

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Denisa Kubová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Malárie  
Bakalářská práce

2023

Denisa Kubová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Denisa Kubová**  
Osobní číslo: **C20233**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Malárie**  
Téma práce anglicky: **Malaria**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

- 1) Vypracujte literární rešerši na téma malárie. V úvodní části se zaměřte na popis onemocnění a jeho diagnostiku.
- 2) V hlavní části bakalářské práce se věnujte především podrobnějšímu popisu interakce původce malárie s červenými krvinkami. Zaměřte se zejména na proteiny glykoforiny, jejich rozdělení do tříd a podrobný popis. V závěrečné části práce shrňte možnosti léčby a prevence.
- 3) Pro zpracování kompilačního textu bakalářské práce čerpejte z odborných článků publikovaných v recenzovaných zahraničních časopisech. Jejich vyhledávání provádějte prostřednictvím elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Pavlína Nývltová, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **23. prosince 2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.**  
děkan

L.S.

**doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Malárie jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 8. 6. 2023

Denisa Kubová v.r.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych poděkovala své vedoucí práce Mgr. Pavlíně Nývtové, Ph.D. za zadání zajímavého tématu, velmi vstřícný přístup, ochotu a cenné rady, které mi poskytla během psaní bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za podporu a motivaci ke studiu.

## **ANOTACE**

Bakalářská práce je věnována onemocnění malárie. Zabývá se přenosem, příznaky, diagnostikou, prevencí a léčbou onemocnění. Jsou zde popsány glykoforiny, jejich jednotlivé typy a je zde popsána také jejich role při invazi parazitů malárie do červených krvinek. Dále je uvedena patogenese onemocnění, která je zaměřena na proces rozetování a oxidační stres. V neposlední řadě je popsána těžká malárie se zaměřením na malarickou anémii, mozkovou a placentární malárii a poškození orgánů jako jsou plíce, ledviny a játra.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

malárie, glykoforiny, erythrocyty, *Plasmodium*

## **TITLE**

Malaria

## **ANNOTATION**

The bachelor's thesis is devoted to the disease of malaria. It deals with the transmission, symptoms, diagnosis, prevention and treatment of the disease. Glycophorins, their individual types, and their role in the invasion of malaria parasites into red blood cells are described here. Furthermore, the pathogenesis of the disease is presented, which is focused on the rosette process and oxidative stress. Last but not least, severe malaria is described with a focus on malarial anemia, cerebral and placental malaria and damage to organs such as lungs, kidneys and liver.

## **KEYWORDS**

malaria, glycophorins, erythrocytes, *Plasmodium*

# OBSAH

ÚVOD .....	13
1 Malárie .....	14
1.1 Přenos onemocnění .....	15
1.2 Příznaky .....	16
1.3 Diagnostika.....	16
1.3.1 Odběr krve.....	16
1.3.2 Zhotovení krevního nátěru.....	17
1.3.3 Mikroskopický průkaz .....	18
1.3.4 Rychlé diagnostické testy a protein PfHRP-2 .....	18
1.3.5 Polymerázová řetězová reakce .....	19
2 Glykoforiny .....	21
2.1 Glykoforin A.....	22
2.1.1 Komplex MSP1-GPA-proužek 3 .....	24
2.2 Glykoforin B.....	25
2.3 Glykoforiny C a D .....	26
2.4 Invaze parazitů do erytrocytu .....	28
2.5 Detekce glykoforinů.....	29
3 Patogeneze malárie .....	30
3.1 Rozetování .....	31
3.1.1 Slezinná filtrace .....	33
3.2 Oxidační stres .....	34
3.2.1 Hem.....	36
3.2.2 Xantinoxidáza.....	36
3.3 Těžká malárie.....	36



3.3.1 Malarická anémie .....	36
3.3.2 Mozková malárie .....	37
3.3.3 Placentární malárie.....	38
3.3.4 Poškození plic .....	39
3.3.5 Poškození ledvin .....	40
3.3.6 Poškození jater.....	42
4 Léčba a prevence malárie .....	43
ZÁVĚR .....	45
POUŽITÁ LITERATURA .....	46

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ACT	terapie založené na artemisininu
ALI	akutní poškození plic
ARDS	syndrom akutní respirační tísně
ARF	akutní selhání ledvin
Asn	asparagin
ATP2B4	ATPáza 4 přenášející vápník z plazmatické membrány
cDNA	komplementární DNA
CSP-A	cirkumsporozoitový protein
DAMP	molekulární vzory asociované s vlastním poškozením buněk
EBA	antigeny vázající erythrocyty
EBL	protein vázající erythrocyty
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
Fuc	fukóza
Gal	galaktóza
GalNAc	N-acetylgalaktozamin
GlcNAc	N-acetylglukozamin
GPA	glykoforin A
GPB	glykoforin B
GPC	glykoforin C
GPD	glykoforin D
GYPA	gen pro glykoforin A
GYPB	gen pro glykoforin B
GYPC	gen pro glykoforin C
HMGB1	chromatinový protein s vysokou mobilitou

HSP	proteiny tepelného šoku
HT/PEXEL	hostitelský cíl/exportní prvek Plasmodia
IGFBP7	protein 7 vázající růstový faktor podobný inzulinu
IL1- $\beta$	interleukin-1 $\beta$
IL6	interleukin-6
IL8	interleukin-8
Man	manóza
mRNA	mediátorová RNA
MSP1	merozoitový povrchový protein 1
NeuAc	kyselina N-acetylneuraminová
NeuGc	kyselina N-glykolyneuraminová
PAMP	molekulární vzory asociované s patogeny
PAS	barvení kyselinou jodistou a Schiffovým činidlem
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDZ doména	modulární proteinová interakční doména
PfEMP1	<i>P. falciparum</i> erytrocytární membránový protein 1
PfGARP	<i>P. falciparum</i> protein bohatý na kyselinu glutamovou
PfHRP2	<i>P. falciparum</i> histidin-bohatý protein 2
PfRh5	<i>P. falciparum</i> homolog proteinu 5 vázajícího retikulocyty
PMCA4	kalciová pumpa plazmatické membrány erytrocytů typu 4
PRR	receptor rozpoznávání vzorů
RBL	protein vázající retikulocyty
RDT	rychlé diagnostické testy
Rh	homolog proteinu vázajícího retikulocyty

ROS	reaktivní formy kyslíku
rRNA	ribozomální RNA
TACT	trojitá artemisininová kombinace terapií
Thr/Ser	threonin/serin
TLR	<i>toll-like</i> receptor
TNF	tumor nekrotizující faktor
TRAP	tryptofanem regulovaný atenuační protein
XO	xantinoxidáza

