	mikrofilárie
mir-155	mikroRNA 155
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
Neuro2a	linie myších neuronů
NIH 3T3	linie myších fibroblastů
NK	přirození zabíječi, z angl. natural killer
OvALT-2	abundantní larvální transkript 2 <i>O. volvulus</i>
OvNLT-1	nový larvální transkript 1 <i>O. volvulus</i>
PARP	z angl. Poly ADP-ribose polymerase
PMBC	mononukleárních buňky periferní krve, z angl. peripheral blood mononuclear cells
PBS	fosfátový pufr, z angl. phosphate buffered saline
PCNA	z angl. proliferating cell nuclear antigen
PI	propidium jodid
PS	fosfatidylserin
qPCR	z angl. quantitative polymerase chain reaction
ROS	reaktivní kyslíkové radikály, z angl. reactive oxygen species
RPMI	Z angl. Roswell Park Memorial Institute medium
rSj16	rekombinantní protein odvozený od <i>S. japonicum</i>
SEA	z angl. soluble egg antigens
SMAC	z angl. second mitochondrial activators of caspases
Smaf	z angl. <i>Schistosoma mansoni</i> derived apoptosis inducing factor
SmNPP5	tegumentální ektoenzym <i>S. mansoni</i>
SH	homogenát schistosomul
STAT3	z angl. signal transducer and activator of transcription 3
T-bet	z angl. T box transcription factor
TdT	terminalní deoxynukleotidová transferáza

TEM	transmisní elektronová mikroskopie
Tfh	folikulární pomocné T lymfocyty, z angl. T follicular helper
Th	pomocné T lymfocyty, z angl. T helper
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
TPM	z angl. transcripts per million
TRADD	z angl. tumor necrosis factor type 1 associated death domain protein
TRAIL	z angl. TNF-related apoptosis inducing ligand
Treg	regulační T lymfocyty
TUNEL	z angl. TdT-mediated dUTP nick end labeling
TyrK	tyrosin kináza
WB	Western blot
wpi	z angl. weeks post infection
7-AAD	7-amino-aktinomycin D

1. Úvod

Pro přežití ve svém hostiteli si řada helmintů¹ osvojila schopnost modulace imunitního systému ve svůj prospěch. Jedním z mechanismů imunomodulace je indukce apoptózy u imunitních buněk hostitele. Apoptóza je druh programované buněčné smrti, ke které dochází skrze komplexní signalizační kaskádu, a je považována za vysoce regulovaný proces. Její uplatnění je v celé řadě imunologických a fyziologických procesů, například při odstranění autoreaktivních imunitních buněk při negativní selekci v brzlíku. Její indukce či naopak inhibice helminty u různých populací imunitních buněk může vést k potlačení imunitní odpovědi nebo skrze eliminaci některých typů imunitních buněk k vytvoření vhodného imunologického prostředí prospěšného pro parazita, což mu zajišťuje dlouhodobější přežívání v hostiteli. Zároveň však indukce apoptózy u hostitelských buněk může vést k poškození tkání a následné patologii, jako vedlejšímu projevu působení parazita.

Lidské schistosomy jsou v literatuře označovány za zdatné imunomodulátory, již působí chronické infekce. K této imunomodulaci přispívá i parazitem indukovaná apoptóza imunitních buněk. V případě infekce myší ptačí neuropatogenní schistosomou *T. regenti* však dochází k jejímu úhynu vlivem imunitního systému. Primárně se tedy zdá, že *T. regenti* není schopna efektivní imunomodulace popsané u lidských schistosom (myši jsou pro ni náhodní hostitelé), zároveň však může parazitem indukovaná apoptóza hostitelských buněk přispívat také k patologii v zasažených tkáních. Z předchozích pozorování v centrální nervové soustavě (CNS) byla patologie způsobená schistosomuly *T. regenti* přisuzována převážně mechanickému poškození vlivem migrace parazita, nicméně žádná práce se dosud nezabývala možným přispěním parazitem indukované apoptózy k patologii způsobené touto ptačí schistosomou. Proto jsme se rozhodli objasnit, zda při infekci myší motolicí *T. regenti* dochází k parazitem indukované apoptóze hostitelských buněk.

Cíle této práce jsou:

- Detekovat v průběhu infekce fragmentaci DNA, která je markerem apoptózy, u hostitelských buněk přítomných ve tkáních zasažených *T. regenti* (kůže a mícha) *in vivo*.
- Charakterizovat v průběhu infekce výskyt apoptických buněk *in vivo* ve slezinách a spádových uzlinách, jakožto orgánů periferní imunity.
- Experimentálně otestovat potenciál parazitárních antigenů indukovat apoptózu u vybraných hostitelských buněk (keratinocyty, fibroblasty, T lymfocyty, splenocyty, gliové buňky a neurony) *in vitro*.

¹ Pro účely této práce jsou za helminty považováni parazitičtí zástupci ze skupin Trematoda, Cestoda a Nematoda.

2. Literární úvod

2.1. Apoptóza

Apoptóza je jedním z typů programované buněčné smrti (dříve používána i jako synonymum pro programovanou buněčnou smrt). Jako samostatný biologický fenomén rozdílný od klasické buněčné smrti byla poprvé popsána v práci Kerra *et al.* (1972). Mezi formy buněčné smrti v současnosti řadíme mimo apoptózu a nekrózu také nekroptózu (regulovaná forma nekrózy), pyroptózu, ferroptózu, entózu, NETózu a další (Tang et al., 2019). Rozlišení konkrétního typu buněčné smrti je však u většiny často problematické. Tradičně nejčastěji s apoptózou srovnávaná nekróza se dá odlišit na základě cytomorfologických a biochemických znaků (viz Tab. 1). Až recentně se ukazuje spojitost apoptózy s nekrózou, kdy v případě ztráty energie či jinému defektu při aktivaci apoptické kaskády dochází k přechodu z apoptózy na nekrózu (Elmore, 2007).

Tabulka 1: Porovnání jevů typických pro apoptózu a nekrózu

Apoptóza	Nekróza
Geneticky regulovaná	Spontánní
Fyziologický i patologický děj	Patologický děj
Na energii závislý aktivní proces	Pasivní proces na energii nezávislý
Smrštění buňky, rozpad na apoptická tělíska	Zvětšení buňky vedoucí k její ruptuře
Kondenzace chromatinu a fragmentace jádra	Kondenzace chromatinu, fragmentace a rozpad jádra
Cytoplazma zůstává v apoptických tělíscích	Cytoplazma uvolněna při ruptuře buňky
Při fagocytóze apoptických tělísek nedochází k zánětu	Absolutní rozklad buňky, kterou doprovází zánět

Apoptóza je přísně regulovaný proces udržování homeostáze, který se běžně uplatňuje v eukaryotických organismech a reguluje buněčné populace v tkáních. Uplatňuje se například v embryogenezi, kde dochází k odstranění přebytečných buněk, nebo během pozitivní a negativní selekce imunitních buněk v brzlíku (Pollard et al., 2016). Mezi její morfologické charakteristiky během časné fáze patří smrštění buňky a kondenzace chromatinu, zahuštění cytoplazmy a fragmentace DNA. V pozdní fázi se v důsledku rozpadu cytoskeletu začínají tvořit tzv. apoptická tělíska obsahující cytoplazmu s organelami (Pollard et al., 2016). Tato tělíska jsou následně fagocytována fagocyty bez vzniku zánětlivé reakce. Eliminaci apoptických buněk umožňuje vystavení fosfatidylserinu (PS) ve vnějším listu cytoplazmatické membrány. Jde o tzv. eat-me signál rozpoznávaný fagocyty (Verhoven et al., 1995). Z biochemického hlediska je apoptóza děj zprostředkovaný komplexem signálních kaskád, k jejichž aktivaci vede několik cest. Mezi hlavní dvě cesty aktivace patří tzv. vnitřní mitochondriální cesta a vnější cesta skrze tzv. receptory smrti (viz dále a Obr. 1). Některé komponenty obou těchto cest mezi sebou mohou komunikovat, a tak i při aktivaci jedné cesty může dojít ke zprostředkování apoptózy přes druhou (Li et al., 1998). Přísná regulace těchto mechanismů je zásadní,

neboť přílišná apoptóza může vést k autoimunitním či neurodegenerativním onemocněním, naopak suprese pak může vést např. k rakovinnému bujení.

2.1.1. Vnitřní cesta aktivace

Za iniciaci vnitřní mitochondriální cesty aktivace jsou zodpovědné faktory jako oxidativní stres, poškození DNA, toxiny, hormony, hypoxie či nedostatek růstových faktorů a další, jež působí jako vnitrobuněčný signál bez zapojení receptorů. V důsledku působení těchto faktorů vznikají v mitochondriální membráně póry, čímž dochází k její depolarizaci a uvolnění proteinů souvisejících s apoptózou do cytosolu. Tyto pro-apoptické proteiny se dají rozdělit do dvou kategorií. Do první kategorie patří cytochrom C a SMAC (z angl. second mitochondrial activators of caspases). Cytochrom C se naváže na adaptorový protein Apaf-1 (z angl. apoptosis protease activating factor 1) a aktivuje tak iniciační kaspázu 9, což má za následek vytvoření apoptozomu, jehož působením dochází k naštěpení a aktivaci efektorových kaspáz 3 a 7. Oproti tomu SMAC inhibuje proteiny inhibice apoptózy (IAP) a zajišťuje tak kontinuální průběh apoptózy. Do druhé kategorie pro-apoptických proteinů patří endonukleázy AIF (z angl. apoptosis inducing factor), G a CAD (z angl. caspase activated DNase), jež se uvolňují až v pozdějším průběhu apoptózy a translokují do jádra, kde způsobují fragmentaci DNA. Endonukleáza CAD degraduje DNA v závislosti na aktivaci kaspázou 3, naopak endonukleázy AIF a G tak činí nezávisle na indukci kaspázami (Elmore, 2007).

Mezi regulační proteiny apoptózy patří proteiny z rodiny Bcl-2 (z angl. B cell lymphoma 2). Tyto proteiny (viz Tab. 2) svým zapojením do signálních kaskád zejména ve vnitřní cestě aktivace ovlivňují, zda apoptóza proběhne či nikoliv. Skrze regulaci těchto proteinů může dojít například i k apoptóze vlivem stresu endoplazmatického retikula (ERS) (Zong et al., 2003).

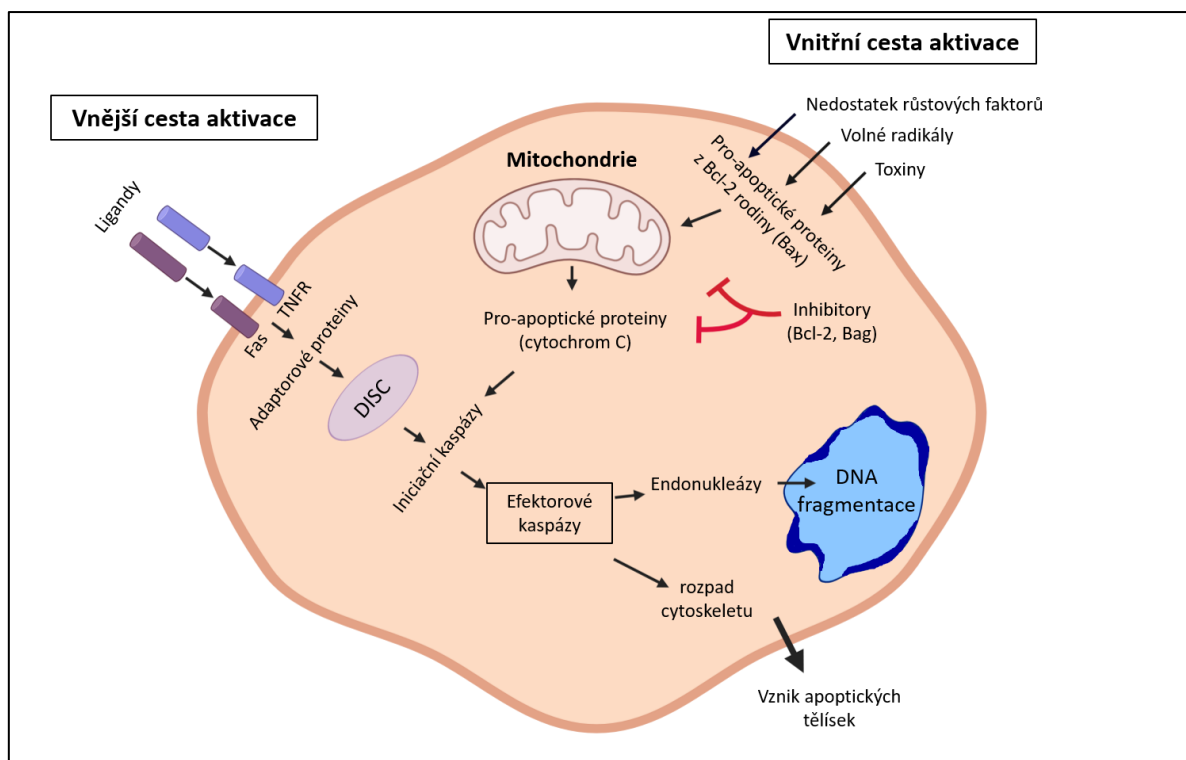
Tabulka 2: Přehled pro- a proti- apoptických regulátorů z rodiny Bcl-2 proteinů

Pro-apoptické proteiny	Proti-apoptické proteiny
Bcl-10 (z angl. B cell lymphoma protein 10)	Bcl-2 (z angl. B cell lymphoma protein 2)
Bax (z angl. Bcl-2 associated X protein)	Bag (z angl. Bcl-2 associated anthanogene)
Bak (z angl. Bcl-2 antagonist killer)	Bcl-X (z angl. Bcl-2 like1)
Bad (z angl. Bcl-2 antagonist of death)	Bcl-XL (z angl. Bcl-2 related protein, long isoform)
Bim (z angl. Bcl-2 interacting protein)	Bcl-XS (z angl. Bcl-2 related protein, short isoform)
Bik (z angl. Bcl-2 interacting killer)	Bcl-w (z angl. Bcl-2 like 2 protein)
Bid (z angl. BH3 interacting domain death agonist)	
Blk (z angl. Bik like killer protein)	
Bnip1 (z angl. Bcl-2 interacting protein 1)	

2.1.2. Vnější cesta aktivace

K iniciaci vnější cesty aktivace dochází skrze interakci mezi receptory smrti na buněčné membráně, jež patří do rodiny receptorů TNF (z angl. tumor necrosis factor) a jejich ligandy. Nejlépe popsán je mechanismus zprostředkování apoptózy následující interakci mezi Fas-L/Fas-R a TNF- α /TNFR1. Při navázání ligandu Fas-L na receptor Fas (z angl. first apoptosis signal) dojde k vazbě adaptorového proteinu FADD (z angl. Fas associated death domain). Při navázání mezi TNF- α na TNFR1 dojde k vazbě adaptorového proteinu TRADD (z angl. tumor necrosis factor type 1 associated death domain protein), jež interaguje s FADD, což vede ke zformování DISC (z angl. death inducing complex). Komplex DISC aktivuje iniciační kaspázu 8, která následně aktivuje další efektorové kaspázy.

Obě tyto cesty aktivace vyústí ve spuštění efektorové fáze zprostředkované efektorovými kaspázami, mezi něž patří kaspázy (skupina cysteinových proteáz) 3, 6 a 7. Ty se pak váží na tzv. substráty smrti, např. cytoskeletární proteiny, jaderné proteiny, cytokeratiny či PARP (z angl. Poly ADP-ribose polymerase) a ve výsledku dochází v buňce k cytomorfologickým apoptickým změnám popsaným výše. Esenciální roli v této fázi zastává kaspáza 3, jež aktivuje endonukleázu CAD a tvorbu apoptických tělísek (Pollard et al., 2016).



Obrázek 1: Schéma vnitřní a vnější cesty aktivace apoptózy, vyhotoveno dle Elmore *et al.*, 2007. Hlavní dvě cesty aktivace se liší ve své indukci a regulaci, ve výsledku pak obě vyústí v aktivaci kaspáz. Ve vnitřní (mitochondriální) cestě dochází k porušení rovnováhy u proteinů z Bcl-2 rodiny, jež regulují permeabilitu mitochondriální membrány a následně k uvolnění různých látek z mitochondrií (např. cytochrom C, což vede k aktivaci kaspáz. Ve vnější cestě (skrze receptory smrti) signály z membránových receptorů vedou k navázání adaptorových proteinů a tvorbě DISC, jež aktivuje kaspázy a výsledný efekt aktivace je stejný u obou cest.

2.1.3. Perforin/Granzym cesta aktivace

Mimo tyto dvě hlavní cesty existuje i perforin/granzym cesta aktivace využívaná T lymfocyty a NK (z angl. natural killer) buňkami při indukci apoptózy u cílových buněk (Devadas *et al.*, 2006). Dochází zde k vytvoření póru v plazmatické membráně vlivem proteinu perforinu, skrze nějž se dostává granzym B do buňky. Granzym B štěpí a aktivuje iniciační i efektorové kaspázy. Také je schopen amplifikace apoptického signálu skrze indukci uvolnění cytochromu C z mitochondrií. Oproti tomu granzym A jedná při degradaci DNA nezávisle na kaspázách (Martinalet *et al.*, 2005).

Za účelem výzkumu okolností a typu buněčné smrti byla vytvořena celá řada metod určených k jejich detekci.

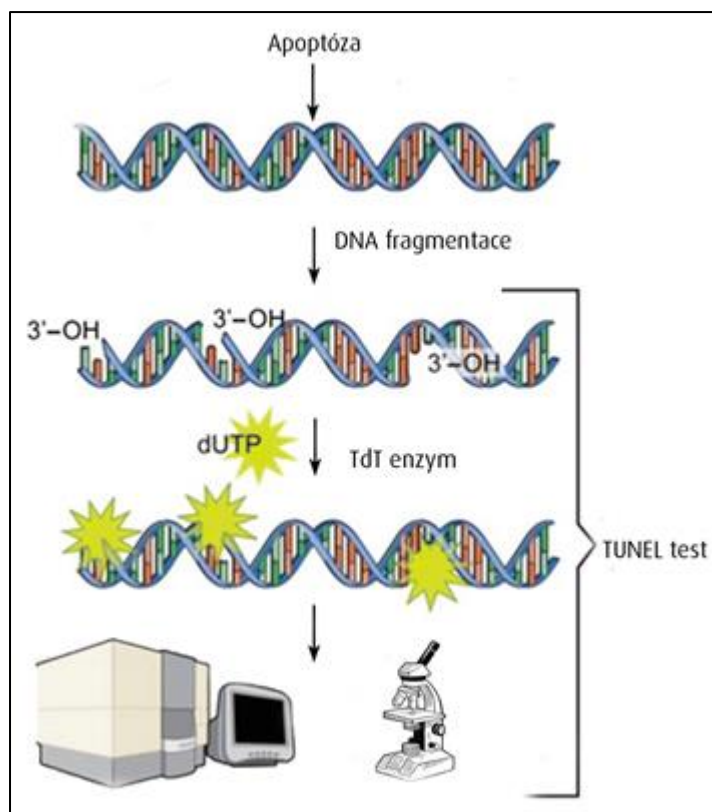
2.1.4. Metody detekce apoptózy

Pro detekci apoptózy je uzpůsobeno množství metod, jež cílí na rozdílné markery, ať už cytomorfologické či biochemické. Avšak některé markery apoptózy jsou společné i pro nekrózu, proto je důležité pro objasnění, zda se jedná skutečně o apoptózu, využít alespoň dvě různé metody detekce založené na odlišných principech. Druhým důležitým faktorem je pak znalost výhod a limitací jednotlivých testů při interpretaci dat. Následující přehled metod pro detekci apoptózy vychází z literatury související se studiem apoptózy indukované parazity, která je shrnuta v kapitole 2.2. Jejím cílem není podat vyčerpávající přehled metod a detailní rozbor jejich mechanismů, nýbrž ukázat diverzitu a limity vybraných metodických přístupů se zaměřením na ty, které byly využity v praktické části této diplomové práce a v publikacích zaměřených na parazitem indukovanou apoptózu (viz Tab. 3).

Tabulka 3: Stručný přehled častých přístupů v detekci parazity indukované apoptózy.

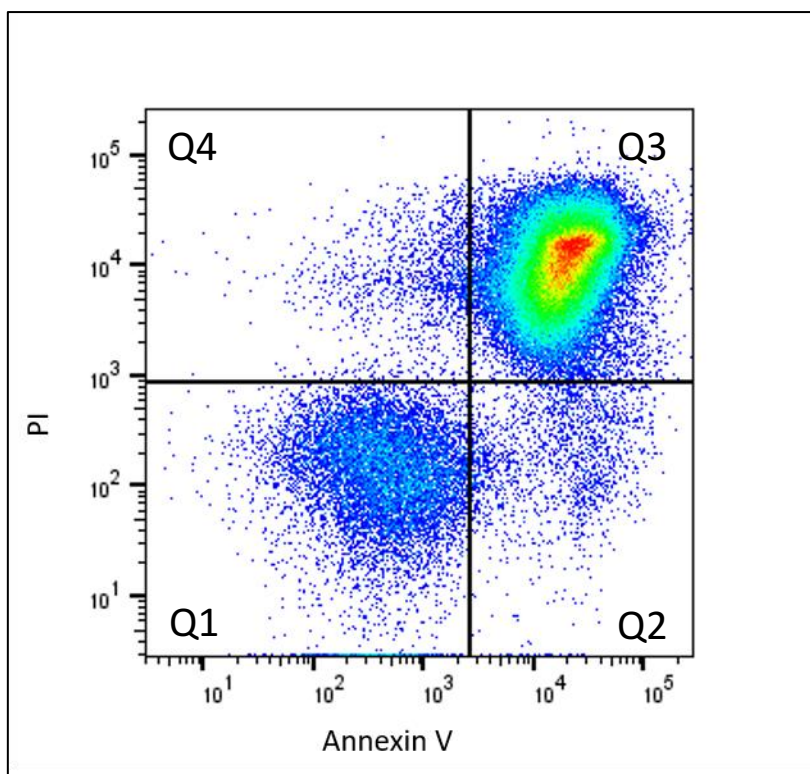
Marker	Metoda detekce
DNA fragmentace	TUNEL test, DNA elektroforéza (DNA laddering, kometový test)
Vystavení PS na vnější list buněčné membrány	Annexin V/propidium jodid (PI)
Cytomorfologické změny	(elektronová) mikroskopie
Kaspázy	Western blot (WB), kolorimetrie a fluorometrie
Uvolnění cytochromu C z mitochondrií	WB
Poškození mitochondrií (mimo cytochrom C)	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT) test
Detekce dalších proteinů souvisejících s apoptózou (např. Fas, Bcl-2 a Bax)	qRT-PCR

Za významný intracelulární marker apoptózy je považována DNA fragmentace. Na detekci DNA fragmentace se dnes hojně využívá TUNEL (z angl. TdT-mediated dUTP nick end labeling) test (viz Obr. 2). K jeho výhodám patří vysoká specifita *in situ*, vizualizace fragmentace a ultrastrukturálních změn na úrovni buňky, možnost aplikace na tkáňových řezech i buněčných kulturách a využití pro detekci časné apoptózy. Nevýhodou je možná falešná pozitivita označením nekrotických buněk nebo buněk, u kterých probíhá oprava DNA nebo aktivní transkripce (Elmore, 2007). Vedle TUNEL testu je na detekci DNA fragmentace zaměřená gelová elektroforéza, konkrétně tzv. kometový test, pomocí něhož jsou na gelu přítomny útvary podobné kometám, kde hlava představuje jádro a ocas komety fragmentovanou DNA. Mezi výhody patří její nenáročnost, senzitivita (vyšší než u TUNEL testu a DNA laddering testu) a její dostupnost. Mezi nevýhody patří její spíše kvantitativní než kvalitativní charakter a náchylnost na manipulaci (Banfalvi, 2017).



Obrázek 2: Princip TUNEL testu, převzato a upraveno od Malvezzi *et al.* (2014). Během apoptózy dochází k typickým zlomům DNA, pomocí enzymu terminalní deoxynukleotidové transferázy (TdT) dojde ke katalýze vazby nukleotidu dUTP konjugovaného s fluoroforem na 3'-OH konce zlomů DNA. Toto fluorescenční značení se dá následně pozorovat pod fluorescenčním mikroskopem či analyzovat za využití průtokové cytometrie.

Asi nejčastěji využívaným povrchovým markerem časně apoptózy je PS. Na něj se v závislosti na Ca^{2+} specificky váže protein annexin V. Annexin V pozitivitu vykazují buňky apoptické (PS ve vnějším listu cytoplazmatické membrány), tak buňky nekrotické (annexin se váže na PS ve vnějším, tak vnitřním listu poškozené cytoplazmatické membrány). Pro přesnější odlišení apoptických a nekrotických buněk se proto používá doplňující značení propidium jodidem (PI) či 7-amino-aktinomycinem D (7-AAD) (Vermes *et al.*, 1995). PI a 7-AAD barví nukleové kyseliny, avšak dokáží projít dovnitř buňky pouze skrze narušenou cytoplazmatickou membránu a značí buňky v pozdní fázi apoptózy, nekrotické a mrtvé buňky. Analýza pak probíhá pomocí průtokového cytometru (viz Obr. 3) či fluorescenčního mikroskopu. Mezi výhody annexinu V patří jeho schopnost navázat se na PS *in vivo* a *in vitro*, jeho vysoká senzitivita a dostupnost. Nevýhodou pak je potřeba vysokého množství buněk, možnost falešně pozitivního výsledku u nekrotických buněk, což může vést ke špatné interpretaci výsledků (Banfalvi, 2017).



Obrázek 3: Reprezentativní dot plot z průtokové cytometrie značení buněk annexinem V a PI, (vlastní data). Q1 – živé buňky, Q2 – časně apoptické buňky, Q3 – pozdně apoptické-nekrotické buňky, Q4 – mrtvé buňky

Dalšími markery jsou některé morfologické změny, jako je smrštění buňky, fragmentace jádra, zachovaná integrita cytoplazmatické membrány, zahuštěná cytoplazma s organelami a tvorba apoptických tělísek s jejich následnou fagocytózou. Také lze pozorovat ztrátu adheze buněk a jejich oddělení od buněk sousedících. Tyto změny jsou pozorovatelné i pod světelným mikroskopem pomocí klasického barvení hematoxylinem/eozinem, avšak reprodukovatelnost těchto pozorování je nízká. Nevýhodami jsou malá senzitivita, vysoká náchylnost k chybám a časová náročnost. Pomocí světelné, fluorescenční nebo elektronové mikroskopie (EM) lze pozorovat celou řadu morfologických změn charakteristických pro apoptózu. Například transmisní elektronová mikroskopie (TEM) je v detekci apoptózy považována za rutinní metodu používanou zejména v patologických oborech. K jejím výhodám patří zvláště množství morfologických znaků, které se dají pozorovat. Mezi nevýhody TEM však patří časová náročnost, cena, náročná příprava vzorků, možnost pozorování malé oblasti vzorku, obtížnost detekce apoptických buněk a nemožnost zachycení časně fáze apoptózy (Elmore, 2007).

Využívaným intracelulárním markerem jsou také kaspázy. Kaspázová aktivita se dá detekovat pomocí WB za využití specifických protilátek proti substrátům kaspáz jako jsou PARP či laminy. Pomocí Western blotu se dá určit i proteolytické štěpení a aktivace kaspáz za použití protilátek proti samotným

kaspázám. Kaspázová aktivita se dá měřit také fluorometrickými a kolorimetrickými testy založenými na proteolýze substrátů napodobujících jejich štěpné místo. Často využíváno je i značení buněk specifickými protilátkami proti kaspázám a detekce pomocí průtokové cytometrie.

Dále se dá detekovat uvolnění cytochromu C z mitochondrií do cytoplazmy, a to pomocí např. WB, za použití celé řady komerčních kitů, nebo lze pomocí WB, ELISA (z angl. enzyme-linked immuno sorbent assay) či qPCR (z angl. quantitative polymerase chain reaction) detekovat změny v expresi celé řady proteinů souvisejících s apoptózou (Banfalvi, 2017).

V závěru lze konstatovat, že na detekci apoptózy existuje mnoho různých metod s odlišnými výhodami a limity, jež cílí na rozdílné markery apoptózy. Postupem let roste tlak na vylepšení stávajících metod a vytvoření nových, které se vyvarují předchozím nedostatkům. V současnosti však stále platí, že pro co nejpřesnější výsledky a interpretaci výsledků je vhodné aplikovat alespoň dvě rozdílné metody.

2.2. Helminty indukovaná apoptóza

Schopnost indukovat apoptózu hostitelských buněk je pro parazita výhodný mechanismus, jenž mu umožňuje vyhnout se imunitní odpovědi hostitele či ji potlačit. Ve výsledku tak vzniká pro parazita vhodné prostředí, čímž se zvyšuje šance na jeho přežití v hostitelském organismu. Následující podkapitola shrnuje poznatky o působení helmintů a jejich exkrečně-sekrečních produktů (ESP) na indukci apoptózy u buněk obratlovčích hostitelů. Jednotliví helminti jsou řazeni dle jejich relevance k tématu této práce, druhu parazita a množství poznatků na toto téma.

2.2.1. *Schistosoma* spp.

Motolice rodu *Schistosoma* patří mezi parazity přetrvávající v krvi a způsobující u člověka i zvířat onemocnění zvané schistosomóza. Schistosomóza je celosvětově považována za nejvýznamnější infekční onemocnění způsobené helminty. Cerkárie schistosom opouští svého meziphostitele ve vodním prostředí a penetrují kůži do definitivního hostitele. Zde se transformují na schistosomula a v závislosti na druhu migrují krevním systémem a usídlují se v cévním zásobení jater, střev či močové soustavy, kde dospívají. Dospělci zde produkují vajíčka, která se mohou při cestě krevním řečištěm z těla hostitele dostat i do dalších orgánů, kde kolem sebe stimulují tvorbu granulomu.

V počátcích infekce v kůži produkují schistosomula *Schistosoma mansoni* faktor SmaF (z angl. *Schistosoma mansoni* derived apoptosis inducing factor) (Chen et al., 2002). Tento faktor je schopen indukovat apoptózu u CD4+ a CD8+ T lymfocytů z kůže, což zde přispívá k potlačení imunitní odpovědi hostitele. SmaF stimuluje zvýšení exprese Fas/Fas-L spolu se zvýšením aktivace kaspáz 3 a 8 (Chen et al., 2002). Indukce apoptózy spolu s hyporesponzivitou závislou na IL-10 u CD4+ T lymfocytů ve spádových lymfatických uzlinách byla zaznamenána při opakované expozici myší cercáriemi *S. mansoni* (celkem 4x dávka 600 cercárií) (Prendergast et al., 2015). K tomuto jevu docházelo již v krátké době po expozici cercáriemi a před nástupem imunomodulace vlivem vajíček v chronické fázi infekce, což poukazuje na schopnost parazita ovlivnit imunitní systém hned v počátcích infekce (Prendergast et al., 2015).

V rámci výzkumu indukce apoptózy v chronické fázi byla v roce 2001 publikována studie zkoumající vliv infekce *S. mansoni* na Fas receptorem zprostředkovanou apoptózu eozinofilů a lymfocytů (Rumbley et al., 2001). Autoři zde navázali na předchozí práci (Rumbley et al., 1999), kde si povšimli výrazné početní převahy eozinofilů oproti lymfocytům v jaterním granulomu u myší infikovaných *S. mansoni*. Splenocyty izolované z těchto myší byly identifikovány jako apoptické (Rumbley et al., 1999). Na základě této studie se proto rozhodli ověřit hypotézu, zda k početní převaze eozinofilů dochází v důsledku apoptózy v okolí přítomných lymfocytů. Zatímco během *in vivo* experimentů nebyly pozorovány žádné apoptické eozinofily, naopak u lymfocytů ze slezin a granulomů

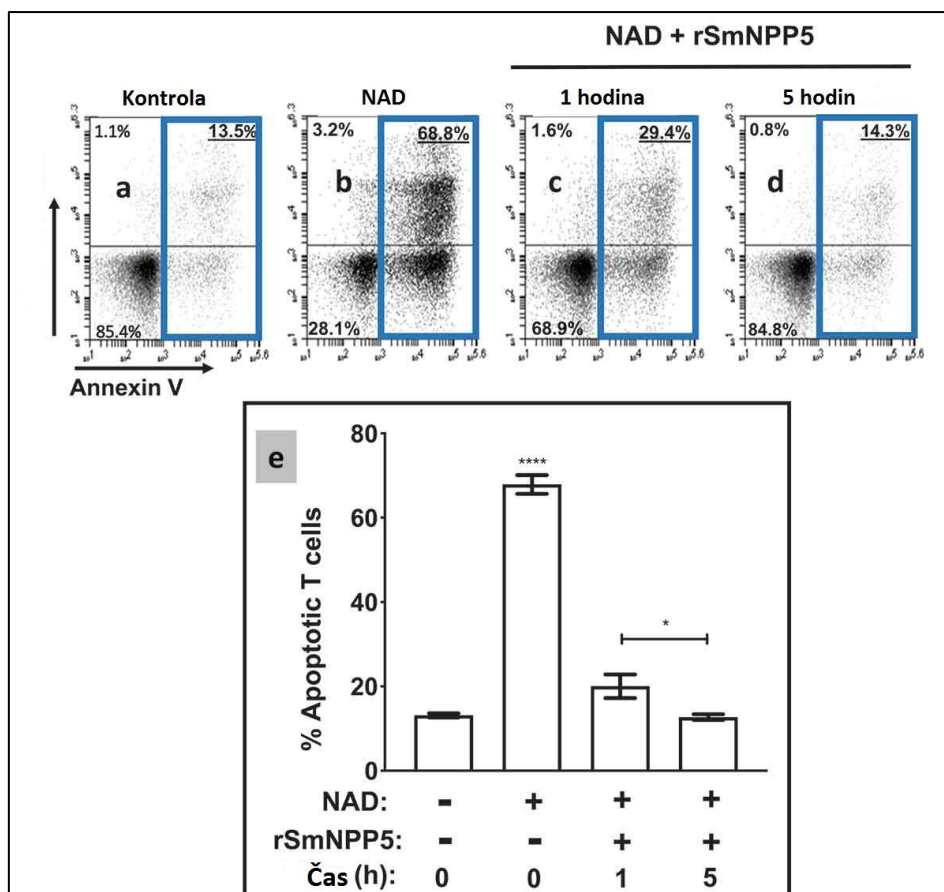
k apoptóze docházelo. Při porovnání vnímavosti obou typů izolovaných lymfocytů se ukázaly lymfocyty z granulomů jako náchylnější populace k apoptóze zprostředkované skrze Fas/Fas-L. Avšak postupem času infekce a nástupem chronické fáze se procento apoptických lymfocytů v granulomu snižovalo až bylo kolem 24. týdne po infekci (wpi, z angl. weeks post infection) procento apoptických lymfocytů z granulomů stejné jako u lymfocytů ze slezin. Během *in vitro* experimentů byla u splenocytů pozorována pozitivní korelace mezi koncentrací SEA (z angl. soluble egg antigens) a mírou apoptózy. Pro objasnění, proč u eozinofilů ze slezin a granulomů na rozdíl od lymfocytů nedochází k apoptóze, se autoři dále zaměřili na mechanismus zprostředkování apoptózy skrze Fas/Fas-L. Následné experimenty naznačily, že absence apoptózy u eozinofilů pravděpodobně souvisí s absencí exprese Fas-L a není tak zřejmě důsledkem anti-apoptické činnosti regulačních proteinů Bcl-2 a Bcl-XL (Rumbley et al., 2001).

Ve stejném roce byla vydána i publikace od Lundy *et al.* (2001), která považovala pozorovaný trend snížení počtu splenocytů v začátcích chronické fáze infekce *S. mansoni* u myši (Chensue & Boros, 1979) za důsledek SEA indukované buněčné smrti. V této publikaci byla pozorována indukce exprese Fas-L vlivem *in vitro* kultivace SEA s CD4+, CD8+ a CD19+ splenocyty, naopak u kultivace buněk pocházejících z granulomu nebyl tento jev pozorován. Neschopnost SEA indukovat vyšší expresi Fas-L si autoři vykládají tím, že granulomové lymfocyty, které mají v porovnání se splenocyty až dvakrát větší expresi Fas-L *in vivo*, jsou jednoduše méně vnímavé na další stimulaci SEA *in vitro*. Také zde byl v *in vitro* stimulačních experimentech pozorován pokles apoptózy u CD4+ T lymfocytů vlivem deplece B lymfocytů. Toto poukázalo na efektorovou roli B lymfocytů z hlediska apoptózy CD4+ T lymfocytů. Při porovnání dvou populací B lymfocytů a to CD19+/CD5+ a CD19+/CD5- se ukázal v indukci apoptózy u CD4+ T lymfocytů jako efektivnější fenotyp CD19+/CD5+ i v ohledu na vyšší expresi Fas-L, která je závislá na interleukinech 4 a 10 (IL-4 a IL-10) (Lundy & Boros, 2002). Závislost indukce apoptózy na IL-10 vlivem SEA u T lymfocytů izolovaných z pacientů s asymptomatickou intestinální formou schistosomózy byla také popsána v práci od (Carneiro-Santos et al., 2000). Při infekci schistosomami dochází k přesunu od počátečního prozánětlivého Th1 prostředí k pozdějšímu tolerančnějšímu Th2 prostředí (Fallon et al., 1998). Tento imunomodulační efekt je pravděpodobně způsoben vlivem SEA, kde jsou vůči jimi indukované apoptóze Th1 lymfocyty vnímavější než Th2 lymfocyty (Fallon et al., 1998).

Také příbuzná *S. japonicum* a její ESP dokáží indukovat apoptózu u některých buněčných typů (Yang et al., 2013; Duan et al., 2014; Wang et al., 2014a). Stimulace aktivovaných stelárních buněk (HSC, z angl. hepatic stellate cells) pomocí SEA izolovaných z vajíček *S. japonicum* měla pozitivní vliv na indukci apoptózy skrze aktivaci kaspáz 3 a 8 a TRAIL/DR5 (z angl. TNF-related apoptosis inducing ligand/ death receptor 5) cestu (Duan et al., 2014). U lidské linie HSC pak SEA *S. japonicum* indukují

apoptózu skrze snížení exprese protein kinázy B (Akt) a naopak zvýšením exprese DR5 závislé na transkripčním faktoru p53 (Wang et al., 2014a). Tato pozorování poukazují na schopnost komponentů *S. japonicum* SEA pozastavit progresi jaterní fibrózy skrze indukci apoptózy u HSC buněk, které pokud jsou aktivované proliferují a jsou zodpovědné za tvorbu fibrotické tkáně (Lee & Friedman, 2011). Také rekombinantní protein odvozený od *S. japonicum* rSj16 indukoval apoptózu u buněk myší myeloidní leukémie (linie WEHI3B) skrze vnitřní cestu aktivace zvýšením permeability mitochondriální membrány a následnou aktivací kaspáz 3, 6 a 9. Spolu s tím je rSj16 schopen stimulovat expresi genu pro pro-apoptický Bax a snížit expresi genu pro anti-apoptický Bcl-2 (Yang et al., 2013). Výsledky této studie ohledně apoptózy a snížené proliferace buněk naznačují anti-onkogenní potenciál rSj16 *in vitro*.

Naopak inhibice apoptózy u některých imunitních buněk vlivem schistosom se pro parazita stává výhodným prostředkem pro imunomodulaci. Inhibovat apoptózu T lymfocytů jsou schopni jak dospělci *S. mansoni*, tak i jejich tegumentální ektoenzym (SmNPP5) (Nation et al., 2020). K této inhibici vlivem parazita či jeho proteinu dochází rozštěpením nikotinamid adenin dinukleotidu (NAD) (Nation et al., 2020). V časně fázi zánětlivé reakce je NAD uvolněn z buněk a spouští apoptózu u nestimulovaných T lymfocytů, čímž přispívá k expanzi stimulovaných T lymfocytů (Adriouch et al., 2007). Inhibice apoptózy vlivem SmNPP5 u T lymfocytů (viz Obr. 4), které autoři dle vnímavosti na apoptózu vlivem NAD navrhuji jako populaci T regulačních lymfocytů, přispívá k vytvoření vhodného imunologického prostředí v hostiteli a napomáhá tak k přežití parazita (Nation et al., 2020). Dalším příkladem je inhibice apoptózy pomocných T lymfocytů v případě *S. japonicum*. Infekce *S. japonicum* i stimulace jejími SEA u CD4+ T folikulárních pomocných lymfocytů (Tfh) měla za následek sníženou míru na kaspáze dependentní apoptózy, pravděpodobně za účelem modulace imunitní odpovědi hostitele, ovšem přesný význam jejich inhibice pro *S. japonicum* není dosud objasněn (Yang et al., 2019).