## ÚVOD

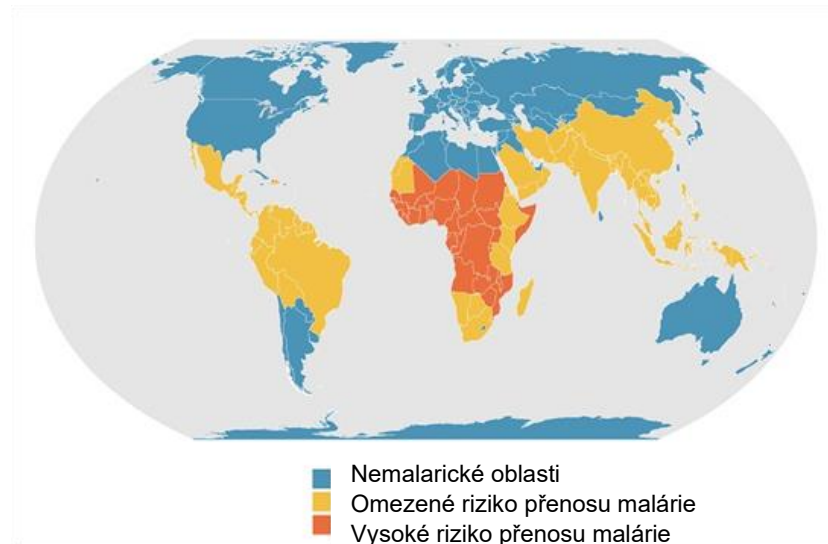
Malárie je parazitární onemocnění způsobené prvky rodu *Plasmodium* a je přenášeno samičkami komárů rodu *Anopheles*. K přenosu dochází slinnými žlázami komára obsahující sporozoity, které se během sání dostanou do krevního řečiště člověka. Mezi první příznaky malárie patří horečka, bolest hlavy, zimnice a zvracení. Dále se mohou rozvinout příznaky jako je těžká anémie, respirační potíže spojené s metabolickou acidózou nebo cerebrální malárie. Může dojít i k poškození životně důležitých orgánů.

Při invazi parazitů malárie do červených krvinek hrají důležitou roli glykoforiny. Jsou to transmembránové glykoproteiny lidských i zvířecích erytrocytů. U lidí existují 4 typy glykoforinů: A, B, C a D, z nichž glykoforin A je nejvýznamnějším receptorem erytrocytů.

Proces invaze erytrocytů parazity je složen z mnoha molekulárních dějů, během kterých se membránové proteiny erytrocytů a merozoitové proteiny zapojují do specifických interakcí receptor-ligand tak, aby se vytvářely jedinečné invazní dráhy. Hlavními determinanty invaze jsou proteiny patřící do dvou rodin – protein vázající erytrocyty (EBL) a protein vázající retikulocyty (RBL). K patogenezi onemocnění navíc přispívá proces rozetování, který má vliv na přežití a zdatnost parazita malárie. Rozety brání procesu fagocytózy a umožňují sekvestraci parazitů, aby unikli slezinné filtraci. Dále k patogenezi přispívají antioxidantní enzymy parazita, které mu umožňují přežít uprostřed oxidačního náporu hostitele.

## 1 Malárie

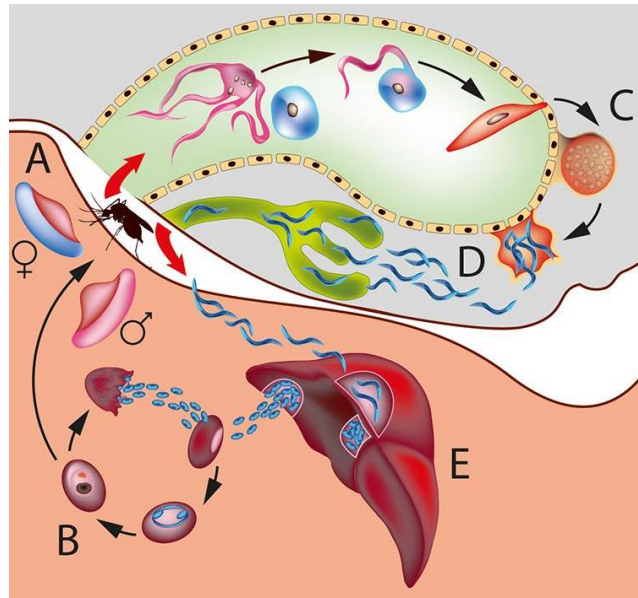
Malárie je nejvýznamnějším parazitárním onemocněním člověka. Je hlavní příčinou anémie v tropických oblastech a způsobuje hemolýzu erytrocytů a dyserythropoézu kostní dřeně [White, 2018]. Malárie může být způsobena čtyřmi hlavními zástupci rodu *Plasmodium*, a to *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax* a *Plasmodium ovale*. Závažný průběh onemocnění nebo dokonce smrt jsou z velké části způsobeny *P. falciparum*. Tento druh převládá v subsaharské Africe, Hispaniole a Papui Nové Guineji. *P. vivax* převládá v jižní Asii, východní Evropě, severní Asii a střední a jižní Americe. *P. ovale* se vyskytuje v západní Africe a příležitostně v jihovýchodní Asii a Papui Nové Guineji. *P. malariae* se vyskytuje celosvětově s nízkou frekvencí [Griffith a kol., 2007]. Oblasti výskytu malárie jsou zobrazeny na obr. 1.



**Obr. 1: Oblasti výskytu malárie ve světě v roce 2020.** Upraveno dle [Centers for Disease Control and Prevention, 2020].

Prvoci rodu *Plasmodium* patří mezi vnitrobuněčné parazity, kteří se řadí do kmene výtrusovci (*Apicomplexa*) a třídy krvinkovky (*Haematozoa*). Tito parazité mají složitý životní cyklus, který je zobrazen na obr. 2. První fází je vstup sporozoitu, infekčního stádia parazita, do krevního řečiště. Sporozoity putují do jater a pronikají do jaterních buněk. Zde zůstávají po dobu 9-16 dnů a podstoupí asexuální replikaci. Z každého sporozoitu vznikají merozoity uvnitř hepatocytu, které po uvolnění z jater napadají červené krvinky. Uvnitř erytrocytu začíná nepohlavní dělení, paraziti se v něm vyvíjí a vzniká trofozoit. Vysoce

aktivním metabolismem dochází ke zvětšování trofozoitu a na konci tohoto stádia dochází k jadernému dělení a vzniku schizontu. Každý zralý schizont obsahuje 20 merozoitů. Ty se uvolňují po lýze erytrocytů, aby napadly další neinfikované erythrocyty. Toto uvolňování se shoduje s prudkým zvýšením tělesné teploty během progresu onemocnění [Tuteja, 2007].



**Obr. 2: *Plasmodium* a jeho životní cyklus.** A) gametocyty, B) asexuální dělení, C) oocysta se sporozoity, D) sporozoity, E) merozoity. Upraveno dle [Siciliano a Alano, 2015].