Obrázek 4: Rekombinantní SmNPP5 *in vitro* zabraňuje NAD indukované buněčné smrti, převzato a upraveno od Nation *et al.* (2020). Horní panely představují reprezentativní dot ploty z průtokové cytometrie purifikovaných T lymfocytů, jež byly následně vystaveny NAD (dot plot b) či ne (kontrola, dot plot a), nebo NAD, které bylo inkubováno s 1 μ g rSmNPP5 po 1 hodinu (dot plot c) a 5 hodin (dot plot d). Procenta celkových apoptických buněk jsou ohraničena na dot plotech modrými rámečky. Spodní graf reprezentuje souhrnná data z replikátů experimentu, ukázáno je průměrné procento celkových apoptických T lymfocytů ($\pm$ SEM) z výše zmíněných skupin. * $p < 0.05$ 1 h v 5 h, **** $p < 0.0001$ + NAD v čase 0 v všechny ostatní skupiny, jednocestná ANOVA, $n \geq 4$ v každém měření.

Závěrem lze říci, že schistosomy využívají indukci, nebo naopak inhibici apoptózy u T lymfocytů pro ovlivnění imunitní odpovědi hostitele ve svůj prospěch. V případě *S. mansoni* a jejích ESP tak dochází k indukci apoptózy u T lymfocytů v závislosti na IL-10 a přes vnější cestu aktivace skrze Fas/Fas-L. Oproti tomu však bylo pozorováno i zapojení vnitřní cesty indukce skrze mitochondrie u rSj16 v rámci indukce apoptózy rakovinných buněk.

2.2.2. Fasciola hepatica

Fasciola hepatica je dvouhostitelská motolice parazitující v jaterních žlučovodech celé řady savců včetně člověka, u kterých je původcem onemocnění zvaného fasciolóza. K nákaze definitivního

hostitele dochází pozřením infekčního stádia metacerkárie. Největší význam má *F. hepatica* u ovcí a skotu, kde jejím vlivem dochází celosvětově k velkým finančním ztrátám.

Eozinofily hrají klíčovou efektorovou roli během časně imunitní odpovědi hostitele proti helmintům, a tak je pro parazity výhodná eliminace těchto buněk prostřednictvím apoptózy. U ESP sekretovaných dospělci *F. hepatica* (FhESP) byl prokázán pro-apoptický účinek na potkaní eozinofily (Serradell et al., 2007). Takto zprostředkovaná apoptóza byla závislá na aktivaci kaspáz a tyrosin kinázy (TyrK). Během experimentů *in vivo* pak autoři pozorovali i nárůst apoptických buněk (mezi nimiž byly i eozinofily) na tkáňových řezech jater. Navíc byl v *in vivo* experimentech během časně fáze experimentální fasciolózy a u intraperitoneální aplikaci FhESP (48 hpi) pozorován nárůst apoptických eozinofilů v peritoneu (Serradell et al., 2009). Při podrobnějším zkoumání mechanismu, jak vlivem FhESP dochází k apoptóze eozinofilů, byl shledán jako klíčová složka tohoto mechanismu peroxid vodíku (Serradell et al., 2009). Vlivem FhESP dochází u eozinofilů *in vitro* ke zvýšení produkce reaktivních kyslíkových radikálů (ROS, z angl. reactive oxygen species), mezi něž patří peroxid vodíku, jehož vlivem nastává depolarizace mitochondriální membrány a následné uvolnění cytochromu C do cytosolu vedoucí k apoptóze (Nutku et al., 2005).

Nejen eozinofily, ale i peritoneální makrofágy podléhají vlivem FhESP apoptóze (Guasconi et al., 2012). Ačkoliv autoři přisuzují apoptózu peritoneálních makrofágů přímo vlivu FhESP, v rámci diskuze ani okrajově zde však nezmiňují možnost jiného vysvětlení indukce apoptózy, např. nepřímého ovlivnění indukce apoptózy či možného mechanismu indukce. Takto cílená eliminace by mohla vést k potlačení prozánětlivého působení makrofágů, což poskytuje parazitovi vhodnější prostředí a usnadňuje tak jeho přežití v hostiteli. V *in vitro* experimentech byly peritoneální makrofágy a linie makrofágů J774 stimulovány FhESP. U obou populací makrofágů byl pozorován nárůst apoptických buněk oproti kontrole. Také u buněk z peritonea myší nakažených metacerkáriemi po 48 hpi byl pozorován nárůst apoptických buněk, naznačující indukci apoptózy v časně fázi infekce (Guasconi et al., 2012).

V dalších pracích byli jako model přirozeného hostitele *F. hepatica* použity ovce a skot. Během akutní a chronické fáze infekce *F. hepatica* u ovcí byla, shodně s potkany, zaznamenána přítomnost apoptických eozinofilů (Escamilla et al., 2016). Pomocí imunohistochemie a TEM byly detekovány apoptické eozinofily s typicky fragmentovanými jádry spolu s intaktní cytoplazmatickou membránou či přítomnost aktivované kaspázy 3. Tyto apoptické eozinofily byly přítomny na okrajích jaterních nekrotických ložisek v 8 a 28 dpi. Detekovány byly také v zánětlivém infiltrátu v čase 17 wpi kolem zvětšených žlučovodů, ve kterých byli většinou i dospělci (Escamilla et al., 2016). Při dalším zkoumání vlivu infekce *F. hepatica* na apoptózu imunitních buněk *in vivo* byl pozorován výrazný nárůst

apoptických makrofágů, lymfocytů a granulocytů izolovaných z peritonea ovcí oproti kontrolní skupině (Escamilla et al., 2017). Tento pozorovaný trend naznačuje, že larvy migrující peritoneem jsou schopny rychlé a efektivní indukce apoptózy u imunitních buněk, jež jim tak pomáhá uniknout imunitní odpovědi a usnadňuje migraci dále. Mimo to byly zvýšené počty apoptických leukocytů oproti kontrolním skupinám přítomny konstantně až do 18 dpi (Escamilla et al., 2017).

Transkriptomová analýza ovčích mononukleárních buněk periferní krve (PMBC, z angl. peripheral blood mononuclear cells) ukázala, že u infikovaných zvířat mají tyto buňky zvýšenou expresi genů souvisejících s vnější cestou aktivace apoptózy. Konkrétně se jednalo o geny pro TNF a TNFR-1/TNFR2 (Fu et al., 2016). Díky analýze transkriptomu z ovcí nakažených *F. hepatica* byla také propojena aktivace vnitřní cesty apoptózy pozorované u ovčích PMBC s geny pro Bik, Bnip1 a Bim, které měly po dobu akutní fáze infekce zvýšenou expresi (Fu et al., 2017). Jelikož se PMBC skládají z populací lymfocytů a monocytů, je proto žádoucí prozkoumat působení *F. hepatica* na tyto buňky separátně, neboť pozorování zapojení obou cest aktivace nemusí být stejné. Proto by v budoucnu měly být na základě poznatků z transkriptomických dat provedeny studie i s experimentálním, a nejen bioinformatickým přístupem k detekci apoptózy. Dále i data získaná z transkriptomu infikovaných telat poukázala na apoptózu antigen prezentujících buněk, jimiž zde mohou být makrofágy, DC nebo B lymfocyty, zprostředkovanou mikroRNA 155 (mir-155) a produkty genů STAT3 (z angl. signal transducer and activator of transcription 3), APP (z angl. amyloid precursor protein) a DUSP1 (z angl. dual specificity protein phosphatase 1) během chronické fáze infekce (Garcia-Campos et al., 2019). Oproti těmto pozorováním byl v této studii současně pozorován v čase 14 wpi i trend spíše inhibice vnější cesty aktivace apoptózy. Zajímavé by zde mohlo být prozkoumání této zdánlivé inhibice apoptózy působením *F. hepatica* ve 14 wpi (Garcia-Campos et al., 2019), zda se nejedná o podobný jev jako při imunomodulaci u schistosom (Yang et al., 2019; Nation et al., 2020).

Ve výsledku se *F. hepatica* jeví jako parazit schopný využít indukce apoptózy pro oslabení imunitní odpovědi hostitele umožňující mu působit chronické infekce ve svých hostitelích. Dokáže takto způsobit úbytek eozinofilů, které jsou hlavní efektorové buňky imunity proti helmintům a uniknout tak imunitní odpovědi hostitele již v časně fázi jejího působení i v případě makrofágů v peritoneu. Indukcí apoptózy u makrofágů potlačuje jejich protizánětlivé působení. K indukci apoptózy dochází i u PMBC v souladu s pozorováním u eozinofilů na zapojení vnitřní cesty aktivace, a navíc i zapojení vnější cesty. Avšak tyto mechanismy indukce apoptózy vlivem parazita musí být dále a hlouběji prozkoumány.

2.2.3. *Taenia* spp.

Taenia spp. patří do třídy tasemnic s dvouhostitelským cyklem. Při nákaze člověka, může člověk sloužit jako definitivní hostitel, kdy dospělé tasemnice žijí v trávicím traktu. Z hlediska patologie je však u člověka významnější onemocnění zvané cysticerkóza, kdy se člověk stává mezihostitelem a larvy jsou přítomny v různých orgánech, např. ve svalovině, játrech či mozku. V případě nákazy *T. solium* může dojít až k život ohrožující neurocysticerkóze. Při výzkumu se jako model lidské neurocysticerkózy způsobené *T. solium* uplatňuje model experimentální infekce myši například tasemnicí *T. crassiceps*.

Pro původce cysticerkózy je imunomodulace skrze apoptózu výhodným mechanismem zajišťujícím jejich přežití. U *T. crassiceps* byl pozorován pro-apoptický efekt živých cysticerků na lidské T lymfocyty (Jurkat linie) (O'Connell et al., 2000). Toto naznačuje výskyt parazitem indukované apoptózy i v případě myši cysticerkózy. Při intraperitoneální aplikaci metacestodů *T. crassiceps* do myši byly pozorovány apoptické eozinofily ve 12 dpi a také úbytek CD4+, CD8+ a CD19+ lymfocytů; u nich však autoři popisují pouze úbytek, nikoliv apoptózu (Zepeda et al., 2010). V průběhu infekce byla také pozorována zvýšená aktivita kaspázy 3, naznačující její roli v indukci apoptózy. Právě indukce apoptózy u eozinofilů umožňuje *T. crassiceps* vyhnout se jejich destruktivnímu působení. Avšak faktor parazita zodpovědný za eliminaci imunitních buněk ve prospěch parazita zůstával neznámý.

Určením tohoto faktoru a jeho působení se zabývalo hned několik studií, kde však šlo ve většině případů o publikace stejného vědeckého týmu (López-Briones et al., 2003; Zepeda et al., 2016; Zepeda et al., 2017; Zepeda et al., 2019). Nejdříve byl testován antigen původem z cysticerků (solubilní frakce homogenátu), kde jeho působením došlo k apoptóze *in vitro* u CD4+ a CD19+ lymfocytů ze slezin myši infikovaných *T. crassiceps*, a to v závislosti na aktivaci kaspáz (López-Briones et al., 2003). U takto stimulovaných lymfocytů byl detekován výskyt PS na povrchu buněk spolu s DNA fragmentací. Druhým kandidátem byla nízkomolekulární frakce (<1250 Da) neboli „metacestodí faktor“ (MF) izolovaný z peritoneální tekutiny myši infikovaných *T. crassiceps* (Zepeda et al., 2016). Při porovnání působení MF oproti působení infekce *T. crassiceps* byla zaznamenána vyšší míra apoptózy u CD4+ T lymfocytů pocházejících ze slezin infikovaných myši oproti lymfocytům stimulovaným MF (Zepeda et al., 2016). Toto pozorování napovídá, že při intenzivnější indukci apoptózy u CD4+ T lymfocytů, jako tomu je u infekce *T. crassiceps*, MF není jediným faktorem přispívajícím k indukci apoptózy (Zepeda et al., 2016).

Oproti tomu je MF schopen skrze apoptózu vyvolat hipokampální sklerózu u myši ve stejné míře jako samotná infekce parazita (Zepeda et al., 2017; Zepeda et al., 2019). U myši inokulovaných

MF i u myši infikovaných *T. crassiceps* byla pozorována rozsáhlá apoptóza buněk v oblasti *gyrus dentatus*, hipokampu a okolí ve 45 dpi (Zepeda et al., 2017). Pomocí TUNEL testu byla detekována přítomnost zlomů DNA charakteristických pro apoptózu. Klinické projevy jako poruchy učení a paměti byly způsobeny právě apoptózou a ztrátou neuronů vlivem MF. Autoři spekulují o možné sekreci MF do peritonea a následné migraci krevním řečištěm přes hematoencefalickou bariéru až do mozkové tkáně, kde údajně MF indukuje apoptózu (Zepeda et al., 2017). Dále tuto svou hypotézu podkládají i na základě pozdější detekce apoptózy endotelu v mozkové tkáni (Zepeda et al., 2019). V této navazující studii byla prodloužena doba infekce parazitem a inokulace MF na 110 a 115 dpi za účelem vyvolání rozsáhlejšího poškození hipokampu (Zepeda et al., 2019). Tato hypotéza však vyžaduje další nezávislé ověření a zároveň kontrolu dalších faktorů, např. systémového zánětu, aktivačního stavu mikroglií aj., které by se mohly na indukci apoptózy v CNS podílet.

Z literatury je tedy známo, že MF dokáže indukovat apoptózu u řady buněk, jako jsou splenocyty (López-Briones et al., 2003; Zepeda et al., 2016), eozinofily (Zepeda et al., 2010) a buňky hipokampu (Zepeda et al., 2017; Zepeda et al., 2019). Avšak i u buněk varlat u samců myši infikovaných *T. crassiceps* či inokulovaných MF byla pozorována zvýšená míra apoptózy s vzniklou hypotézou o pravděpodobné migraci MF do varlat (viz hypotéza stejného týmu o migraci MF z peritonea do mozku) (Zepeda et al., 2011a; Zepeda et al., 2011b). K obdobně zvýšené apoptóze docházelo i u samic ve vaječnících vlivem MF (Solano et al., 2015), což naznačuje využití apoptózy parazitem nejen za účelem imunosuprese pro jeho přežití, nýbrž i za účelem využití prostředků hostitele na svou vlastní reprodukci. V budoucnu je však nutno blíže prozkoumat přesné složení MF a mechanismy, jimiž indukuje apoptózu, jež zůstávají v současnosti neznámé.

Při porovnání pro-apoptických účinků živých metacestodů *T. solium* a jejich ESP při kultivaci lidských CD4+ T lymfocytů byl pozorován pozitivní vliv na indukci apoptózy díky cystein proteázové aktivitě faktoru produkovaného metacestody *T. solium in vitro* (Tato et al., 2004). Pomocí TUNEL testu, elektronové mikroskopie a elektroforézy zde byla pozorována fragmentace jader, kondenzace chromatinu a apoptická tělíska. U lymfocytů kultivovaných s živými metacestody a inhibitorem cysteinových proteáz E-64 nebyly pozorovány žádné apoptické lymfocyty, což poukazuje na cysteinové proteázy jako na hlavní zprostředkovatele apoptózy (Tato et al., 2004). Na tuto práci pak navazuje studie od (Solano et al., 2006) věnující se biochemickým a ultrastrukturním změnám v apoptických lymfocytech u prasečí cysticercózy. U apoptických lymfocytů extrahovaných ze zánětlivého infiltrátu v blízkosti metacestodů ze svaloviny zde byla kromě fragmentace jader a poškození DNA pozorována pomocí annexinu V také vyšší přítomnost PS na vnějším povrchu lymfocytů. V souladu s výsledky pozorování od Solano et al. (2006) byly i závěry pozorování ve studii od Sikasunge et al. (2008). V této práci byly detekovány apoptické CD3+ T lymfocyty ze zánětlivého

infiltrátu v okolí cysticerků. Apoptické lymfocyty však byly pozorovány pouze v časně fázi infekce, v dalším průběhu infekce již nebyly zaznamenány. Toto pozorování naznačuje, že pouze v časně fázi infekce mají ještě živé larvy schopnost ovlivnit imunitní odpověď hostitele pomocí eliminace lymfocytů skrze apoptózu. Tento parazitem indukovaný protektivní efekt po odumření larvy nepřetrvává (Sikasunge et al., 2008).

Z předchozích studií však nebyl znám mechanismus zprostředkování apoptózy vlivem *T. solium*. Yan et al. (2008) ve své práci pomocí nového faktoru produkovaného metacestody, annexinu B1, objasňuje možný mechanismus indukce apoptózy u lidských eozinofilů. Parazitární annexin B1 se dokáže navázat na eozinofily a skrze influx Ca^{2+} je schopen aktivovat kaspázu 3 spolu s uvolněním cytochromu C. Tato pozorování vedla k propojení kaspázové aktivity a vnitřní mitochondriální cesty s indukcí apoptózy vlivem faktoru *T. solium* (Yan et al., 2008). V souladu se začleněním aktivace kaspázy 3 do mechanismu apoptózy u eozinofilů u Yan et al. (2008) bylo i u *P. westermani* ESP indukované apoptózy eozinofilů pozorováno zapojení této kaspázy do aktivace apoptózy (Min et al., 2004).

Ve shrnutí lze říci, že *T. crassiceps* je schopná využívat apoptózu nejen při eliminaci imunitních buněk jako jsou lymfocyty či eozinofily, ale její MF je nejspíše schopen vyvolat apoptózu u dalších buněčných typů jako jsou nervové, endotelové buňky či buňky varlat a vaječníků u myší. Mechanismus zprostředkování apoptózy je dosud neznámý a je potřeba dalšího výzkumu věnujícímu se tomuto jevu. V případě cysticerkózy *T. solium* lze hovořit o eliminaci lymfocytů a eozinofilů skrze apoptózu za účelem oslabení imunity a vytvoření tak pro parazita vhodného imunologického profilu hostitele. Zde bylo také pozorováno zapojení vnitřní cesty aktivace kaspáz do indukce apoptózy. Avšak do budoucna je žádoucí hlubší prozkoumání *T. solium* indukované apoptózy.

2.2.4. *Echinococcus* spp.

Tasemnice rodu *Echinococcus* jsou dvouhostitelské tasemnice, mezi jejichž definitivní hostitele patří psovitě či kočkovitě šelmy a meziphostitelem mohou být sudokopytníci, lichokopytníci či hlodavci. Náhodným hostitelem pozřením vajíček může být i člověk. U lidí larvocysty způsobují onemocnění zvané echinokokóza. V závislosti na druhu může mít toto onemocnění u člověka několik forem. *Echinococcus multilocularis* je původcem častější cystické echinokokózy, kde jsou ojedinělé cysty přítomny v játrech či plicích. *Echinococcus granulosus* naopak způsobuje závažnější alveolární echinokokózu, kde jsou mnohočetné cysty přítomny zpravidla v játrech a mohou se rozšířit do dalších orgánů.

Bylo prokázáno, že infekce *Echinococcus multilocularis* u myší způsobuje indukci apoptózy u hepatocytů (Zhang et al., 2012). Zajímavým faktem je, že při počáteční fázi infekce dochází v hepatocytech naopak ke zvýšení exprese proti-apoptických genů pro ERK1/2 (z angl. extracellular signal-regulated kinases), cyklin D1, A, B1, Gadd45b (z angl. growth arrest and DNA damage inducible beta) a PCNA (z angl. proliferating cell nuclear antigen), což by mohlo napomáhat proliferaci hepatocytů a regeneraci jaterní tkáně. Postupem času infekce však parazit naopak stimuluje indukci apoptózy vedoucí k oslabení imunitní odpovědi hostitele s vedlejším efektem poškození jater skrze zvýšení exprese pro-apoptických genů pro p53, p21, Gadd45c a aktivované kaspázy 3. Tento pro-apoptický efekt usnadňuje diseminaci protoskolexů v játrech (Zhang et al., 2012).

Při využití nikoliv infekce živým parazitem, ale kultivací derivátů larválních stádií *E. multilocularis* derivovaným materiálem byla *in vitro* prokázána vnímavost lidských dendritických buněk (DC) vůči parazitem indukované apoptóze (Nono et al., 2012). Celkem tři typy tohoto materiálu byly testovány na DC, a to primární buňky, vezikuly metacestodů a homogenát protoskolexů. Tyto typy měly u buněk simulovat buď časnou, pokročilou či pozdní fázi infekce. U DC stimulovaných primárními buňkami a vezikuly metacestodů, byl pozorován nárůst apoptických buněk oproti kontrolám a buňkám stimulovaným homogenátem protoskolexů (Nono et al., 2012). Jelikož DC stimulované vezikuly metacestodů měly největší apoptický přírůstek, rozhodli se autoři vyzkoušet stimulace i na lymfocytech (CD19+, CD19-) ze slezin. Splenocyty se však ukázaly jako odolné vůči takto indukované apoptóze (Nono et al., 2012), v kontrastu například se stimulačními experimenty na splenocytech u schistosom (Lundy et al., 2001; Lundy & Boros, 2002). Tato pozorování v případě *E. multilocularis* naznačují imunomodulaci skrze apoptózu DC, které hrají důležitou roli při aktivaci T lymfocytů, což by mohlo ovlivnit snížení zánětlivé imunitní odpovědi ve prospěch parazita.

V případě *Echinococcus granulosus* byl testován pro-apoptický potenciál cystové (hydatida) tekutiny (HF, z angl. hydatid fluid) na lidských lymfocytech z krve (Spotin et al., 2012). U lymfocytů stimulovaných HF z fertilních cyst byla pozorována zvýšená aktivita kaspázy 3 spolu se zvýšenou expresí pro-apoptického Bax v kontrastu se sníženou expresí proti-apoptického Bcl-2 oproti lymfocytům stimulovaným HF z nefertilních cyst, což mělo za následek apoptózu lymfocytů *in vitro* (Spotin et al., 2012). Také u stimulace myších peritoneálních makrofágů HF a její frakcí (uvedena jako frakce 37) dochází k indukci apoptózy (Mejri et al., 2017). Při dalším testování frakcí HF na buněčné linii myší rakoviny prsu se ukázala frakce glykoproteinů a 78kDa protein jako molekuly zodpovědné za indukci apoptózy u linií rakovinných buněk (Daneshpour et al., 2019).

Oproti předchozím pro-apoptickým výsledkům má HF naopak inhibiční vliv na apoptózu u buněk lidského melanomu (A375 linie), kde dochází ke zvýšení exprese Bcl-2 a snížení exprese Bax (Gao et al., 2018). Oproti tomu opačný efekt má u buněk lidského adenokarcinomu epitelu mléčné žlázy (MDA-MB-231) Kunitz typ proteázový inhibitor z onkoscféry *E. granulosus* (EgKI-1), kde po stimulaci 24 hod v závislosti na dávce EgKI-1 došlo k zastavení buněčného růstu a indukci apoptózy *in vitro* (Ranasinghe et al., 2018). Tyto rozporuplné výsledky u experimentů na různých typech rakovinných buněk naznačují jejich různou vnímavost k apoptóze vlivem molekul *E. granulosus*.

Z výše uvedeného textu vyplývá, že je *E. multilocularis* schopen indukce apoptózy u antigen prezentujících DC a hepatocytů, což napomáhá jeho přežívání v hostiteli. Jeho působením dochází k ovlivnění regulace genů souvisejících s apoptózou. Vlivem *E. granulosus* podléhají lymfocyty a makrofágy apoptóze, což má za následek oslabení imunitní odpovědi proti parazitu. V současnosti se však tato schopnost ESP *E. granulosus* využívá při testování vnímavosti různých typů nádorových buněk *in vitro*. Během indukce apoptózy u rakovinných buněk se zdá regulace proteinů z Bcl-2 rodiny jako stěžejní jev při indukci apoptózy. Přesto je však potřeba dalších publikací věnovaných mechanismu zprostředkování apoptózy za účelem lepšího prozkoumání tohoto fenoménu a jeho možného využití.

2.2.5. *Trichinella spiralis*

Trichinella spiralis je hlístice parazitující u savců a ptáků včetně člověka. V rámci životního cyklu nemá stádium, které by se vyskytovalo ve vnějším prostředí mimo hostitele. Infekce v hostiteli, který může působit jako mezipřenositel a definitivní hostitel zároveň, má dvě fáze: střevní a svalovou. K infekci u člověka dochází požitím svalových cyst parazita. Onemocnění u zvířat či člověka způsobené larvami *T. spiralis* se nazývá trichinelóza.

U infekce *T. spiralis* byla již dříve pozorována apoptóza u střevních buněk ve střevní fázi infekce (Karmańska et al., 2000; Piekarska et al., 2009a; Piekarska et al., 2009b; Piekarska et al., 2011), ale bylo zapotřebí podrobnějšího prozkoumání mechanismu a klíčových molekul zapojených do indukce apoptózy. Při podrobnějším zkoumání bylo během *in vivo* experimentů pozorována role zapojení stresu endoplazmatického retikula (ERS) do indukce apoptózy ve střevech vlivem infekce *T. spiralis* u myši (Yu et al., 2014). K tomuto závěru vedla pozorovaná zvýšená exprese fosforylované c-Jun N-terminální kinázy (JNK) a aktivované kaspázy 12, která je následně zodpovědná za aktivaci kaspázy 3, detekované ve tkáni, vlivem molekul asociovaných s ERS (Yu et al., 2014). Tato pozorování poukazují na roli apoptózy při patogenezi ve střevech vlivem parazita.

Pro udržení vhodného mikroprostředí v tzv. nurse cells, neboli ochranných kapsulích ve svalové tkáni v intracelulární fázi cyklu parazita se zdá výhodným adaptivním mechanismem

parazita regulovat expresi genů pro apoptózu (Babal et al., 2011). Během tvorby této nurse cell dochází ke zvýšení exprese pro-apoptických Bax, Apaf-1 a kaspázy 9 v bazofilní cytoplazmě transformujících se svalových buněk kolem larvy se současným zvýšením exprese proti-apoptické protein kinázy B v eozinofilní cytoplazmě přítomných satelitních buněk vlivem mitochondriální cesty aktivace (Boonmars et al., 2004). Tato pozorování naznačují up-regulaci pro-apoptických genů pro transformaci a destrukci původních svalových vláken, naopak žádoucí pro zajištění přežití a fungování nurse cell je zase upregulace genů proti-apoptických (Boonmars et al., 2004). Stejný kolektiv autorů ve své navazující práci potvrdil zapojení TNF- α /TNF-R signální vnější cesty v aktivaci jak apoptických tak proti-apoptických událostí v infikované svalové buňce během tvorby ochranné kapsule (Wu et al., 2005). Oproti předchozí práci zde však byla pozorována zvýšená exprese jak pro- tak i proti-apoptických genů pouze v bazofilní cytoplazmě (Boonmars et al., 2004; Wu et al., 2005). Tudíž při formaci nurse cell dochází k aktivaci apoptózy pravděpodobně skrze vnitřní i vnější cestu aktivace po infekci *T. spiralis*.

Zajímavé výsledky pak přinesly v kontextu apoptózy práce zabývající se studiem protinádorových vlastností *T. spiralis* (Kang et al., 2013). Během infekce *T. spiralis* byl pozorován pozastavený růst a snížená metastázová aktivita tumorů u myši injikovaných B16-F10 melanomem (Kang et al., 2013). K tomuto protektivnímu efektu *in vivo* však došlo pravděpodobně na základě regulace cytokinů, tedy ne přímo působením parazita. Ve studii od Wang *et al.* (2009) byl pozorován pozitivní efekt homogenátu z dospělců a larev *T. spiralis* na apoptózu buněčných linií lidské chronické myeloidní leukémie (K562) a lidského hepatomu (H7402). V těchto dvou buněčných liniích byla pozorována fragmentace DNA, jež je markerem apoptózy, spolu s pozastavením buněčného růstu. K pozastavení vývoje a proliferace u linií melanomových buněk myšího karcinomu žaludku, hepatomu a sarkomu došlo také i vlivem infekce larvami *T. spiralis* (Wang et al., 2009). Pro-apoptický potenciál antigenů *T. spiralis* byl dále testován pomocí transfekce rekombinantního proteinu A200711, který je kódován *T. spiralis*, do buněčné linie lidského hepatomu (H7402). Působení tohoto rekombinantního proteinu pak mělo u H7402 buněk za následek apoptózu (Wang et al., 2013).

Indukce apoptózy melanomových buněk B-16 *in vitro* jsou schopny i exkrečně-sekreční molekuly produkované svalovými larvami (ES-L1) (Vasilev et al., 2015). Při stimulačních experimentech s ES-L1 kde byly části B-16 buněk podány inhibitory kaspáz 3, 8 a 9, zde došlo k potlačení indukce apoptózy, naznačující tak vnější cestu aktivace závislou na kaspázách jako hlavní mechanismus indukce (Vasilev et al., 2015). Ve stejné studii pak byl testován pro-apoptický potenciál samotné infekce *T. spiralis* v myších s melanomy *in vivo*. Přestože došlo k potlačení růstu

melanomů, vlivem infekce byl však nárůst apoptických buněk v melanomech nízký. Odlišné výsledky z *in vivo* a *in vitro* experimentů zde ukazují na rozdíl mezi těmito dvěma systémy.

Na základě dostupné literatury se *T. spiralis* jeví jako další helmint, který je schopen využívat indukce apoptózy ve svůj prospěch. Indukce apoptózy napomáhá tvorbě ochranných kapsulí ve svalech ve svalové fázi infekce. Tyto kapsule poskytují larvám vhodné prostředí a úkryt před imunitní reakcí hostitele. Zároveň však indukce apoptózy ve střevech přispívá i k patogenezi. Během indukce apoptózy ovlivňuje *T. spiralis* regulaci exprese genů pro apoptózu a ke zprostředkování dokáže spustit vnější i vnitřní cestu aktivace. Oproti schistosomám či výše zmíněným tasemnicím nebyla popsána apoptóza cílená přímo na imunitní buňky hostitele. Při studiu vlivu *T. spiralis* a jejích molekul na zastavení růstu nádorů přispěla i parazitem indukovaná apoptóza k eliminaci nádorových buněk. Pokračování výzkumu zaměřeného na pro-apoptický potenciál *T. spiralis* by mohl přispět k rozšíření poznatků ohledně tohoto tématu a přiblížit tak možnost terapeutického využití molekul helmintů.

2.2.6. Filárie

Brugia malayi patří mezi parazitické hlístice způsobující u člověka lymfatickou filariózu. U lidských DC dochází vlivem mikrofilárií (Mf) k indukci buněčné smrti, a to hlavně apoptózy (Semnani et al., 2003). Tím dochází ke snížení potenciálu DC aktivovat T lymfocyty, což se zdá jako původce trendu snížené aktivity T lymfocytů spolu se sníženou produkcí interferonu γ (IFN- γ), jež je typický pro lymfatické filariózy (Semnani et al., 2003). Pro-apoptický potenciál Mf byl dále znovu pozorován u lidských DC, avšak nikoli na makrofázích (Semnani et al., 2008). Ve 48 hodinách po stimulaci byl u DC pozorován nárůst exprese mRNA pro-apoptického TRAIL a TNF- α . Na základě dalších pozorování zde autoři navrhuji mechanismus zprostředkování apoptózy skrze TRAIL/TNFR1 aktivaci Bid, jež vede k uvolnění cytochromu C z mitochondrií a následné aktivaci kaspázy 9 (Semnani et al., 2008). U jiného buněčného typu a to NK kultivace se živými Mf neměla na indukci apoptózy žádný efekt (Babu et al., 2007). Oproti tomu kultivace s živými L3 larvami měla za následek rychlejší aktivaci NK buněk a jejich produkci IFN- γ během 24 hodin po stimulaci, kde později došlo v závislosti na kaspázách k apoptóze (Babu et al., 2007).

V případě lymfocytů kultivovaných s Mf příbuzné *Brugia pahangi* byl pozorován nárůst apoptózy u CD4+ T lymfocytů, nikoli však při kultivaci s L3 (Jenson et al., 2002). Při podání inhibitoru inducibilní NO syntázy aminoguanidinu byla zaznamenána inhibice apoptózy, což poukazuje na indukci apoptózy závislou na NO. Ve výsledku autoři navrhuji nepřímou indukci apoptózy T lymfocytů vlivem parazita, kdy dojde k nepřímé indukci apoptózy T lymfocyty samými, vlivem

jejich nadprodukce IFN- γ vedoucí ke zvýšení koncentrace NO (Jenson et al., 2002; O'Connor & Devaney, 2002). Antigen sekretovaný *B. pahangi* (BpA) dokáže indukovat apoptózu se zapojením kaspázy 3 u lidských monocytů pocházejících ze zdravých jedinců, avšak monocyty z mikrofilarických jedinců se ukázaly jako rezistentní (das Mohapatra et al., 2014). Tato rozdílná vnímavost je pravděpodobně způsobená potlačením exprese Toll-like receptorů (TLR) u mikrofilarických jedinců. Zprostředkování indukce apoptózy je pravděpodobně skrze TLR-4 signalizaci (das Mohapatra et al., 2014).

Wuchereria bancrofti patří také mezi původce lymfatické filariózy. Při hledání faktoru zodpovědného za hyporesponzivitě imunitní odpovědi v periférii u lymfatických filarióz byly navrženy B1-a buňky jako jeden ze zprostředkovatelů apoptózy pomocných T lymfocytů (Th) (Mishra et al., 2017). K této hypotéze vedla korelace mezi množstvím apoptických Th lymfocytů a zvýšenou expresí Fas-L na povrchu B1-a buněk u pacientů s filariózou (Mishra et al., 2017). Možnost B lymfocyty zprostředkované apoptózy u CD4+ T lymfocytů byla také popsána na základě pozorování u infekce *S. mansoni* a stimulací SEA (Lundy & Boros, 2002).

Onchocerca volvulus je původcem onemocnění zvaného říční slepota. V práci od (Hartmann et al., 2013) byly identifikovány dva proteiny, abundantní larvální transkript 2 (OvALT-2) a nový larvální transkript 1 (OvNLT-1), které při stimulaci ovalbumin specifických T lymfocytů *in vitro* zapříčinily supresi těchto buněk skrze indukci apoptózy. Jejich působení na tyto ovalbumin specifické CD4+ a CD8+ T lymfocyty vedlo k potlačení syntézy DNA a buněčného dělení. Navíc u CD8+ lymfocytů potlačily produkci IFN- γ a IL-2 (Hartmann et al., 2013).

Dirofilaria immitis je hlístice parazitující v krevním systému psovitých šelem. Dimri et al. (2012) popsal nárůst apoptických periferních leukocytů u psů trpících dirofilariózou oproti zdravým psům. Naznačena je zde pozitivní korelace mezi oxidativním stresem a indukcí apoptózy, odvozená ze zaznamenání změny rovnováhy oxidantů a antioxidantů směrem k oxidativnímu stavu (Dimri et al., 2012). Přesto však zůstává mechanismus indukce apoptózy neznámý.

V souhrnu lze říci, že filárie využívají apoptózu imunitních buněk k oslabení převážně T lymfocyty zprostředkované imunitní odpovědi, vedoucí k větší šanci parazita na přežití v hostiteli. Nicméně je potřeba hlubšího prozkoumání mechanismů indukce apoptózy a jejímu vlivu na imunosupresi vlivem těchto parazitů.

2.2.7. Další helminti

Haemonchus contortus je hlístice parazitující v gastrointestinálním traktu ovcí a koz. Během posledních let byla publikována řada studií věnující se vlivu již různých bioaktivních komponentů ESP *H. contortus* (HcESP) na imunitní buňky. Stimulace kozích PMBC galektinem *H. contortus* (Hco-gal-m) vedla ke snížení proliferace a migrace, a naopak ke zvýšení míry apoptózy u T lymfocytů, avšak nikoliv u monocytů (Wang et al., 2014b). Při navázání Hco-gal-m na povrch T lymfocytů interaguje jeho MCh doména s transmembránovým proteinem 63A a MNh doména s transmembránovým proteinem 147 (Yuan et al., 2015; Li et al., 2016). Při porovnání schopnosti indukovat apoptózu u obou těchto domén, se ukázala doména MCh jako efektivnější stimul apoptózy u PMBC (Lu et al., 2017). Svůj pro-apoptický a imunosupresivní potenciál u PMBC *in vitro* prokázaly i další komponenty HcESP, mezi něž patřily arginin kináza, 15 kDa exkrečně sekreční antigen a tropomyosin (Ehsan et al., 2017; Ehsan et al., 2020a; Ehsan et al., 2020b). Zajímavým trendem u stimulace PMBC elongačním faktorem α (HcEF-1 α), oproti předchozím komponentům HcESP, byla spolu s pozorovanou zvýšenou mírou apoptózy i zvýšená míra proliferace a migrace buněk (Ehsan et al., 2020c). Avšak mechanismus této indukce apoptózy zůstával neznámý. Až při nedávné analýze mRNA u T lymfocytů stimulovaných HcESP byla pozorována up regulace genů pro Fas, Fas-L, FADD, Bid a kaspáz 3, 8 a 9 naznačují zapojení vnější cesty aktivace do indukce apoptózy (Lu et al., 2020). Oproti tomu ESP příbuzné hlístice *Necator americanus* indukují apoptózu u lidských T lymfocytů (Jurkat linie) bez zapojení Fas/FasL (Chow et al., 2000).

Angiostrongylus cantonensis je parazitická hlístice, která při infekci člověka může způsobit eozinofilní meningitidu. Při studiu vlivu infekce *A. cantonensis* na apoptózu v mozковém parenchymu a subarachnoideálním prostoru myši bylo pozorováno zvýšení exprese některých pro-apoptických proteinů, kaspáz 3, 8 a 9 či cytochromu C, a naopak současné snížení exprese anti-apoptických proteinů, Bcl-2 a IAP-1 (Chen et al., 2008). Pomocí imunohistochemie pak byla určena lokalizace některých pro-apoptických faktorů na leukocytech infiltrujících centrální nervovou soustavu (CNS). Během infekce tohoto helminta dochází také k upregulaci exprese TNF- α (Yoshimura, 1998), který dokáže indukovat apoptózu v pozdní fázi infekce (Wang et al., 2008). *A. cantonensis* je také schopen indukce apoptózy v mozku myši (Lam et al., 2020). V počátku infekce docházelo ke zvýšení množství pyroptických buněk v mozku, postupem času se však jejich počty snižovaly. Oproti tomu zde během infekce z počátečních velmi malých čísel docházelo k navýšení počtů buněk apoptických. Apoptické buňky ve svém maximu v pozdní fázi infekce dosahovaly vyšších počtů než buňky pyroptické, jejichž počty dominovaly ve fázi počáteční (Lam et al., 2020). V kontrastu k předchozím pracím jsou oproti leukocytům dle Sugaya *et al.* (2001) eozinofily přítomné v mozkomíšním moku myši infikovaných *A. cantonensis* vůči apoptóze naopak rezistentní.

Je však potřeba dalších studií zabývajících se indukcí apoptózy vlivem *A. cantonensis* a objasnění proč parazit cílí na určité typy imunitních buněk a jiné jsou naopak rezistentní. V případě slezin z myší infikovaných *A. cantonensis* byl popsán vliv infekce parazita v CNS na apoptózu u splenocytů a zároveň zvýšení zastoupení regulačních T lymfocytů (Liu et al., 2017).

Paragonimus westermani způsobuje u člověka a zvířat vážné onemocnění zvané paragonimóza. ESP izolované z čerstvě excystovaných metacerkárií prokázaly svůj přímý apoptogenní efekt na lidské eozinofily *in vitro* (Shin, 2000; Min et al., 2004). Po prvotních pozorováních apoptózy u eozinofilů se přisuzoval tento pro-apoptický efekt hlavně cysteinovým proteázám v ESP, avšak při následných experimentech s podáním inhibitoru cysteinových proteáz před stimulací zůstala míra apoptózy u eozinofilů neovlivněna (Shin, 2000; Min et al., 2004). Takto stimulované apoptické eozinofily měly na svém povrchu vystaven PS (Min et al., 2004). V lyzátu eozinofilů pak byla detekována aktivovaná kaspáza 3 a spolu s inhibicí apoptózy při podání inhibitorů kaspáz vedly k určení závislosti indukce apoptózy na kaspázách (Min et al., 2004). Pro larvy *P. westermani* se eliminace imunitních buněk, zvláště eozinofilů, jež jsou zodpovědné za imunitní odpověď zacílenou na parazita, zdá jako sofistikovaný mechanismus pro jeho přežití a efektivnější migraci v hostiteli během časně fáze infekce.

Nippostrongylus brasiliensis je hlístice parazitující v gastrointestinálním traktu hlodavců. Infekce *N. brasiliensis* indukuje zvýšenou míru apoptózy v klících tenkého střeva potkanů (Hyoh et al., 1999). Během infekce byla zjištěna zvýšená koncentrace aktivované kaspázy 3 a při podání inhibitoru kaspáz byla apoptóza částečně inhibována, což poukazuje na zapojení kaspáz do indukce apoptózy (Hyoh et al., 2002). Při *in vitro* stimulacích střevních epiteliálních buněk byla spolu s up-regulací Fas pozorována indukce apoptózy vlivem bioaktivních molekul sekretovaných *N. brasiliensis* (Kuroda et al., 2002). Takto indukovaná apoptóza vede k patologii ve střevech vlivem *N. brasiliensis*. Avšak přesný faktor produkovaný parazitem zodpovědný za indukci apoptózy zůstává neidentifikován.

Mesocostoides vogae (syn. *corti*) patří mezi tříhostitelské tasemnice, jehož stádium metacestoda je schopno asexuálního rozmnožování. Ovlivnění imunitních procesů zaměřených na eliminaci parazita v časně fázi napomáhá jeho přežití v hostiteli. Během infekce myší *M. vogae* byla pozorována akumulace myeloidních buněk a současný pokles počtu buněk lymfoidního typu v peritoneu (Mačák-Kubašková et al., 2019). Při následném fluorescenčním značení annexinem V a PI obou typů těchto buněk byla pozorována vnímavost myeloidních buněk (hlavně granulocytů a makrofágů), a naopak překvapivá rezistence lymfoidních buněk vůči apoptóze, naznačující depleci lymfoidních buněk na apoptóze nezávislou. Oproti peritoneálním adherentním

buňkám podléhajícím pozdní apoptóze, buňky přichycené na povrchu larev parazita neměly fragmentovaná jádra a apoptóze tak zřejmě nepodléhaly. V rámci výzkumu tumoricidního efektu eozinofilů izolovaných z peritonea myší infikovaných *M. corti* na buňkách myšího melanomu (linie A20) byla jako typ buněčné smrti A20 buněk *in vitro* určena právě apoptóza (Costain et al., 2001). Eozinofily zde měly současně zvýšenou expresi granzymu B, perforinu a Fas-L. Podání kompetitivního substrátu pro granzym B byla pozorována inhibice apoptózy, demonstrující závislost indukce apoptózy na granzymu B (Costain et al., 2001).

V souhrnu lze říci, že někteří helminti a jejich ESP jsou schopni indukovat více signálních drah aktivace apoptózy, přes různé receptory či regulační proteiny apoptózy u imunitních i jiných typů buněk (viz Tab. 4). Nečiní tak bezvýznamně, nýbrž za účelem utlumení imunitní odpovědi hostitele. Také mohou takto eliminovat buňky ve svém okolí, pro usnadnění kolonizace tkáně či při tvorbě tzv. nurse cells u *T. spiralis* pro vytvoření pro parazita vhodného prostředí. Jejich schopnost indukovat tento sofistikovaný typ buněčné smrti má i svůj farmakogenní potenciál zejména u autoimunitních a nádorových onemocnění.

Tabulka 4: Shrnutí vybraných helmintů a jejich produktů spolu s mechanismy využitých v indukci apoptózy na základě jejich relevance k tématu, druhu parazita a dostupné literatury, převzato a upraveno od Zakeri (2017).

Helmint	Stádium/ESP	Cílové buňky	Mechanismus	Metody detekce apoptózy	Zdroj
<i>Schistosoma mansoni</i>	Vajíčka	CD4+ a CD8+ T lymfocyty	Neznámý	Annexin V/PI	Fallon et al. (1998) Rumbley et al. (2001) Carneiro-Santos et al. (2000) Lundy et al. (2001) a Lundy & Boros (2002) Chen et al. (2002) Prendergast et al. (2015)
	SEA	Lymfocyty	Fas/Fas-L	TUNEL, 3H thymidin test, RNA protection test	
	SEA	T lymfocyty z INT pacientů	Korelace s IL-10	FACS (fluorescent activated cell sorting), DNA elektroforéza	
	SEA a vajíčka	CD4+ T lymfocyty	Skrze B1-a lymfocyty s Fas-L	Annexin V/PI, FACS, 3H thymidin test	
	Smaf	CD4+ a CD8+ T lymfocyty	Zvýšení exprese Fas, Fas-L a FADD v lymfocytech ze spádových uzlin pro kůži	Annexin V/PI, FACS, DNA elektroforéza, TUNEL, RT-PCR	
	Cerkárie	CD4+ T lymfocyty	Mechanismus závislý na IL-10	Annexin V/PI	
<i>Schistosoma japonicum</i>	SEA	Jaterní buňky (HSC)	Aktivace kaspáz 3 a 8, stimulace TRAIL/DR5	Annexin V/PI, TUNEL, měření aktivity kaspázy 3, TRAIL ELISA, qRT-PCR, WB, immunofluorescence (IF), MTT	Duan et al.(2014) Wang et al. (2014) Yang et al. (2013)
		Lidské LX-2 buňky	Zvýšení p53 a DR5 a snížení Akt exprese	Annexin V/PI, qRT-PCR, WB, měření aktivity kaspázy 3, IF	
	rSj16	WEHI3B buňky	Skrze změnu memb. potenciálu mitochondrií, zvýšení kaspáz 3, 6 a 9 aktivity, upregulace Bax a downregulace Bcl-2 exprese	Annexin V/PI, fluorescenční mikroskopie, měření změny potenciálu mitochondriální membrány a kaspázové aktivity, WB	
<i>Fasciola hepatica</i>	ESP	Eozinofily	Tyrosin kinázy (TyrK) a kaspázy	Annexin V/PI, aktivita kaspáz, TUNEL, TEM, optická a fluorescenční mikroskopie, cytofluorometrie	Serradel et al. (2007) a (2009) Escamilla et al. (2016) Guasconi et al. (2012) Escamilla et al. (2017) Fu et al. (2016) (Fu et al. 2019) Garcia-Campos et al. (2019)
	ESP a juvenilní motolice	Eozinofily	Skrze ROS a H ₂ O ₂ -> depolarizace mitochondriální memb. a uvolnění cytochromu C	Annexin V/PI, cytofluorometrie, měření změny potenciálu mitochondriální membrány a kaspázové aktivity	
	Dospělci a juvenilní motolice	Eozinofily z jater ovcí	Dependentní na kaspáze 3	Imunohistochemie (IHC), TEM	
	Metacerkárie a ESP	Makrofágy	Neznámo	Annexin V/PI, cytofluorometrie	
	Juvenilní motolice	Peritoneální makrofágy, lymfocyty a granulocyty	Neznámo	AnnV/PI, imunocytochemie (ICC), TEM	
	Dospělci	PMBC	Upregulace genů proTNF a TNFR1/2	Transkriptomická analýza	
			Vnitřní cesta aktivace přes mitochondrie, zapojení Bik, Bnip1 a Bim		
		Antigen prezentující buňky	Skrze mir-155 a produkty STAT, APP a DUSP1		

<i>Taenia crassiceps</i>	Metacestodi	Jurkat buňky B a T lymfocyty (CD4 ⁺ CD8 ⁺ CD19 ⁺) a eozinofily	Neznámo Zvýšení aktivity kaspázy 3	Kometový test, kolorimetrie Annexin V/PI, TUNEL, DNA laddering test, měření aktivity kaspázy 3, TEM	O'Connell et al. (2000) Zepeda et al. (2010) Zepeda et al. (2016) López-Briones et al. (2003) Zepeda et al. (2017) Zepeda et al. (2019)
	MF	CD4+ T lymfocyty ze slezin	Neznámo	TUNEL, TEM, genová exprese	
	Cysticerkální antigen	CD4+ a CD19+ splenocyty	Pravděpodobně zprostředkovaná kaspázami	Annexin V/PI, DNA laddering test, WB	
	MF	Buňky hipokampu a endotel v CNS	Neznámo	TUNEL, TUNEL-peroxidázové značení, optická mikroskopie	
<i>Taenia solium</i>	Metacestodi	CD4+ T lymfocyty	Neznámo	Annexin V/PI, TUNEL, elektroforéza DNA, EM	Tato et al. (2004) Solano et al. (2006) Sikasuge et al. (2008) Yan et al. (2008)
	Cysticerky	CD3+ T lymfocyty	Neznámo	TUNEL	
	Annexin B1	Eozinofily	Aktivace kaspázy 3 a cytochromu C skrze influx Ca ²⁺	Annexin A5/PI, WB, EM, měření aktivity kaspázy 3	
<i>Echinococcus multilocularis</i>	Metacestodi	Hepatocyty	Upregulace genů pro-apoptických p53, p21, Gadd45c a aktivovaná kaspáza 3	TUNEL, WB, IHC, qRT-PCR	Zhang et al. (2012)
	Vezikuly larev	DC	Neznámo	Annexin V/7-AAD	Nono et al. (2012)
<i>Echinococcus granulosus</i>	HF	Lidské lymfocyty	Zvýšená aktivace kaspázy 3 a zvýšení exprese Bax, snížení exprese Bcl-2	Detekce aktivity kaspázy 3, RT-PCR	Spotin et al. (2012)
	HF a frakce 37	Peritoneální makrofágy	Neznámo	Annexin V/7-AAD	Merji et al. (2017)
	Frakce HF	Rakovinné buňky	Neznámo	Annexin V/PI	Daneshpour et al. (2019)
	EgK1-1	MDA-MB—231	Neznámo		Ranasinghe et al. (2018)
<i>Trichinella spiralis</i>	Dospělci	Střevní buňky	Štěpení kaspázy 12 skrze ERS související molekuly a fosforylace JNK	TUNEL, WB	Yu et al. (2014) Wang et al. (2009) a (2013) Vasilev et al. (2015)
	ES-L1	B16 melanomové buňky	Aktivace vnější cesty skrze receptor a na kaspázách dependentní	Annexin V/PI, TUNEL, MTT, detekce kaspázové aktivity	
	Homogenát dospělců a larev	Různé linie rakovinných buněk	Redukce růstu a proliferace, mechanismus apoptózy neznám	MTT, DNA laddering test	
<i>Brugia malayi</i>	L3	NK buňky	Dependentní na kaspázách	Annexin V/PI, detekce kaspázové aktivity	Babu et al. (2007) Semnani et al. (2003) Semnani et al. (2009)
	Mf	DC	Skrze TRAIL/TNFR1, aktivace Bid-> uvolnění cytochromu C a aktivace kaspázy 9	TUNEL, RT-PCR, imunoblot, EM, detekce kaspázové aktivity	
<i>Brugia pahangi</i>	BpA	Monocyty	Dependentní na kaspázách a TLR4	Annexin V/PI, 3H thymidin test, CFSE, ICC	das Mohapatra et al. (2014)
	Mf, plazma pacientů s Mf	CD4+ T lymfocyty	Nepřímá indukce skrze T lymfocyty, zvýšení NO	TUNEL, CSFE	Jenson et al. (2002) O'Connor et al. (2002)
<i>Wucherechia bancrofti</i>	Mf	CD4+ T lymfocyty	Upregulace Fas-La B1-a buněk	Annexin V/7-AAD, fluorometrie	Mishra et al. (2017)
<i>Onchocerca volvulus</i>	OvALT-2, OvNLT-1	Ovalbumin specifické CD4+, CD8+ lymfocyty	Suprese syntézy DNA, buněčného dělení a cytokinové produkce	Annexin V/7-AAD, 3H thymidin test, CFSE	Hartmann et al. (2017)
<i>Dirofilaria immitis</i>	Mf	Psí leukocyty	Korelace oxidativního stresu a apoptózy	Annexin V	Dimri et al. (2012)
<i>Haemonchus contortus</i>	Hco-gal-m	T lymfocyty z koz	Neznámý	Annexin V/PI	Wang et al. (2014) Lu et al. (2020)
	HcESP		Upregulace genů pro Fas, Fas-L, FADD, Bid, kaspázy 3, 8 a 9	Annexin V/PI, měření syntézy DNA, transkriptomická analýza	

<i>Angiostrongylus cantonensis</i>	Larvy	Mozkové buňky myší a leukocyty v infiltrátu	Dependentní na kaspázách 3, 8, 9 a zvýšení exprese cytochromu C spolu se snížením exprese proti-apoptických proteinů (IAP, Bcl-2),	TUNEL, WB, IHC	Chen et al. (2008) Lam et al. (2020)
		Mozkové buňky myší	Neznámo	Annexin V/PI	
<i>Paragonimus westermani</i>	ESP metacerkárií	Eozinofily	Aktivace kaspázy 3	Annexin V/7-AAD, WB	Min et al. (2004), Shin et al. (2000)
<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	ESP	IEC-6 střevní buňky	Upregulace Fas a aktivace kaspázy 3	BrDU test, imunoblot, FACS, histochemie, DNA elektroforéza, detekce aktivity kaspázy	Kuroda et al. (2002) Hyoh et al. (1999) Hyoh et al. (2002)
<i>Mesocostoides vogae</i>	Tetrathyridia	Granulocyty a makrofágy	Neznámo	Annexin V/PI, fluorometrie	Mačák-Kubašková et al. (2019) Costain et al. (2001)
	Eozinofily z infikovaných myší	Buňky myšího melanomu (A20)	Skrze granzym B, perforin a Fas-L	Detekce DNA fragmentace, RT-PCR	

2.3. *Trichobilharzia regenti*

T. regenti je neurotropní parazit z čeledi Schistosomatidae, jehož mezipřevoditelem je plž rodu *Radix* a definitivním hostitelem jsou kachnovití ptáci. Také je schopen náhodně infikovat savce, jako tomu je u myši a člověka. V náhodném hostiteli však parazit nedokáže dospět a hyne u myši v počátku v kůži anebo později v CNS. Oproti tomu u kachen, jakožto definitivního hostitele schistosomula *T. regenti* migrují z CNS dále do nosní sliznice, kde dospívají a produkují vajíčka (Hrádková & Horák, 2002) Právě migrace v CNS definitivního či náhodného hostitele zapříčiňuje závažné neurologické dysfunkce jako např. ochrnutí končetin (Horák et al., 1999) U člověka penetrace cercárií *T. regenti*, ale i dalších ptačích schistosom do kůže vede k manifestaci svědivé makulopapulózní vyrážky známé jako cercáriová dermatitida (Horák et al., 2015; Macháček et al., 2018)

Asi nejprobádanější experimentálním modelem infekce *T. regenti* z hlediska imunitní odpovědi hostitele je myší model. Cercárie penetrují kůži myši, kde dochází k jejich transformaci na schistosomula. Cercárie jsou k penetraci hostitele vybaveny cysteinovými peptidázami, jež sekretují a vlivem nichž dochází ke štěpení kolagenu a keratinu v kůži (Kašný et al., 2007). V případě imunokompetentních myši se v kůži okolo schistosomul objevuje zánětlivý infiltrát imunitních buněk, skládající se převážně z neutrofilů, eozinofilů a makrofágů spolu s žírnými buňkami a CD4+ lymfocyty (Kouřilová et al., 2004a; Kouřilová et al., 2004b). Vlivem těchto imunitních buněk dochází k produkci zánětlivých cytokinů IL-1 β , IL-12 a IL-6. Je známo že většina schistosomul byla zastavena a uhynula v kůži pravděpodobně vlivem silné zánětlivé imunitní reakce hostitele (Hrádková & Horák, 2002; Kouřilová et al., 2004b).

Okolo 1/10 schistosomul se z kůže dostává skrze periferní nervy do CNS, oproti tomu u imunodeficientních myši bylo množství schistosomul v CNS větší, také byla schistosomula lokalizována v extraparenchymální oblasti, pravděpodobně z důvodu vyhnutí se zánětlivé imunitní odpovědi (Kouřilová et al., 2004b). Po dosažení CNS v imunokompetentní myši jsou schistosomula detekována převážně v bílé hmotě míchy (Bulantová et al., 2016), kde kolem poškozených parazitů a v jejich migračních drahách se nachází zánětlivý infiltrát složený z převážně z makrofágů, granulocytů a CD3+ lymfocytů a aktivovaných mikroglií, jež jsou pravděpodobně zodpovědné za eliminaci schistosomul (Kouřilová et al., 2004b; Lichtenbergová et al., 2011). Také zde byla zaznamenána přítomnost astrocytů a tvorba reparačních gliových jizev v místech poškozených migrací schistosomul (Lichtenbergová et al., 2011). U astrocytů a mikroglií stimulovaných *in vitro* homogenátem *T. regenti* či rekombinantními katepsiny B1.1 a B2 byla zaznamenána produkce oxidu dusnatého a zánětlivých cytokinů IL-6 a TNF- α , což naznačuje jejich vliv na udržení zánětlivého prostředí a přispění k patologii v CNS vlivem ESP a homogenátu *T. regenti* (Macháček et al., 2016).

Právě produkce $\text{TNF-}\alpha$ vlivem parazitárního antigenu by mohla mít za následek jím zprostředkovanou indukci apoptózy u buněk v CNS.

Recentně byl popsán vliv infekce *T. regenti* na polarizaci T lymfocytů směrem ke smíšené odpovědi typu 1/2 (Majer et al., 2020). T buněčná odpověď je zřejmě ovlivněna především zánětem v kůži a dosahuje vrcholu 7 dpi. Zajímavé však bylo zjištění, že ve slezině infikovaných myší dochází k poklesu počtu CD4+ a CD8+ lymfocytů. Přesný mechanismus tohoto jevu není objasněn, mohl by nicméně souviset s apoptózou zmíněných lymfocytárních populací.

3. Materiál a metodika

3.1. Pufry média a roztoky

Fosfátový pufr (PBS)

Ve všech experimentech byl použit čerstvě připravený 0,1M PBS s pH 7,4 o složení: 136,89mM NaCl, 2,68mM KCl, 4,23mM Na₂HPO₄; 1,47mM KH₂PO₄. Připravován byl z 10x koncentrovaného sterilního zásobního roztoku.

Pro *in vivo* experimenty

Anestetikum

Mix anestetik byl vždy čerstvě připraven v 1ml insulinové injekční stříkačce za sterilních podmínek v pokojové teplotě dle následujícího složení:

- Sterilní fyziologický roztok (Mayrhofer Pharmaceutica)
- 10% (v/v) Rometar (Bioveta), finální koncentrace xylazinu = 2 mg/ml
- 20% (v/v) Narketan (Vétoquinol), finální koncentrace ketaminu = 20 mg/ml

Promývací roztok pro perfuze

Jako promývací roztok byl použit heparinizovaný (1 U/ml, Heparin Zentiva) PBS o teplotě 37 °C.

Fixační roztok pro perfuze

Jako fixační roztok byl použit čerstvě namíchaný 4% (m/v) formaldehyd připravený rozpouštěním paraformaldehydu (Sigma-Aldrich) v PBS ve vodní lázni o teplotě 72 °C a následně ochlazený na ledu na 4 °C.

Pro *in vitro* experimenty

Kultivační médium pro schistosomula

Médium pro kultivaci schistosomul bylo připraveno dle Vrbové (2017) a bylo před použitím uchováváno ve 4 °C. Jednotlivé složky média jsou uvedeny v Tab. 5.

Tabulka 5: Složení média pro kultivaci schistosomul (převzato od Vrbová, 2017)

Složka	Množství	Výsledná koncentrace
Eaglovo bazální médium (BME) (Life Technologies)	100 ml	-
Laktalbumin hydrolyzát (Fluka)	0,1 g	0,1% (w/v)
HEPES (Sigma-Aldrich)	0,24 g	1x10 ⁻³ M

Glukóza (Sigma-Aldrich)	0,1 g	111×10^{-4} M
Hypoxantin (Sigma-Aldrich)	50 μ l	5×10^{-7} M
Serotonin (Sigma-Aldrich)	100 μ l	1×10^{-6} M
Hydrokortison (Sigma-Aldrich)	200 μ l	1×10^{-6} M
Trijodtyronin (Sigma-Aldrich)	100 μ l	2×10^{-7} M
Insulin (Sigma-Aldrich)	800 μ l	$1,4 \times 10^{-3}$ M
Schneiderovo médium (Sigma-Aldrich)	5 ml	5% (v/v)
MEM vitamíny (Life Technologies)	0,5 ml	0,5% (v/v)
BSA (Sigma-Aldrich)	1 g	15×10^{-3} M
Mix penicilinu a streptomycinu (Sigma Aldrich)	1 ml	1 % (v/v)

Jako první byly připraveny zásobní roztoky hormonů dle Tab. 6, které byly před použitím uchovávány v -20 °C. Následovala příprava zásobního roztoku Schneiderova média, které bylo rozpuštěno v ddH₂O (26,4 mg/ml) a přidáno 0,59 M NaHCO₃ do výsledné koncentrace média 0,012 M. Dále bylo za použití pH metru (inoLab, WTW) změřeno pH a pomocí 1M NaOH upraveno na 9,2 a následně 1M HCl sníženo na 6,7. Pro dosažení výsledné koncentrace 0,0054 M bylo přidáno 0,27 M CaCl₂ a výsledný roztok byl uchováván ve 4 °C bez přístupu světla.

Dále byly dle Tab. 5. rozpuštěny HEPES, glukóza a laktalbumin hydrolyzát v BME. Následovalo přidání hormonů a úprava pH na 7,3 až 7,4 přidáním 1M HCl. Poté bylo přidáno Schneiderovo médium, MEM vitamíny a mix antibiotik a antimykotik. Následně bylo znovu upraveno pH 1M HCl na 7,3 až 7,4 a byla změřena osmolalita na osmometru (Os3000, Marcel) a upravena dH₂O na 275 mOsm/kg. Finální médium bylo pak sterilně přefiltrováno přes 0,2 μ m filtr (Sigma-Aldrich) a před použitím uloženo do 4 °C.

Tabulka 6: Zásobní roztoky hormonů (převzato od Vrbová 2017)

Hormon	Rozpouštědlo	Koncentrace zásobního roztoku
Hydrokortison	96% (v/v) etanol, poté byla přidána do finální koncentrace dH ₂ O	1×10^{-3} M
Hypoxantin	1M NaOH	1×10^{-3} M
Insulin	10^{-3} M HCl	0,17 M
Trijodtyronin	1M NaOH	2×10^{-4} M
Serotonin	10^{-4} M HCl	1×10^{-3} M

Média pro kultivaci buněčných linií a kultur

Pro kultivaci buněčných linií a kultur byla použita dvě základní kultivační média:

- RPMI (z angl. Roswell Park Memorial Institute Medium) 1640 bez L-glutaminu s fenolovou červení (Lonza)
- DMEM (z angl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Lonza)

Do médií pro jednotlivé buněčné linie a kultury byla přidána potřebná aditiva dle Tab. 7:

- 10% fetální bovinní sérum (FBS) (Labtech), inaktivované v 56 °C po dobu 30 min
- 1% (v/v) L-glutamin (Lonza), výsledná koncentrace 2mM
- 1% (v/v) penicilin-streptomycin (P/S) (Lonza), výsledná koncentrace 100 U/ml, resp. 100 mg/ml

Tabulka 7: Kultivační média pro jednotlivé buněčné linie

Buněčná linie	Médium
NIH 3T3	DMEM s 10% FBS a 1% P/S
Splenocyty	RPMI s 10% FBS, 1% L- glutaminu a 1% P/S
Astrocyty	RPMI s 10% FBS, 1% L- glutaminu a 1% P/S
Mikroglie	RPMI s 10% FBS, 1% L- glutaminu a 1% P/S
Neuro2a	DMEM s 10% FBS a 1% P/S
HaCaT	DMEM s 10% FBS a 1% P/S
HFF	DMEM s 10% FBS, 1% L- glutaminu a 1% P/S
Jurkat	RPMI s 10% FBS, 1% L- glutaminu a 1% P/S

Nejdříve byly všechny alikvóty potřebných aditiv přefiltrovány přes 0,2 µm filtr (Sigma-Aldrich). Poté byly přidány v požadovaném množství do média a kompletní kultivační médium bylo před použitím uchovávalo ve 4 °C. Veškerá manipulace s médiem a jeho složkami probíhala za sterilních podmínek v laminárním boxu (Esco).

Lyzační pufr

Lyzační pufr o pH 7,2 byl připraven pro lýzi erytrocytů při izolaci splenocytů ze sleziny. Po přípravě byl sterilně filtrován přes 0,2 µm filtr (Sigma-Aldrich) a uložen do 4 °C před použitím. Jeho složení bylo v 1000 ml dH₂O:

- 8,3 g NH₄Cl, výsledná koncentrace 1,6x10⁻¹ M
- 1 g KHCO₃, výsledná koncentrace 1x10⁻² M
- 37,2 mg EDTA, výsledná koncentrace 1,27x10⁻⁴ M

3.2. Modelový organismus a experimentální infekce

3.2.1. *Trichobilharzia regenti*

Životní cyklus motolice *Trichobilharzia regenti* je trvale udržován v laboratoři helmintologie Katedry parazitologie (Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova; PŘF UK) za využití plžů *Radix lagotis* jako mezipositelů a kachen *Anas platyrhynchos f. domestica* jako definitivních hostitelů (Horák et al., 1999). Pro vyloučení a následný sběr cercárií byli plži umístěni do nádoby s odstátou vodou za stálého svitu lampy po dobu zhruba 60 minut, což stimulovalo vylučování cercárií. Následně byla voda s cercáriemi slita do odměrné baňky obalené alobalem a cercárie byly díky své pozitivní fototaxi koncentrovány u jejího lampou nasvíceného hrdla. Poté byly cercárie Pasteurovou pipetou přeneseny do 50 ml zkumavky. Pro stanovení jejich koncentrace (ml^{-1}) bylo spočteno dvacet 50 μl vzorků odebraných ze zkumavky.

3.2.2. Náhodní hostitelé a jejich infekce

Jako náhodný savčí hostitel byly použity samice myši kmene C57BL/6 (AnLab), 8 týdnů staré a chované v Centru pro experimentální biomodely (1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova), kde byly umístěny ve vyhrazených konvenčních kójiích (23 °C, 55% vzdušné vlhkosti, 12/12 světelný režim, přístup ke krmení a vodě *ad libitum*). Pro získání gliových kultur byla využita mláďata nenakažených myší (viz 3.6.2.1) V rámci této práce byly prováděny dva typy infekcí pro zachycení parazitů v kůži a dále v míše.

Za účelem infekce míchy byly před infekcí myši jednotlivě rozmístěny do zatemněných kádinek s 50 ml 40 °C vody po dobu 30 min k urinaci a defekaci. Dále byla voda vyměněna za 50 ml odstáté vody s 2000 cercárií, zde byly myši ponechány po dobu 60 min. Následně byly myši navraceny do chovných boxů a usmrceny dle schémat níže. Nenakažené myši (označené jako „0 dpi“) byly u všech experimentů použity jako biologická negativní kontrola.

V případě infekce kůže byly myši uspány intraperitoneálně mixem anestetik (viz dříve) a umístěny na destičku s 1,5 ml mikrozkuvkami obsahujícími infekční dávku 500 cercárií v objemu 1,5 ml, do kterých jim byla ponořena co největší plocha levého boltece po dobu 15 min. Následně byly myši navraceny do boxů a pravidelně kontrolovány, dokud se neprobraly z anestézie. Poté byly myši usmrceny stržením vazů. Nenakažené myši (označené jako „0 hpi“) byly u všech experimentů použity jako biologická negativní kontrola.

Veškerá práce se zvířaty probíhala pod dohledem držitele osvědčení o odborné způsobilosti k navrhování pokusů a projektů pokusů v souladu s § 15d odst. 3 zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání. Experimentální činnosti s laboratorními zvířaty byly schváleny

Odbornou etickou komisí PŘF UK a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (MSMT-31114/2013-9).

Anestezie

Během *in vivo* experimentů byly použity dva typy anestezie. Jako inhalační anestetikum byl použit Isoflurin® (1000mg/g isofluranum v zásobním roztoku; Vetpharma animal health) u myši před usmrcením a odebráním slezin (viz 3.5.1.). V ostatních experimentech byl myším intraperitoneálně podán mix anestetik (viz výše) o objemu 250-300 µl s ohledem na velikost a hmotnost myši.

3.3. Bioinformatická analýza

Analýza míry exprese genů asociovaných s apoptózou (vytipovaných na základě literatury) byla provedena na transkriptomických datech získaných z RNA sekvenování míchy myši infikovaných *T. regenti* (Macháček et al., Helminthodny 2019 - <https://drive.google.com/file/d/1H4JC6zgCTKi3O-akXTd4Gjw2GXG0pJN5/view>). Analýza byla provedena na vzorcích 7, 14 a 21 dpi, zdravé myši příslušného věku byly použity jako biologická negativní kontrola (n=4). Míra exprese je vyjádřena v jednotkách „transcripts per million“ (TPM), data pro analýzu laskavě poskytl Mgr. Roman Leontovych, Ph.D.

3.4. První část *in vivo* experimentů: fragmentace DNA v kůži a míše

Pro detekci fragmentace DNA v kůži (8, 24 a 48 hpi) a zdravé myši jako kontroly) a míše (7 a 14 dpi a zdravé myši jako kontroly) myši infikovaných *T. regenti* byla použita metoda tzv. TUNEL test. Tato metoda detekuje zlomy v DNA charakteristické právě pro apoptózu.

Myši s infekcí v míše byly nejdříve uspány inhalačním anestetikem a následně perfundovány promývacím a fixačním roztokem, poté z nich byla vypreparována mícha. Z míchy pak byly zhotoveny kryorezy. Myši s infekcí v kůži byly usmrceny stržením vazů a následně jim byly odebrány boltce. Z boltců pak byly zhotoveny kryorezy a spolu s kryorezy míchy byly použity na detekci DNA fragmentace pomocí TUNEL testu.

3.4.1. Transkardiální perfuze

Poté, co byla myš hluboce uspána anestetikem a připevněna k pitevní podložce, jí byl opatrně otevřen hrudní koš a zavedena 25G jehla perfuzní soustavy do levé srdeční komory a nastřížena pravá srdeční předsíň. Pomocí injekční stříkačky byl pomalu vpraven promývací roztok (cca 40-50 ml). Při úspěšném vykrvení a promytí došlo k odbarvení jater. Následně byla myš perfundována obdobným objemem fixačního roztoku a u úspěšné fixace byl pozorován „formalínový tanec“.

3.4.2. Zpracování tkáně a zhotovení kryorezů

Po perfuzi byla vyjmuta páteř, která byla po odstranění maximálního možného množství svaloviny postfixována ve fixačním roztoku zhruba 15 min. Následně byla opatrně vypreparována mícha dále postfixována ve 2 ml 4% formaldehydu přes noc ve 4 °C.

Myším s infekcí kůže byly po usmrcení stržením vazů ustřiženy infikované ušní boltce. Ty byly poté postfixovány v 5 ml 4% formaldehydu přes noc ve 4 °C.

Poté byla z nafixované tkáně vymyta fixáž promytím v PBS (3x15min) a následovalo prosycení sacharózou (Pentax) v PBS pro kryoprotekci. Nejdříve byla tkáň inkubovaná s 10% sacharózou 2 hod, poté s 20% sacharózou 6 hod a nakonec s 30% sacharózou přes noc. Po prosycení byla tkáň přenesena do zamrazovacích formiček (Leica Biosystems) a zalita zamrazovacím médiem (Tissue Freezing Medium, Leica Biosystems). Takto zpracované vzorky tkání byly uloženy do -20 °C přes noc. Pro pozdější využití (nejpozději 4 měsíce po zpracování) byly vzorky přesunuty do -80 °C.

Pomocí kryomikrotomu (Leica Biosystems CM3050S) vychlazeného na -20 °C byly zhotoveny 10 µm silné řezy hluboce zmrazených tkání. Řezy byly umístěny na adhezivní podložní sklíčka X-tra (Leica Biosystems) a neprodleně po zhotovení prohlédnuta na přítomnost schistosomul v tkáni. Sklíčka se schistosomuly určená pro detekci fragmentace DNA byla uchovávána v -80 °C (nejdéle 4 měsíce).

3.4.3. TUNEL test

Po vytemperování v pokojové teplotě byly kryorezy ohraničeny hydrofobní tužkou NovoPen (Leica Biosystems). Následně byly řezy zpracovány dle pokynů (viz zjednodušený protokol v odstavci níže) výrobce v komerčním kitu Click-iT™ Plus TUNEL Assay (Invitrogen). Jako pozitivní kontrola sloužily tkáňové řezy ze zdravých (nenakažených) myší inkubované s DNázou I (30 min v pokojové teplotě) (Life Technologies).

Tkáňové řezy míchy a boltců na sklíčkách byly omytím v PBS 3x5 min zbaveny zbytků média, fixovány 4% formaldehydem 15 min (37 °C) a dále inkubovány s permeabilizačním agens

proteinkinázou K po dobu 15 min. Následně byly řezy omyty v PBS (5 min) a znovu fixovány formaldehydem (5 min, 37 °C). Část řezů z nenakažených myší byla inkubována s DNázou I, která způsobuje DNA fragmentaci pro využití jako pozitivní kontrola. Dále byly řezy inkubovány s reakčním pufr (10 min) a poté s mixem TdT enzymu a nukleotidu dUTP (60 min, 37 °C) ve vlhké komůrce ve tmě. Následně byl přidán blokační pufr (5 min) a řezy byly omyty v PBS. Poté byly řezy inkubovány s reakčním mixem s flouroforem (30 min, 37 °C, ve tmě) ve vlhké komůrce. Následovalo promytí pufr (5 min) a PBS (5 min).

Následně byly řezy zamontovány do média VectaShield s DAPI (Vector Labs) pro označení buněčných jader a byly prohlíženy ve fluorescenčním mikroskopu (Olympus BX51), fotografovány (Olympus DP-2) a výsledné fotografie zpracovány v programech Quick PHOTO MICRO 3.0 a GIMP 2.10.

Fotografie byly dále zpracovávány v programu Image J. 1.50i. Kde bylo vždy vybráno místo zájmu obsahující schistosomulum, či jeho migrační dráhu s okolní tkání zhruba o stejném početním zastoupení buněk ve tkáni, ve kterém byly následně spočítány všechny jádra buněk a následně jádra TUNEL pozitivních buněk (intenzivní zelená fluorescence). Procento zastoupení TUNEL pozitivních (TUNEL+) buněk ve tkáni hostitele a parazita dohromady bylo počítáno jako poměr TUNEL+ buněk ku všem buňkám. V případě pouze procenta zastoupení TUNEL+ buněk hostitele bylo počítáno bez započtení buněk parazita.

3.5. Druhá část *in vivo* experimentů: apoptóza v lymfatických orgánech

Druhá část *in vivo* experimentů byla prováděna za účelem detekce apoptických populací buněk ve slezinách a lymfatických uzlinách myší infikovaných *T. regenti* (3, 7, 14, 21 a 28 dpi a zdravé myši byly použity jako kontroly). Ty byly detekovány pomocí značení buněk annexinem V a propidium jodidem (PI) konjugovaných s fluorofory.

3.5.1. Zisk splenocytů a lymfatických uzlin

Myš byla ve sklenici hluboce usnuta inhalačním anestetikem Isoflurin® (Vetpharma animal health) a vykrvena. Po otevření břišní dutiny byla vyjmuta slezina s tříselnými lymfatickými uzlinami a obojí bylo umístěno do Petriho misek s PBS na ledu. Následně byla slezina pomocí pinzet mechanicky rozvolněna a pipetou přemístěna do 1,5ml mikrozkušavky, kde byla pomocí jednorázového plastového mikrohomogenizátoru homogenizována. Tříselné lymfatické uzliny byly pinzetami zbaveny přebytečné tukové tkáně a homogenizovány stejně jako sleziny. Vzniklé suspenze slezin a lymfatických uzlin byly přefiltrovány přes sítko o velikosti pórů 70 µm (VWR) do 50ml zkumavky a objem byl doplněn PBS do 25 ml. Následně byly zkumavky 2x 5 min

centrifugována při 4 °C a 350 g. Mezi centrifugacemi byl odstraněn supernatant a resuspendován pelet spolu s doplněním objemu PBS do původních 25 ml. Po odstranění PBS bylo do každé zkumavky se suspenzí slezin, nikoliv lymfatických uzlin, které byly ponechány na ledu, přidáno 5 ml lyzačního pufru a pelet byl opatrně resuspendován a ponechán 5 min při pokojové teplotě. Následovala centrifugace 5 min při 4 °C a 350 g, poté byl odstraněn supernatant a resuspendován pelet spolu s doplněním objemu PBS do 5 ml. Dále následovala centrifugace 5 min při 4 °C a 350 g a odstranění supernatantu. Pelet byl resuspendován v definovaném objemu PBS.

Následně byly buňky zpracovány pro cytometrickou analýzu, jak je popsáno níže (viz 3.7.).

3.6. *In vitro* experimenty

In vitro experimenty byly prováděny za účelem detekce apoptických populací buněk v kulturách a liniích buněk stimulovaných dvěma typy parazitárního antigenu *T. regenti* (viz 3.6.1.) po dobu 48 hod. Zvoleny byly takové typy buněk, které jsou relativní z pohledu biologie parazita. Takto vybrané buňky pro stimulaci byly buď z buněčných linií, či získány ze zdravých myší v podobě primárních kultur. V rámci stimulačních experimentů byly zařazeny i experimenty restimulační, kde byly buňky izolované ze slezin z myší nakažených *T. regenti* (3 a 7 dpi) znovu stimulovány parazitárními antigeny po dobu 48 hod. Takto stimulované/restimulované buňky byly inkubovány s annexinem V a PI (viz 3.5.).

3.6.1. Příprava antigenu

Jako stimulační agens byly použity dva typy antigenu *T. regenti*, a to cercariální antigen a homogenát schistosomul získaných *in vitro* mechanickou transformací cercárií.

Cercariální antigen (CAG)

Cerkárie byly získány, jak již bylo popsáno výše (3.2.1.), a dále byly centrifugovány (Eppendorf, 5804R) 5x 10 min, 16 000 g, bez brzdy. Mezi jednotlivými centrifugacemi byly cercárie promývány ve sterilním PBS a po posledním promytí přemístěny do 1,5ml mikrozkuavky s PBS s přidáním inhibitorů proteáz (1 tableta/10 ml PBS, Roche). Poté následovala homogenizace na ledu za využití sonifikátoru (3x 30 sekund, 60 W amplituda; Vibra cell). Suspenze pak byla centrifugována (Eppendorf, 5804R) 2x 10 min při 16 000 g. V supernatantu byla následně změřena koncentrace proteinu za využití Quant-iT™ Protein Assay Kit (Invitrogen) dle pokynů výrobce. Všechny supernatanty byly měřeny v triplicátu. Do doby využití byly supernatanty uloženy v -80 °C.

Homogenát schistosomul (SH)

Při izolaci homogenátu schistosomul bylo postupováno dle modifikovaného protokolu dle Chanová et al. (2009). Cercárie byly získány, jak již bylo popsáno výše (3.2.1.) a následně mechanicky transformovány nasátím přes 23G jehlu cca 20-30krát. Poté byly přeneseny do sterilní Petriho misky (PM) a 3x promyty kultivačním médiem a následně kultivovány po dobu 48 hod v inkubátoru (Esco) při 37 °C a 5% CO₂. Po kultivaci byla schistosomula 4x promyta v PBS a přemístěna do 1,5ml mikrozkušavky s PBS s přidáním inhibitorů proteáz (1 tableta/10 ml PBS, Roche). Poté následovala homogenizace na ledu za využití sonifikátoru (3x 30 sekund, 60 W amplituda; Vibra cell). Suspenze pak byla centrifugována (Eppendorf, 5804R) 2x 10 min při 16 000 g. Ze supernatantu byla následně změřena koncentrace proteinu (viz výše).

3.6.2. Buněčné kultury použité při stimulačních *in vitro* experimentech

Pro testování apoptického potenciálu parazitárních antigenů *T. regenti* na různých buněčných typech bylo vybráno několik kultur myších i lidských buněčných typů. Z části šlo o vlastní primární kultury, zčásti o buněčné linie (viz Tab. 8).