## 1.1 Přenos onemocnění

Onemocnění je přenášeno komáry rodu *Anopheles*. Samičky tohoto komára potřebují krevní potravu pro produkci vajec, díky čemuž dojde ke spojení mezi vnímavým jedincem a hostitelem komára v životním cyklu. Slinné žlázy komára obsahují sporozoity, které se během sání krve dostanou do krevního řečiště vnímavého jedince. Samci komárů neštípou, takže nemohou přenášet malárii [Centers for Disease Control and Prevention, 2020].

Samičky komára *Anopheles* se dělí na antropofilní, zoofilní a oportunistické. Zoofilní druhy se živí krví zvířat, jako je např. dobytek. Antropofilní samičky preferují krev lidskou. Po nasátí krve z infikované osoby dochází k přenášení parazitů malárie z jedné osoby na druhou. Existují i samičky oportunistické, které se živí jakýmkoli dostupným hostitelem. Komáři druhu

*A. gambiae* a *A. funestus* jsou primárními přenašeči malárie *P. falciparum* [Centers for Disease Control and Prevention, 2020].

## 1.2 Příznaky

Příznaky malárie se objevují nejdříve po sedmi dnech od nákazy a bez léčby může onemocnění vést ke smrti. Mezi první příznaky patří horečka, bolest hlavy, zimnice a zvracení. U dětí s těžkou malárií se mohou rozvinout příznaky jako je těžká anémie, respirační potíže spojené s metabolickou acidózou nebo cerebrální malárie. U dospělých může dojít i k poškození životně důležitých orgánů. V endemických oblastech malárie si lidé mohou vyvinout částečnou imunitu, což umožňuje vznik asymptomatických infekcí [Talapko a kol., 2019; Milner, 2018].

## 1.3 Diagnostika

Rychlá a přesná diagnostika je zásadní pro efektivní léčbu malárie. Diagnostika zahrnuje identifikaci parazitů malárie nebo jejich antigenů v krvi pacienta [Tangpukdee a kol., 2009]. V endemických oblastech má diagnostika určitá omezení, která jsou způsobena nedostatkem přístrojů a nedostatečnými kontrolami kvality. Dalším problémem je možnost chybné diagnózy kvůli nízké parazitémii nebo smíšeným infekcím. V mnoha oblastech se proto jako primární nástroj pro parazitologickou diagnostiku nebo potvrzení malárie používají rychlé diagnostické testy [Berzosa a kol., 2018].

### 1.3.1 Odběr krve

Krevní vzorky by měly být odebírány před zahájením antimalarické léčby. Odebírá se kapilární krev z prstu nebo venózní krev. Výhodnější je však krev kapilární, neboť je v ní přítomno větší procento parazitů. Při odběru venózní krve může být změněna morfologie buněk a dále může být morfologie změněna také dlouhým intervalem mezi odběrem a vyšetřením vzorku. V oblastech, kde malárie není endemická, je častěji krev získávána venepunkcí. Vhodným antikoagulantem je např. kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) [Mathison a kol., 2017].

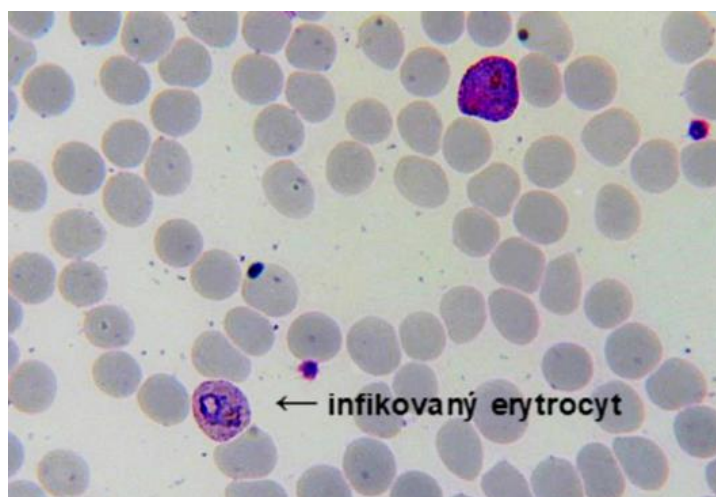


### 1.3.2 Zhotovení krevního nátěru

Krevní nátěry by měly být zhotoveny co nejdříve po vlastním odběru krve. Vždy by měly být vytvořeny tlusté i tenké krevní nátěry. Tlustý nátěr poskytuje největší citlivost pro screening malárie a tenký nátěr umožňuje pozorování morfologie pro identifikaci druhů parazitů [Mathison a kol., 2017].

Tlustý nátěr se zhotovuje ze 2-3 kapek krve kápnutých na podložní sklíčko a rohem roztíracího sklíčka se rozprostře do kruhu o průměru až 2 cm. Konečný nátěr má tloušťku přibližně 20 až 30 buněčných vrstev. Po zaschnutí by měl mít jen takovou tloušťku, přes kterou lze jen stěží přečíst text. Tento typ nátěru se nefixuje methanolem a zasychá déle. Existuje metoda škrábání, která urychluje dobu zasychání. Okrajem roztíracího sklíčka je vyvíjen silný tlak tak, aby se na podložním sklíčku při roztírání krve vytvořily malé škrábance. Ty umožňují lepší přilnutí krevního filmu ke sklíčku, a to bez ovlivnění morfologie erytrocytů [Mathison a kol., 2017].

Tenký nátěr se připravuje pomocí jedné kapky krve rozetřené roztíracím sklíčkem. Nátěr se fixuje methanolem a před barvením se nechá úplně zaschnout, takže erytrocyty zůstanou nedotčené. Poté se barví dle Giemsy, kdy se doporučuje pro identifikaci druhu použít barvivo s pH okolo 7,2 [Mathison a kol., 2017]. Na obr. 3 je možné vidět tenký krevní nátěr s přítomností malarického parazita.



**Obr. 3: Tenký krevní nátěr obarvený dle Giemsy.** Malárií infikovaný erytrocyt je označen šipkou. Upraveno dle [Tek a kol., 2009].

### 1.3.3 Mikroskopický průkaz

Pro ověření přítomnosti parazita se používá mikroskopie krevních nátěrů, konkrétně se využívají suché krevní nátěry obarvené dle Giemsa-Romanowski. Principem tohoto barvení je absorpce barviva organickými strukturami. Jádra buněk jsou poté zbarvena modře až fialově a cytoplazma růžově. Mnoho asymptomatických infekcí je však submikroskopických a detekují se pouze molekulárními metodami, jako je například polymerázová řetězová reakce (PCR) [Tangpukdee a kol., 2009].

Metoda mikroskopie je levná, umožňuje identifikaci druhů a zjištění hustoty parazitů. Průměrné mikroskopy detekují 50-100 parazitů/μl krve. Průkaz se provádí pomocí světelného mikroskopu za použití imerzního oleje a objektivu se zvětšením 100x. K detekci se pozoruje více zorných polí [Mbanefo a kol., 2020].