Tabulka 8: Souhrn a původ jednotlivých buněčných linií a kultur použitých v experimentech

Buněčný typ	Myší	Původ	Lidské	Původ
Keratinocyty	nebyly k dispozici		HaCaT	linie, Mgr. Tomáš Lidák (Ústav molekulární genetiky AVČR, Oddělení nádorové biologie)
Fibroblasty	NIH 3T3	linie, Mgr. Tomáš Lidák (Ústav molekulární genetiky AVČR, Oddělení nádorové biologie)	HFF	linie, Mgr. Tomáš Lidák (Ústav molekulární genetiky AVČR, Oddělení nádorové biologie)
Leukocyty	Splenocyty	vlastní primokultura	Jurkat	linie, Jana Dvořáková (PřF UK, katedra buněčné biologie)
Astrocyty	Astrocyty	vlastní primokultura	nebyly k dispozici	
Mikroglie	Mikroglie	vlastní primokultura		
Neurony	Neuro2a	linie, Mgr. Ondřej Honc (PřF UK, katedra fyziologie)		

3.6.2.1. Založení primárních gliových kultur

Gliové kultury byly založeny podle Macháčka et al. (2016) s využitím mláďat myši C57BL/6 mladších 48 hod. Po dekapitaci a desinfekci hlavy v 70 % ethanolu byly všechny kroky protokolu prováděny sterilně v laminárním boxu (Esco). Hlava byla přemístěna do sterilní Petriho misky s 10 ml kultivačního média a mozek byl vypreparován z lebky. Poté byl mozek opatrně zbaven mozkových plen a přemístěn do další Petriho misky s 10 ml kultivačního média, kde byl rozdělen na části a dále zbavován zbytků plen. Zbylá mozková tkáň byla mechanicky homogenizována pomocí pakovaného nasávání 10 ml pipetou. Vzniklá buněčná suspenze byla umístěna do 75 cm³ kultivačních lahví (Eppendorf), které byly předem inkubovány s 5 mg/ml poly-L-lysinem (PLL) (Sigma-Aldrich) (inkubace přes noc v při 37 °C, před použitím 2x promyty sterilním PBS).

V jedné kultivační lahvi byla vždy buněčná suspenze ze dvou mozků. Takto získané buněčné kultury byly uloženy do inkubátoru (Esco) při 37 °C a 5% CO₂. Výměna média probíhala druhý den po izolaci a poté již každý druhý den spolu s pravidelnými kontrolami na bakteriální či kvasinkovou kontaminaci a pozorováním růstu kultury pod mikroskopem (Olympus IX50) za použití fázového kontrastu do doby dosažení konfluence.

Zhruba 1 až 2 dny po dosažení konfluence bylo z kultivačních lahví odlito médium do sterilní 50ml zkumavky na ledu a do lahví s vrstvou astrocytů a mikroglíí byly po promytí PBS přidány 2 ml Trypsin-EDTA (Sigma Aldrich). Lahve byly umístěny na zhruba 10 min do inkubátoru při 37 °C a 5% CO₂, dokud nedošlo k oddělení buněk od povrchu, trypsinizace byla následně zastavena přidáním 2 ml kultivačního média. Poté byla suspenze přidána do zkumavek s odlitým médiem a centrifugována (Heraeus Megafuge 8R) při 4 °C 300 g po dobu 1 min/1 ml objemu suspenze. Po stočení byl pelet resuspendován v kultivačním médiu a následně byla spočítána koncentrace a viabilita (za využití trypanové modři) buněk pomocí Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen). Všechny vzorky byly měřeny v duplikátu a jejich průměr byl brán jako finální koncentrace.

Poté byly buňky rozděleny do 12 jamkových destiček (Nunc) o hustotě 2.0×10⁵ buněk v 0,5 ml média/jamka a následně byly uloženy do inkubátoru při 37 °C a 5% CO₂ 48 hod před stimulací.

3.6.2.2. Manipulace s buněčnými liniemi

Pro testování apoptického potenciálu parazitárních antigenů *T. regenti* na různých buněčných typech bylo vybráno několik linií myších i lidských buněčných typů (viz Tab. 8).

Buněčné linie byly uchovávány v tekutém dusíku do doby zahájení jednotlivých experimentů, ve kterých byly použity.

Vymražení

Nejprve byly buňky vymrazeny dle následujícího postupu. Mikrozkušavka s buňkami byla přenesena z tekutého dusíku do vodní lázně (37 °C) a rychlým ohřátím rozmražena. Následně pak byla mikrozkušavka omyta etanolem pro zamezení kontaminace a přesunuta do laminárního boxu (Esco). Její obsah byl přesunut do 15ml zkušavky s 9 ml teplého média a jemně promíchán. Zkušavka byla centrifugována (Heraeus Megafuge 8R) 5 min při 4 °C a 300 g (s výjimkou Neuro2a, zde bylo nastaveno otáčení na 140 g). Supernatant byl odstraněn a pelet resuspendován v 1 ml teplého média a následně byla spočítána koncentrace a viabilita (za využití trypanové modři) buněk pomocí Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen) s defaultním nastavením. Poté byly buňky přeneseny do 75 cm³ kultivačních lahví (Eppendorf) s 9 ml teplého média a umístěny do inkubátoru (Esco) při 37 °C a 5% CO₂.

Kultivace neadhezivních buněk

Z vybraných buněčných linií u dlouhodobější kultivace byla pouze Jurkat linie neadhezivní. Při pravidelné výměně média a rozdělení do 75 cm³ kultivačních lahví (Eppendorf) zhruba každé 3 dny, bylo nutno médium s buňkami zcentrifugovat (Heraeus Megafuge 8R) 5 min při 4°C a 300 g, odstranit supernatant a pelet resuspendovat v médiu a poté dle množství buněk rozdělit ve vhodném poměru do kultivačních lahví.

Kultivace adhezivních buněk

U linií adhezivních buněk bylo při pravidelné subkultivaci a výměně média zapotřebí zbavit se jejich přichycení trypsinizací. Z kultivačních lahví bylo odlito médium do 15 ml zkušavky a do lahví s vrstvou přichycených buněk po promytí PBS přidány 2 ml Trypsin-EDTA (Sigma Aldrich). Lahve byly umístěny na několik minut do inkubátoru (Esco) při 37 °C a 5% CO₂ dokud nedošlo k odchlípnutí buněk od povrchu, trypsinizace byla poté zastavena přidáním 2 ml kultivačního média. Dále byla buněčná suspenze centrifugována (Heraeus Megafuge 8R) 5 min při 4 °C a 300 g (opět s výjimkou

Neuro2a, zde bylo nastaveno otáčení na 140 g), odstraněn supernatant a pelet resuspendován v médiu a poté dle počtu buněk rozdělen ve vhodném poměru do kultivačních lahví.

3.6.2.3. Zisk splenocytů

Zisk splenocytů pro stimulační experimenty byl proveden podle již popsaného postupu (3.5.1.) do kroku k poslednímu stočení na centrifuze po promytí v PBS. Následně byly odstraněny supernatanty a získané pelety (vždy 1 pelet/1 slezina) byly za sterilních podmínek resuspendovány do kultivačního média a rozděleny do 12 jamkové destičky v laminárním boxu (Esco). Takto zpracované buňky byly před stimulací uloženy v inkubátoru při 37 °C po dobu cca 1 hod.

3.6.3. Stimulace buněk

Stimulace všech buněčných typů probíhala za sterilních podmínek v laminárním boxu (Esco). Do jamek s buňkami byly přidány stimulanty, aby jejich výsledná koncentrace byla dle Tab. 9. Buňky byly ponechány stimulovat 48 hod v inkubátoru (Esco) při 37 °C a 5% CO₂. Jako negativní kontrola byly použity buňky v médiu bez přidání stimulantů.

Tabulka 9: Koncentrace stimulantů použitých pro stimulaci buněk

Stimulant	Použité koncentrace	
Staurosporin (MedChemExpres), pozitivní kontrola	0,1 µl/ml	-
Cerkariální antigen	50 µg/ml	5 µg/ml
Homogenát schistosomul	50 µg/ml	5 µg/ml

3.7. Příprava vzorků z *in vivo* a *in vitro* experimentů pro průtokovou cytometrii

Nestimulační experimenty

K předem připraveným jednotlivým vzorkům buněk ze slezin a lymfatických uzlin (viz 3.5.1.) resuspendovaných v PBS v 1,5ml mikrozku mávkách, jejichž část byla předem odebrána jako neznačený vzorek (blank) byla pro zablokování nespecifických vazeb protilátek přidána protilátka proti CD16/32 (eBioscience, klon 93) v poměru 1:100 po dobu 5 min při 4 °C. Následně byla do mikrozku mávek přidána protilátka proti CD45 (eBioscience, klon 30F11) v poměru 1:100 po dobu 30 min ve tmě při 4 °C. Po skončení inkubace byly vzorky centrifugovány 5 min při 4 °C a 350 g (Heraeus Megafuge 8R). Po stočení byl odstraněn supernatant a pelety byly resuspendovány v pufru a dále zpracovány dle pokynů výrobce v komerčním kitu Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V Alexa Fluor™ 488 & Propidium Iodide (PI) (Invitrogen). Následně byly buňky přeneseny

z mikrozkušavek do 5ml plastových zkumavek (Thermo Fisher) určených pro měření na průtokovém cytometru.

Stimulační experimenty

Příprava vzorků všech buněčných linií (viz Tab. 8) probíhala podle stejného postupu až na několik uvedených výjimek. Po 48h stimulaci buněk bylo zapotřebí u adhezivních kultur oddělit buňky ze dna jamek za použití Trypsin-EDTA (viz 3.6.2.1.). Po přesunu jednotlivých vzorků do 1,5ml mikrozkušavek byly vzorky centrifugovány 5 min při 4 °C a 350 g (Heraeus Megafuge 8R) (s výjimkou Neuro2a, zde bylo nastaveno otáčení na 140 g).

U buněk ze slezin následovalo po stočení a resuspendování peletu v médiu protilátkové značení (viz dříve) a po inkubaci s protilátkami byly vzorky centrifugovány 5 min při 4 °C a 350 g. Zbýlé buněčné kultury byly čisté linie jednoho definovaného druhu buněk (s výjimkou smíšených kultur gliových buněk) a protilátkové značení u nich nebylo prováděno.

Po stočení pak byl u všech vzorků odstraněn supernatant a pelety byly resuspendovány v pufru a dále zpracovány dle pokynů výrobce v komerčním kitu Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V Alexa Fluor™ 488 & Propidium Iodide (PI) (Invitrogen). Následně byly buňky přeneseny z mikrozkušavek do 5ml plastových zkumavek (Thermo Fisher) určených pro měření na průtokovém cytometru. Vzorky byly před měřením vždy uchovávány na ledu a v temnu.

3.8. Měření *in vitro* experimentů na průtokovém cytometru

Veškeré měření na průtokovém cytometru probíhala na přístroji BD LSRII v servisní laboratoři cytometrie PŘF UK za použití programu FACSDiva (BD Biosciences) z plastových zkumavek (Thermo Fisher) určených pro měření na průtokovém cytometru. Správná kalibrace přístroje a CST kontrola byly před každým měřením prováděny MVDr. Jozefem Jandou, Ph.D. Před každým měřením byla provedena také vlastní kontrola kalibrace cytometru pomocí Rainbow calibration particles (Spherotech). Během každého měření pak byl použit nebarvený vzorek tzv. blank, pro vyloučení potenciálních artefaktů způsobených vlastní fluorescencí vzorku. Následná analýza dat získaných měřeními byla provedena v programu FlowJo 10.6.2. (FlowJo). Jako apoptická populace byla vybrána z angl. early apoptotic neboli tzv. časně apoptická populace annexin pozitivních a PI negativních buněk (Annexin V+/PI-).

3.9. Statistika

Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno v programu GraphPad Prism (verze 8). Nejdříve byla data testována na normalitu Shapiro-Wilkovým testem. U dat z *in vivo* a *in vitro* experimentů následovalo použití jednocestného ANOVA testu pro porovnání dat s následným použitím

Dunnetova testu pro mnohočetné srovnávání s kontrolní skupinou. V případě transkriptomické analýzy a stimulací/restimulací splenocytů byl použit dvoucestný ANOVA test pro porovnání dat s následným použitím Šidákova testu pro mnohočetné porovnávání mezi jednotlivými skupinami. Jako statisticky signifikantní byl považován výsledek testu při $p < 0,05$.

Krabicové diagramy zobrazují 2. a 3. kvartil a medián, úsečky zde značí maximální a minimální hodnoty. Ve sloupcových a bodových grafech je znázorněn průměr a směrodatná odchylka.

4. Výsledky

4.1. Bioinformatická analýza

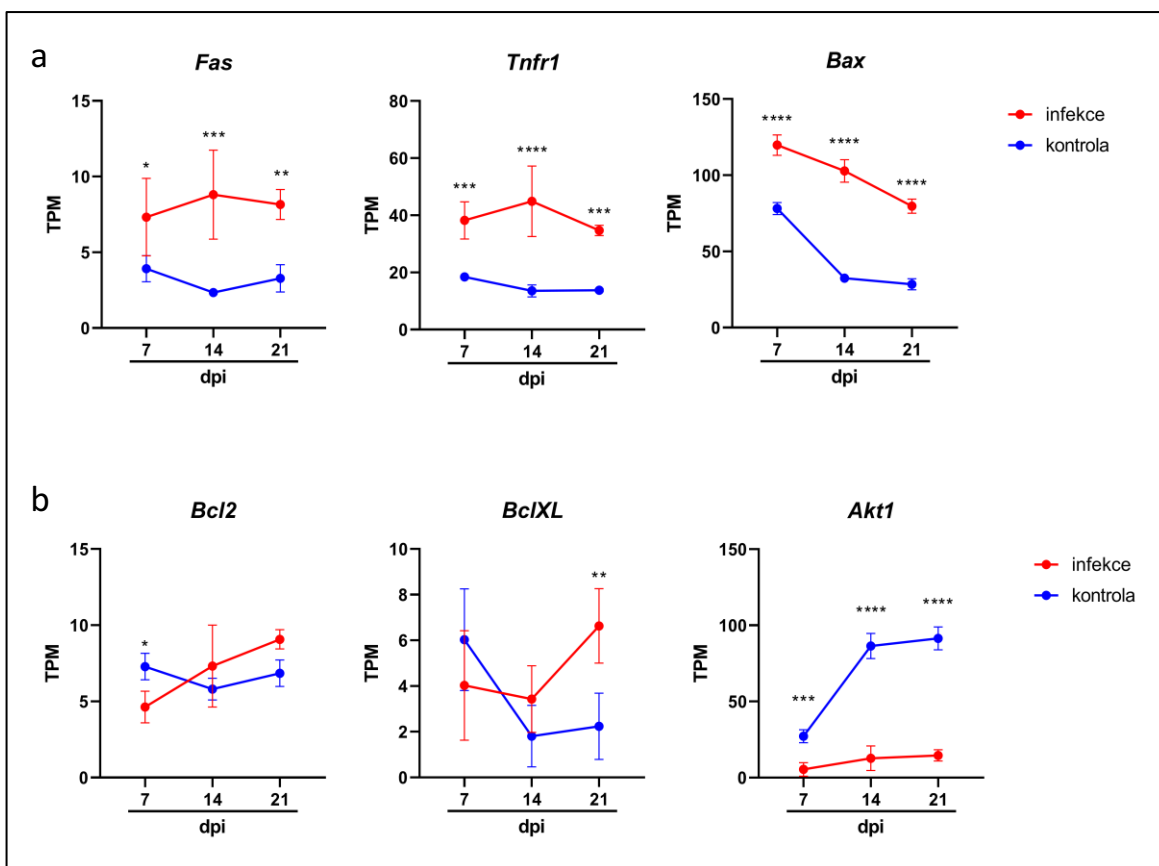
V rámci bioinformatické analýzy bylo provedeno porovnání míry exprese genů asociovaných s apoptózou v míchách infikovaných myší (7, 14 a 21 dpi) oproti věkově stejně starým zdravým kontrolám pro každý časový interval. Pro tuto analýzu byla využita již existující transkriptomická data (Macháček et al., Helmentodny 2019). Analyzované geny (viz přílohy, str. 89-90) byly vybrány na základě poznatků přejatých z literatury, jež je uvedena v kapitole 2.2.

U infikovaných myší byl u pozorován ve všech časových úsecích (7, 14 a 21 dpi) infekce nárůst exprese pro-apoptických genů (Obr. 5a). Identifikační kódy (ID) transkriptů z Obr. 5. jsou uvedeny v Tab. 10. U genů *Fas* a *Tnfr1*, jež kódují proteiny související s vnější cestou aktivace, byl pozorován největší nárůst exprese ve 14 dpi oproti zdravým kontrolám a postupem infekce (21 dpi) došlo k mírnému poklesu. Oproti tomu u genu *Bax*, který kóduje protein související s vnitřní cestou aktivace, byl pozorován po počátečním nárůstu (7 dpi) postupný pokles ve 14 a 21 dpi.

Oproti tomu u proti-apoptického genů *Bcl2* byl pozorován počáteční pokles exprese v infikovaných myších (7 dpi) (Obr. 5b). Dále byl pak postupem infekce pozorován nesignifikantní mírný trend nárůstu exprese ve 14 a 21 dpi, ovšem statisticky bez rozdílu oproti zdravé kontrole. V případě *BclXL* došlo k nárůstu pouze ve 21 dpi. Naopak u genu *Akt1* byla exprese ve všech časových intervalech infekce výrazně snížena oproti zdravým myším (Obr. 5b).

Tabulka 10: Identifikační kódy transkriptů

Gen	Identifikační kód transkriptu
<i>Fas</i>	NM_007987.2
<i>Tnfr1</i>	NM_011609.4
<i>Bax</i>	NM_007527.3
<i>Bcl2</i>	NM_009741.5
<i>BclXL</i>	NM_001289717.1
<i>Akt1</i>	NM_009652.3



Obrázek 5: Porovnání míry exprese diferenciálně exprimovaných genů pro-apoptických (a) a proti-apoptických (b) v míše myši nakažené *Trichobilharzia regenti*; jednotlivé body ukazují průměry se směrodatnou odchylkou ($n = 4$); TPM = z angl. transcripts per million, dpi – dny po infekci

4.2. In vivo experimenty

Detekce apoptických buněk vlivem infekce *T. regenti* byla provedena (1) pomocí TUNEL testu na tkáňových řezech kůže a míchy a (2) dále Annexin V/PI značením splenocytů a buněk lymfatických uzlin za využití průtokové cytometrie.

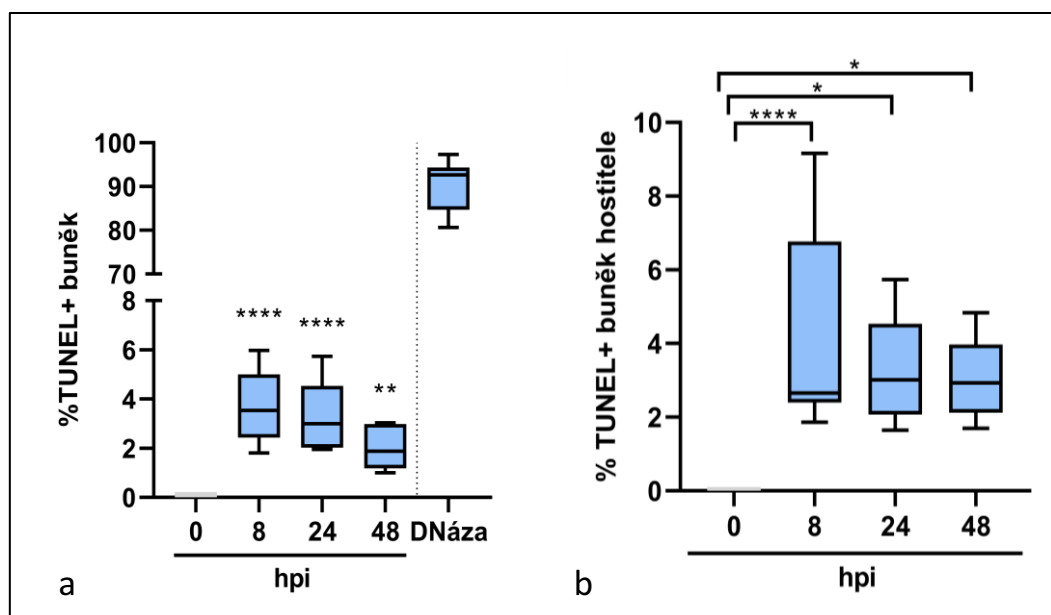
4.2.1. TUNEL test

Apoptické buňky byly detekovány na tkáňových řezech kůže z infikovaných myších boltců a řezech míchy z infikovaných myši pomocí TUNEL testu (Obr.7 a 9). Pro každý časový bod (kůže: 0, 8, 24 a 48 hpi; mícha: 0, 7 a 14) byly použity 3 myši kde z každé pak byly použity 3 různé řezy se schistosomuly či migračními tunely po nich. Vlivem náhlého úmrtí myši ze skupiny 24 hpi po podání anestezie a infekci boltců, byly pro časový interval 24 hpi využity jen 3 řezy ze 2 myši. Jako TUNEL+ buňky jsou označovány buňky, ve kterých byly pozorovány zlomy v DNA pomocí TUNEL

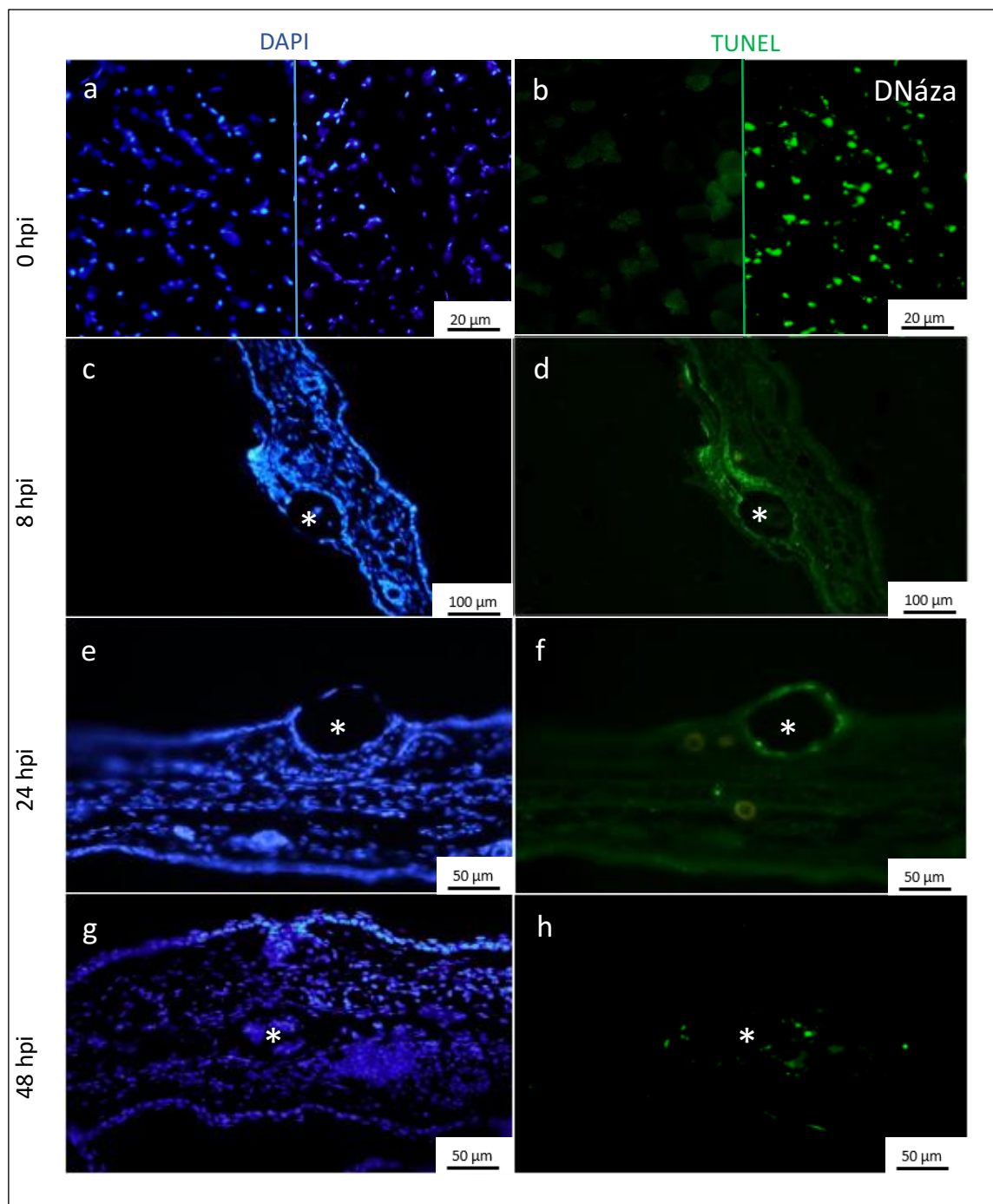
testu. Přestože je DNA fragmentace markerem pro apoptózu, ke zlomům může dojít i z jiných důvodů. Proto nebudou tyto buňky označovány jako apoptotické, nýbrž jako TUNEL+ buňky.

4.2.1.1. TUNEL kůže

V kůži zdravých myší nebyly detekovány žádné TUNEL+ buňky (viz Obr. 7). V infikované kůži byl pozorován u TUNEL+ buněk ku všem buňkám v řezu nárůst ve všech časových bodech infekce oproti kontrole s vrcholem 8 hpi a postupným poklesem 24 a 48 hpi (Obr. 6a). TUNEL+ buňky byly detekovány v menší míře i na povrchu a uvnitř schistosomul. V případě zastoupení TUNEL+ buněk hostitele byly pozorovány tyto TUNEL+ buňky v blízkosti schistosomul, jejich migračních drah a infiltrátu v epidermis a dermis (škára). Nejvyššího zastoupení dosahovaly TUNEL+ buňky hostitele 8 hpi, poté byl pozorován jejich pokles ve 24 a dále 48 hpi (Obr. 6b).



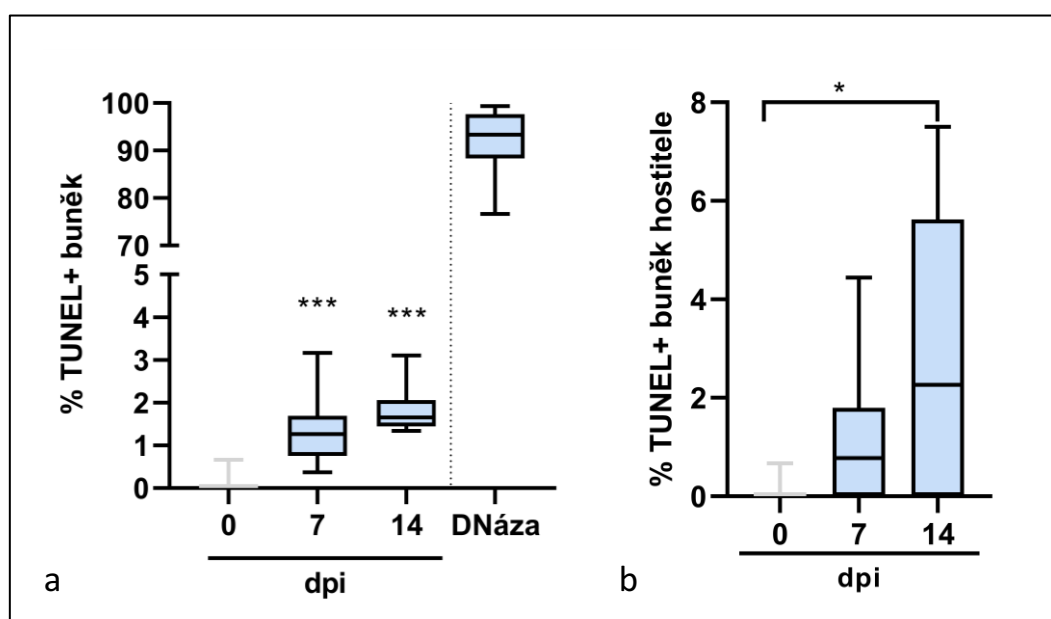
Obrázek 6: Relativní zastoupení TUNEL+ buněk ku všem buňkám v řezu (a) a pouze ku buňkám hostitele (b) v průběhu infekce v kůži; ($n = 9$); hpi – hodin po infekci



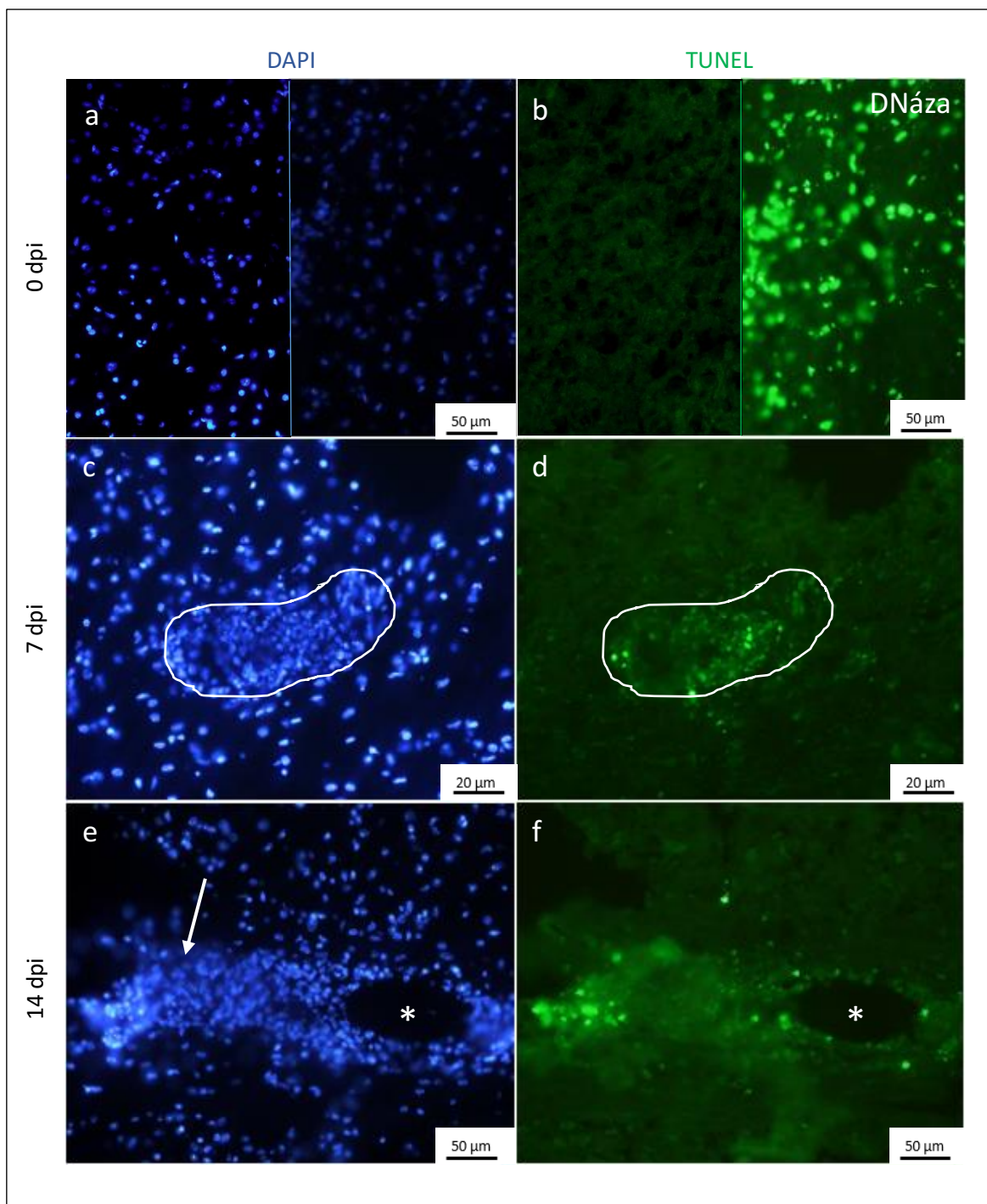
Obrázek 7: Reprezentativní fotografie značení **DAPI** a **TUNEL** v kůži z infikovaných myší v 0 (a, b), 8 (c, d), 24 (e, f) a 48 (g, h) hpi. V levém sloupci jsou fotografie se značenými jádry (modře) pro lepší orientaci ve tkáni a v pravém pak značené TUNEL+ buňky (zeleně). Na fotografii a je v levé části příslušný snímek s DAPI pro negativní kontrolu a v pravé pro pozitivní kontrolu; na fotografii b je v levé části negativní kontrola a v pravé pozitivní kontrola s DNázou. Hvězdičky – migrační tunel se schistosomulem (c, d, g, h) bez schistosomula (e, f); hpi – hodin po infekci

4.2.1.2. TUNEL mícha

V míše zdravých myší nebyly až na výjimky pozorovány TUNEL+ buňky (viz Obr 9). V infikované míše byl pozorován u TUNEL+ buněk ku všem buňkám v řezu mírný nárůst zastoupení v 7 a 14 dpi oproti kontrole (Obr. 8a). TUNEL+ buňky byly detekovány v menší míře i na povrchu a uvnitř schistosomul. V případě zastoupení TUNEL+ buněk hostitele bylo největší zastoupení TUNEL+ buněk v čase 14 dpi oproti 7 dpi a kontrole (Obr. 8b). V 7 dpi byl zaznamenaný trend nárůst apoptických buněk oproti kontrole v kontrastu se 14 dpi. TUNEL+ hostitelské buňky se vyskytovaly v blízkosti schistosomul a jejich migračním drah ve tkáni. Ve 14 dpi byly TUNEL+ buňky přítomny i v infiltrátech okolo schistosomula.



Obrázek 8: Relativní zastoupení TUNEL+ buněk ku všem buňkám v řezu (a) a pouze ku buňkám hostitele (b) v průběhu infekce v míše; ($n = 9$); dpi – dní po infekci



Obrázek 9: Reprezentativní fotografie značení **DAPI** a **TUNEL** v míše z infikovaných myši v 0 (a, b), 7 (c, d) a 14 (e, f) dpi. Na každý časový interval byly použity 3 myši, kde z každé myši byly použity 3 řezy na sklíčkách se schistosomuly či migrační tunely po nich. V levém sloupci jsou fotografie se značenými jádry (modře) pro lepší orientaci ve tkáni a v pravém pak značené TUNEL+ buňky (zeleně). Na fotografii a je v levé části příslušný snímek s DAPI pro negativní kontrolu a v pravé pro pozitivní kontrolu; na fotografii b je v levé části negativní kontrola a v pravé pozitivní kontrola s DNázou. Šipka – (e) infiltrát buněk u migračního tunelu schistosomula; schistosomulum bíle orámováno; hvězdičky – migrační tunel bez schistosomula; dpi – dní po infekci

4.2.2. Průtoková cytometrie

Vliv infekce *T. regenti* na apoptózu imunitních buněk byl pozorován v buněčných suspenzích připravených ze slezin a tříselných lymfatických uzlin. Leukocyty byly identifikovány pomocí markeru CD45, apoptotické buňky následně pomocí značení annexinem V a PI. Buňky byly následně analyzovány na základě gatovací strategie, jež je uvedena v přílohách (viz přílohy, str. 91-99). U slezin bylo pro časové intervaly 0, 3, 7 a 14 dpi použito 7 myší, oproti tomu u 21 a 28 dpi bylo možno zpracovat pouze 6 myší pro každý interval. U lymfatických uzlin bylo použito pro časové intervaly 3 a 7 dpi 7 myší, avšak u 0, 14, 21 a 28 dpi bylo možno zpracovat pouze 6 myší na každý interval. Při zpracování vzorků z lymfatických uzlin zdravých myší došlo k delší prodlevě mezi izolací buněk a značením s následným měřením na cytometru. Z tohoto důvodu zde došlo k většímu zastoupení apoptických buněk v kontrolách.

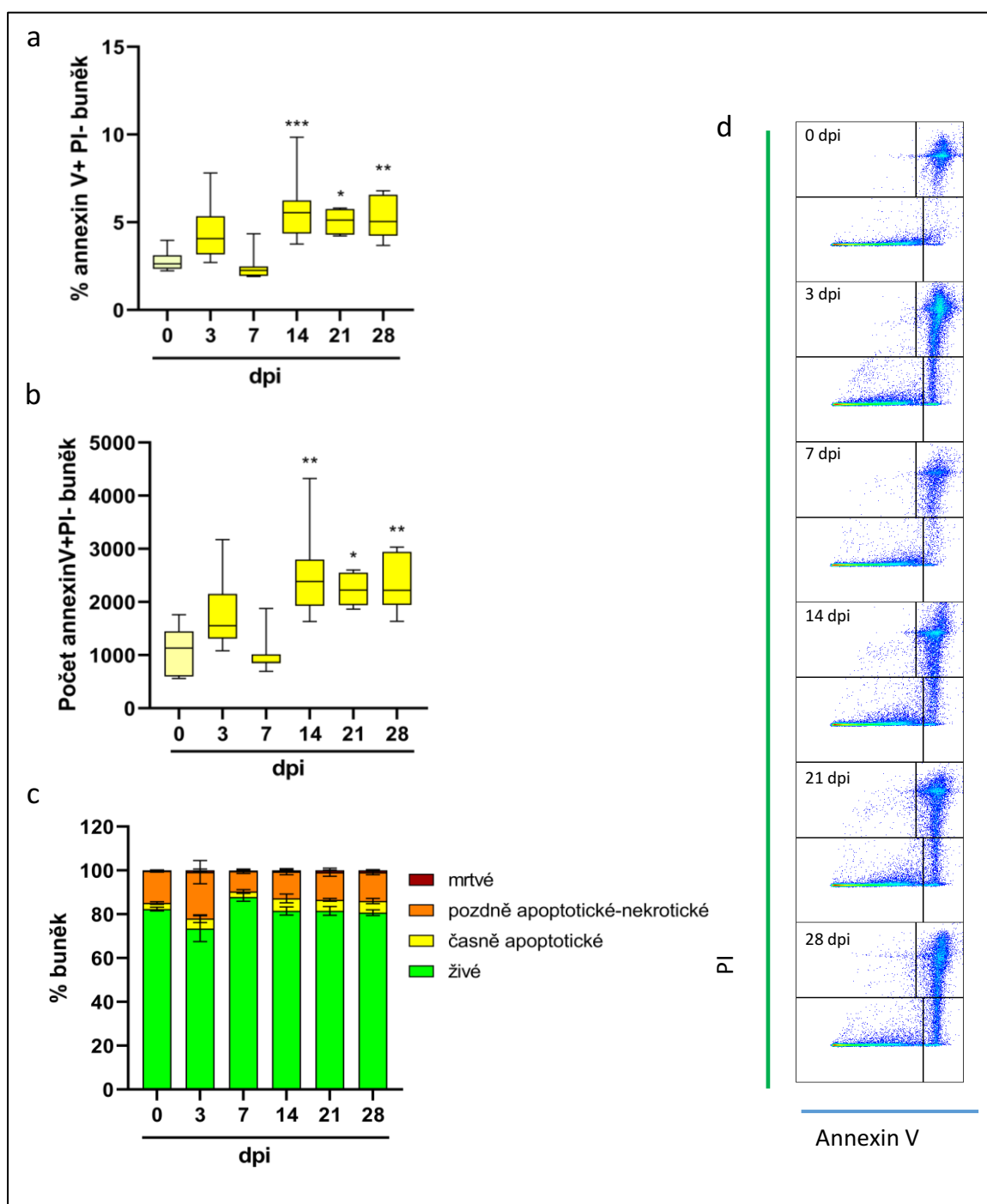
4.2.2.1. Vliv infekce na apoptózu u buněk ze slezin a lymfatických uzlin

Sleziny (Obr. 10, viz str. 56)

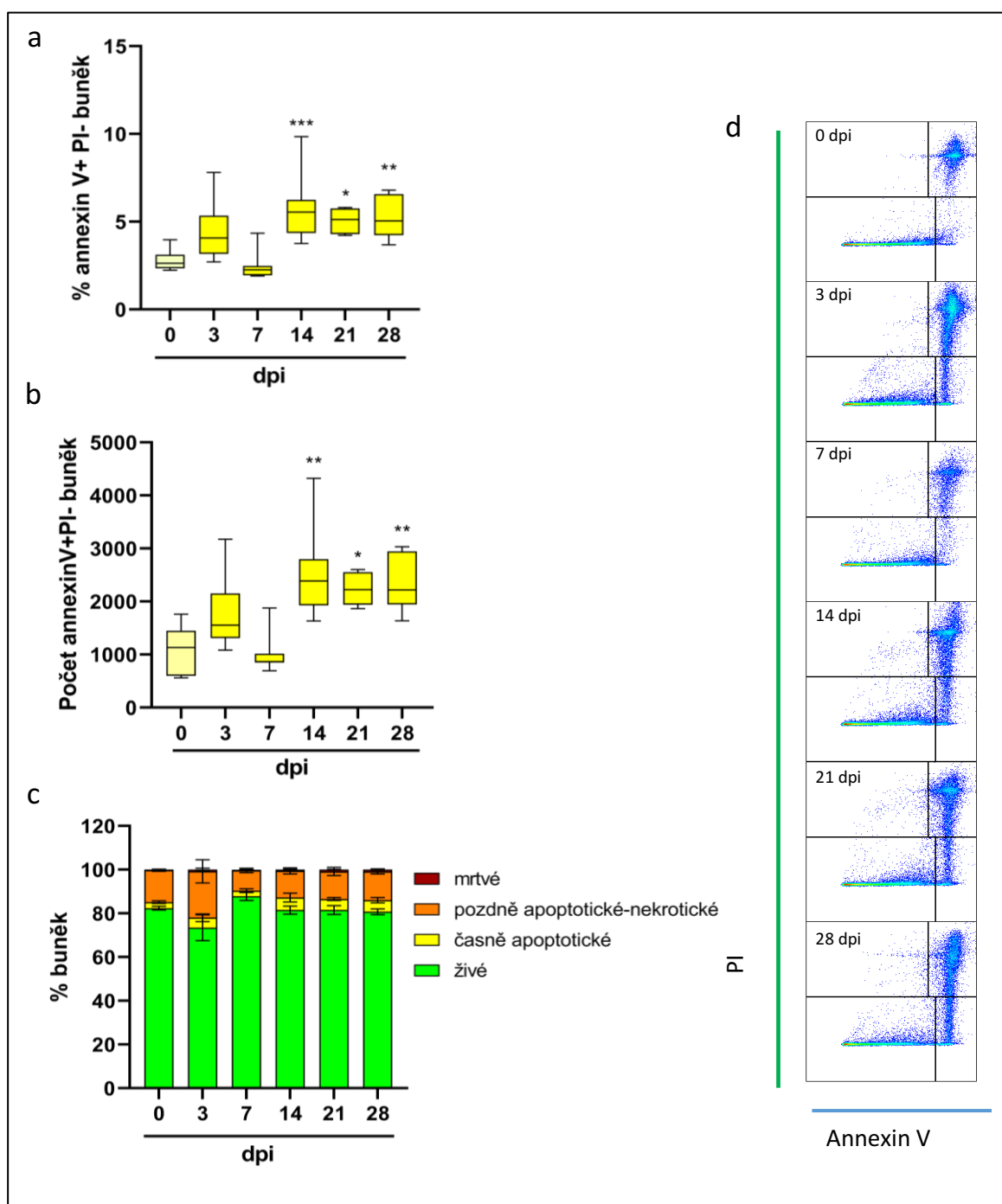
Na základě předběžného experimentu (viz přílohy, str. 100), ve kterém byl pozorován podobný trend ve 3 a 7 dpi byl proveden tento rozsáhlejší experiment. V průběhu infekce byl zaznamenán nesignifikantní trend nárůstu absolutních hodnot a relativního zastoupení apoptických leukocytů v časně fázi ve 3 dpi oproti kontrole. V 7 dpi byl pozorováno naopak pokles apoptických leukocytů mírně pod úroveň apoptických buněk u zdravých myší. Po tomto poklesu došlo opět k nárůstu ve 14 dpi, kde byl pozorován největší nárůst a dále již pouze mírný nárůst ve 21 a 28 dpi. Na Obr. 10c je znázorněno zastoupení buněk živých, časně apoptických, pozdně apoptických-nekrotických a mrtvých v jednotlivých časových intervalech.

Lymfatické uzliny (Obr. 11, viz str. 57)

V průběhu infekce byl pozorován pokles zastoupení a absolutních hodnot apoptických leukocytů ve 3 dpi a opětovný nárůst ve 14 dpi. Největší nárůst absolutních hodnot mají apoptické leukocyty ve 14 dpi, poté zde dochází k trendu poklesu ve 21 a 28 dpi. Na Obr. 11c je znázorněno zastoupení buněk živých, časně apoptických, pozdně apoptických-nekrotických a mrtvých buněk v jednotlivých časových intervalech.



Obrázek 10: Zastoupení apoptických (AnnexinV+/PI-) leukocytů ze slezin infikovaných myši a reprezentativní dot ploty (d). a – podíl apoptických buněk (AnnexinV+/PI-), b – absolutní počty apoptických buněk, c – podíl apoptických, živých, pozdně apoptických-nekrotických a mrtvých buněk; (n = 6-7); dpi – dny po infekci



Obrázek 11: Zastoupení apoptických (AnnexinV+/PI-) leukocytů z lymfatických uzlin infikovaných myši a reprezentivní dotploty (d). a – podíl apoptických buněk (AnnexinV+/PI-), b – absolutní počty apoptických buněk c – podíl apoptických, živých, pozdně apoptických-nekrotických a mrtvých buněk; (n = 6-7); dpi – dny po infekci

4.3. *In vitro* experimenty

Detekce apoptických buněk z buněčných linií a kultur působením parazitárních antigenů *T. regenti* byla provedena pomocí značení Annexin V/PI za využití průtokové cytometrie.

4.3.1. Průtoková cytometrie

Vliv parazitárních antigenů *T. regenti* na apoptózu různých buněčných linií a kultur byl pozorován pomocí značení Annexin V/PI. Všechny buněčné linie a kultury byly stimulovány po dobu 48 hodin, značeny a následně měřeny ($n = 4$). V případě kultur splenocytů bylo použito pro každý časový interval (0 a 7 dpi) 6 myší ve věku 8 týdnů ($n = 6$).

4.3.1.2. Vliv parazitárních antigenů na apoptózu u buněčných kultur a linií

HaCaT (Obr. 12, viz str. 60)

Zastoupení apoptických buněk bylo výrazněji zvýšeno pouze u keratinocytů stimulovaných CAg. Při stimulaci vyšší koncentrací (50 $\mu\text{g/ml}$) bylo toto zvýšení statisticky signifikantní. V případě stimulace buněk nižší koncentrací CAg byl podíl apoptických buněk menší než u stimulace vyšší koncentrací, avšak stále statisticky výrazný ($p = 0,10$), avšak větší než u buněk stimulovaných SH a negativního vzorku. Nízké zastoupení apoptických buněk po stimulaci staurosporinem, zde bylo z důvodu naopak výrazného podílu buněk pozdně-apoptických nekrotických.

NIH 3T3 (Obr. 13, viz str. 61)

V případě apoptických buněk u stimulovaných NIH 3T3 fibroblastů bylo pozorováno téměř totožné velmi nízké zastoupení apoptických buněk u všech stimulovaných vzorků spolu s negativní kontrolou. Výjimkou zde byla pozitivní kontrola (staurosporin), kde byl výrazný podíl apoptických buněk.

Hff (Obr. 14, viz str. 62)

U stimulovaných Hff buněk byl zaznamenán pouze velmi mírný statisticky nesignifikantní nárůst apoptických buněk v případě stimulací CAg (50 $\mu\text{g/ml}$) a SH (50 $\mu\text{g/ml}$). Naopak u pozitivní kontroly bylo zastoupení apoptických buněk výrazně zvýšené.

Jurkat (Obr. 15, viz str. 63)

Podíl apoptických buněk u stimulovaných Jurkat T lymfocytů dosahoval s výjimkou buněk stimulovaných SH o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$, kde byl podíl buněk srovnatelný, o něco nižších hodnot než u negativní kontroly. Přičemž pozitivní kontrola zde měla vysoké zastoupení apoptických buněk.

Neuro2a (Obr. 16, viz str. 64)

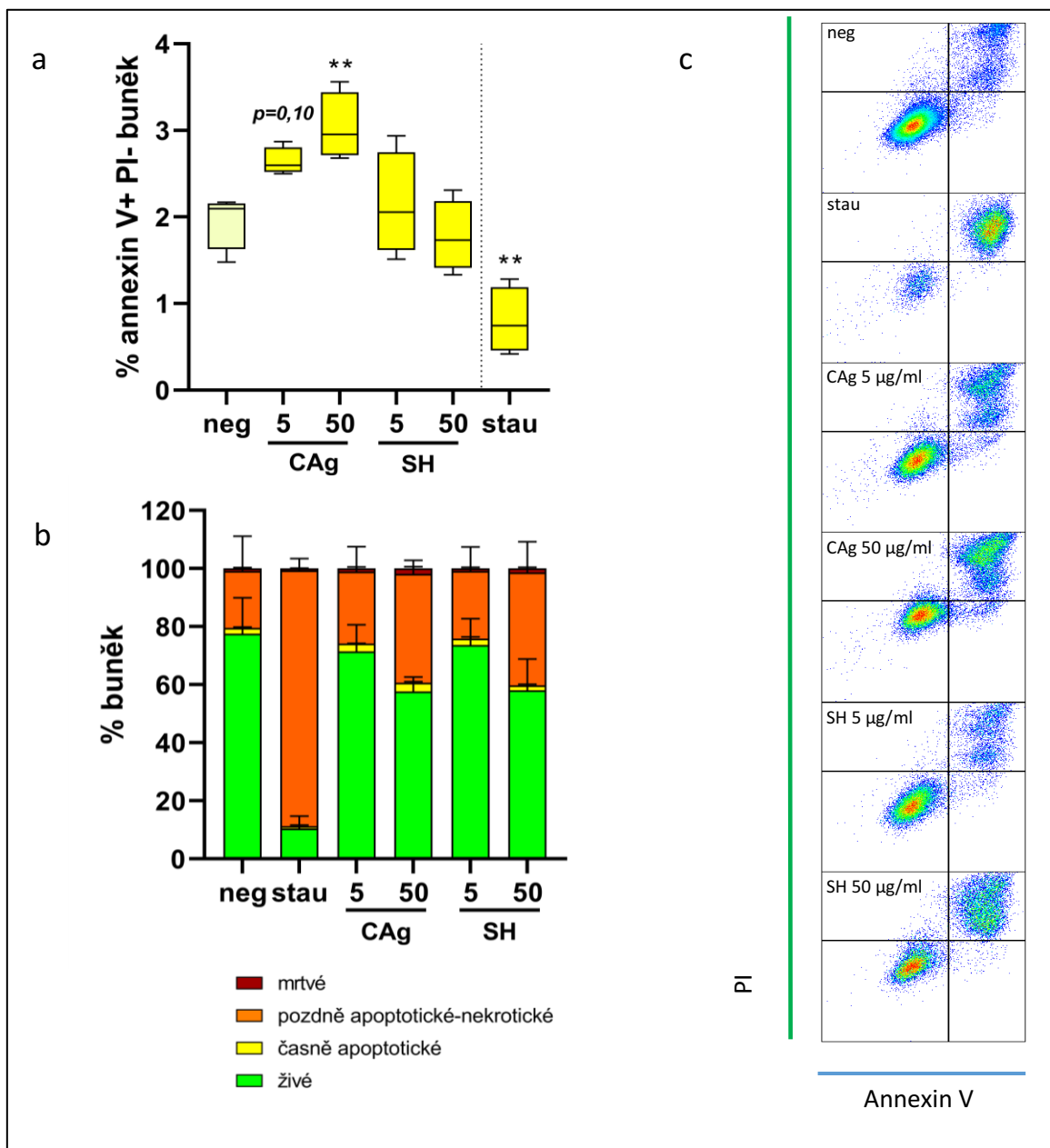
U Neuro2a buněk bylo pozorované zastoupení apoptických buněk ve vzorcích stimulovaných SH a CAg oproti negativní kontrole víceméně totožné, jako tomu je u gliových buněk (viz níže) a NIH 3T3 fibroblastů. Pozitivní kontrola zde měla také výrazné zastoupení apoptických buněk.

Glie (Obr. 17, viz str. 65)

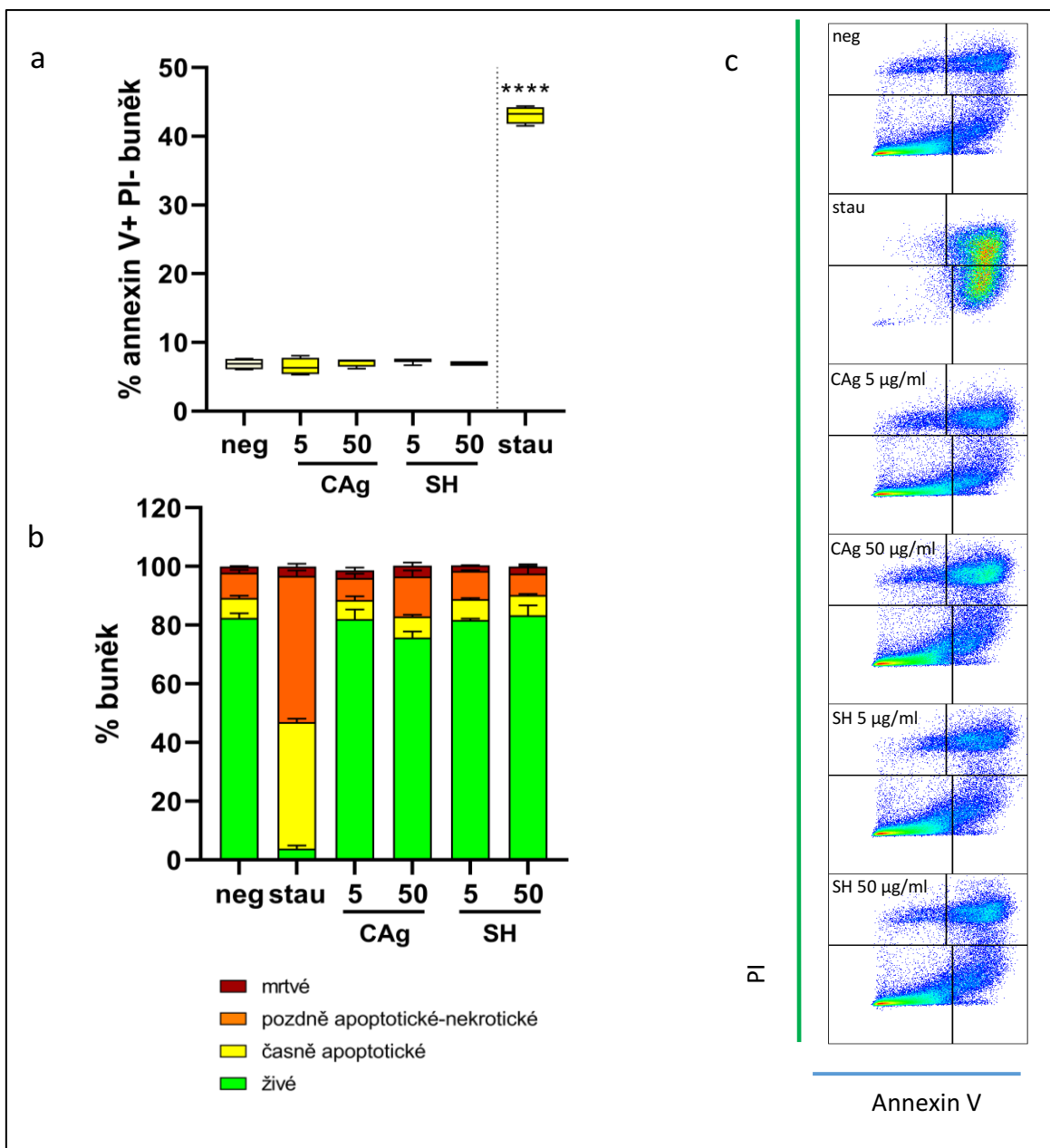
Při stimulacích smíšených gliových kultur byl pozorován podobný trend jako tomu bylo u NIH 3T3 fibroblastů. Pozorováno bylo na pohled identické zastoupení apoptických buněk ve všech případech stimulací a negativní kontroly s výjimkou pozitivní kontroly, kde byl opět výrazný podíl apoptických buněk.

Splenocyty (Obr. 18, viz str. 66)

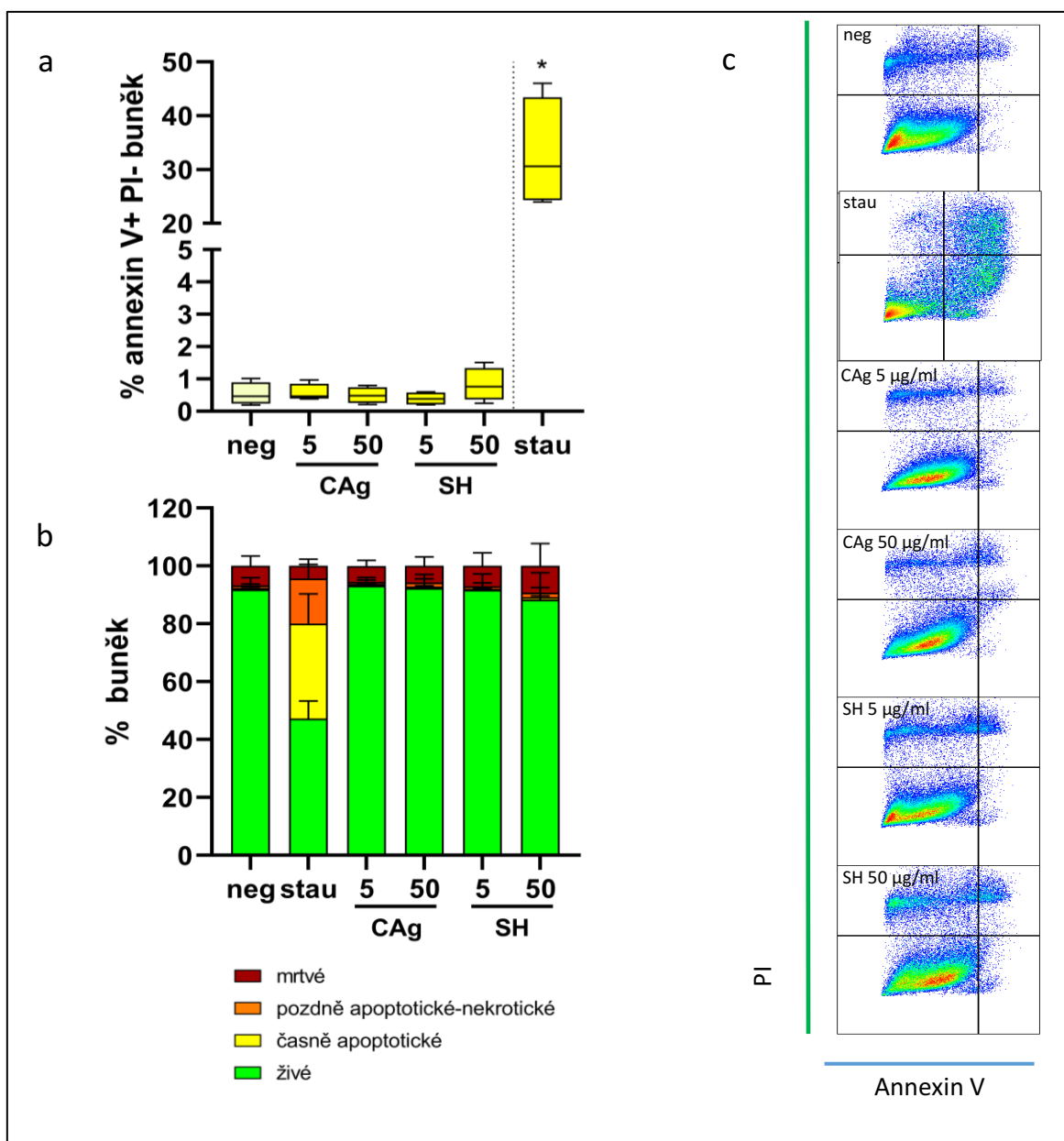
V případě restimulovaných splenocytů (leukocytů) v 7 dpi bylo pozorováno větší zastoupení apoptických buněk oproti stimulovaným splenocytům ze zdravých myší, přestože statisticky signifikantní byla pouze hodnota u pozitivní kontroly. V rámci tohoto experimentu byly zpracovány i výsledky z restimulací splenocytů pocházejících ze 3 dpi (viz přílohy, str 101), kde byl pozorován signifikantní nárůst zastoupení populace apoptických buněk u stimulací CAg (50 µg/ml) oproti 0 dpi a 7 dpi, spolu se signifikantním nárůstem i u stimulací SH (50 µg/ml) oproti 0 dpi. Avšak kvůli vysoké variabilitě a nízkému počtu myší ($n = 3$) nebyly zařazeny do finálních výsledků.



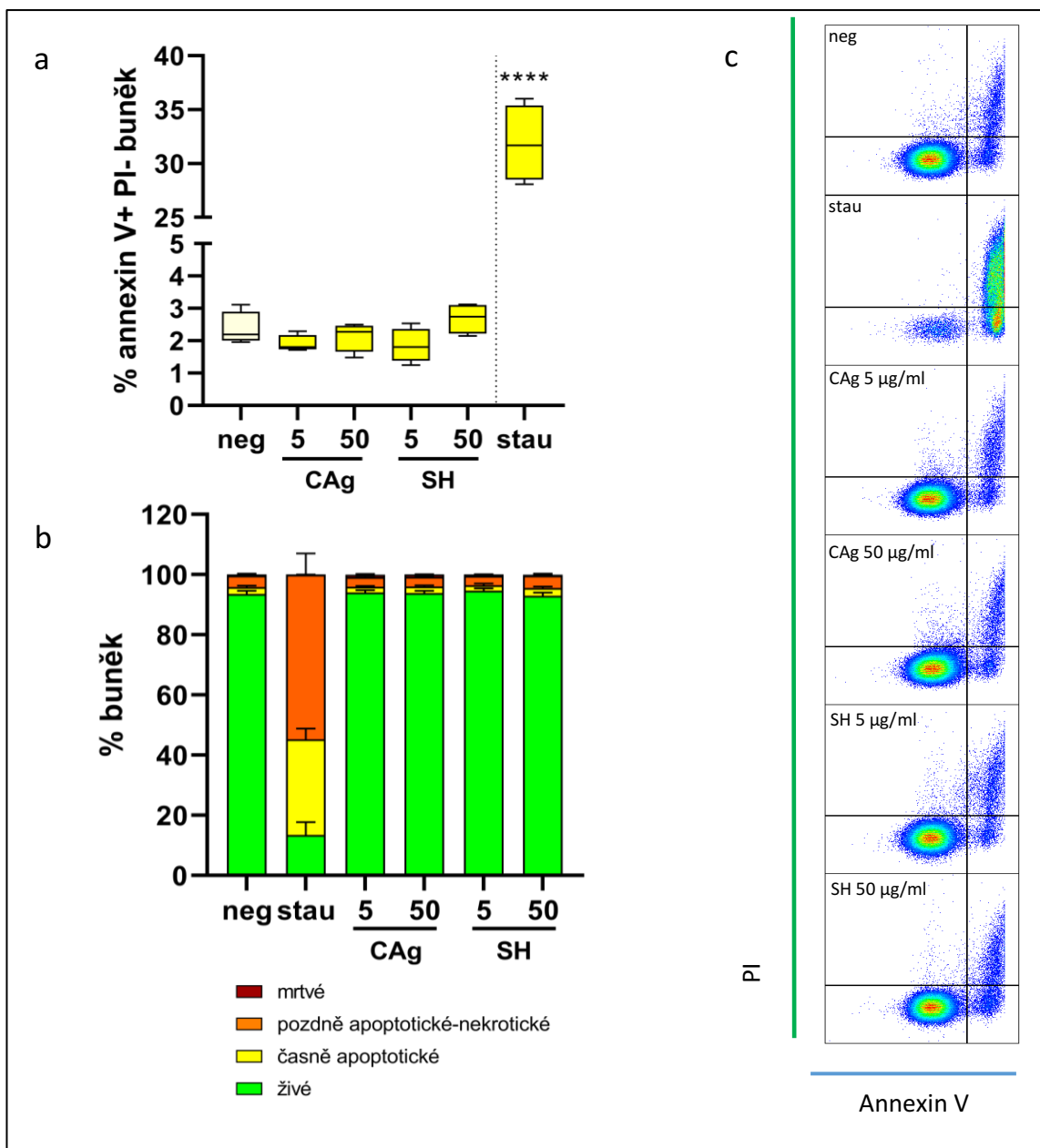
Obrázek 12: Zastoupení apoptických (AnnexinV+/PI-) buněk u keratinocytů HaCaT stimulovaných parazitárními antigeny a reprezentativní dot ploty (c). a – podíl apoptických buněk (AnnexinV+/PI), b – podíl apoptických, živých, pozdně apoptických-nekrotických a mrtvých buněk ($n = 4$); neg = negativní kontrola, CAg = cercariální antigen, SH = homogenát schistosomul, 5 = 5 µg/ml, 50 = 50 µg/ml, stau = staurosporin (pozitivní kontrola)



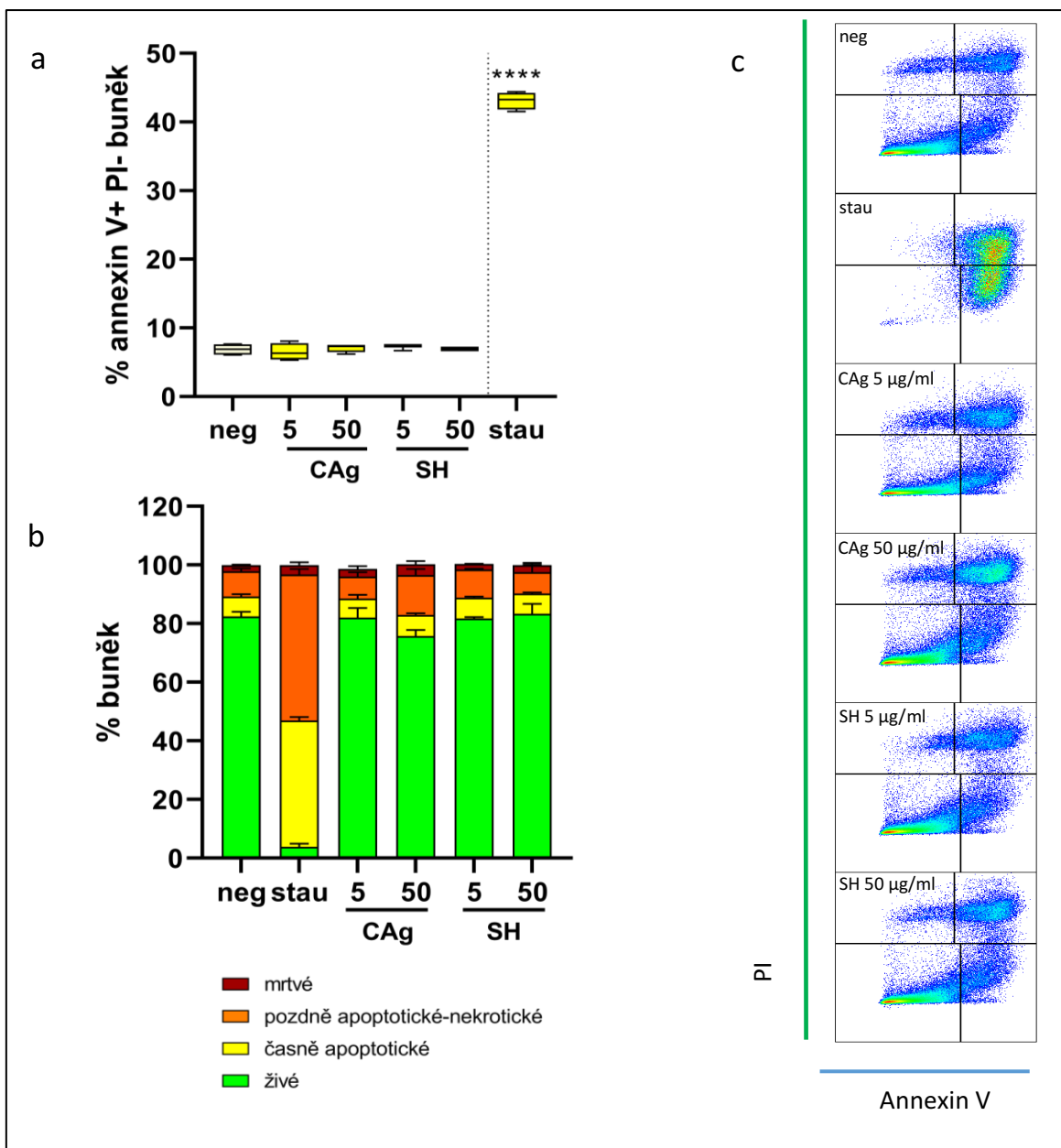
Obrázek 13: Zastoupení apoptických (AnnexinV+/PI-) buněk u fibroblastů NIH 3T3 stimulovaných parazitárními antigeny a reprezentativní dot ploty (c). **a** – podíl apoptických buněk (AnnexinV+/PI), **b** – podíl apoptických, živých, pozdně apoptických-nekrotických a mrtvých buněk ($n = 4$); neg = negativní kontrola, CAg = cercariální antigen, SH = homogenát schistosomul, 5 = 5 $\mu\text{g/ml}$, 50 = 50 $\mu\text{g/ml}$, stau = staurosporin (pozitivní kontrola)



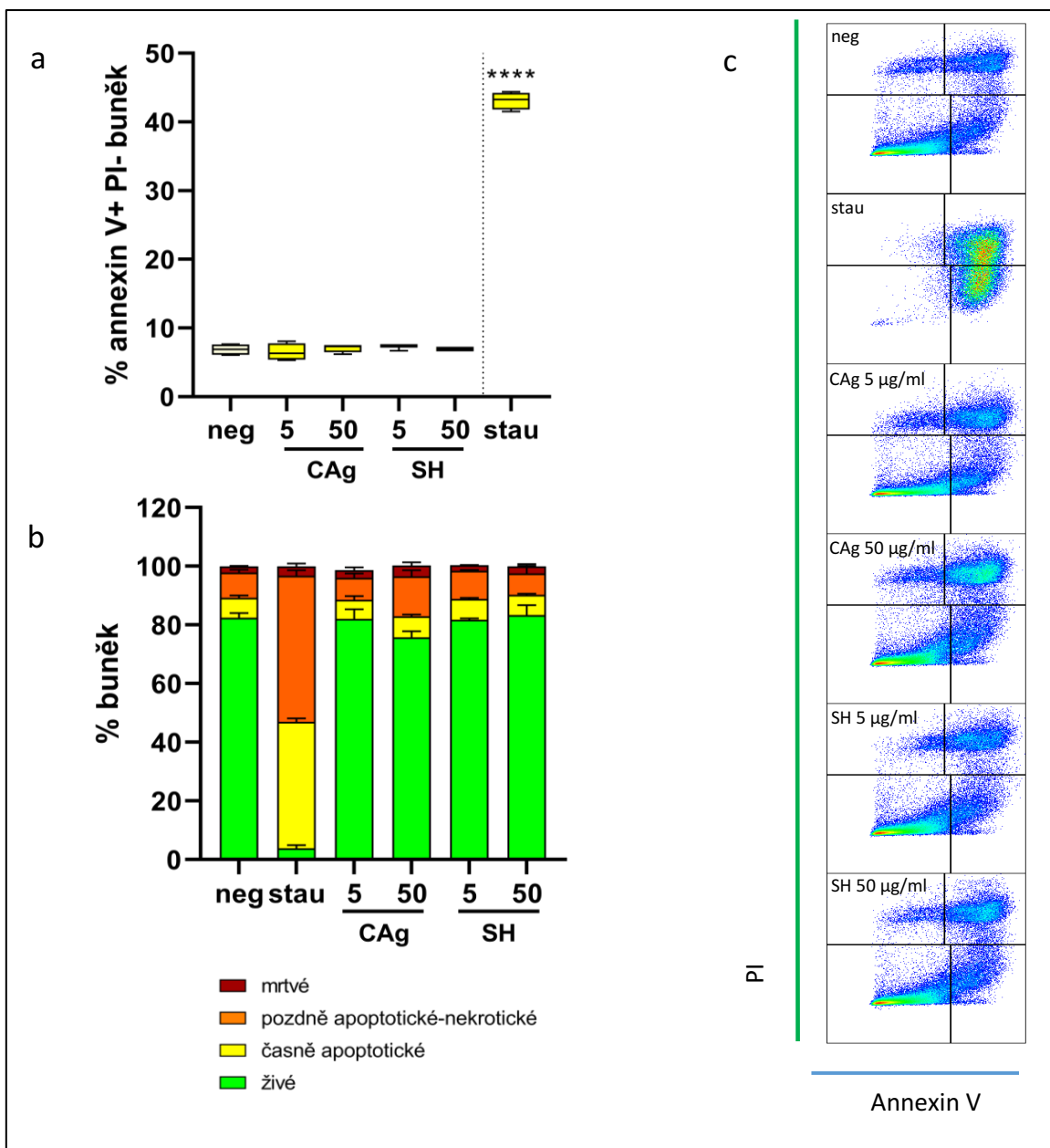
Obrázek 14: Zastoupení apoptických (AnnexinV+/PI-) buněk u fibroblastů Hff stimulovaných parazitárními antigeny a reprezentativní dot ploty (c). a – podíl apoptických buněk (AnnexinV+/PI), b – podíl apoptických, živých, pozdně apoptických-nekrotických a mrtvých buněk ($n = 4$); neg = negativní kontrola, CAg = cercariální antigen, SH = homogenát schistosomul, 5 = 5 µg/ml, 50 = 50 µg/ml, stau = staurosporin (pozitivní kontrola)



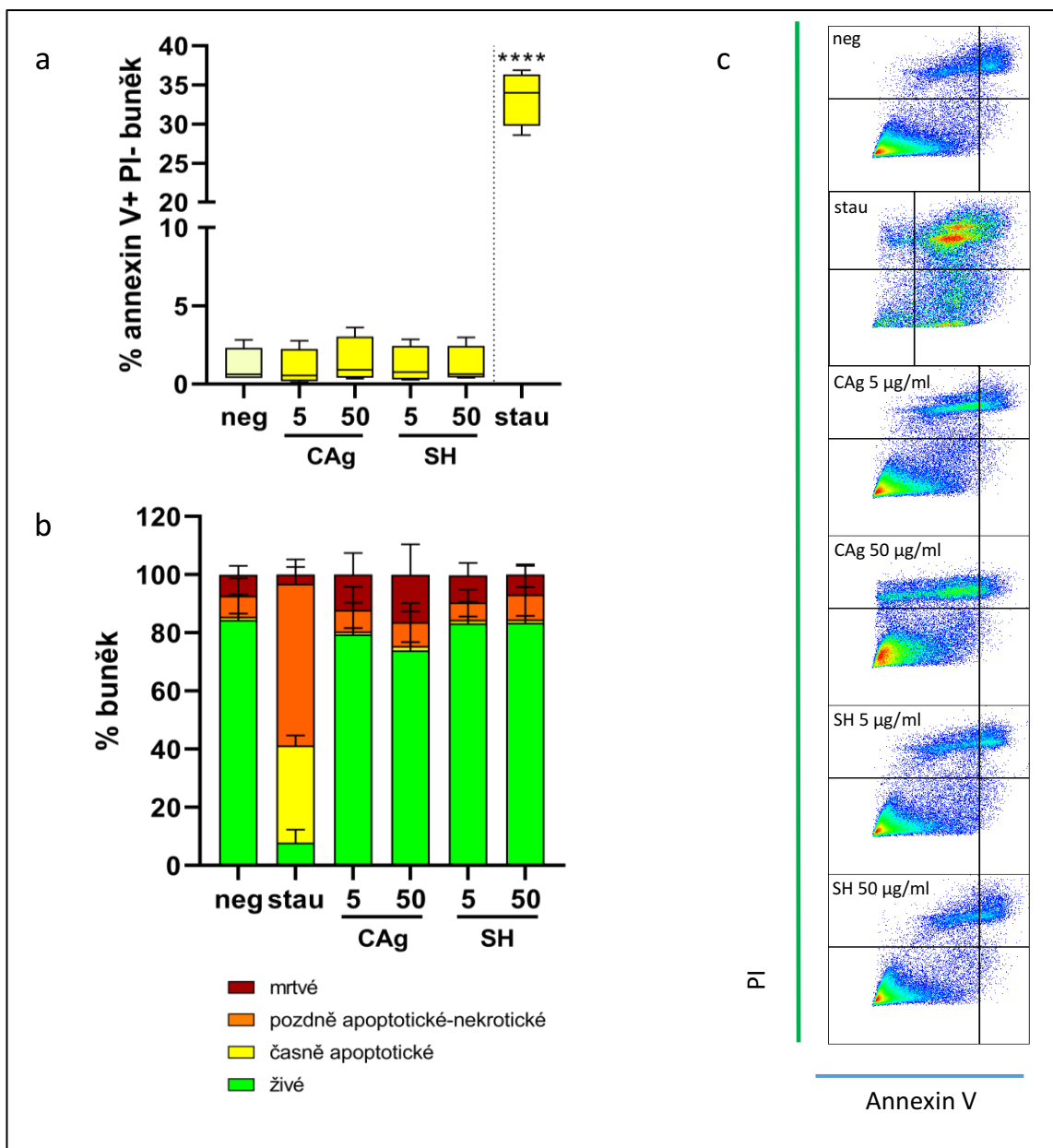
Obrázek 15: Zastoupení apoptických (AnnexinV+/PI-) buněk u T lymfocytů Jurkat stimulovaných parazitárními antigeny a reprezentativní dot ploty(c). **a** – podíl apoptických buněk (AnnexinV+/PI), **b** – podíl apoptických, živých, pozdně apoptických-nekrotických a mrtvých buněk ($n = 4$); neg = negativní kontrola, CAg = cercariální antigen, SH = homogenát schistosomul, 5 = 5 µg/ml, 50 = 50 µg/ml, stau = staurosporin (pozitivní kontrola)



Obrázek 16: Zastoupení apoptických (AnnexinV+/PI-) buněk u neuronů Neuro2a stimulovaných parazitárními antigeny a reprezentativní dot ploty (c). a – podíl apoptických buněk (AnnexinV+/PI), b – podíl apoptických, živých, pozdně apoptických-nekrotických a mrtvých buněk ($n = 4$); neg = negativní kontrola, CAg = cercariální antigen, SH = homogenát schistosomul, 5 = 5 µg/ml, 50 = 50 µg/ml, stau = staurosporin (pozitivní kontrola)



Obrázek 17: Zastoupení apoptických (AnnexinV+/PI-) buněk u gliových buněk stimulovaných parazitárními antigeny a reprezentativní dot ploty (c). **a** – podíl apoptických buněk (AnnexinV+/PI-), **b** – podíl apoptických, živých, pozdně apoptických-nekrotických a mrtvých buněk ($n = 4$); neg = negativní kontrola, CAg = cercariální antigen, SH = homogenát schistosomul, 5 = 5 µg/ml, 50 = 50 µg/ml, stau = staurosporin (pozitivní kontrola)



Obrázek 18: Zastoupení apoptických (AnnexinV+/PI-) buněk u splenocytů z myší 7 dpi (restimulace) a 0 dpi stimulovaných parazitárními antigeny a reprezentativní dot ploty (b). a – podíl apoptických buněk (AnnexinV+/PI-) (n = 6); dpi – dny po infekci, neg = negativní kontrola, CAg = cercariální antigen, SH = homogenát schistosomul, 5 = 5 µg/ml, 50 = 50 µg/ml, stau = staurosporin (pozitivní kontrola)

5. Diskuze

Helminti dokáží indukovat apoptózu buněk hostitele za účelem potlačení imunitní odpovědi. Apoptóza hostitelských buněk může hrát také roli v patologii způsobené helminty, již se v postižených tkáních vyskytují. Lidské schistosomy jsou považovány za zdatné modulátory imunitní odpovědi, což jim umožňuje přežít v hostiteli (Carneiro-Santos et al., 2000; Rumbley et al., 2001; Lundy et al., 2001; Chen et al., 2002; Lundy & Boros, 2002; Prendergast et al., 2015). Jako jeden z mechanismů imunomodulace využívají právě i indukci apoptózy imunitních buněk. Nakolik tuto strategii používají ptačí schistosomy však není jasné. Rozhodli jsme se proto ověřit *in vivo* a *in vitro* schopnost *T. regenti*, neurotropní ptačí schistosomy, využít indukci apoptózy pro únik před imunitní odpovědí hostitele. Právě ta je totiž považována za hlavní faktor zodpovědný za eliminaci parazita v náhodném hostiteli. Vedle toho jsme zkoumali, zda dochází k apoptóze ve tkáních zasažených migrací *T. regenti*, což by mohlo přispívat k patogenезi infekce.