Mikroskopie má poměrně nízkou citlivost, pokud je prováděna špatně vyškoleným personálem. To může vést k nedostatečné nebo nesprávné diagnóze a dále pak k nedbalé léčbě nebo nadměrnému užívání léků proti malárii, což vede k rozvoji rezistence [Berzosa a kol., 2018].

### 1.3.4 Rychlé diagnostické testy a protein PfHRP-2

Rychlé diagnostické testy (RDT) slouží pro diagnostiku malárie jako testy pomocné. Nemají schopnost identifikovat jednotlivé druhy malárie a neposkytují informace o vývojových stádiích. Proto se současně provádí i odběr nesrážlivé krve a zhotovení krevního nátěru. V oblastech s menším laboratorním zázemím mají pro kontrolu malárie největší význam kvůli své nízké ceně a nevyžadují vyškolený personál [Clinton a kol., 2008; Zimmerman a kol., 2015].

RDT jsou založeny na detekci *P. falciparum* histidin-bohatého proteinu 2 (PfHRP-2). Protein PfHRP-2 je jedinečný pro *P. falciparum*. Je to přirozeně se vyskytující protein bohatý na histidin. Je lokalizován v cytoplazmě parazita a na membráně parazitovaných erytrocytů. Ve značném množství je vylučován parazitem do krve hostitele. Je exprimován ve vysokých hladinách časně během asexuálního cyklu, s rychlým nárůstem koncentrace v kruhovém stádiu a pomalejší akumulací ve stádiu trofozoitu [Clinton a kol., 2008; Poti a kol., 2020].

Plazmatický PfHRP-2 potlačuje proliferaci B a T lymfocytů a inhibuje uvolňování interferonu- $\gamma$  T lymfocyty, čímž parazit může unikat imunitnímu

systemu hostitele. Může se podílet na změnách cytoskeletu erytrocytů, dále narušit hematoencefalickou bariéru, čímž může způsobit zvýšenou expresi cytoadherenčních molekul na endoteliálním povrchu. To následně podporuje adhezenci parazita k endotelu a tím se vyhne filtraci slezinou [Poti a kol., 2020].

Během infekce malárie se největší koncentrace tohoto proteinu nacházejí v červených krvinkách a plazmě. PfHRP-2 lze také měřit v mozkomíšním moku, moči a slinách, ale dosud tato měření nenalezla klinické uplatnění [Poti a kol., 2020].

Současné testy využívají imunochromatografickou technologii s laterálním tokem, kde vzorek migruje jako kapalina přes povrch nitrocelulózové membrány pomocí kapilárního působení. Pro průkaz antigenu se využívají 2 typy protilátek, protilátka záchytná a detekční. Záchytné protilátky jsou zabudované jako proužek na nitrocelulózovou membránu. Takto fixované protilátky slouží k extrakci a navázání parazitárního antigenu z migrujícího kapalného vzorku. Detekční protilátky jsou konjugovány se zlatými částicemi, které slouží jako indikátor v mobilní fázi. Komplex indikátor-protilátka se váže na antigen parazita, který byl na membráně zachycen záchytnou protilátkou a v případě positivity, tj. v případě přítomnosti antigenu ve vzorku, dochází ke vzniku viditelného proužku. Potřebný objem vzorku pro analýzu pomocí RDT je 5  $\mu$ l krve [Clinton a kol., 2008; Zimmerman a kol., 2015].

Existují falešně pozitivní i falešně negativní výsledky. Falešně pozitivní výsledky jsou spojeny s perzistencí PfHRP-2 v periferní krvi, zkříženou reaktivitou proti lidskému revmatoidnímu faktoru a dalšími infekčními onemocněními. Falešně negativní výsledky mohou být způsobeny přirozenými delecemi genů PfHRP-2 a PfHRP-3 [Clinton a kol., 2008].

### **1.3.5 Polymerázová řetězová reakce**

Metody založené na PCR identifikují přítomnost cílových genů malárie ve vzorku krve. Pro amplifikaci a detekci je nejčastěji používaným cílem 18S podjednotka ribozomálního RNA (rRNA) genu. Existují různé modifikace tohoto testu – multiplexní PCR, kvantitativní PCR, vnořená PCR, PCR s reverzní transkriptázou. Tyto testy lze použít pro počáteční testování při podezření na malárii a jsou užitečné k identifikaci asymptomatických pacientů. Limit

detekce je 0,5-5 parazitů/μl krve, citlivost a specificita se pohybují okolo 98 % [Mbanefo a kol., 2020].

Multiplexní PCR se využívá pro současnou amplifikaci více sekvencí v jediné reakci. Vyžaduje, aby primery vedly k amplifikaci jedinečných oblastí DNA za stejných reakčních podmínek. Pro úspěšnost jsou důležité relativní koncentrace primerů, koncentrace pufru, teplota, množství templátové DNA a DNA polymerázy, rovnováha mezi koncentracemi chloridu hořečnatého a deoxynukleotidů [Markoulatos a kol., 2002]. Kvantitativní PCR umožňuje citlivou, specifickou a reprodukovatelnou kvantifikaci DNA a RNA prostřednictvím specifických sad primerů. Je zde minimalizováno riziko přenosu kontaminace díky postupům, které umožňují stanovení bez otevření zkumavky. K detekci produktů se využívají nespecifické fluorofory vázající nukleové kyseliny a specifické fluoroforem značené oligonukleotidové sondy [Mackay, 2004].

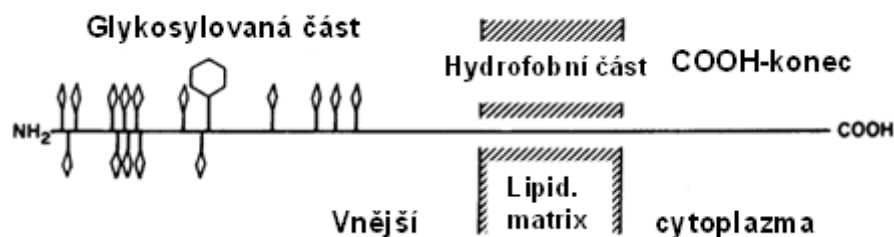
Vnořená PCR se využívá v případech, kdy je potřeba zvýšit senzitivitu nebo specifitu reakce. Tato metoda zahrnuje dvě sekvenční amplifikační reakce, z nichž každá používá jinou sadu primerů. Senzitivita je zvýšena vyšším počtem cyklů reakce díky použití dvou párů oligonukleotidů. Produkt první reakce se používá jako templát pro druhou amplifikační reakci, která je aktivována oligonukleotidy, které jsou umístěny uvnitř prvního páru primerů. Zvýšení specifity se docílí vazbou dvou samostatných sad primerů na stejný cílový templát [Green a Sambrook, 2019].