Kůže je místem penetrace cercárií a jejich následné transformace na schistosomula. Většina z nich je zde však zastavena a zničena imunitní odpovědí hostitele (Hrádková & Horák, 2002; Kouřilová et al. 2004a). V našich experimentech byla zaznamenána přítomnost TUNEL+ buněk v boltcích myši infikovaných *T. regenti* v okolí červů a jejich migračních tunelů. Největší zastoupení měly TUNEL+ buňky 8 hpi a dále následoval jejich postupný pokles 24 a 48 hpi. V čase 8 hpi, kdy dochází k nástupu imunitní odpovědi, jsou v okolí parazita přítomny buňky s fragmentovanými jádry, naznačující možnou indukci apoptózy vlivem parazita u imunitních buněk. Naopak, při již kompletním zastoupení imunitních buněk 24 a 48 hpi (Kouřilová et al. 2004a), jsme pozorovali snížení počtu buněk s fragmentovanými jádry. Tento pozorovaný trend může mít několik vysvětlení. Během infekce parazita je stěžejní modulovat imunitní odpověď v začátcích infekce, aby došlo k jejímu vyčerpání hned v počátku a byla tak parazitům umožněna lepší migrace do dalších orgánů (Zakeri, 2017). To by odpovídalo našim pozorováním 8 hpi, avšak při porovnání s množstvím TUNEL+ buněk v okolí *T. regenti* a okolí *S. mansoni* v kůži, lze vidět výrazné početní zastoupení TUNEL+ buněk u *S. mansoni* oproti *T. regenti* (Chen et al., 2002). Nicméně v případě *S. mansoni* se u TUNEL+ buněk jednalo pouze o T lymfocyty akumulované u schistosomul, kdežto v našem případě byly do TUNEL+ buněk zahrnuty všechny buňky, tudíž se nejednalo pouze o imunitní buňky. Dalším možným vysvětlením pro pokles TUNEL+ pozitivních buněk 24 a 48 hpi oproti 8 hpi může být také zvýšená aktivita a zastoupení fagocytů v kůži, jež fagocytují apoptické buňky. Pouze malé procentuální zastoupení, ač signifikantní, TUNEL+ buněk v našich výsledcích 8, 24 a 48 hpi poukazuje na možnou indukci apoptózy jen u malého množství buněk, což nedokáže efektivně oslabit imunitní odpověď a zajistit tak přežití většímu množství schistosomul. Tato hypotéza by byla v souladu

s výsledky předchozích pozorování, kde je uváděna destrukce většiny schistosomul *T. regenti* v kůži vlivem imunitní odpovědi hostitele (Hrádková & Horák, 2002; Kouřilová et al., 2004a).

Z literatury víme, že *T. regenti* není schopna efektivní imunomodulace v kůži náhodného hostitele, která by jí zde umožnila větší přežívání schistosomul. Na tomto základě by proto námi pozorované TUNEL+ buňky v blízkosti schistosomul mohly být spíše než imunitní buňky, buňky rezidentní v kůži. Většina námi pozorovaných TUNEL+ buněk se nacházela ve vrchní vrstvě kůže a škáře, tudíž by se mohlo jednat o keratinocyty a fibroblasty. Právě možná apoptóza těchto buněk vlivem parazita by mohla přispívat k patologii v kůži (Eidsmo et al., 2007). Ačkoliv je TUNEL test hojně využívanou metodou při detekci apoptózy, jeho nevýhodou je značení pouze 3' OH konců zlomů DNA, ke kterým nemusí dojít vlivem jen apoptózy, ale i nekrózy či aktivní transkripce (Banfalvi, 2017). Proto jsme se rozhodli ověřit, zda je apoptóza skutečně původcem DNA fragmentace v kůži pomocí *in vitro* experimentů zaměřených na detekci jiného markeru apoptózy, a to PS vystaveného na vnějším listu buněčné membrány. Při testování pro-apoptického potenciálu CAg a SH *T. regenti* *in vitro* jsme zaznamenali u linie lidských keratinocytů HaCaT stimulovaných těmito parazitárními antigeny po dobu 48 hod nárůst zastoupení apoptických buněk v případě stimulace CAg o koncentraci 50 µg/ml. U keratinocytů stimulovaných nižší koncentrací 5 µg/ml CAg byl zaznamenán podobný, leč nižší nárůst. Oproti tomu SH u keratinocytů neměl vliv na indukci apoptózy. V případě stimulace HaCaT keratinocytů a lidských epidermálních keratinocytů se supernatanty z kultur infikovaných *Leishmania major* (původce kutánní leishmaniózy) podléhaly tyto keratinocyty apoptóze v závislosti na Fas a TRAIL (Eidsmo, et al., 2005; Eidsmo, et al., 2007). Stimulací buněk myšího melanomu B-16, který je modelem pro lidskou kožní rakovinu, ES-L1 *T. spiralis* došlo k indukci apoptózy závislé na kaspázách těchto buněk *in vitro* (Vasilev et al., 2015). V souladu s tím naše pozorování poukazují na indukci apoptózy v závislosti na stádiu parazita a míry koncentrace parazitárního antigenu *T. regenti* u keratinocytů *in vitro*. Výsledky tohoto experimentu pozitivně korelují s našimi *in vivo* pozorováními v kůži infikovaných myší. Někteří helminti indukují apoptózu v orgánech, ve kterých se vyskytují, jako tomu je u dospělců *T. spiralis* ve střevech. Zde dochází k indukci apoptózy ve střevních buňkách, což přispívá k patologii infekce. V případě parazita gastrointestinálního traktu *N. brasiliensis* byla pozorována indukce apoptózy u střevních buněk, která přispěla k patologii ve střevech (Hyoh et al., 1999; Hyoh et al., 2002). V *in vitro* experimentech pak byl u střevních buněk prokázán pro-apoptický potenciál ESP *N. brasiliensis* (Kuroda et al., 2002). Tato pozorování by mohla podporovat naši hypotézu, že ve svrchní vrstvě kůže může docházet k indukci apoptózy působením antigenů *T. regenti*, spolu s tím, že k fragmentaci DNA by zde mohlo docházet parazitem indukovanou apoptózou. Pro potvrzení této hypotézy by bylo vhodné využít v následujících experimentech myší keratinocyty a současně detekovat i kaspázovou aktivitu.

Oproti keratinocytům se v našich experimentech ukázaly fibroblasty z lidských kožních (Hff) a myších (NIH 3T3) linií fibroblastů jako rezistentní vůči *T. regenti* indukované apoptóze. Přestože v případě Hff se buňky stimulované SH o vyšší koncentraci zdály jako vnímavé k indukci apoptózy, antigeny *T. regenti* jsou v kontrastu s *in vitro* pozorováním u aktivovaných HSC stimulovaných SEA *S. japonicum*, kde tyto tzv. myofibroblast-like buňky podléhaly apoptóze (Duan et al., 2014, Wang et al., 2014a). U fibroblastů v kůži infikované *T. regenti* se tedy na základě našich *in vitro* pozorování zdá, že apoptóze vlivem *T. regenti* nepodléhají.

V případě výsledků našich experimentů pak musíme brát také v potaz, zda u TUNEL+ pozitivních buněk nedochází místo/či současně s apoptózou k sekundární nekróze. K té by zde mohlo dojít také vlivem zánětu zprostředkovaného imunitní odpovědí hostitele v kůži (Kouřilová et al., 2004a). Pro odlišení apoptózy od nekrózy by proto bylo žádoucí zopakovat tento experiment a k TUNEL testu přidat i IHC značení na kaspázy 3 a 8 či ověřit jejich aktivitu. Vhodné by bylo také za účelem lepší identifikace buněk, jež podléhají DNA fragmentaci využití IHC značení pro jejich určení.

Pro objasnění *T. regenti* indukované apoptózy v kůži jsme dále detekovali také apoptické buňky přítomné v tříselných uzlinách, jakožto spádového orgánu periferní adaptivní imunity v kůži. Schistosomula *S. mansoni* v kůži produkují tzv. Smaf, který je významným mediátorem indukce apoptózy u CD4+ a CD8+ T lymfocytů v kůži a přispívá tak k potlačení imunitní odpovědi (Chen et al., 2002). V této publikaci autoři zaznamenali apoptické lymfocyty ze spádových tříselných uzlin a kůže z myší infikovaných cercáriemi v břišní oblasti. Navíc při opakované (4x) perkutánní infekci cercárií *S. mansoni* v boltcích myší byla popsána indukce apoptózy závislá na IL-10 u CD4+ T lymfocytů z aurikulárních spádových uzlin (Prendergast et al., 2015). Výsledky našich experimentů poukázaly na pokles relativního zastoupení i absolutních počtů apoptických (na základě SSC a FSC gatu převážně lymfocytů) leukocytů 3 dpi a nárůstem 14 dpi oproti zdravým kontrolám. Avšak v čase 14 dpi již není přítomen zánět v kůži (Kouřilová et al., 2004a), tudíž se zde pravděpodobně nejedná o vliv *T. regenti* na indukci apoptózy. Nicméně při zpracování vzorků z lymfatických uzlin zdravých myší došlo k delší prodlevě mezi izolací buněk a značením s následným měřením na cytometru. Z tohoto důvodu zde pravděpodobně došlo k většímu zastoupení apoptických buněk v kontrolách. Naše pozorování tedy naznačují, že se pravděpodobně nejedná o indukci apoptózy vlivem *T. regenti* v případě spádových uzlin pro kůži.

Jak je již výše zmíněno, jsou tříselné uzliny spádové uzliny pro kůži, a nikoliv pro CNS. Tudíž by se zde měl reflektovat pouze vliv infekce a imunitní odpovědi v kůži, kde zánět odeznívá zhruba do 8 dpi (Kouřilová et al., 2001a). Majer et al. (2020) pozorovali vliv zánětu v kůži na T lymfocyty zprostředkovanou imunitní odpověď v periferních lymfatických uzlinách (axilární a tříselné)

s vrcholem v 7 dpi. Při porovnání s našimi výsledky lze nízké zastoupení apoptických buněk ve 3 dpi přisuzovat přítomnosti lymfocytů majoritně stále v kůži. Oproti tomu se zdají zajímavé námi pozorované zvýšené zastoupení a absolutní počty apoptických buněk 14 dpi, kdy již v kůži není zánět (Kouřilová et al., 2004a). Pro objasnění, o které apoptické lymfocyty se v tříselných uzlinách jedná by bylo vhodné experiment opakovat a přidat další protilátkové značení i pro lepší porovnatelnost s publikacemi (Chen et al., 2002; López-Briones et al., 2003; Nono et al., 2012; Liu et al., 2017; Majer et al., 2020) zabývajícími se dynamikou periferní imunity v případě infekce helminty. V rámci cytometrických experimentů se značením annexinem V a PI u buněk izolovaných z tříselných lymfatických uzlin a slezin (viz dále) se jednalo o nově zaváděnou metodu, a proto zde nebylo použito dalších značení pro identifikaci buněčných populací. Zároveň by byla v následujících experimentech vhodná detekce (např. RT-PCR) proteinů asociovaných s možnými cestami aktivace apoptózy pro objasnění mechanismu její indukce, který dosud v případě infekce *T. regenti* nebyl předmětem zkoumání. Možným logickým vodítkem při zkoumání mechanismu indukce apoptózy u leukocytů z lymfatických uzlin a slezin by mohly být pozorování indukce apoptózy související se zvýšením exprese Fas-L u CD4+, CD8+ a CD19+ lymfocytů ze slezin, či zvýšením exprese Fas, Fas-L a FADD u CD4+ a CD8+ T lymfocytů z kůže poukazující na zapojení vnější cesty aktivace přes Fas receptor u lymfocytů působením *S. mansoni* (Lundy et al., 2001; Chen et al., 2002; Lundy & Boros, 2002).

Schistosomula, která v kůži uniknou likvidaci imunitní reakcí hostitele, migrují skrze periferní nervy do CNS. Patologie vzniklá působením schistosomul *T. regenti* v CNS je přisuzována hlavně mechanickému poškození tkáně a sekundární demyelinizaci vlivem migrace schistosomul spíše než zánětlivé imunitní odpovědi hostitele (Kolářová et al., 2001; Kouřilová et al., 2004b; Lichtenbergová et al., 2011). Již v publikaci od Kolářová et al. (2001) si autoři povšimli dystrofických a nekrotických změn u neuronů v blízkosti schistosomul *T. regenti*. Nicméně možnost parazitem indukované apoptózy a jejího přispění k patologii a klinickým projevům způsobených infekcí *T. regenti* v CNS dosud nebyla podrobena zkoumání.

Naše pozorování z *in vivo* experimentů odhalilo mírný, statisticky nesignifikantní, trend k nárůstu TUNEL+ buněk v 7 dpi a větší a signifikantní nárůst ve 14 dpi v míše oproti zdravým kontrolám. V 7 dpi je již v infikované míše přítomen infiltrát imunitních buněk skládající se z lymfocytů, granulocytů a makrofágů, které s přispěním astrocytů a mikroglií zprostředkovávají imunitní odpověď potřebnou k eliminaci schistosomul (Kouřilová et al., 2004b; Lichtenbergová et al., 2011). V souladu s těmito pozorováními by pak byla pro *T. regenti* výhodná indukce apoptózy těchto buněk. Z výsledných dat se však jeví zastoupení těchto TUNEL+ buněk v 7 dpi jako velmi nízké a nesignifikantní, což naznačuje neschopnost schistosomul efektivně indukovat apoptózu

u možných hostitelských imunitních buněk v CNS. Tato hypotéza odpovídá dosavadním pozorováním, jež popisují úhyn schistosomul během migrace CNS a zde kompletní eliminaci parazita v čase zhruba 24 dpi kdy, již nejsou detekována žádná schistosomula (Hrádková a Horák, 2002; Kouřilová et al., 2004b; Lichtenbergová et al. 2011). V souladu s tím jsou i pozorování v našem experimentu v čase 14 dpi, kde byla část schistosomul již poškozených. Avšak v zánětlivém infiltrátu v jejich okolí byly detekovány TUNEL+ buňky, což naznačuje, že by schistosomula *T. regenti* mohla indukovat apoptózu u imunitních buněk přítomných v infiltrátu. Zároveň však jde o nízké počty, přestože signifikantní, TUNEL+ buněk 14 dpi, což poukazuje, stejně jako u našich pozorování v kůži, na možnou indukci apoptózy pouze u malého množství buněk, která ve výsledku nedokáže efektivně potlačit imunitní odpověď v míše a zajistit tak přežití schistosomul. Ovšem na základě našich pozorování TUNEL+ buněk pod mikroskopem bez dalšího IHC protilátkového značení se nejedná o spolehlivou identifikaci buněčných typů. U infiltrátu leukocytů v CNS infikované *A. cantonensis* byla popsána parazitem indukovaná apoptóza (Chen et al., 2002). Výskyt těchto TUNEL+ leukocytů byl v mozковém parenchymu a subarachnoideálním prostoru ve kterých se nacházely i larvy *A. cantonensis*. Navíc i při průtokové cytometrii za použití značení Annexin V/PI mozkových buněk z myší infikovaných *A. cantonensis* byl zaznamenán nárůst apoptických buněk během infekce (Lam et al., 2020), nicméně zda se jednalo o imunitní buňky či jiné buňky nebylo v této práci dále zkoumáno. V případě zastoupení apoptických TUNEL+ buněk v hipokampu myší infikovaných *T. crassiceps* či působením MF bylo pozorováno masivní zastoupení těchto apoptických buněk (Zepeda et al., 2017; Zepeda et al., 2019). Ovšem otázkou je, zda mohou být v uvedených publikacích takto vysoké počty apoptických buněk u infikovaných myší slučitelné se životem. Apoptóza v nervové tkáni je popsána i jako původce neuropatologických projevů (Takahashi et al., 2008). V případě neuroinfekce *A. cantonensis* u myší se protektivní efekt podaného terapeutika přisuzuje i snížené míře apoptózy u buněk v mozku (Tsai et al., 2015). V souladu s tím se z našich pozorování se zdá, že přítomnost hostitelských buněk s DNA fragmentací v míše spíše přispívá k patologii zde způsobené nežli záměrné imunomodulaci.

Pro verifikaci přítomnosti apoptických procesů v míše byla provedena i analýza míry exprese konkrétních genů asociovaných s apoptózou. Výsledná data ukazují expresi diferenciálně exprimovaných genů asociovaných s apoptózou v případě myší infikovaných *T. regenti* oproti zdravým myším. V případě pro-apoptických genů byla u genů pro Fas a Tnfr1, jež souvisí s vnější cestou aktivace (Pollard et al., 2016), pozorována vyšší míra exprese v průběhu infekce (7, 14 a 21 dpi) vůči zdravým kontrolám s maximem ve 14 dpi. Míra exprese genu pro Bax z naší analýzy byla také zvýšená oproti kontrolám, avšak s trendem postupného klesání během infekce. Naše pozorování jsou v souladu s popsanou parazitem indukovanou apoptózou přes protein Fas v případě

S. mansoni u myších T lymfocytů, *N. brasiliensis* a střevních epitelálních buněk potkanů spolu se zvýšením exprese genu pro Fas vlivem HcESP u T lymfocytů původem z koz (Rumbley et al., 2001; Chen et al., 2002; Kuroda et al., 2002; Lu et al., 2020). Navíc upregulace genů pro TNFR1 byla popsána u PMBC vlivem infekce také u *F. hepatica* (Garcia-Campos et al., 2019). Tato pozorování dohromady s našimi výsledky naznačují, že vlivem infekce *T. regenti* v CNS dochází ke zvýšení exprese pro-apoptických genů v míše, což v souladu s našimi (viz výše) pozorováními TUNEL+ buněk naznačuje indukci apoptózy vlivem parazita v míše.

Analýza u genů pro proti-apoptické proteiny Bcl-2 ukázala téměř nezměněnou míru exprese oproti zdravým kontrolám a u Bcl-XL byl pozorován nárůst pouze v čase 21 dpi. Míra exprese genu pro Akt byla naopak výrazně snížena ve všech časech infekce oproti kontrolám. V případě působení rekombinantního proteinu *S. japonicum* rSj16 na apoptózu WEHI3B rakovinných buněk bylo pozorováno zvýšení exprese Bax a naopak snížení proti-apoptického Bcl-2, navíc SEA u indukce apoptózy lidské linie HSC snižovaly expresi Akt (Yang et al., 2013). Podobný trend v expresi Bax a snížení exprese Bcl-2 jako u rSj16 popsal Spotin *et al.* (2012) v případě stimulace lidských lymfocytů HF *E. granulosus*. Při porovnání dynamiky exprese pro- a proti-apoptických genů dochází k poklesu míry exprese pro-apoptických genů v pozdní části infekce (21 dpi), kdy už je většina schistosomul v míše zničena (Hrádková & Horák, 2002; Kouřilová et al., 2004b), a zároveň zvýšení míry exprese v případě proti-apoptického genu pro Bcl-XL.

Porovnání míry exprese těchto pro- a proti-apoptických genů 7 a 14 dpi ukazuje na probíhající apoptózu během přítomnosti schistosomul v míše a její inhibici v pozdní fázi, kdy je většina schistosomul již mrtvých. Také by mohlo docházet k inhibici apoptózy i z důvodu regulace vzniklé patologie v CNS (Robertson et al., 2000). Zároveň lze na základě míry exprese diferenciatně exprimovaných genů v našem případě také predikovat jakým mechanismem k fragmentaci DNA v míše myší infikovaných *T. regenti* mohlo dojít. Dle míry diferenciatní exprese pro-apoptických genů se nám nabízí zapojení vnější dráhy aktivace apoptózy skrze receptory smrti. V případě studia apoptických buněk v CNS u neurocysticercózy způsobené *T. solium* byly detekovány TUNEL+ lymfocyty majoritně lokalizované v zánětlivém infiltrátu kolem časných lézí s živými cysticerky, oproti tomu u pozdních granulomatózních lézích s již rozloženými cysticerky nebyly detekovány žádné TUNEL+ buňky (Sikasunge et al., 2008). Toto pozorování naznačuje indukci apoptózy *T. solium* v časnou fázi infekce a její supresi v pozdní fázi infekce u již neživých parazitů, což je ve shodě s našimi pozorováními snížení míry exprese pro-apoptických genů, a naopak zvýšení u genů proti-apoptických 21 dpi oproti 14 dpi infekce v míše. Naopak v kontrastu s našimi výsledky je zaznamenaný nárůst apoptických buněk v průběhu neuroinfekce *A. cantonensis*, kde měly

apoptické buňky nejvyšší zastoupení ve 4 wpi (Lam et al., 2020). Nicméně v této době (jak je uvedeno výše) se již schistosomula *T. regenti* v míše nevyskytují.

Na základě našich pozorování tedy předpokládáme, že infekce *T. regenti* v míše má vliv na expresi genů asociovaných s apoptózou. Což by mohlo potvrzovat, že se v případě TUNEL+ buněk námi pozorovaných v míše jedná o buňky apoptické. Pro další verifikaci by bylo optimální (obdobně jako u experimentů v kůži) opakovat tento experiment se současným přidáním IHC značení pro kaspázy a pro jednotlivé typy buněk přítomných na řezech pro přesnější identifikaci TUNEL+ buněk jako apoptických. Zajímavá by v dalších experimentech byla také detekce konkrétních proteinů spojených s apoptickou signální kaskádou pro objasnění mechanismu, jak k DNA fragmentaci působením schistosomul *T. regenti* v míše dochází.

Následně jsme testovali pro-apoptický potenciál antigenů *T. regenti in vitro* na primárních kulturách gliových buněk a myší linie neuronů Neuro2a. Pro lepší odraz funkčního stavu v míše *in vivo* jsme využili vlastní smíšené primokultury gliových buněk a nikoliv imortalizované linie, které se mohou v některých aspektech lišit (Fok-Seang et al., 1995; Stansley et al., 2012). Na rozdíl od výskytu TUNEL+ buněk v blízkosti schistosomul v míše, nebyl překvapivě pozorován žádný vliv parazitárních antigenů na indukci apoptózy u gliových buněk a Neuro2a. V případě stimulace CAg jsme tento trend předpokládali, jelikož jsou cercárie přítomny pouze v kůži a buňky v CNS se s nimi nesesetkají. Ovšem negativní výsledky stimulací SH byly zajímavé právě v kontrastu s *in vivo* pozorováními v infikované míše. TUNEL+ pozitivní buňky se vyskytovaly také mimo zánětlivý infiltrát i v tkáni, ve které byly gliové buňky a neurony přítomny. Rozpor mezi pozorováním *in vivo* a stimulačními *in vitro* experimenty je možné vysvětlit tím, že k možné indukci apoptózy buněk nervové tkáně nedochází přímo produkty parazita. Tuto hypotézu by mohla potvrzovat schopnost TNF- α , jehož produkce byla popsána u mikroglií a astrocytů stimulovaných homogenátem a ESP *T. regenti* (Macháček et al., 2016). TNF- α může také působit jako vnější faktor spouštějící apoptózu u neuronů a oligodendrocytů po poškození míchy (Inukai et al., 2009). Což by bylo v souladu s výsledky z transkriptomické analýzy, která naznačuje zapojení vnější dráhy aktivace apoptózy skrze TNFR1, který je receptorem pro TNF- α (Pollard et al., 2016).

TUNEL+ buňky schistosomul nebyly do finálních dat započteny, jelikož naším zájmem byla detekce TUNEL+ hostitelských buněk, a nikoliv buněk parazita. Avšak některé buňky na povrchu by mohly být také imunitní buňky (Kassis et al., 1979). Nicméně pro přesnější identifikaci buněk na povrchu schistosomula, či na jeho příčných řezech (uvnitř schistosomula) by bylo zapotřebí IHC značení jednotlivých typů buněk.

Vliv infekce *T. regenti* na apoptózu imunitních buněk jsme studovali také na leukocytech izolovaných ze slezin infikovaných myší. U peritoneální infekce myší *T. crassiceps* byl pozorován úbytek CD4+, CD8+ a CD19+ lymfocytů ve slezinách, jež značí pravděpodobnou indukci apoptózy vlivem parazita (Zepeda et al., 2010). Z literatury také víme, že *S. mansoni* dokáže regulovat imunitní odpověď skrze apoptózu CD4+, CD8+ a CD19+ lymfocytů ve slezinách (stejně populace jako u *T. crassiceps*), což je podloženo i výsledky *in vitro* ze stimulace těchto splenocytů SEA (Lundy et al., 2001; Rumbley et al., 2001; Lundy & Boros, 2002). Oproti tomu *S. japonicum* nejspíše pro vytvoření vhodného imunologického profilu naopak inhibuje apoptózu u populace Tfh lymfocytů ve slezinách infikovaných myší a v *in vitro* stimulacích SEA těchto buněk (Yang et al., 2019). Na rozdíl od ptačí schistosomy *T. regenti* jsou však tyto v krvi přetrvávající schistosomy schopny chronických infekcí v savčích hostitelích, tudíž musí být schopní imunomodulátoři pro zajištění dlouhodobého přežití v hostiteli. Takto výhodná imunomodulace hostitele vlivem parazita se však v případě *T. regenti*, jež v je savčím hostiteli eliminována imunitní odpovědí, nejeví jako mechanismus, který by dokázala efektivně ovládat. Jde patrně o důsledek toho, že myši/savci představují pro *T. regenti* náhodné hostitele, na které není parazit evolučně adaptován.

Naše výsledky naznačují, že zánět v kůži v důsledku infekce myší *T. regenti* nemá vliv na absolutní počty apoptických leukocytů ve slezinách. Majer *et al.* (2020) si povšimli vysokého procentuálního zastoupení T-bet+ (z angl. T box transcription factor) a GATA-3+ (z angl. GATA binding protein 3) pomocných lymfocytů ve slezině v čase 7 dpi u myší infikovaných *T. regenti*. Z literatury víme, že lidské schistosomy využívají apoptózu také u pomocných Th lymfocytů jako regulační mechanismus imunomodulace (Fallon et al., 1998; Yang et al., 2019). Majer *et al.* (2020) se ve svých experimentech zabývali i dynamikou zastoupení u různých populací T lymfocytů ve slezinách a při porovnání s našimi pozorováními je zde spojitost mezi námi pozorovanými absolutními počty apoptických leukocytů a absolutními počty T lymfocytů ze slezin myší infikovaných *T. regenti*. V počáteční fázi infekce, kde Majer *et al.* zaznamenali úbytek počtů T lymfocytů ve slezinách, byl v našich experimentech trend zvýšení počtů apoptických leukocytů. Při nejvyšších počtech T lymfocytů ve slezinách v 7 dpi u Majer *et al.* (2020) byl v našich experimentech zaznamenán trend poklesu počtů leukocytů ve slezinách. V případě 14 dpi, kdy Majer *et al.* (2020) zaznamenali stále ještě zvýšené počty T lymfocytů oproti 0 dpi, avšak trend poklesu oproti 7 dpi spolu s trendem poklesu počtů T lymfocytů i ve 21 dpi. Toto se odráží i v našich experimentech, kde byl od 14 dpi, kdy měly počty apoptických leukocytů své maximum, do 28 dpi zaznamenán nárůst apoptických leukocytů ve slezinách. Porovnání našich výsledků s pozorováními u Majer *et al.* (2020) naznačuje ovlivnění absolutních počtů T lymfocytů ve slezině apoptózou těchto imunitních buněk u myší infikovaných *T. regenti*. Ovšem v našich experimentech byly mimo

T lymfocyty zahrnuty i další populace imunitních buněk, jako jsou granulocyty či monocyty, identifikované na základě FSC a SSC. Proto by bylo vhodné opakovat naše experimenty za využití podrobnějšího protilátkového značení jednotlivých subpopulací imunitních buněk ve slezinách a lymfatických uzlinách pro jejich detailní identifikaci. Nicméně v kontrastu s hypotézou od Majer *et al.* (2020), která charakterizuje dynamiku T lymfocytů v orgánech periferní imunity spíše jako odraz zánětu v kůži, než vliv pozdějšího zánětu v CNS, jsou naše pozorování zvýšených hodnot apoptických leukocytů i v absolutních číslech ve 14 až 28 dpi. Nicméně v čase 28 dpi se schistosomula v míše již nevyskytují, což může poukazovat na možný vliv delšího působení mrtvých schistosomul v CNS. Vliv infekce parazita v CNS na periferní odpověď skrze apoptózu imunitních buněk byl popsán v případě infekce myši *A. cantonensis*, kde byla pozorována výrazná atrofie slezin a snížení počtu splenocytů v důsledku apoptózy, zároveň bylo pozorováno zvýšení zastoupení regulačních lymfocytů (Liu *et al.*, 2017). Ačkoliv by pozorování v případě neuroinfekce *A. cantonensis* potvrzovali naši hypotézu o vlivu zánětu na periferní imunitu ve slezině, jedná se v tomto případě o daleko závažnější patologické projevy v CNS, než je tomu u infekce CNS *T. regenti*. V závěru lze tedy konstatovat, že z našich výsledků se jeví, že spíše vliv infekce v CNS, a nikoliv infekce v kůži *T. regenti* má za následek zvýšení absolutních počtů apoptických buněk ve slezině ve 14 dpi a a 21 dpi.

V případě stimulací splenocytů zdravých myší a restimulací splenocytů myší infikovaných *T. regenti* 7 dpi antigeny *T. regenti* byl pozorovaný pouze statisticky nesignifikantní trend zvyšování zastoupení apoptických leukocytů v 0 dpi a 7dpi. Při porovnání výsledků z *in vivo* části ze slezin myší infikovaných *T. regenti*, kde jsme zaznamenali zvýšené absolutní počty apoptických leukocytů 14 až 21 dpi a výsledků stimulace a restimulace, je pravděpodobné že k apoptóze leukocytů nedochází přímo produkty parazita. V publikaci od Lundy *et al.* (2002) byla pozorována nepřímá indukce apoptózy vlivem SEA *S. mansoni* u CD4⁺ T lymfocytů, kde zprostředkovatelé apoptózy byly B lymfocyty, s vyšší expresí Fas-L závislé na přítomnosti IL-10 a IL-4. Tento mechanismus zprostředkování apoptózy u CD4⁺ T lymfocytů by v našem modelu mohl být dosažitelný, protože u splenocytů z myší infikovaných *T. regenti* byla při stimulaci cercariálním antigenem zaznamenána zvýšená produkce IL-10 a IL-4 (Majer *et al.*, 2020). Oproti našim pozorováním při restimulaci splenocytů z infikovaných myší bylo u restimulace antigenem z cysticerek *T. crassiceps* u myší 30 dpi pozorováno ve všech dobách stimulace výrazné zastoupení apoptických buněk (López-Briones *et al.*, 2003). Ovšem v porovnání s *T. regenti* je pro *T. crassiceps* myš přirozeným mezipřijímatel, u něhož tato tasemnice působí chronické infekce díky efektivní imunomodulaci, ke které přispívá právě indukce apoptózy u lymfocytů.

Za účelem ověření vlivu *T. regenti* na apoptózu u leukocytů, resp. lymfocytů jsme se rozhodli ověřit působení antigenů *T. regenti in vitro* na lidské linii immortalizovaných T lymfocytů z krve Jurkat, která je rutinně využívána pro simulaci T lymfocytů *in vivo*. Jurkat lymfocyty kultivované s metacestody *T. crassiceps* či živými dospělci *N. americanus* podléhaly apoptóze oproti nestimulovaným buňkám (Chow et al., 2000; O'Connell et al., 2000). Dále i vlivem filárií dochází k indukci apoptózy zejména u lymfocytů v *in vivo* a *in vitro* systému (Jenson et al., 2002; Hartmann et al., 2013; Mishra et al., 2017). Naopak v našich stimulačních experimentech s SH a CAg *T. regenti* nebyl pozorován žádný vliv těchto parazitárních antigenů na apoptózu u Jurkat lymfocytů. Zaznamenané hodnoty apoptických buněk byly téměř totožné s hodnotami nestimulovaných. Nicméně v našich experimentech se jednalo o lidské, a nikoliv myší T lymfocyty. Toto pozorování pozitivně koreluje s našimi výsledky stimulačních a restimulačních experimentů na leukocytech, resp. lymfocytech ze slezin, což by mohlo znamenat, že k indukci apoptózy u T lymfocytů nedochází přímo produkty *T. regenti*.

Nízké hodnoty apoptických buněk v procentuálním zastoupení i v absolutních počtech, mohlo být také způsobeno námi zvoleným určením apoptických buněk pouze Annexin V+/PI- (viz podkapitola metody detekce apoptózy, str. 11). Stejně určení apoptických buněk pouze Annexin V+/PI-, které jsme použili pro přísnější diskriminaci apoptózy od nekrózy v našich cytometrických experimentech použili, v již výše uvedených publikacích zabývajících se parazitem indukovanou apoptózou od Lundy et al. (2001), Lundy & Boros (2002), López-Briones et al. (2003) či Prendergast et al. (2015). Přesto v některých publikacích zabývajících se parazitem indukovanou apoptózou označují za apoptické buňky i Annexin V+/PI+, často označované jako pozdně apoptické-nekrotické, jako tomu je například v publikacích od Nation et al., (2020) nebo Yang et al., (2019), což může vést k nesprávnému zahrnutí i nekrotických či buněk usmrčených jiným způsobem k buňkám apoptickým. Zajímavé by mohlo být ověřit při opakování našich *in vitro* experimentů se stimulací SH a CAg různých typů buněk, zda bude zastoupení apoptických buněk vykazovat stejný trend námi pozorovaný ve stimulacích 48 hod při nižším časovém intervalu stimulace antigeny *T. regenti* např. 6, 12, 18 a 24 hod, jako tomu bylo v případě stimulací antigenů jiných parazitů (López-Briones et al., 2003; Wang et al., 2014a). Tyto experimenty by pak mohly objasnit, zda u některých námi využitých buněčných kultur a linií nedochází při stimulaci antigeny *T. regenti* k možné apoptóze dříve a v době 48 hod už jsou tyto buňky pozitivní na PI a klasifikovány jako neapoptické, jako je tomu u výrazného zastoupení Annexin V+/PI+ buněk v našich pozorováních v případě HaCaT a gliových buněk.

Ve shrnutí lze říci, že naše výsledky z *in vivo* detekce fragmentace DNA pomocí TUNEL testu v infikované kůži a míše ukázaly na přítomnost buněk hostitele s DNA fragmentací v okolí schistosomul a jejich migračních drah. V případě infekce *T. regenti* v míše pak byla základě

transkriptomických dat pozorována zvýšená míra exprese genů asociovaných s apoptózou. Na základě těchto pozorování se zdá, že v kůži a míše infikovaných *T. regenti* by mohlo docházet k parazitem indukované apoptóze hostitelských buněk, která by mohla spíše souviset s patologií ve tkáních než s imunomodulací. V lymfatických orgánech (slezina a tříselné lymfatické uzliny) byly za pomoci průtokové cytometrie detekovány zvýšené počty apoptických leukocytů, naznačující možný odraz infekcí v kůži a míše. Výsledky stimulačních experimentů parazitárními antigeny *T. regenti* s výjimkou lidských keratinocytů neprokázaly svůj pro-apoptický potenciál, což naznačuje, že k možné parazitem indukované apoptózy vlivem *T. regenti* pravděpodobně nedochází přímo produkty parazita. Naše výsledky tedy naznačují možnou apoptózu hostitelských buněk spíše jako příspěvek k patologii v zasažených tkáních než jako modulaci imunitního systému.

6. Závěr

Parazitem indukovaná apoptóza může být důležitým mechanismem při imunomodulaci hostitele, zároveň může být i původcem patologie ve tkáních zasažených parazity. Nicméně téma parazitem indukované apoptózy v případě infekce *T. regenti* doposud nebylo předmětem zkoumání. Cílem této práce bylo proto objasnit, zda při infekci myši schistosomou *T. regenti* dochází k parazitem indukované apoptóze hostitelských buněk.

Hlavní cíle dosažené v této práci jsou:

- V kůži 8, 24 a 48 hpi a míše 14 dpi byla detekována fragmentace DNA u hostitelských buněk v blízkosti schistosomul a migračních drah *in vivo*. Na základě kvantifikace těchto buněk byla popsána přítomnost DNA fragmentace u hostitelských buněk a v případě míchy díky transkriptomické analýze i zvýšená míra exprese pro-apoptických genů, což poukazuje na možnou indukci apoptózy v míše a kůži.
- Byla popsána zvýšená přítomnost apoptických buněk ve slezinách 14, 21 a 28 dpi a tříselných uzlinách 14 dpi *in vivo*. Výskyt apoptických leukocytů ve tříselných uzlinách naznačuje odraz působení infekce v kůži. V případě slezin se naopak nabízí odraz působení infekce v CNS.
- Vliv parazitárních antigenů na indukci apoptózy u vybraných hostitelských buněk byl zaznamenán u lidských keratinocytů stimulovaných homogenátem schistosomul *in vitro*, naznačující tak možnou indukci apoptózy v kůži vlivem schistosomul pozorovanou *in vivo*. U ostatních hostitelských buněk parazitární antigeny neprokázaly svůj pro-apoptický potenciál, což naznačuje, že k možné indukci apoptózy zde pravděpodobně nedochází přímo produkty *T. regenti*.

Výsledky této práce jsou prvním popsáním možné parazitem indukované apoptózy u experimentálního modelu infekce *T. regenti* v myších, a to jak ve tkáních zasažených parazitem, tak i v lymfatických orgánech. Získaná data prohloubila znalosti ohledně patologie a ovlivnění imunity působením *T. regenti* a poslouží v dalším zkoumání těchto témat.

7. Seznam literatury

- Adriouch, S., Hubert, S., Pechberty, S., Koch-Nolte, F., Haag, F., & Seman, M. (2007). NAD⁺ Released during Inflammation Participates in T Cell Homeostasis by Inducing ART2-Mediated Death of Naïve T Cells In Vivo . *The Journal of Immunology*, 179(1), 186–194.
- Babal, P., Milcheva, R., Petkova, S., Janega, P., & Hurnikova, Z. (2011). Apoptosis as the adaptation mechanism in survival of *Trichinella spiralis* in the host. *Parasitology Research*, 109(4), 997–1002.
- Babu, S., Blauvelt, C. P., & Nutman, T. B. (2007). Filarial Parasites Induce NK Cell Activation, Type 1 and Type 2 Cytokine Secretion, and Subsequent Apoptotic Cell Death. *The Journal of Immunology*, 179(4), 2445–2456.
- Banfalvi, G. (2017). Methods to detect apoptotic cell death. *Apoptosis*, 22(2), 306–323.*
- Boonmars, T., Wu, Z., Nagano, I., & Takahashi, Y. (2004). Expression of apoptosis-related factors in muscles infected with *Trichinella spiralis*. *Parasitology*, 128(3), 323–332.
- Bulantová, J., Macháček, T., Panská, L., Krejčí, F., Karch, J., Jährling, N., Saghafi, S., Dodt, H. U., & Horák, P. (2016). *Trichobilharzia regenti* (Schistosomatidae): 3D imaging techniques in characterization of larval migration through the CNS of vertebrates. *Micron*, 83, 62–71.
- Carneiro-Santos, P., Martins-Filho, O., Alves-Oliveira, L. F., Silveira, A. M. S., Coura-Filho, P., Viana, I. R. C., Wilson, R. A., & Correa-Oliveira, R. (2000). Apoptosis: A mechanism of immunoregulation during human schistosomiasis mansoni. *Parasite Immunology*, 22(6), 267–277.
- Chanová, M., Bulantová, J., Máslo, P., & Horák, P. (2009). In vitro cultivation of early schistosomula of nasal and visceral bird schistosomes (*Trichobilharzia* spp., Schistosomatidae). *Parasitology Research*, 104(6), 1445–1452.
- Chen, K. M., Lee, H. H., Lai, S. C., Hsu, L. S., Wang, C. J., & Liu, J. Y. (2008). Apoptosis in meningoencephalitis of *Angiostrongylus cantonensis*-infected mice. *Experimental Parasitology*, 119(3), 385–390.
- Chen, L., Rao, K. V. N., He, Y.-X., & Ramaswamy, K. (2002). Skin-stage schistosomula of *Schistosoma mansoni* produce an apoptosis-inducing factor that can cause apoptosis of T cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(37), 34329–34335.
- Chensue, S. W., & Boros, D. L. (1979). Population dynamics of T and B lymphocytes in the lymphoid organs, circulation, and granulomas of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 28(2), 291–299.
- Chow, S. C., Brown, A., & Pritchard, D. (2000). The human hookworm pathogen *Necator americanus* induces apoptosis in T lymphocytes. *Parasite Immunology*, 22(1), 29–37.
- Costain, D. J., Guha, A. K., Liwski, R. S., & Lee, T. D. G. (2001). Murine hypodense eosinophils induce tumour cell apoptosis by a granzyme B-dependent mechanism. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 50(6), 293–299.
- Daneshpour, S., Kefayat, A., Mofid, M., Rostami Rad, S., & Yousofi Darani, H. (2019). Effect of Hydatid Cyst Fluid Antigens on Induction of Apoptosis on Breast Cancer Cells. *Advanced Biomedical Research*, 8(1), 27.

- das Mohapatra, A., Kumar Panda, S., Pradhan, A. K., Prusty, B. K., Satapathy, A. K., & Ravindran, B. (2014). Filarial Antigens Mediate Apoptosis of Human Monocytes Through Toll-Like Receptor 4. *The Journal of Infectious Diseases*, 210(7), 1133-1144.
- Devadas, S., Das, J., Liu, C., Zhang, L., Roberts, A. I., Pan, Z., Moore, P. A. A., Das, G., & Shi, Y. (2006). Granzyme B Is Critical for T Cell Receptor-Induced Cell Death of Type 2 Helper T Cells. *Immunity*, 25(2), 237–247.
- Dimri, U., Singh, S. K., Sharma, M. C., Behera, S. K., Kumar, D., & Tiwari, P. (2012). Oxidant/antioxidant balance, minerals status and apoptosis in peripheral blood of dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis*. *Research in Veterinary Science*, 93(1), 296–299.
- Duan, Y., Gu, X., Zhu, D., Sun, W., Chen, J., Feng, J., Song, K., Xu, F., He, X., & He, X. (2014). *Schistosoma japonicum* soluble egg antigens induce apoptosis and inhibit activation of hepatic stellate cells: A possible molecular mechanism. *International Journal for Parasitology*, 44(3–4), 217–224.
- Ehsan, M., Gadahi, J. A., Hasan, M. W., Haseeb, M., Ali, H., Yan, R., Xu, L., Song, X., Zhu, X. Q., & Li, X. (2020a). Characterization of *haemonchus contortus* excretory/secretory antigen (ES-15) and its modulatory functions on goat immune cells in vitro. *Pathogens*, 9(3), 162.
- Ehsan, M., Gadahi, J. A., Lu, M., Yan, R., Xu, L., Song, X., Zhu, X., Du, A., Hu, M., & Li, X. (2020c). Recombinant elongation factor 1 alpha of *Haemonchus contortus* affects the functions of goat PBMCs. *Parasite Immunology*, 42(5), e12703.
- Ehsan, M., Gao, W. X., Gadahi, J. A., Lu, M. M., Liu, X. C., Wang, Y. J., Yan, R. F., Xu, L., Song, X. K., & Li, X. R. (2017). Arginine kinase from *Haemonchus contortus* decreased the proliferation and increased the apoptosis of goat PBMCs in vitro. *Parasites and Vectors*, 10(1), 311.
- Ehsan, M., Haseeb, M., Hu, R., Ali, H., Memon, M. A., Yan, R., Xu, L., Song, X., Zhu, X., & Li, X. (2020b). Tropomyosin: An excretory/secretory protein from *haemonchus contortus* mediates the immuno-suppressive potential of goat peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Vaccines*, 8(1), 109.
- Eidsmo, L., Fluor, C., Rethi, B., Ygberg, S. E., Ruffin, N., de Milito, A., Akuffo, H., & Chiodi, F. (2007). FasL and TRAIL induce epidermal apoptosis and skin ulceration upon exposure to *Leishmania major*. *American Journal of Pathology*, 170(1), 227–239.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. In *Toxicologic Pathology* 35(4), 495–516.*
- Escamilla, A., Bautista, M. J., Zafra, R., Pacheco, I. L., Ruiz, M. T., Martínez-Cruz, S., Méndez, A., Martínez-Moreno, A., Molina-Hernández, V., & Pérez, J. (2016). *Fasciola hepatica* induces eosinophil apoptosis in the migratory and biliary stages of infection in sheep. *Veterinary Parasitology*, 216, 84–88.
- Escamilla, A., Pérez-Caballero, R., Zafra, R., Bautista, M. J., Pacheco, I. L., Ruiz, M. T., Martínez-Cruz, M. S., Martínez-Moreno, A., Molina-Hernández, V., & Pérez, J. (2017). Apoptosis of peritoneal leucocytes during early stages of *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Veterinary Parasitology*, 238, 49–53.

- Fallon, P. G., Smith, P., & Dunne, D. W. (1998). Type 1 and type 2 cytokine-producing mouse CD4+ and CD8+ T cells in acute *Schistosoma mansoni* infection. *European Journal of Immunology*, 28(4), 1408–1416.
- Fok-Seang, J., Smith-Thomas, L. C., Meiners, S., Muir, E., Du, J. S., Housden, E., Johnson, A. R., Faissner, A., Geller, H. M., Keynes, R. J., Rogers, J. H., & Fawcett, J. W. (1995). An analysis of astrocytic cell lines with different abilities to promote axon growth. *Brain Research*, 689(2), 207–223.
- Fu, Y., Browne, J. A., Killick, K., & Mulcahy, G. (2017). Network analysis of the systemic response to *Fasciola hepatica* infection in sheep reveals changes in fibrosis, apoptosis, toll-like receptors 3/4, and B cell function. *Frontiers in Immunology*, 8(1), 485.
- Fu, Y., Chrysafidis, A. L., Browne, J. A., O’Sullivan, J., McGettigan, P. A., & Mulcahy, G. (2016). Transcriptomic Study on Ovine Immune Responses to *Fasciola hepatica* Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(9), e0005015.
- Gao, X. Y., Zhang, G. H., & Huang, L. (2018). Modulation of human melanoma cell proliferation and apoptosis by hydatid cyst fluid of *Echinococcus Granulosus*. *OncoTargets and Therapy*, 11, 1447–1456.
- Garcia-Campos, A., Correia, C. N., Naranjo-Lucena, A., Garza-Cuartero, L., Farries, G., Browne, J. A., MacHugh, D. E., & Mulcahy, G. (2019). *Fasciola hepatica* Infection in Cattle: Analyzing Responses of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) Using a Transcriptomics Approach. *Frontiers in Immunology*, 10(1), 2081.
- Guasconi, L., Serradell, M. C., & Masih, D. T. (2012). *Fasciola hepatica* products induce apoptosis of peritoneal macrophages. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 148(3–4), 359–363.
- Hartmann, W., Brenz, Y., Kingsley, M. T., Ajonina-Ekoti, I., Brattig, N. W., Liebau, E., & Breloer, M. (2013). Nematode-Derived Proteins Suppress Proliferation and Cytokine Production of Antigen-Specific T Cells via Induction of Cell Death. *PLoS ONE*, 8(6), e68380.
- Horák, P., Dvořák, J., Kolářová, L., & Trefil, L. (1999). *Trichobilharzia regenti*, a pathogen of the avian and mammalian central nervous systems. *Parasitology*, 119(6), 577–581.
- Horák, Petr, Mikeš, L., Lichtenbergová, L., Skála, V., Soldánová, M., & Brant, S. V. (2015). Avian schistosomes and outbreaks of cercarial dermatitis. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), 165–190.*
- Hrádková, K., & Horák, P. (2002). Neurotropic behaviour of *Trichobilharzia regenti* in ducks and mice. *Journal of Helminthology*, 76(2), 137–141.
- Hyoh, Y., Ishizaka, S., Horii, T., Fujiwara, A., Tegoshi, T., Yamada, M., & Arizono, N. (2002). Activation of caspases in intestinal villus epithelial cells of normal and nematode infected rats. *Gut*, 50(1), 71–77.
- Hyoh, Y., Nishida, M., Tegoshi, T., Yamada, M., Uchikawa, R., Matsuda, S., & Arizono, N. (1999). Enhancement of apoptosis with loss of cellular adherence in the villus epithelium of the small intestine after infection with the nematode *Nippostrongylus brasiliensis* in rats. *Parasitology*, 119(2), 199–207.

- Inukai, T., Uchida, K., Nakajima, H., Yayama, T., Kobayashi, S., Mwaka, E. S., Guerrero, A. R., & Baba, H. (2009). Tumor Necrosis Factor-Alpha and Its Receptors Contribute to Apoptosis of Oligodendrocytes in the Spinal Cord of Spinal Hyperostotic Mouse (twy/twy) Sustaining Chronic Mechanical Compression. *Spine*, 34(26), 2848–2857.
- Jenson, J. S., O'Connor, R., Osborne, J., & Devaney, E. (2002). Infection with *Brugia microfilariae* induces apoptosis of CD4+ T lymphocytes: a mechanism of immune unresponsiveness in filariasis. *European Journal of Immunology*, 32(3), 858–867.
- Kang, Y. J., Jo, J. O., Cho, M. K., Yu, H. S., Leem, S. H., Song, K. S., Ock, M. S., & Cha, H. J. (2013). *Trichinella spiralis* infection reduces tumor growth and metastasis of B16-F10 melanoma cells. *Veterinary Parasitology*, 196(1–2), 106–113.
- Karmańska, K., Houszka, M., & Piekarska, J. (2000). The phenomenon of apoptosis in the course of experimental trichinellosis in mice. *Wiadomosci Parazytologiczne*, 46(1), 111–115.
- Kašný, M., Mikeš, L., Dalton, J. P., Mountford, A. P., & Horák, P. (2007). Comparison of cysteine peptidase activities in *Trichobilharzia regenti* and *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology*, 134(11), 1599–1609.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239–257.*
- Kouřilová, P., Syrůček, M., & Kolářová, L. (2004b). The severity of mouse pathologies caused by the bird schistosome *Trichobilharzia regenti* in relation to host immune status. *Parasitology Research*, 93(1), 8–16.
- Kouřilová, Pavlína, Hogg, K. G., Kolářová, L., & Mountford, A. P. (2004a). Cercarial Dermatitis Caused by Bird Schistosomes Comprises Both Immediate and Late Phase Cutaneous Hypersensitivity Reactions. *The Journal of Immunology*, 172(6), 3766–3774.
- Kuroda, A., Uchikawa, R., Matsuda, S., Yamada, M., Tegoshi, T., & Arizono, N. (2002). Up-regulation of Fas (CD95) and induction of apoptosis in intestinal epithelial cells by nematode-derived molecules. *Infection and Immunity*, 70(8), 4002–4008.
- Lam, H. Y. P., Chen, T. T. W., Chen, C. C., Yang, T. H., Cheng, P. C., & Peng, S. Y. (2020). *Angiostrongylus cantonensis* activates inflammasomes in meningoencephalitic BALB/c mice. *Parasitology International*, 77, e102119.
- Lee, U. E., & Friedman, S. L. (2011). Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 25(2), 195–206.*
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., & Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94(4), 491–501.
- Li, Y., Yuan, C., Wang, L., Lu, M., Wang, Y., Wen, Y., Yan, R., Xu, L., Song, X., & Li, X. (2016). Transmembrane protein 147 (TMEM147): another partner protein of *Haemonchus contortus* galectin on the goat peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *Parasites & Vectors*, 9(1), 355.
- Lichtenbergová, L., Lassmann, H., Jones, M. K., Kolářová, L., & Horák, P. (2011). *Trichobilharzia regenti*: Host immune response in the pathogenesis of neuroinfection in mice. *Experimental Parasitology*, 128(4), 328–335.

- Liu, Z., Wu, Y., Feng, Y., Wu, F., Liu, R. F., Wang, L. F., Liang, J. Y., Liu, J. H., Sun, X., & Wu, Z. D. (2017). Spleen atrophy related immune system changes attributed to infection of *Angiostrongylus cantonensis* in mouse model. *Parasitology Research*, 116(2), 577–587.
- López-Briones, S., Sciutto, E., Ventura, J. L., Zentella, A., & Fragoso, G. (2003). CD4+ and CD19+ splenocytes undergo apoptosis during an experimental murine infection with *Taenia crassiceps*. *Parasitology Research*, 90(2), 157–163.
- Lu, M., Tian, X., Yang, Z., Wang, W., Tian, A. L., Li, C., Yan, R., Xu, L., Song, X., & Li, X. (2020). Proteomic analysis revealed T cell hyporesponsiveness induced by *Haemonchus contortus* excretory and secretory proteins. *Veterinary Research*, 51(1), 65.
- Lundy, S. K., Lerman, S. P., & Boros, D. L. (2001). Soluble egg antigen-stimulated T helper lymphocyte apoptosis and evidence for cell death mediated by FasL+ T and B cells during murine *Schistosoma mansoni* infection. *Infection and Immunity*, 69(1), 271–280.
- Lundy, Steven K, & Boros, D. L. (2002). Fas ligand-expressing B-1a lymphocytes mediate CD4(+)-T-cell apoptosis during schistosomal infection: induction by interleukin 4 (IL-4) and IL-10. *Infection and Immunity*, 70(2), 812–819.
- Mačák Kubašková, T., Mudroňová, D., Gergel-Čechová, M., Hřčková, G. (2019). Differential sensitivity of myeloid and lymphoid cell populations to apoptosis in peritoneal cavity of mice with model larval *Mesocostoides vogae* infection. *Helminthologia*, 56(3), 183–195.
- Macháček, T., Panská, L., Dvořáková, H., & Horák, P. (2016). Nitric oxide and cytokine production by glial cells exposed in vitro to neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti*. *Parasites & Vectors*, 9(1), 579.
- Macháček, T., Turjanicová, L., Bulantová, J., Hrdý, J., Horák, P., & Mikeš, L. (2018). Cercarial dermatitis: a systematic follow-up study of human cases with implications for diagnostics. *Parasitology Research*, 117(12), 3881–3895.
- Macháček, T., Leontovyč, R., Horák, P. (2019). Transcriptomic profiling sheds new light on the invasion of the mouse spinal cord by the neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti*. *Helminthological Days 2019. Book of Abstracts*, Praha, Charles university, Faculty of science. p29.
- Majer, M., Macháček, T., Súkeníková, L., Hrdý, J., & Horák, P. (2020). The peripheral immune response of mice infected with a neuropathogenic schistosome. *Parasite Immunology*, 42(6), e12710.
- Malvezzi, H., Sharma, R., Agarwal, A., Abuzenadah, A. M., & Abu-Elmagd, M. (2014). Sperm quality after density gradient centrifugation with three commercially available media: A controlled trial. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), 121.
- Martinvalet, D., Zhu, P., & Lieberman, J. (2005). Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity*, 22(3), 355–370.
- Mejri, N., Hassen, I. E., Knapp, J., & Saidi, M. (2017). Impairment of Macrophage Presenting Ability and Viability by *Echinococcus granulosus* Antigens. In *Iran Journal of Immunology* 14(1), 35-50.

- Min, D. Y., Lee, Y. A., Ryu, J. S., Ahn, M. H., Chung, Y. B., Sim, S., & Shin, M. H. (2004). Caspase-3-mediated apoptosis of human eosinophils by the tissue-invading helminth *Paragonimus westermani*. *International Archives of Allergy and Immunology*, 133(4), 357–364.
- Mishra, R., Panda, S. K., Sahoo, P. K., Bal, M. S., & Satapathy, A. K. (2017). Increased Fas ligand expression of peripheral B-1 cells correlated with CD4 + T-cell apoptosis in filarial-infected patients. *Parasite Immunology*, 39(4), e12421.
- Nation, C. S., Da'Dara, A. A., & Skelly, P. J. (2020). The essential schistosome tegumental ectoenzyme SmNPP5 can block NAD-induced T cell apoptosis. *Virulence*, 11(1), 568–579.
- Nono, J. K., Pletinckx, K., Lutz, M. B., & Brehm, K. (2012). Excretory/secretory-products of *Echinococcus multilocularis* larvae induce apoptosis and tolerogenic properties in dendritic cells in vitro. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(2), e1516.
- Nutku, E., Hudson S. A., & Bochner, B. S. (2005). Mechanisms of Siglec-8-induced human eosinophil apoptosis: Role of caspases and mitochondrial injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336(3), 918-924.
- O'Connell, K. M., & Rogan, M. T. (2000). Apoptosis in human Jurkat T cells after culture with live *Taenia crassiceps cysticerci* in vitro. *Parasitology*, 120(6), 649–655.
- Piekarska, J., Michalski, A., Szczypka, M., & Obmińska-Mrukowicz, B. (2009). *Trichinella spiralis*: Effect of thymus factor X on apoptosis and necrosis in mice. *Experimental Parasitology*, 123(2), 128–133.
- Piekarska, J., Miśta, D., Houszka, M., Króliczewska, B., Zawadzki, W., & Gorczykowski, M. (2011a). *Trichinella spiralis*: The influence of short chain fatty acids on the proliferation of lymphocytes, the goblet cell count and apoptosis in the mouse intestine. *Experimental Parasitology*, 128(4), 419–426.
- Piekarska, J., Szczypka, M., Obmińska-Mrukowicz, B., & Gorczykowski, M. (2009b). Effect of phytohaemagglutinin-P on apoptosis and necrosis in *Trichinella spiralis* infected mice. *Veterinary Parasitology*, 159(3–4), 240–244.
- Pollard, T. D., Earnshaw, W. C., Lippincott-Schwartz, J., & Johnson, G. (2016). *Cell Biology E-Book*. Elsevier Health Sciences, 3, 797-815.*
- Prendergast, C. T., Sanin, D. E., Cook, P. C., & Mountford, A. P. (2015). CD4+ T cell hyporesponsiveness after repeated exposure to *Schistosoma mansoni* larvae is dependent upon interleukin-10. *Infection and Immunity*, 83(4), 1418–1430.
- Ranasinghe, S. L., Boyle, G. M., Fischer, K., Potriquet, J., Mulvenna, J. P., & McManus, D. P. (2018). Kunitz type protease inhibitor EgKI-1 from the canine tapeworm *Echinococcus granulosus* as a promising therapeutic against breast cancer. *PLoS ONE*, 13(8), e0200433.
- Robertson, G. S., Crocker, S. J., Nicholson, D. W., & Schulz, J. B. (2000). Neuroprotection by the inhibition of apoptosis. *Brain Pathology*, 10(2), 283–292.*
- Rumbley, C. A., Sugaya, H., Zekavat, S. A., el Refaei, M., Perrin, P. J., & Phillips, S. M. (1999). Activated eosinophils are the major source of Th2-associated cytokines in the schistosome granuloma. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(2), 1003–1009.

- Rumbley, C. A., Sugaya, H., Zekavat, S. A., Perrin, P. J., & Phillips, S. M. (2001). Elimination of lymphocytes, but not eosinophils, by fas-mediated apoptosis in murine schistosomiasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 65(5), 442–449.
- Semnani, R. T., Liu, A. Y., Sabzevari, H., Kubofcik, J., Zhou, J., Gilden, J. K., & Nutman, T. B. (2003). *Brugia malayi* Microfilariae Induce Cell Death in Human Dendritic Cells, Inhibit Their Ability to Make IL-12 and IL-10, and Reduce Their Capacity to Activate CD4 + T Cells . *The Journal of Immunology*, 171(4), 1950–1960.
- Semnani, R. T., Venugopal, P. G., Mahapatra, L., Skinner, J. A., Meylan, F., Chien, D., Dorward, D. W., Chaussabel, D., Siegel, R. M., & Nutman, T. B. (2008). Induction of TRAIL- and TNF- α -Dependent Apoptosis in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells by Microfilariae of *Brugia malayi* . *The Journal of Immunology*, 181(10), 7081–7089.
- Serradell, M. C., Guasconi, L., Cervi, L., Chiapello, L. S., & Masih, D. T. (2007). Excretory-secretory products from *Fasciola hepatica* induce eosinophil apoptosis by a caspase-dependent mechanism. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 117(3–4), 197–208.
- Serradell, M. C., Guasconi, L., & Masih, D. T. (2009). Involvement of a mitochondrial pathway and key role of hydrogen peroxide during eosinophil apoptosis induced by excretory-secretory products from *Fasciola hepatica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 163(2), 95–106.
- Shin, M. H. (2000). Excretory-secretory product of newly excysted metacercariae of *Paragonimus westermani* directly induces eosinophil apoptosis. *The Korean Journal of Parasitology*, 38(1), 17.
- Sikasunge, C. S., Phiri, I. K., Johansen, M. v., Willingham, A. L., & Leifsson, P. S. (2008). Host-cell apoptosis in *Taenia solium*-induced brain granulomas in naturally infected pigs. *Parasitology*, 135(10), 1237–1242.
- Solano, S., Zepeda, N., Copitin, N., Fernandez, A. M., Tato, P., & Molinari, J. L. (2015). A *Taenia crassiceps* metacestode factor enhances ovarian follicle atresia and oocyte degeneration in female mice. *Journal of Helminthology*, 89(1), 49–57.
- Solano, Sandra, Cortés, I. M., Copitin, N. I., Tato, P., & Molinari, J. L. (2006). Lymphocyte apoptosis in the inflammatory reaction around *Taenia solium* metacestodes in porcine cysticercosis. *Veterinary Parasitology*, 140(1–2), 171–176.
- Spotin, A., Majdi, M. M. A., Sankian, M., & Varasteh, A. (2012). The study of apoptotic bifunctional effects in relationship between host and parasite in cystic echinococcosis: A new approach to suppression and survival of hydatid cyst. *Parasitology Research*, 110(5), 1979–1984.
- Stansley, B., Post, J., & Hensley, K. (2012). A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 9, 115. *
- Sugaya, H., Abe, T., & Yoshimura, K. (2001). Eosinophils in the cerebrospinal fluid of mice infected with *Angiostrongylus cantonensis* are resistant to apoptosis. *International Journal for Parasitology*, 31(14), 1649–1658.
- Takahashi, K., Funata, N., Ikuta, F., & Sato, S. (2008). Neuronal apoptosis and inflammatory responses in the central nervous system of a rabbit treated with Shiga toxin-2. *Journal of neuroinflammation*, 5(1), 11.

- Tang, D., Kang, R., Berghe, T. vanden, Vandenabeele, P., & Kroemer, G. (2019). The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Research*, 29(5), 347-364.*
- Tato, P., Fernández, A. M., Solano, S., Borgonio, V., Garrido, E., Sepúlveda, J., & Molinari, J. L. (2004). A cysteine protease from *Taenia solium* metacestodes induce apoptosis in human CD4+ T-cells. *Parasitology Research*, 92(3), 197–204.
- Tsai, H. C., Lee, B. Y., Yen, C. M., Wann, S. R., Lee, S. S. J., & Chen, Y. S. (2015). Dexamethasone inhibits brain apoptosis in mice with eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* infection. *Parasites and Vectors*, 8(1), 200.
- Vasilev, S., Ilic, N., Gruden-Movsesijan, A., Vasilijic, S., Bosic, M., & Sofronic-Milosavljevic, L. (2015). Necrosis and apoptosis in *Trichinella spiralis*-mediated tumour reduction. *Central European Journal of Immunology*, 40(1), 42–53.
- Verhoven, B., Schlegel, R. A., & Williamson, P. (1995). Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic t lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 182(5), 1597–1607.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., & Reutellingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, 184(1), 39–51.
- Vrbová, K. (2017). In vitro cultivation of the trematode species *Trichobilharzia regenti*. Master's Thesis. Charles University. p19-20.
- Wang, J., Xu, F., Zhu, D., Duan, Y., Chen, J., Sun, X., He, X., Li, P., Sun, W., & Feng, J. (2014a). *Schistosoma japonicum* Soluble Egg Antigens Facilitate Hepatic Stellate Cell Apoptosis by Downregulating Akt Expression and Upregulating p53 and DR5 Expression. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(8), e3106.
- Wang, L., Du, F., & Wang, X. (2008). TNF- α Induces Two Distinct Caspase-8 Activation Pathways. *Cell*, 133(4), 693–703.
- Wang, W., Wang, S., Zhang, H., Yuan, C., Yan, R., Song, X., Xu, L., & Li, X. (2014b). Galectin Hco-gal-m from *Haemonchus contortus* modulates goat monocytes and T cell function in different patterns. *Parasites & Vectors*, 7(1), 342.
- Wang, X. L., Fu, B. Q., Yang, S. J., Wu, X. P., Cui, G. Z., Liu, M. F., Zhao, Y., Yu, Y. L., Liu, X. Y., Deng, H. K., Chen, Q. J., & Liu, M. Y. (2009). *Trichinella spiralis*-A potential anti-tumor agent. *Veterinary Parasitology*, 159(3–4), 249–252.
- Wang, X. L., Liu, M. Y., Sun, S. M., Liu, X. L., Yu, L., Wang, X. R., Chu, L. X., Rosenthal, B., Shi, H. N., Boireau, P., Wang, F., Zhao, Y., & Wu, X. P. (2013). An anti-tumor protein produced by *Trichinella spiralis* induces apoptosis in human hepatoma H7402 cells. *Veterinary Parasitology*, 194(2–4), 186–188.
- Yan, H. li, Xue, G., Mei, Q., Ding, F. xiang, Wang, Y. zhao, & Sun, S. han. (2008). Calcium-dependent proapoptotic effect of *Taenia solium* metacestodes annexin B1 on human eosinophils: A novel strategy to prevent host immune response. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 40(10), 2151–2163.

- Yang, F., Sun, X., Shen, J., Yu, L. P., Liang, J. Y., Zheng, H. Q., & Wu, Z. D. (2013). A recombinant protein (rSj16) derived from *Schistosoma japonicum* induces cell cycle arrest and apoptosis of murine myeloid leukemia cells. *Parasitology Research*, 112(3), 1261–1272.
- Yang, Q., Qu, J., Jin, C., Feng, Y., Xie, S., Zhu, J., Liu, G., Xie, H., Qiu, H., Qi, Y., Mu, J., & Huang, J. (2019). *Schistosoma japonicum* Infection Promotes the Response of Tfh Cells Through Down-Regulation of Caspase-3—Mediating Apoptosis. *Frontiers in Immunology*, 10(1), 2154.
- Yoshimura, K. (1998). The role of CD4+ and CD8+ T-cells in host morbidity and innate resistance to *Angiostrongylus cantonensis* in the mouse. *Parasitology Research*, 84(2), 91–99.
- Yu, Y. R., Deng, M. J., Lu, W. W., Zhang, J. S., Jia, M. Z., Huang, J., & Qi, Y. F. (2014). Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis is activated in intestines of mice with *Trichinella spiralis* infection. *Experimental Parasitology*, 145(1), 1–6.
- Yuan, C., Zhang, H., Wang, W., Li, Y., Yan, R., Xu, L., Song, X., & Li, X. (2015). Transmembrane protein 63A is a partner protein of *Haemonchus contortus* galectin in the regulation of goat peripheral blood mononuclear cells. *Parasites and Vectors*, 8(1), 211.
- Zakeri, A. (2017). Helminth-induced apoptosis: a silent strategy for immunosuppression. *Parasitology*, 144(13), 1663–1676.*
- Zepeda, N., Copitin, N., Chávez, J. L., García, F., Jaimes-Miranda, F., Rincón-Heredia, R., Paredes, R., Solano, S., Fernández, A. M., & Molinari, J. L. (2019). Hippocampal sclerosis induced in mice by a *Taenia crassiceps* metacestode factor. *Journal of Helminthology*, 93(6), 690–696.
- Zepeda, N., Solano, S., Copitin, N., Chávez, J. L., Fernández, A. M., García, F., Tato, P., & Molinari, J. L. (2017). Apoptosis of mouse hippocampal cells induced by *Taenia crassiceps* metacestode factor. *Journal of Helminthology*, 91(2), 215–221.
- Zepeda, N., Tirado, R., Copitin, N., Solano, S., Fernández, A. M., Tato, P., & Molinari, J. L. (2016). A *Taenia crassiceps* factor induces apoptosis of spleen CD4+T cells and TFG- β and Foxp3 gene expression in mice. *Journal of Helminthology*, 90(2), 223–231.
- Zepeda, Nadia, Copitin, N., Solano, S., Fernández, A. M., Tato, P., & Molinari, J. L. (2011a). *Taenia crassiceps*: A secretion-substance of low molecular weight leads to disruption and apoptosis of seminiferous epithelium cells in male mice. *Experimental Parasitology*, 128(3), 184–191.
- Zepeda, Nadia, Copitin, N., Solano, S., González, M., Fernández, A. M., Tato, P., & Molinari, J. L. (2011b). *Taenia crassiceps*: Infections of male mice lead to severe disruption of seminiferous tubule cells and increased apoptosis. *Experimental Parasitology*, 127(1), 153–159.
- Zepeda, Nadia, Solano, S., Copitin, N., Fernández, A. M., Hernández, L., Tato, P., & Molinari, J. L. (2010). Decrease of peritoneal inflammatory CD4+, CD8+, CD19+ lymphocytes and apoptosis of eosinophils in a murine *Taenia crassiceps* infection. *Parasitology Research*, 107(5), 1129–1135.
- Zhang, C., Wang, J., Lü, G., Li, J., Lu, X., Mantion, G., Vuitton, D. A., Wen, H., & Lin, R. (2012). Hepatocyte proliferation/growth arrest balance in the liver of mice during *E. multilocularis* infection: A coordinated 3-stage course. *PLoS ONE*, 7(1), e30127.
- Zong, W. X., Li, C., Hatzivassiliou, G., Lindsten, T., Yu, Q. C., Yuan, J., & Thompson, C. B. (2003). Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 162(1), 59–69.

8. Přílohy

8.1. Bioinformatická analýza

8.2. Gatovací strategie

8.3. Splenocyty z infikovaných myší *T. regenti*

8.4. Stimulace a restimulace splenocytů

8.1. Bioinformatická analýza

Tabulky (Tab. p1 a Tab. p2) s expresí diferenciálně exprimovaných námi vybraných genů asociovaných s apoptózou u zdravých myší a myší infikovaných *T. regenti*. Pro každý časový bod infekce (7, 14 a 24 dpi) byly data i ze stejně starých zdravých myší. Pro každý časový bod byly využity data ze 4 myší. V jednotlivých sloupcích tabulek je uváděna míra exprese transkriptů v TPM (z angl. transcripts per million). **Červeně** jsou označeny geny proti-apoptické a **modře** geny pro-apoptické.

Tabulka p1: Expresce diferenciálně exprimovaných genů asociovaných s apoptózou u zdravých (kontrolních) myší.

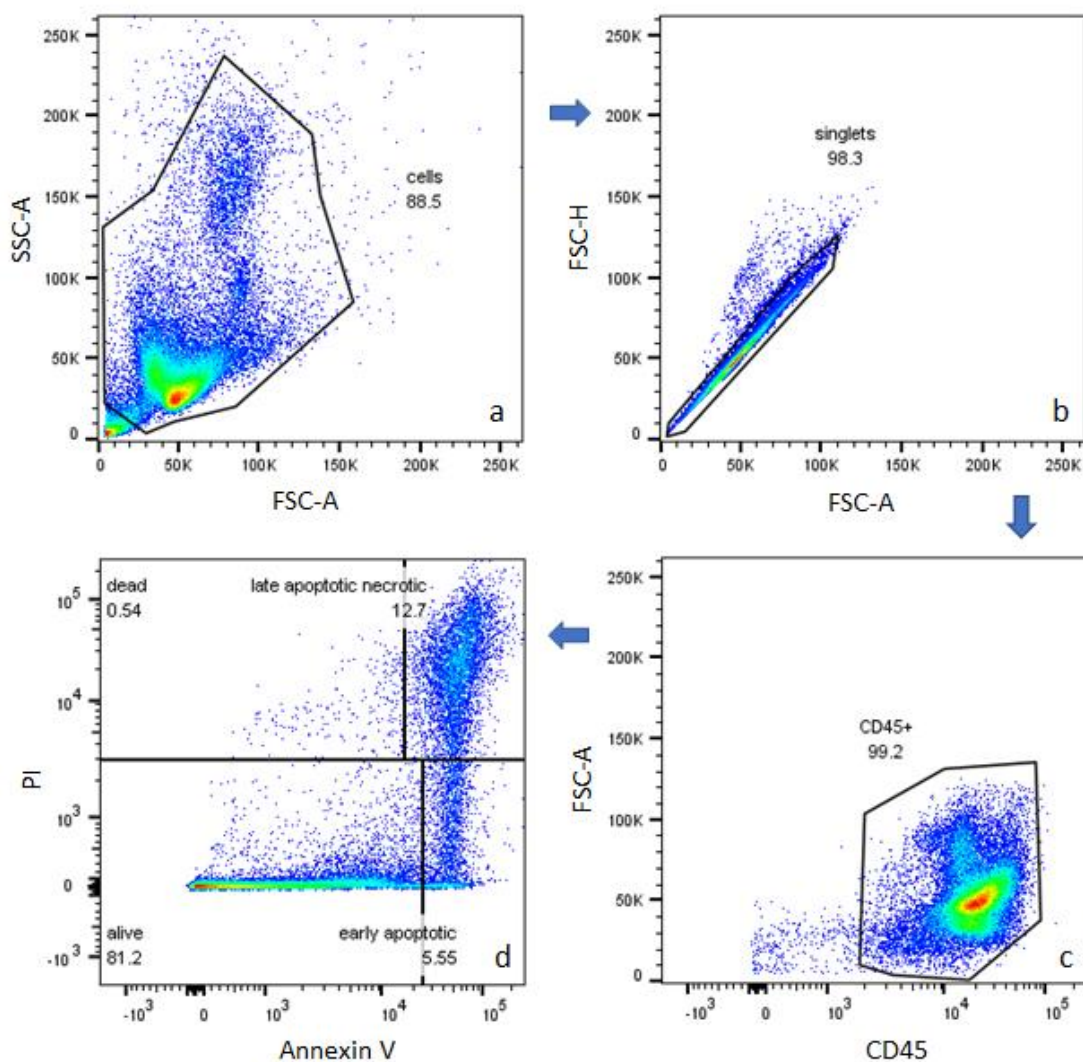
Gen	ID transkriptu	Kontrola 7 dpi				Kontrola 14 dpi				Kontrola 21 dpi			
<i>Bcl2</i>	NM_009741.5	8.02	6.55	6.52	8.06	4.91	5.57	6.4	6.36	6.07	6.65	6.59	8.09
	NM_177410.3	0.06	0	0.06	0.23	0.08	0	0.13	0.17	0.14	0.06	0	0.08
<i>Pik3r1</i>	NM_001024955.2	10.88	11.28	10.18	10.76	10.57	6.49	11.87	11.66	8.86	8.96	7.53	9.08
	NM_001077495.2	33.61	30.19	31	37.53	20.89	29.41	31.61	31.55	35.19	30.33	33.48	40.66
<i>Akt1</i>	NM_001165894.1	1.51	2.1	1.42	1.33	0.78	1.06	1.84	2.21	1.81	0.36	0	0.99
	NM_001331107.1	96.42	97.36	92.63	106.25	10.65	15.73	11.06	29.2	0	8.69	8.67	5.29
	NM_009652.3	31.14	30.69	23.48	23.48	82.08	90.06	96.03	77.45	97	96.26	80.7	91.67
<i>Akt2</i>	NM_001110208.2	7.2	5.78	6.27	7.15	3.95	4.58	3.98	5.21	3.97	4.34	4.35	4.83
	NM_001331108.1	0.13	0.21	0.23	0.07	0	0.25	0.46	0.22	0.16	0.38	0.15	0.28
	NM_001331109.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Flip</i>	NM_007434.4	0.11	0	0.65	0.14	0.13	0.14	0	0.69	0.37	0.17	0.12	0
	NM_001289704.3	0	0	0	0	0	0	0.82	0	0	2.2	0	0
	NM_001293804.2	0.59	0	1.59	0.98	0	0.46	0.48	0.12	0.42	0.83	0.85	0
	NM_001293805.2	1.21	1.22	0.33	1.36	1.91	1.3	1.33	2.18	0.88	1.2	0	2.77
	NM_001355056.1	0	0	0	0	0	0	0	0.36	0.19	0	0	0
	NM_009805.4	0.87	0.7	0.5	0.64	0.63	0.8	0.73	0.56	0.83	0.39	0.84	0.91
	NM_207653.6	0	0.01	1.69	0.65	0	0	0	0	0.58	0	0.03	0
<i>Naip2</i>	NM_001126182.2	0.4	0.67	0.64	0.94	0.42	0.4	0.65	0.48	0.39	0.62	0.53	0.7
<i>BclXL</i>	NM_001289717.1	3.38	6.64	8.69	5.41	0.9	0.43	2.71	3.19	3.44	0.96	3.55	1
<i>Tnfrsf10</i>	NM_009425.2	0.65	0.36	0.43	0.47	0.47	0.54	0.64	0.73	1.06	0.69	0.49	0.76
<i>Fas</i>	NM_001146708.1	0	0.21	0.82	0.45	0	0	0.17	0.22	0	0.22	0.23	0
	NM_007987.2	3.27	3.15	4.96	4.3	2.29	2.35	2.39	2.35	2.45	3.04	3.08	4.56
<i>Apaf1</i>	NM_001042558.1	1.69	0.67	1.41	2.26	0.37	1.06	1.35	1.3	2.43	0.62	1.26	0.31
	NM_001282947.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bim</i>	NM_009684.2	1.48	1.99	1.37	1	1.32	0.95	0.74	0.81	0	1.47	0.79	2.44
	NM_207680.2	1.16	0.87	1.27	1.1	0.93	1.54	0.59	1.35	2.04	0.78	1.04	1.47
	NM_011609.4	20.04	17.99	18.84	16.86	11.12	12.7	14.38	15.94	14.11	13.07	13.96	13.99
<i>Fadd</i>	NM_010175.6	3.75	3.27	2.99	2.64	2.74	3.63	3.44	3.41	3.16	3.48	3.12	3.09
<i>Bax</i>	NM_007527.3	81.04	80.6	72.52	78.35	30.26	31.62	34.19	33.5	28.7	24.78	26.87	33.38
<i>Gzmb</i>	NM_013542.3	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0	0.05	0.1	0	0	0	0
<i>Prf1</i>	NM_011073.3	0	0	0.04	0	0	0	0.03	0	0	0	0.03	0
<i>Bid</i>	NM_007544.4	4.89	4.61	4.95	6.63	5.43	6.06	5.15	3.75	5.61	5.16	4.56	7.57

Tabulka p2: Expres diferenciálně exprimovaných genů asociovaných s apoptózou u myší nakažených *T. regenti*.