Metoda PCR s reverzní transkriptázou využívá jako výchozí materiál mediátorovou RNA (mRNA) pro *in vitro* amplifikaci nukleové kyseliny. PCR s reverzní transkriptázou využívá RNA-dependentní DNA polymerázu, která katalyzuje syntézu DNA pomocí RNA jako templátu. Produktem je komplementární DNA (cDNA), která nepodléhá degradaci reverzní transkriptázou a je tudíž stabilnější. Poté následuje přeměna jednořetězcové cDNA na dvouřetězcovou a běžná PCR [Carter a kol., 2022].

## 2 Glykoforiny

Glykoforiny jsou transmembránové glykoproteiny lidských i zvířecích erytrocytů a hrají důležitou roli při invazi parazitů malárie do červených krvinek. Skládají se průměrně ze 131 aminokyselin a 16 oligosacharidových řetězců. 15 oligosacharidů je navázáno na zbytky threoninu či serinu prostřednictvím O-glykosidických vazeb. Tyto proteiny jsou organizovány do tří domén podle umístění glykosylovaných aminokyselin a shlukování zbytků. Schématické znázornění pořadí peptidů v glykoforinu lidských erytrocytů je znázorněno na obr. 4.

Struktura glykoforinů obsahuje glykosylovaný segment složený přibližně z 64 zbytků a NH<sub>2</sub>-konce, hydrofobní segment se 32 nepolárními zbytky a dále COOH-terminální segment složený z přibližně 35 zbytků aminokyselin, z nichž určitá část je hydrofilní. Tento segment je vhodný pro vazby kationtů, především Ca<sup>2+</sup>, nebo elektrostatickou interakci se základními peptidy či s aminoskupinami fosfolipidů lipidové dvojvrstvy [Tomita a kol., 1975].



**Obr. 4: Schématické znázornění pořadí peptidů v glykoforinu lidských erytrocytů.** Upraveno dle [Tomita a kol., 1975].

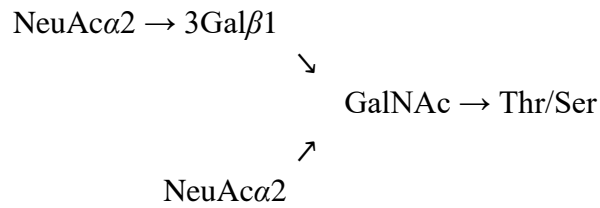
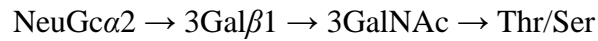
Glykoforiny mají relativně nízkou molekulovou hmotnost okolo 20-30 kDa. U lidí existují 4 typy glykoforinů: A, B, C a D. Glykoforiny A a B nejsou spojeny s cytoskeletem, což umožňuje jejich snadné uvolnění z membrány, zatímco glykoforiny C a D jsou ukotveny cytoskeletem k membráně erytrocytu. Kromě malarických parazitů interagují i s jinými infekčními patogeny, včetně virů. Glykoforiny také určují polymorfní systém krevních skupin [Jaskiewicz a kol., 2019]. Glykoforiny A a B určují krevní skupiny MNSs antigenního systému a několik dalších krevních skupin je způsobeno variací glykoforinů. Dále glykoforiny slouží jako substrát pro glykosylaci, což dává erytrocytům záporně

nabitý komplexní glykanový plášť a umožní tak cirkulaci bez přilnutí k jiným buňkám nebo stěnám krevních cév [Hollox a Louzada, 2022].

Antigenní systém MNSs je založen na dvou genech, a to na genu pro glykoforin A (GYPA) a genu pro glykoforin B (GYPB). Tyto homologní geny GYPA a GYPB jsou umístěny na chromozomu 4 a jsou náchylné k delecím, konverzím a křížení. Díky této náchylnosti vznikla komplexní strukturní genomická varianta DUP4. Ta nese kopie fúzního genu GYPB-A a chrání proti těžké malárii, kdy homozygoti vykazují až 74% ochranu. DUP4 je spojen s vyššími hladinami hemoglobinu, což souvisí s ochranou proti malarické anémii. Ochrana před malárií je zprostředkována hlavně zvýšením povrchového napětí erytrocytů, které brání invazi parazita [Hollox a Louzada, 2022]. V nejvyšších frekvencích se tento polymorfismus vyskytuje v Africe. Dalšími ochrannými faktory jsou například talasémie a hemoglobin S, které jsou způsobeny mutacemi v genech  $\alpha$  a  $\beta$  globinu [Kariuki a Williams, 2020].

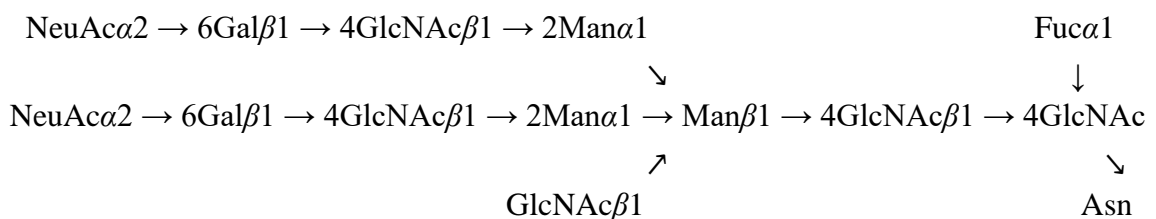
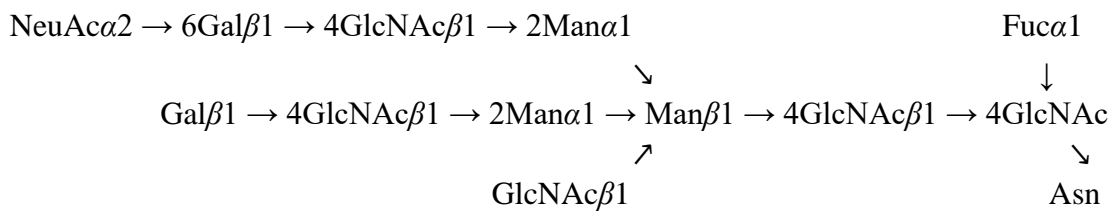
## 2.1 Glykoforin A

Nejhojnějším lidským erytrocytárním glykoforinem je glykoforin A (GPA). Odpovídá 1,6 % všech proteinů lidských erytrocytů. Obsahuje 16 O-glykosidických vazeb a 1 N-glykosidickou. N-koncová část je na extracelulárním povrchu a C-koncová část se skládá z alfa-helixu – hydrofobní transmembránové domény a hydrofilní cytoplazmatické domény. GPA je obklopen asi 34 fosfolipidy a obsahuje kyselinu sialovou v přibližném množství 75 % z celkového množství kyseliny sialové v membráně erytrocytů. Základní struktura O-navázaného oligosacharidu, zobrazená na obr. 5, se skládá ze dvou kyselin N-acetylneuraminových (NeuAc), galaktózy (Gal) a N-acetylgalaktosaminu (GalNAc) a tvoří tetrasacharid. Koncový zbytek GalNAc je připojen k threoninu/serinu (Thr/Ser) polypeptidového řetězce.



**Obr. 5: Základní struktura O-vázaných oligosacharidů glykoforinu A.** NeuGcα – α vázaná kyselina N-glykolyneuraminová, Galβ – β vázaná galaktóza, GalNAc – N-acetylgalaktosamin, Thr/Ser – threonin/serin, NeuAcα – α vázaná kyselina N-acetylneuraminová. Upraveno dle [Aoki, 2017].

Základní struktura N-vázaného oligosacharidu, zobrazená na obr. 6, obsahuje kyselinu N-glykolyneuraminovou (NeuGc), galaktózu, manózu (Man), fukózu (Fuc) a N-acetylglukozamin (GlcNAc), jehož koncový zbytek je připojen k asparaginu 26 (Asn26) glykoforinového polypeptidu [Aoki, 2017].



**Obr. 6: Základní struktura N-vázaných oligosacharidů glykoforinu A.** NeuAcα – α vázaná kyselina N-acetylneuraminová, Galβ – β vázaná galaktóza, GlcNAcβ – β vázaný N-acetylglukozamin, Manα – α vázaná manóza, Manβ – β vázaná manóza, Fuca – α vázaná fukóza, Asn – asparagin. Upraveno dle [Aoki, 2017].

Antigeny krevních skupin jsou umístěny na O-vázaných oligosacharidech a jejich blízkých aminokyselinových sekvencích vazebného místa. GPA exprimuje antigeny M a N, určené aminokyselinovou sekvencí ve zbytku 1. a 5. polypeptidu. Pro M je to Ser1/Gly5 a pro N Leu1/Glu5. GPA také zásobuje

buňku silnými negativními náboji, což brání adhezi mezi krevními buňkami a povrchy vaskulárního endotelu [Aoki, 2017].

GPA je nejvýznamnějším receptorem erytrocytů, který se váže s antigeny vázající erytrocyty (EBA) EBA-175 prostřednictvím jeho polypeptidového složení. Lidské erytrocyty postrádající GPA a mají tedy částečnou rezistenci vůči invazi *P. falciparum* [Baldwin a kol., 2015; Hollox a Louzada, 2022].

K vazbě ligandu na receptor erytrocytu dochází dvoustupňovým procesem. Nejprve dochází k navázání fragmentu oblasti II na kyselinu sialovou GPA, což vyvolá konformační změnu v EBA-175. Ten následně vystaví peptid pro vazbu s erytrocytem. Byla potvrzena i schopnost EBA-175 vázat nesialylovaný GPA. Vazba EBA-175 s GPA způsobuje změny v deformovatelnosti červených krvinek. Aktivuje fosforylaci cytoskeletu, která mění vlastnosti membrány erytrocytů a je nezbytná pro úspěšnou invazi. Interakce podporuje shlukování erytrocytů antigenem EBA-175, poskytuje merozoitům snadný přístup k neinfikovaným krvinkám a chrání před imunitním rozpoznáním [Jaskiewicz a kol., 2019].

Bylo prokázáno, že cukerná složka, kyselina 2,3-didehydro-2-deoxy-N-acetylneuraminová, strukturní analog N-acetylneuraminyl-N-acetát-laktozaminu, je dobrým inhibítozem EBA-175 a je schopna významně inhibovat invazi erytrocytů. Do budoucna by ji šlo využít jako součást léků ke snížení závažnosti onemocnění malárie [Jaskiewicz a kol., 2019].

### **2.1.1 Komplex MSP1-GPA-proužek 3**

Během počáteční fáze adheze při invazi parazitů malárie do červených krvinek má zásadní roli komplex MSP1-GPA-proužek 3. Merozoitový povrchový protein 1 (MSP1) je vysoce hojný ligand pokrývající povrch merozoitů u všech druhů parazitů malárie a je nezbytný pro napadení erytrocytů. Lidé žijící v endemických oblastech nesou ve své krvi specifické protilátky proti MSP1 [Baldwin a kol., 2015]. Protilátky anti-MSP1, od jedinců, kteří jsou klinicky imunní vůči malárii, inhibují invazi merozoitů do erytrocytů *in vitro*. Těchto protilátek by se dalo využít pro vývoj vakcíny proti malárii [Singh a kol., 2006]. Bylo prokázáno, že interakce MSP1<sub>12</sub> a MSP1<sub>19</sub> s lidskými erytrocyty je nezávislá na kyselině sialové. Tyto ligandy interagují s receptorem proužku 3 hostitele a zprostředkovávají invazi parazitů do erytrocytů prostřednictvím cesty nezávislé



na kyselině sialové. Proužek 3 je membránový protein v erythrocytech, tvoří těsný komplex s GPA a zajišťuje vysokou aktivitu aniontového transportu. Převádí CO<sub>2</sub> z lidských tkání do plic výměnou za Cl<sup>-</sup>, kdy CO<sub>2</sub> je transportováno ve formě hydrogenuhličitanového aniontu a podílí se na regulaci pH v buňkách. MSP1<sub>12</sub> zahrnuje sekvenci, která váže GPA a mohla by fungovat jako inhibitor invaze parazitů malárie, kdy tato vazba mění vlastnosti membrány erythrocytu. Dále i genetické abnormality proužku 3 poskytují odolnost vůči infekci. Příkladem je mutace proužku 3 u ovalocytózy, kdy dochází k částečné rezistenci k infekci malárie [Baldwin a kol., 2015; Aoki, 2017].

## 2.2 Glykoforin B

Glykoforin B (GPB) také známý jako SS-aktivní sialoglykoprotein je protein, který je u lidí kódován genem GYPB. Jeho molekulová hmotnost je přibližně 20 kDa a sekvence N-terminální domény je identická se sekvencí GPA. GPB obsahuje 11 O-vázaných oligosacharidů a žádný N-vázaný oligosacharid. GPB exprimuje pouze antigeny N MNSs krevního systému a sekvence aminokyselin methionin 29 a threonin 29 exprimují antigeny S a s [Aoki, 2017]. GPB je receptorem pro protein vázající erythrocyty 1 (EBL-1), který je exprimován pouze ve schizontním stádiu intraerythrocytárního životního cyklu a jeho předpokládaná velikost je 300 kDa. Na erythrocyty ošetřené trypsinem se váže EBL-1, což dokazuje vazbu s GPB. Erythrocyty ošetřené neuraminidázou nebo chymotrypsinem však eliminují schopnost EBL-1 vázat lidské erythrocyty. GPB-nulová varianta EBL-1 neváže. Hlavní vazebné místo pro GPB bylo identifikováno v jeho 69-aminokyselinovém segmentu domény F2. Několik peptidů umístěných v doménách F1 a F2 ligandu se váží na lidské erythrocyty, ale existuje zde jeden peptid, který vykazuje schopnost inhibovat růst parazitů, tudíž tohoto peptidu by se mohlo využít při vývoji vícepodjednotkové vakcíny proti malárii [Mayer a kol., 2009; Jaskiewicz a kol., 2019].