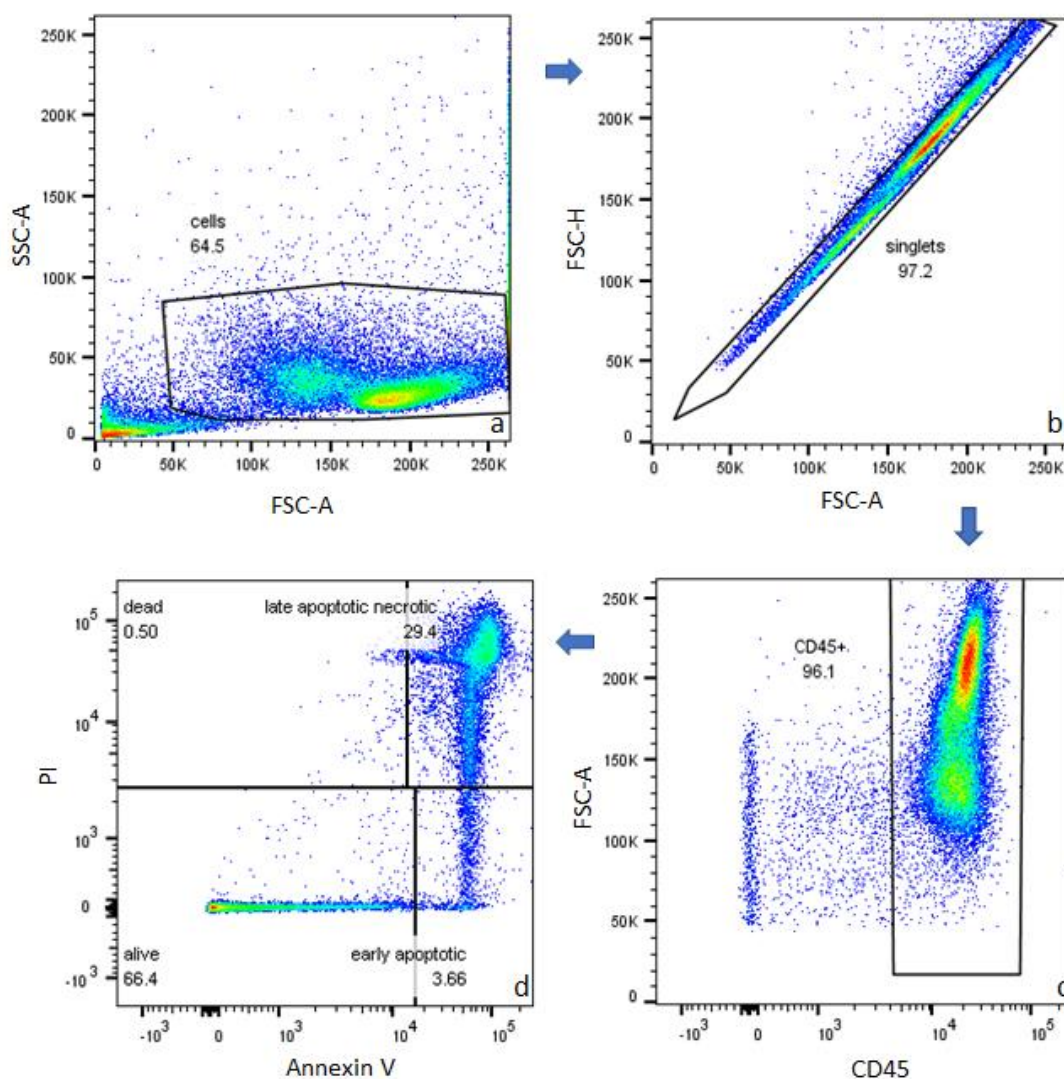
Gen	ID transkriptu	7 dpi				14 dpi				21 dpi			
<i>Bcl2</i>	NM_009741.5	3.43	4.29	4.91	5.89	3.48	7.44	9.26	9.1	8.47	9.17	9.92	8.73
	NM_177410.3	0.29	0.16	0.12	0.19	0.16	0.24	0.05	0.15	0.05	0.11	0.19	0.07
<i>Pik3r1</i>	NM_001024955.2	11.09	15.9	19.76	23.12	9.74	24.88	11.6	10.57	18	14.98	12.69	15.35
	NM_001077495.2	0.91	0.95	1.47	4.08	0.07	8.93	31.24	31.5	22.97	24.71	28.96	29.12
<i>Akt1</i>	NM_001165894.1	1.02	0.56	1.3	1.22	0.58	1.09	2.68	0.95	0	1.33	0.39	1.48
	NM_001331107.1	63.75	82.03	82.35	90.58	59.08	87.86	101.04	105.24	95.12	99.65	104.86	112.02
	NM_009652.3	0.71	7.75	2.85	10.34	0.72	17.24	16.67	16.31	11.52	17.87	17.73	11.37
<i>Akt2</i>	NM_001110208.2	2.81	2.91	3.47	4.36	0.89	5.93	5.94	5.57	5.37	5.49	6.21	7.37
	NM_001331108.1	0.22	0.19	0	0.09	0	0.08	0.34	0.42	0.18	0.42	0.07	0.19
	NM_001331109.1	0.42	0	0.26	0	2.53	0	0.11	0	0	0	0	0
	NM_007434.4	0	0	0.26	0.18	0	0	0.1	0	0.36	0	0	0.15
<i>Flip</i>	NM_001289704.3	0	0	0	0	0.03	1.17	0	0	0.88	0	0	0
	NM_001293804.2	0	0	0.16	0	0.06	1.74	3.57	2.33	1.58	2.5	1.32	1.54
	NM_001293805.2	3.61	2.7	3.69	4.87	2.53	4.07	2.05	1.38	3.76	1.86	1.96	1.13
	NM_001355056.1	0	0.2	0	0	0	0	0	0.61	0	0	0	0
	NM_009805.4	0.23	0.95	1.08	1.18	0	2.29	3.04	2.12	1.68	1.5	0.07	1.27
	NM_207653.6	0	0	0	0	0	0	0.51	1.03	0	0	1.97	2.03
<i>Naip2</i>	NM_001126182.2	1.7	1.92	2.47	2.63	1.49	4.37	7.23	4.49	3.51	3.24	4.36	3.42
<i>BclXL</i>	NM_001289717.1	1.54	2.44	6.38	5.75	2	3.06	5.46	3.2	4.92	7	5.89	8.72
<i>Tnfrsf10</i>	NM_009425.2	0.38	0.47	0.59	0.7	0.37	1.21	1.35	0.7	0.87	0.98	1.13	1.13
<i>Fas</i>	NM_001146708.1	0.12	0.54	0.29	0.48	0.43	0.37	0.9	0.2	0.42	0.23	0.49	0.23
	NM_007987.2	5.31	5.27	8.12	10.6	4.48	9.53	10.91	10.3	8.94	7.98	8.87	6.83
<i>Apaf1</i>	NM_001042558.1	0.65	0	0	0.54	0	0.83	1.14	0.46	0.69	0	0.38	0
	NM_001282947.1	0	1.26	0.48	1.39	0.53	0	0	0	0	0	0	0
	NM_009684.2	0	0	1.21	0	0	1.79	2.26	2.65	2.39	2.49	2.95	3.03
<i>Bim</i>	NM_207680.2	0	1.04	0.37	0.54	0	0.97	3.83	2.89	1.04	2.27	2.18	2.11
<i>Tnfr1</i>	NM_011609.4	36.85	30.34	39.55	46.08	26.49	49.24	51.8	52.02	33.02	34.55	37.25	34.03
<i>Fadd</i>	NM_010175.6	3.43	3.29	3.64	3.46	3.84	3.89	4.53	4.4	3.46	3.15	4.21	3.19
<i>Bax</i>	NM_007527.3	125.26	120.72	122.98	110.08	113.74	97.63	99.41	100.55	80.16	76.44	86.03	75.97
<i>Gzmb</i>	NM_013542.3	7.42	6.72	8.12	6.94	1.62	3.96	3.33	2.19	0.53	0.96	0.57	1.8
<i>Prf1</i>	NM_011073.3	0	0	0	0	0	0	0.1	0	0.08	0	0	0
<i>Bid</i>	NM_007544.4	3.82	5.99	4.87	4.95	2.66	5.09	5.44	7.66	8.2	6.03	6.77	5.73

8.2. Gatovací strategie

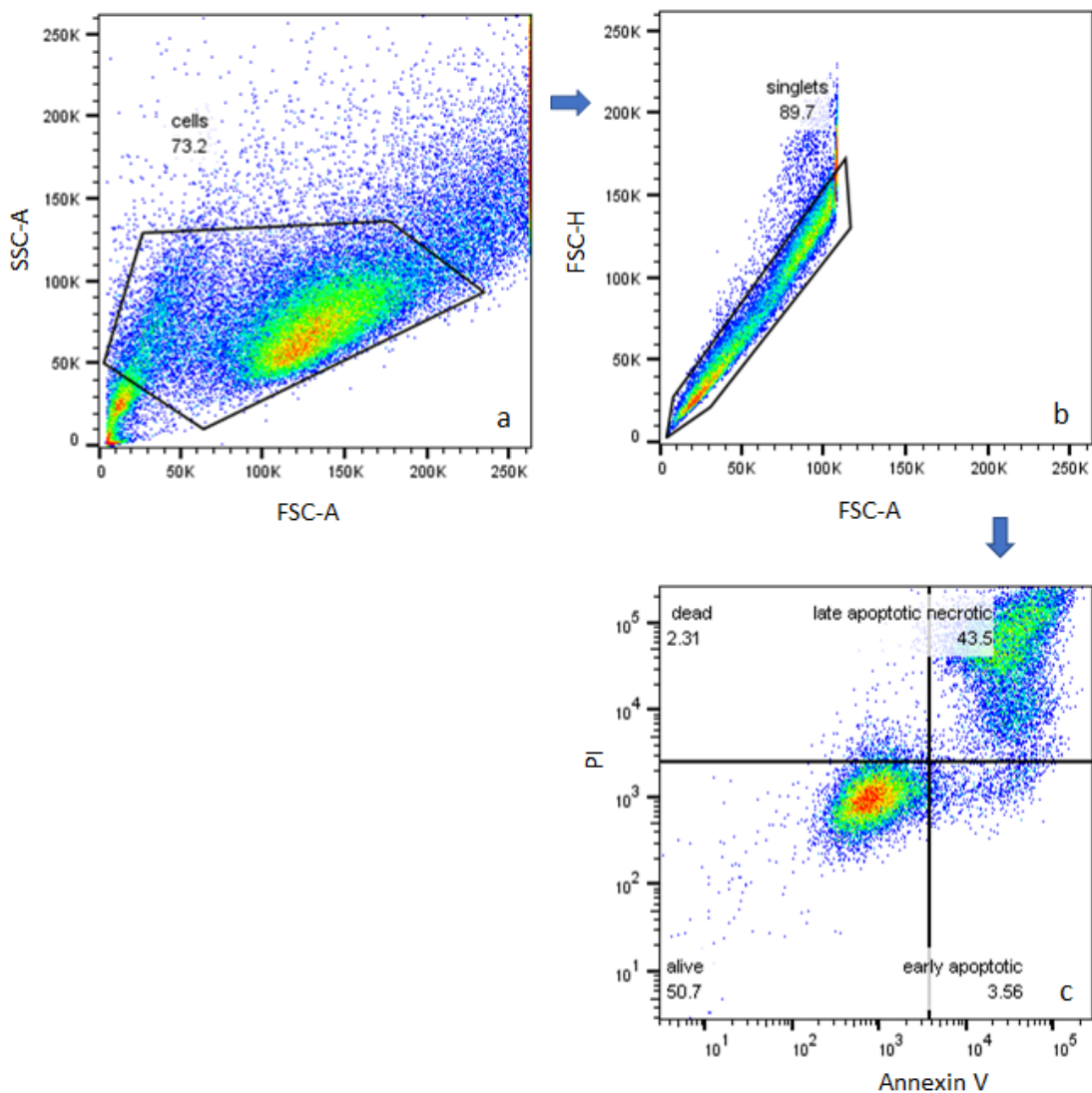
Gatovací strategie pro jednotlivé buněčné linie a kultury použité při analýze dat z průtokové cytometrie z *in vivo* a *in vitro* experimentů (Obr. p1-p9).



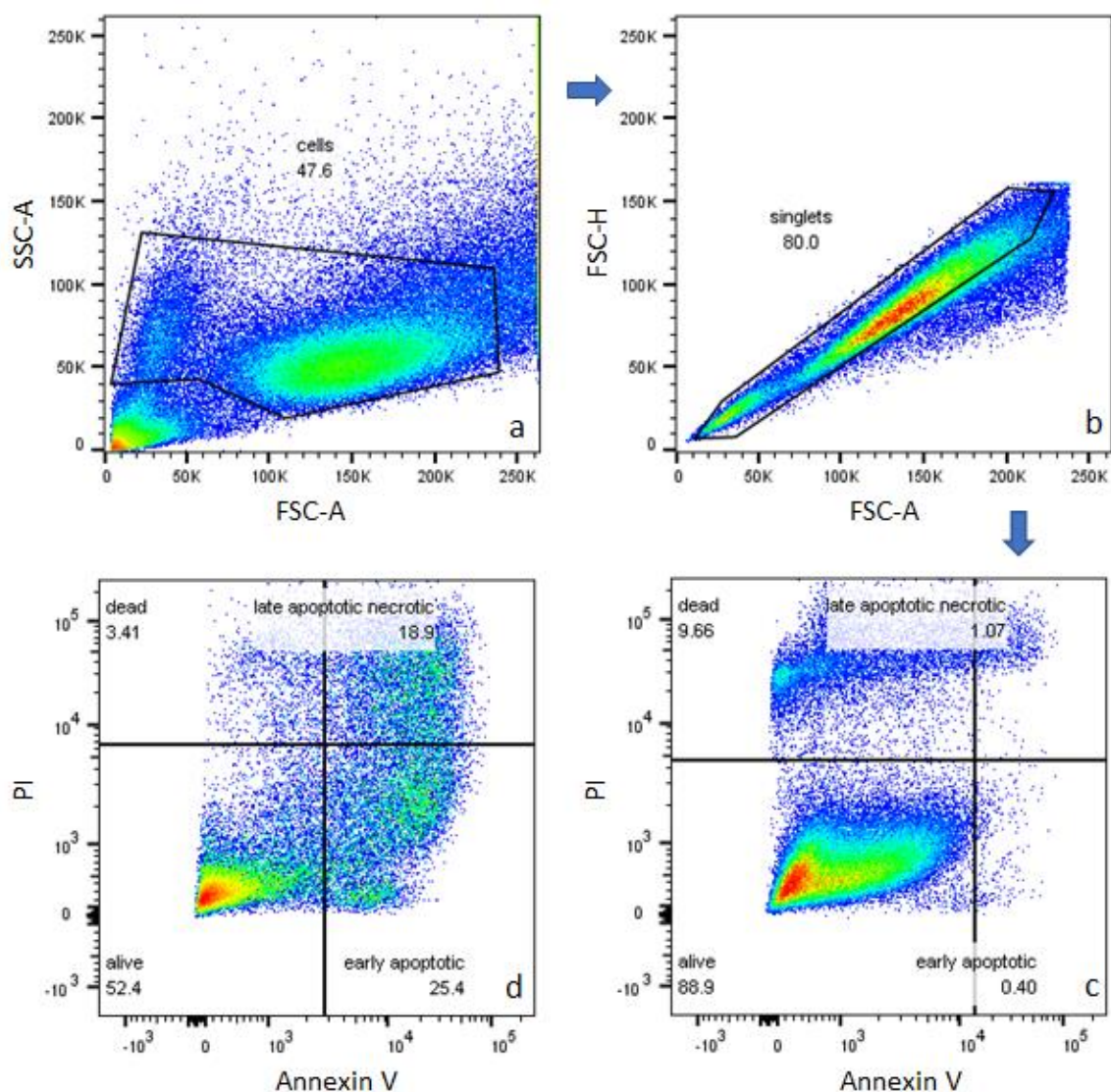
Obrázek p1: Gatovací strategie použitá pro analýzu splenocytů. Dle granularity a velikosti (SSC-A/FSC-A) byla vymezena oblast odpovídající splenocytům (a), následně byly z těchto událostí vyloučeny shluky buněk (FCS-H/FSC-A) (b). Na základě zobrazení CD45 pozitivních buněk byla identifikována populace CD45+ leukocytů (c). U nichž bylo analyzováno relativní zastoupení buněk, jež byly identifikovány jako časně apoptické (AnnexinV+/PI-) (d).



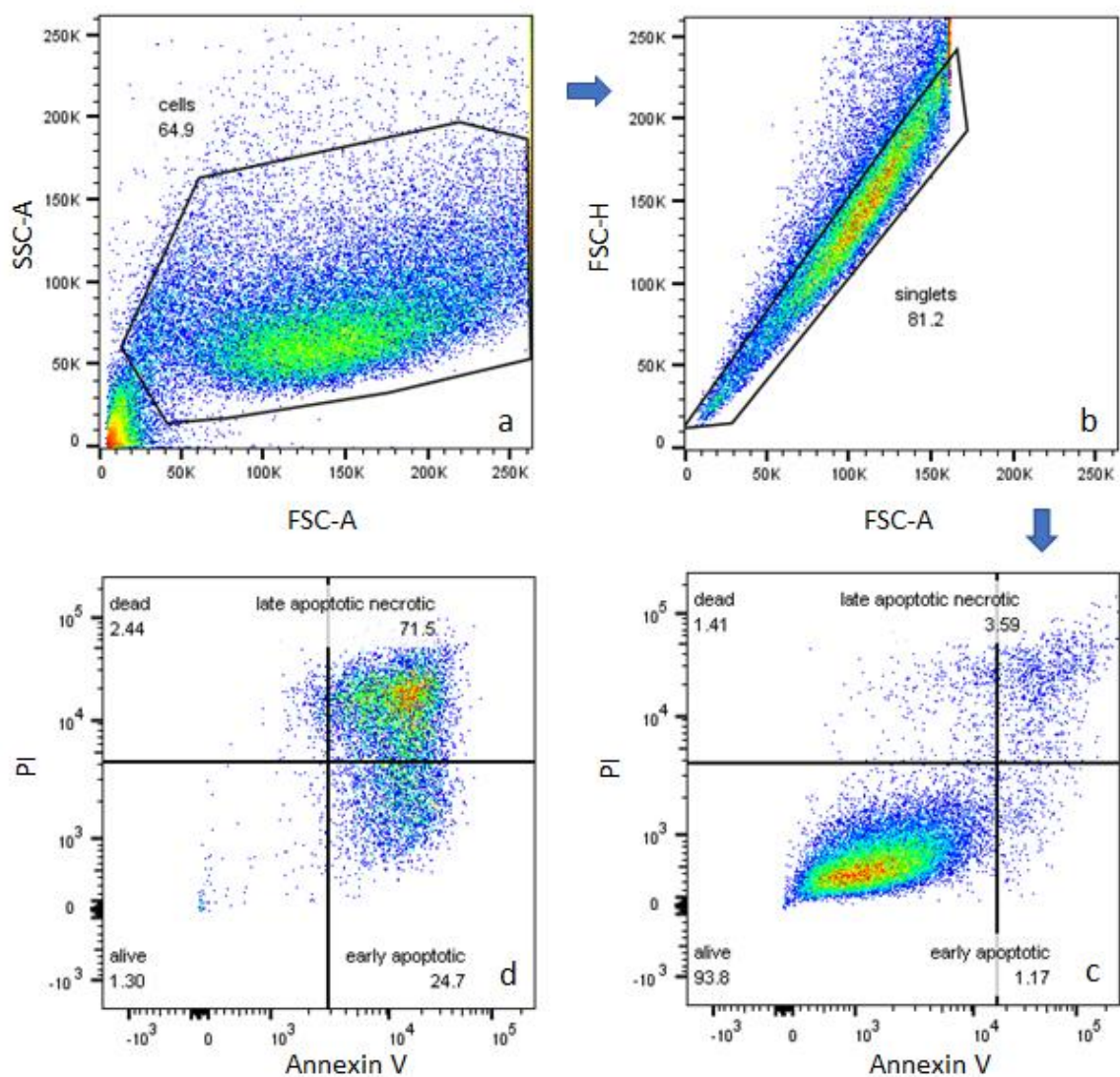
Obrázek p2: Gatovací strategie použitá pro analýzu buněk z lymfatických uzlin. Dle granularity a velikosti (SSC-A/FSC-A) byla vymezena oblast odpovídající buňkám z lymfatických uzlin (a), následně byly z těchto událostí vyloučeny shluky buněk (FCS-H/FSC-A) (b). Na základě zobrazení CD45 pozitivních buněk byla identifikována populace CD45+ leukocytů (c). U nichž bylo dále analyzováno relativní zastoupení buněk, jež byly identifikovány jako časně apoptické (AnnexinV+/PI-) (d).



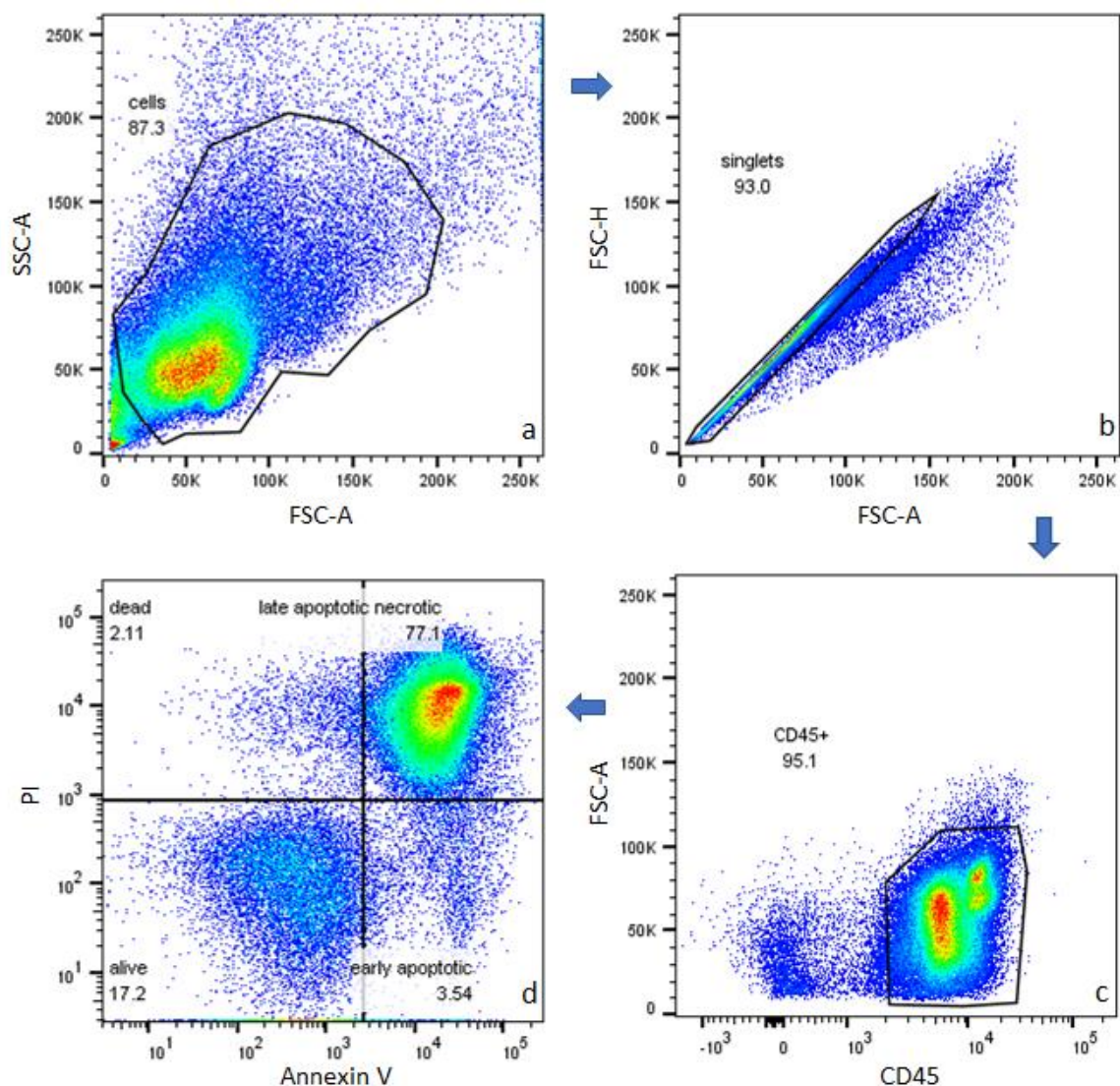
Obrázek p3: Gatovací strategie použitá pro analýzu HaCaT buněk. Dle granularity a velikosti (SSC-A/FSC-A) byla vymezena oblast odpovídající HaCaT buňkám (a), následně byly z těchto událostí vyloučeny shluky buněk (FSC-H/FSC-A) (b). Dále bylo u buněk analyzováno relativní zastoupení buněk, jež byly identifikovány jako časně apoptické (AnnexinV+/PI-) (c).



Obrázek p4: Gatovací strategie použitá pro analýzu NIH 3T3 fibroblastů. Dle granularity a velikosti (SSC-A/FSC-A) byla vymezena oblast odpovídající NIH 3T3 buňkám (a), následně byly z těchto událostí vyloučeny shluky buněk (FCS-H/FSC-A) (b). Dále bylo u buněk analyzováno relativní zastoupení buněk, jež byly identifikovány jako časně apoptické (AnnexinV+/PI-) (c). Stejná gatovací strategie byla použita u všech vzorků NIH 3T3 buněk při detekci apoptózy s výjimkou vzorků stimulovaných staurosporinem, kde byl gating pozměněn (d).

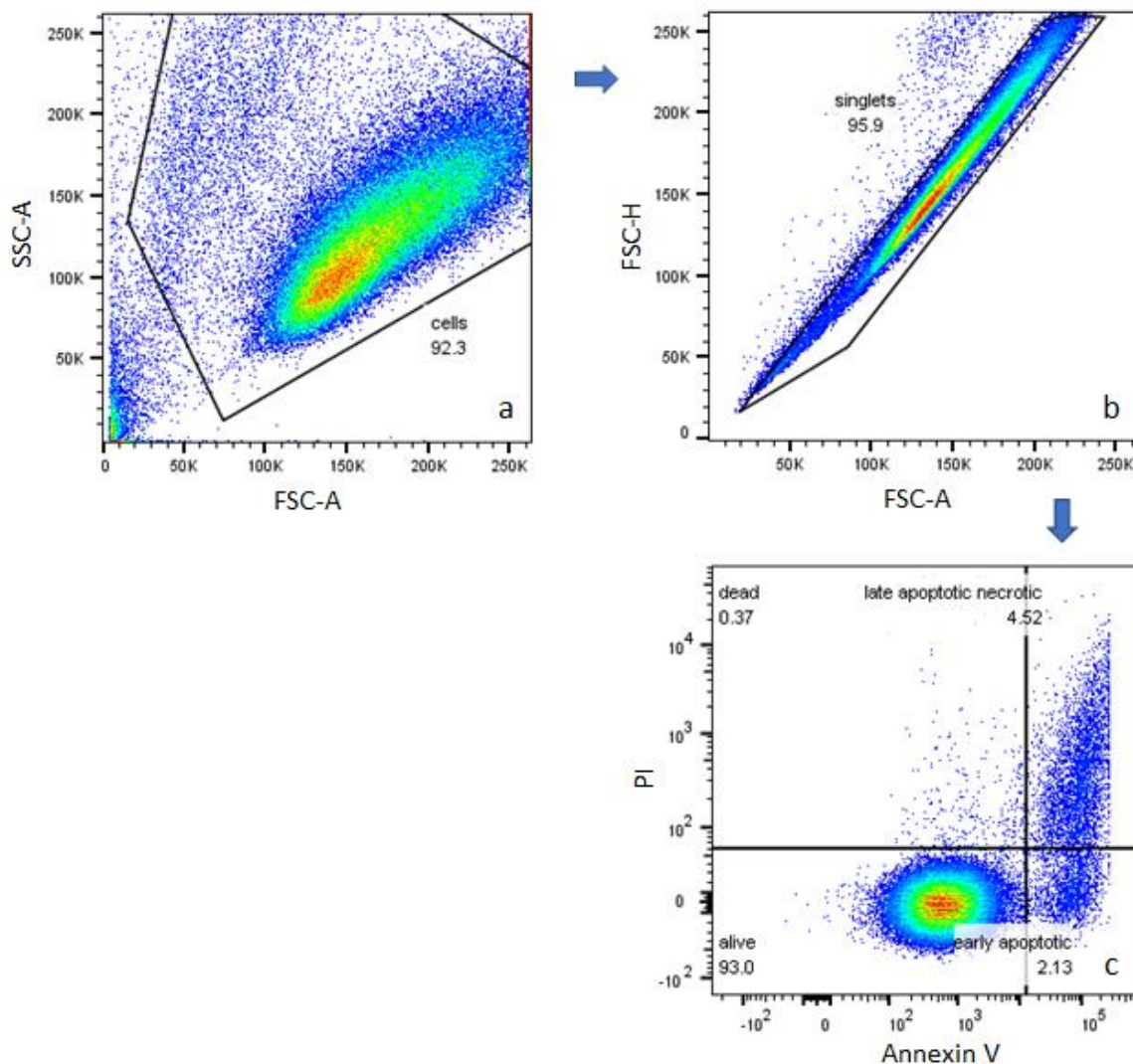


Obrázek p5: Gatovací strategie použitá pro analýzu Hff buněk. Dle granularity a velikosti (SSC-A/FSC-A) byla vymezena oblast odpovídající Hff buňkám (a), následně byly z těchto událostí vyloučeny shluky buněk (FSC-H/FSC-A) (b). Dále bylo u buněk analyzováno relativní zastoupení buněk, jež byly identifikovány jako časně apoptické (AnnexinV+/PI-) (c). Stejná gatovací strategie byla použita u všech vzorků Hff buněk při detekci apoptózy s výjimkou vzorků stimulovaných staurosporinem, kde byl gating pozměněn (d).

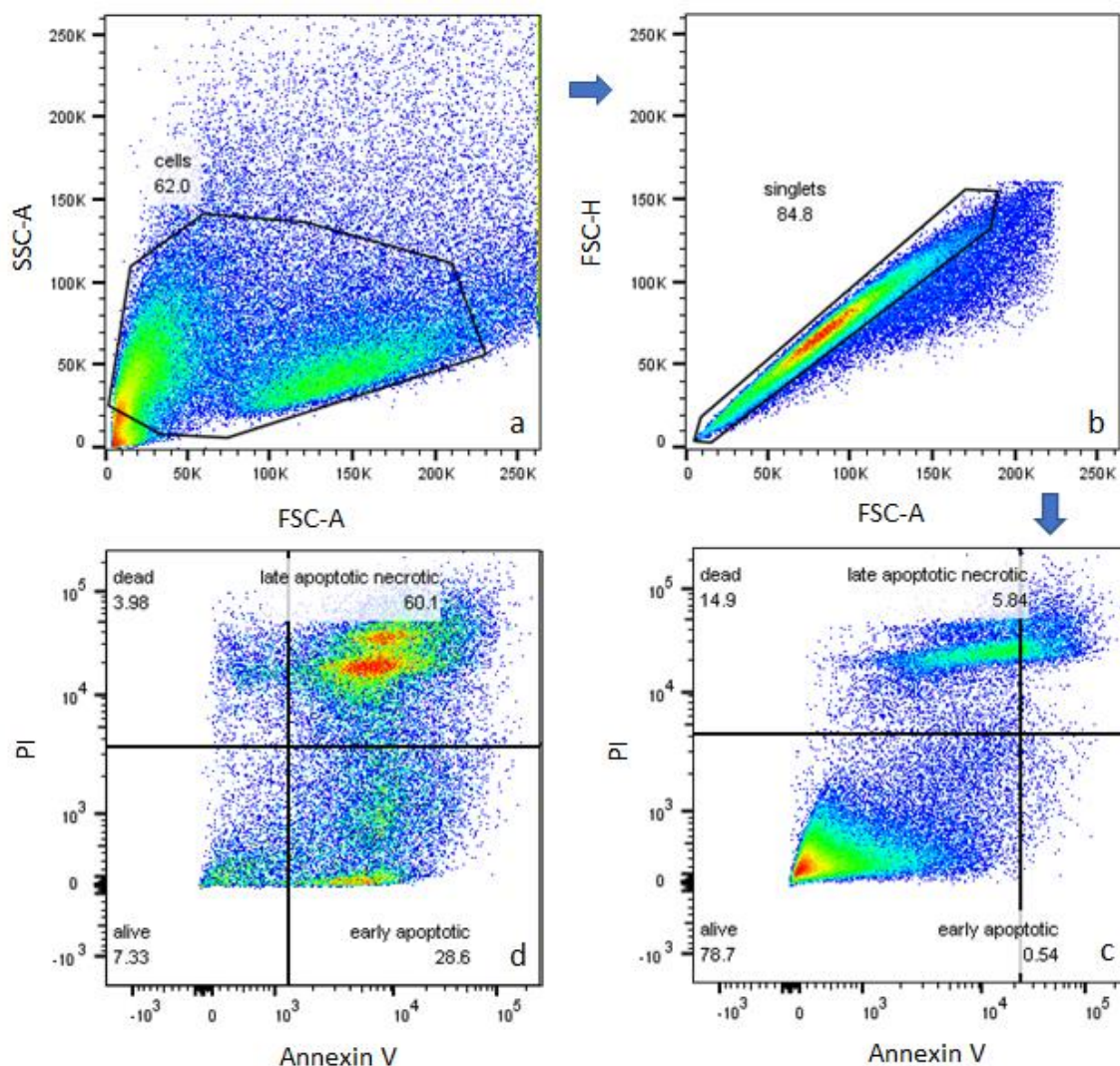


Obrázek p6: Gatovací strategie použitá pro analýzu stimulovaných a restimulovaných splenocytů.

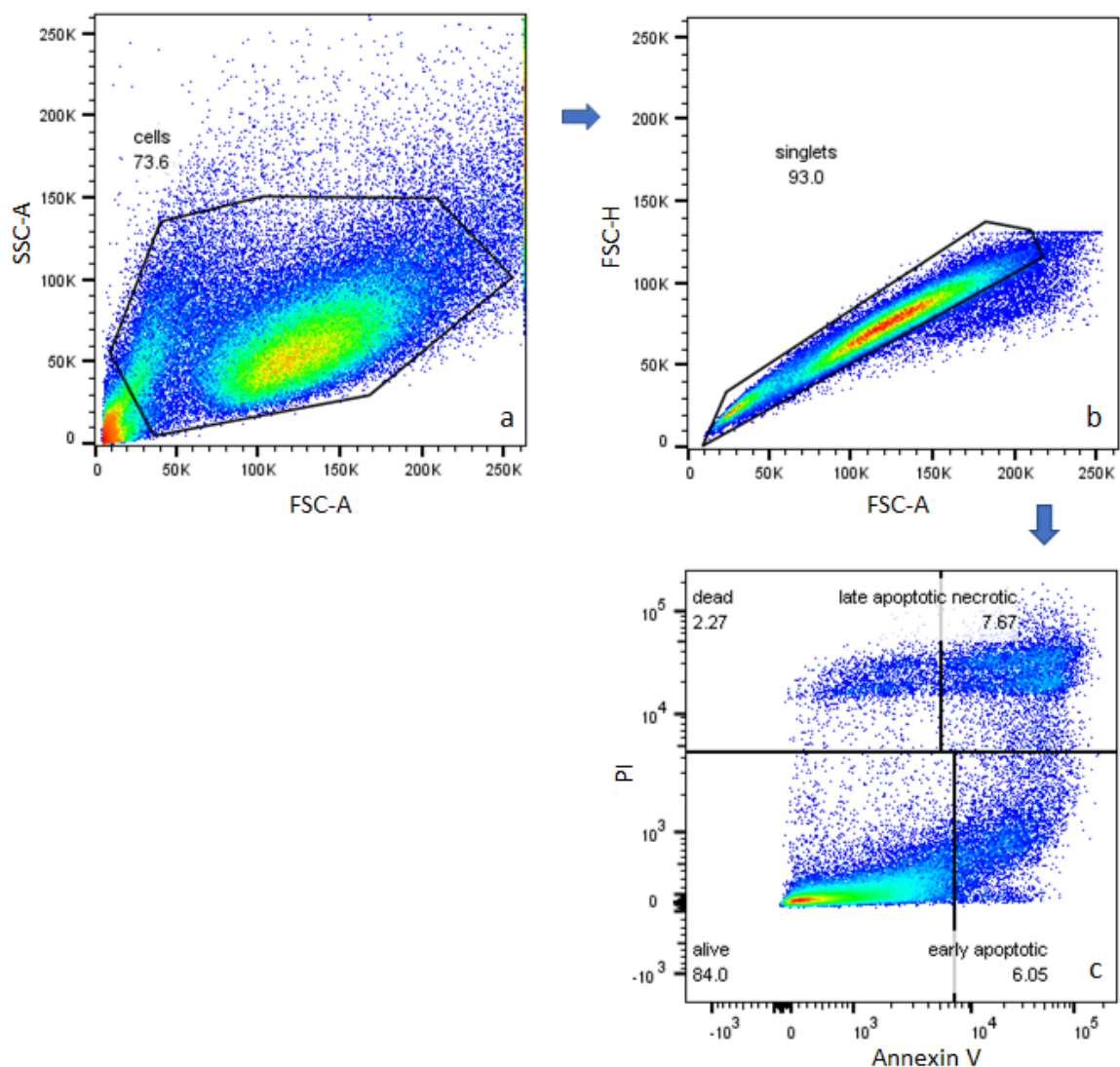
Dle granularity a velikosti (SSC-A/FSC-A) byla vymezena oblast odpovídající splenocytům (a), následně byly z těchto událostí vyloučeny shluky buněk (FSC-H/FSC-A) (b). Na základě zobrazení CD45 pozitivních buněk byla identifikována populace CD45+ T lymfocytů (c). U nichž bylo analyzováno relativní zastoupení buněk, jež byly identifikovány jako časně apoptické (AnnexinV+/PI-) (d).



Obrázek p7: Gatovací strategie použitá pro analýzu Jurkat T lymfocytů. Dle granularity a velikosti (SSC-A/FSC-A) byla vymezena oblast odpovídající Jurkat buňkám (a), následně byly z těchto událostí vyloučeny shluky buněk (FCS-H/FSC-A) (b). Dále bylo u buněk analyzováno relativní zastoupení buněk, jež byly identifikovány jako časně apoptické (AnnexinV+/PI-) (c).



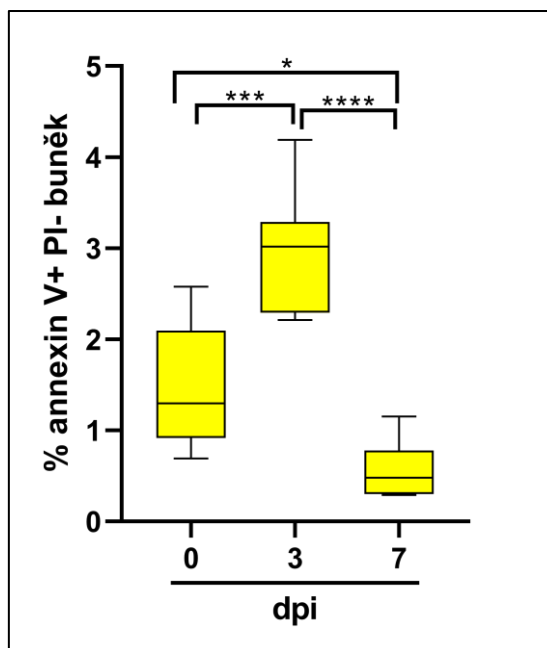
Obrázek p8: Gatovací strategie použitá pro analýzu gliových buněk. Dle granularity a velikosti (SSC-A/FSC-A) byla vymezena oblast odpovídající astrocytům a mikroglíím (a), následně byly z těchto událostí vyloučeny shluky buněk (FCS-H/FSC-A) (b). Dále bylo u buněk analyzováno relativní zastoupení buněk, jež byly identifikovány jako časně apoptické (AnnexinV+/PI-) (c).



Obrázek p9: Gatovací strategie použitá pro analýzu Neuro2a buněk. Dle granularity a velikosti (SSC-A/FSC-A) byla vymezena oblast odpovídající Neuro2a buňkám (a), následně byly z těchto událostí vyloučeny shluky buněk (FSC-H/FSC-A) (b). Dále bylo u buněk analyzováno relativní zastoupení buněk, jež byly identifikovány jako časně apoptické (AnnexinV+/PI) (c).

8.3. Splenocyty z infikovaných myší *T. regenti*

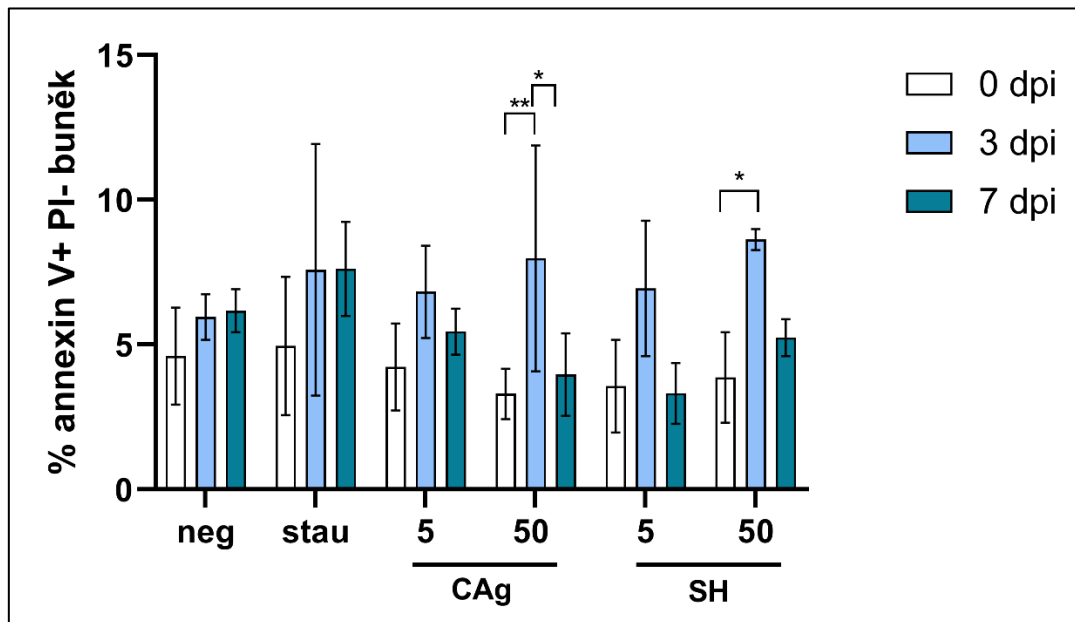
V prvotním experimentu (Obr. p10), na jehož základě jsme provedli experiment rozšířenější o časové body infekce (0, 3, 7, 14, 21 a 28 dpi), bylo pozorováno zvýšení zastoupení apoptických leukocytů oproti zdravé kontrole a 7dpi. V čase 7 dpi byl zároveň pozorován pokles zastoupení oproti zdravé kontrole a 3 dpi. V tomto počátečním experimentu bylo zastoupení apoptických buněk v obou časových bodech infekce (3 a 7 dpi) statisticky signifikantní, podobný trend, ač nesignifikantní, byl pozorován 3 dpi a 7 dpi v rozšířeném experimentu (viz výsledky).



Obrázek p10: Zastoupení apoptických AnnexinV+/PI- buněk ze slezin infikovaných myší. dpi = dní po infekci

8.4. Stimulace a restimulace splenocytů

U stimulace splenocytů (leukocytů) ze zdravých myší (0 dpi) a restimulací splenocytů z myší infikovaných *T. regenti* (3, 7 dpi) byl z důvodu zahrnutí pouze 4 myší ($n = 4$) a velké variability dat vyloučen časový bod 3 dpi. Na Obr. p10 je znázorněno procentuální zastoupení apoptických leukocytů ze slezin v 0, 3 a 7 dpi.



Obrázek p11: Zastoupení apoptických (Annexin V-/PI+) buněk ze slezin zdravých myší (0 dpi) a infikovaných (3 a 7 dpi) stimulovaných parazitárními antigeny; dpi – dny po infekci, neg = negativní kontrola, CAg = cercariální antigen, SH = homogenát schistosomul, 5 = 5 $\mu\text{g/ml}$, 50 = 50 $\mu\text{g/ml}$, stau = staurosporin