Některé kmeny mají buď delecí genu EBL-1, inzerci thymidinu nebo předčasný stop kodon, což vede ke zkrácenému produktu EBL-1. To znamená, že existuje další parazitní ligand, který se váže na GPB. Tento ligand může mít vlastnosti společné s jinými invazními ligandy *P. falciparum*, které vážou glykoforiny [Dankwa a kol., 2017].

## 2.3 Glykoforiny C a D

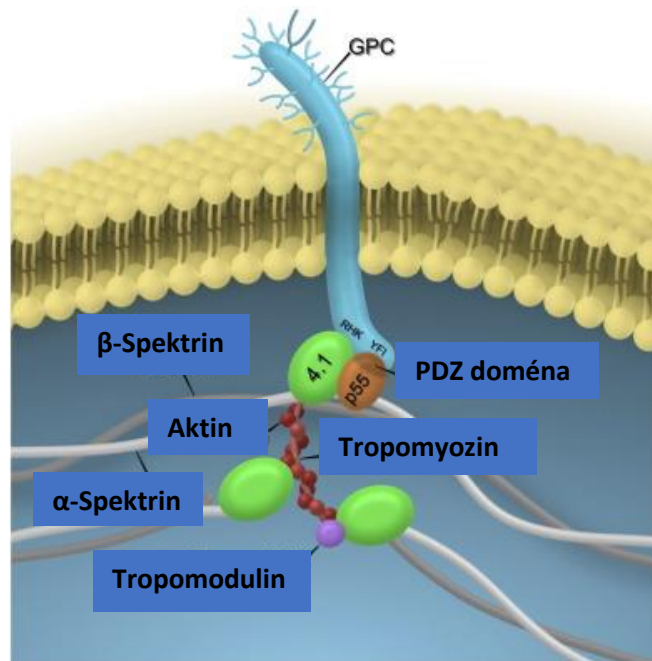
Glykoforiny C (GPC) a D (GPD) se podílejí na mechanických vlastnostech membrán erytrocytů. Jsou kódovány stejným genem pro glykoforin C (GYPC) a liší se v důsledku různých míst startu translace. GPC je specifický pouze pro člověka, ale GPD nalezneme u všech lidoopů. Na rozdíl od GPA a GPB není GPC omezeno pouze na erytroidní řadu a nachází se také na B a T lymfocytech, monocytech i myeloidních prekurzorech. GPC mRNA byla také detekována v mnoha nehematopoetických tkáních jako jsou například žaludek a brzlík. GPC hraje roli i v životním cyklu parazita *P. vivax*, jelikož protilátky rozpoznávající N-terminální oblast tohoto glykoforinu významně inhibují tvorbu rozet [Rydzak a kol., 2015; Jaskiewicz a kol., 2018].

Tyto glykoforiny jsou antigeně odlišné od GPA a GPB. Na GPC a GPD jsou exprimovány antigeny systému krevních skupin Gerbich, které působí jako receptory pro malarického parazita [Hollox a Louzada, 2022]. Antigeny Ge4, Wb, Dha, GEAT jsou exprimovány pouze na GPC, zatímco na GPD to jsou Ge2 a Ana. Na obou glykoforinech jsou pak exprimovány antigeny Ge3, Lsa, GEIS, GEPL, GETI. Ge3 je exprimován jako vnitřní epitop umístěný blízko lipidové dvojvrstvy [Jaskiewicz a kol., 2018].

GPC má vliv na udržování stability, deformability a tvaru membrány erytrocytu prostřednictvím své interakce s proteinem 4.1 a se silně palmitoylovaným periferním membránovým proteinem p55. Tvoří ternární komplex, zobrazený na obr. 7. Tento komplex je propojen spektrin-aktinovým spojením s lipidovou dvojvrstvou.

GPC interaguje s proteinem 4.1 prostřednictvím aminokyselinových zbytků 86-88 a s proteinem p55 prostřednictvím aminokyselinových zbytků 126-128. GPC se skládá ze 128 aminokyselinových zbytků, je kódován 4 exony a jeho molekulová hmotnost je 35-40 kDa. Je sestaven z extracelulární (aminokyselinové zbytky 1-57), transmembránové (aminokyselinové zbytky 58-81) a cytoplazmatické (aminokyselinové zbytky 82-128) domény. Obsahuje mnoho sialylovaných oligosacharidových řetězců, 12 O-glykosidických vazeb a 1 N-glykosidickou vazbu, kterou je navázaný na asparagin 8 (Asn8) a je to vazba, která má zásadní roli při interakci s ligandem EBA-140. N-glykosidickou vazbou jsou připojovány sacharidy na NH<sub>2</sub> skupinu asparaginu pomocí

N-acetylglukozaminu a je zde ještě navíc přítomno malé množství terminální fukózy. Sialoglykan GPC se přímo účastní interakce s EBA-140 [Ashline a kol., 2015; Rydzak a kol., 2015].



**Obr. 7: GPC ternární komplex s proteinem 4.1 a p55 spojený s cytoskeletem erythrocytu.** PDZ doména – modulární proteinová interakční doména. Upraveno dle [Jaskiewicz a kol., 2018].

Receptorem pro ligand EBA-140 je tedy konformačně uspořádaný shluk zbytků kyseliny sialové připojených k N- a O-vázaným oligosacharidovým řetězcům na molekule GPC. Tento ligand obsahuje dvě domény F1 a F2 a pouze doména F1 je přímo zapojena do interakce s receptorem. Studie ukázaly, že tento ligand neváže lidské erythrocyty ošetřené neuraminidázou. Výrazně sníženou vazbu vykazují GPC s delecí aminokyselinových zbytků 17-35, respektive 36-63 a červené krvinky postrádající GPC (GPC-nulová) nejsou s ligandem EBA-140 vázány vůbec. GPC-Gerbich může obsahovat zvýšené množství prodloužených aminových řetězců zakončených fukózou, což vysvětluje nedostatek vazby EBA-ligandu na Gerbich-nulové erythrocyty v důsledku variantní fukosylace N-glykosidické vazby GPC. Oblast II domény existuje pouze v monomerní formě a v důsledku toho může vázat pouze 2 glykanové skupiny GPC, zatímco EBA-175 je dimer a interaguje se

6 glykanovými skupinami GPA. Tyto vlastnosti pak přispívají ke zvýšené afinitě ligandů k jejich receptorům [Head a kol., 2005; Ashline a kol., 2015; Jaskiewicz a kol., 2019].

GPD je zkrácená forma GPC, která postrádá prvních 21 aminokyselinových zbytků a obsahuje pouze 6 O-glykosidických vazeb. Je složen ze 108 aminokyselin. Oba glykoforiny jsou produkovány stejnou mRNA pomocí dvou iniciačních kodonů [Ashline a kol., 2015].

Strukturální změny GPC a GPD vedou k expresi různých fenotypů Gerbichových krevních skupin. Řadí se zde fenotyp Leach, který neexprimuje glykoforin C ani D a tudíž představuje přirozeně se vyskytující nulový fenotyp. Je způsoben delecí exonu 3 a 4 nebo změnou nukleotidů v exonu 3. To má za následek posun čtecího rámce a předčasný stop kodon. Červené krvinky tohoto fenotypu vykazují abnormální eliptický tvar. Varianta Yus je výsledkem delece exonu 2 a 3 v genu GYPC vedoucí k expresi zkrácené formy GPC a žádné GPD. Tento fenotyp se vyskytuje převážně ve Středomoří a Středním východu. Duplikací exonu 3 vzniká fenotyp Lsa, který je spojen s expresí GPC a GPD variantních proteinů s prodlouženou extracelulární doménou. Tyto fenotypy jsou odolné vůči invazi *P. falciparum* a vyplynuly ze selektivního tlaku vyvíjeného tímto parazitem [Head a kol., 2005; Jaskiewicz a kol., 2018].

## 2.4 Invaze parazitů do erytrocytu

Invaze erytrocytů parazity je vícestupňový proces zahrnující několik ligandů, které umožňují merozoitům proniknout do červených krvinek. Hlavními determinanty invaze jsou proteiny patřící do dvou rodin – EBL a protein vázající retikulocyty (RBL). Do EBL se řadí antigeny vázající erytrocyty EBA-175, EBA-181 a EBA-140 a dále ligand vázající erytrocyty EBL-1. Tyto funkční proteiny byly nalezeny u *P. falciparum* a obsahují několik oblastí, jako je oblast II, která se podílí na vazbě receptoru na erytrocytech. EBA-175 je nejdůležitějším invazivním ligandem a je cílem lidských inhibičních protilátek přítomných v séru pacienta s malárií [Rydzak a kol., 2015; Jaskiewicz a kol., 2019].

Do RBL se řadí pět ligandů: homolog proteinu vázajícího retikulocyty 1, 2a, 2b, 4 a 5 (Rh1, Rh2a, Rh2b, Rh4 a Rh5) [Dankwa a kol., 2017]. Tyto ligandy jsou exprimovány ve schizogonii jako velké proteiny o molekulové hmotnosti větší jak 300 kDa a vážou se specificky na retikulocyty. Mají kritickou roli při počáteční

selekcí a apikálním připojením merozoitu k hostitelské buňce. V genomu *P. vivax* již bylo identifikováno více jak 10 paralogních genů RBL, z nichž několik má mutace s posunem čtecího rámce nebo jsou neúplnými genovými fragmenty či nefunkčními pseudogeny [Semenya a kol., 2012]. *P. falciparum* homolog proteinu 5 vázajícího retikulocyty (PfRh5) je zatím nejslibnějším cílem pro vývoj vakcíny. PfRh5 má nízký sekvenční polymorfismus, což umožňuje specifickým protilátkám anti-PfRh5 účinně inhibovat invazi erytrocytů parazity *P. falciparum*. PfRh5 tvoří funkční komplex s extracelulárním proteinem, který je vázaný na glykofosfatidylinositol a funguje jako ochranný antigen bohatý na cystein a podporuje také inhibici invaze erytrocytů parazity [Paul a kol., 2015].

## 2.5 Detekce glykoforinů

Glykoforiny mohou být detekovány barvením kyselinou jodistou-Schiffovým činidlem (PAS) po separaci membrány elektroforézou na gelu. Před elektroforézou je nutné solubilizovat fosfolipidovou dvojvrstvu pomocí detergentů, k čemuž slouží dodecylsírán sodný a poté mohou být extrahované membránové proteiny a glykoforiny separovány na polyakrylamidovém gelu. Proužek 3 je detekován díky mikroheterogenitě připojených oligosacharidů. Obsahuje přibližně 7 % sacharidů a na celkových membránových sacharidech se podílí 10 %. GPA je zobrazován pod proužkem 3. Elektroforetická migrace glykoforinu je nízká ve srovnání s jinými membránovými složkami, jelikož je glykoforin silně glykosylován. Erytrocyty se vzácným Gerbichovým a Yusovým fenotypem migrují v polyakrylamidovém gelu jako široké difuzní pásy kvůli rozdílům v glykosylaci [Aoki, 2017; Jaskiewicz a kol., 2018].

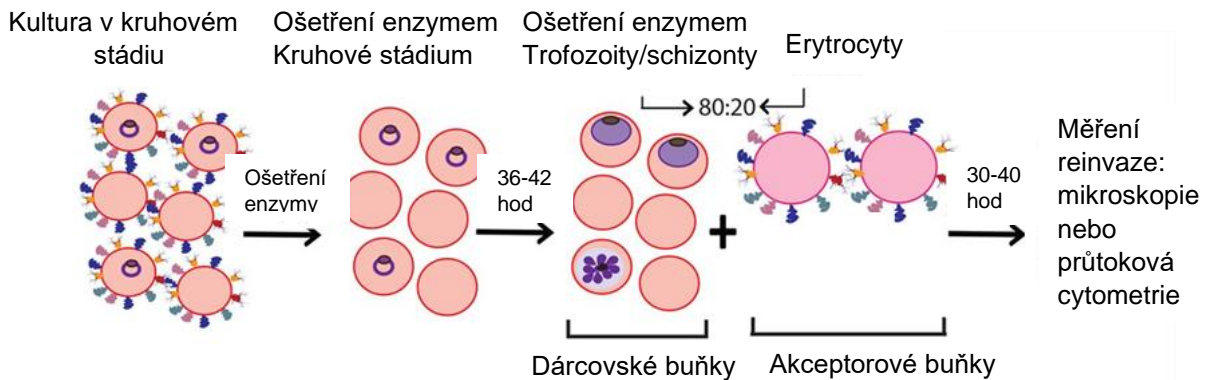
### 3 Patogeneze malárie

Proces invaze je složen z mnoha molekulárních dějů, během kterých se membránové proteiny erytrocytů a merozoitové proteiny zapojují do specifických interakcí receptor-ligand tak, aby se vytvářely jedinečné invazní dráhy [Baldwin a kol., 2015]. Invazní dráhy lze klasifikovat podle závislosti na přítomnosti kyseliny sialové na receptorech.

Invazní dráhy závislé na kyselině sialové jsou dráhy zahrnující EBL invazní ligandy a Rh1. Dráhy zahrnující zbylé RBL ligandy jsou nezávislé na kyselině sialové. Dominantní invazní dráhy podléhají kmenu a klasifikují kmeny *P. falciparum* jako závislé nebo nezávislé na kyselině sialové. Virulence *P. falciparum* je tedy připisována souboru invazních drah, které mu umožňují účinně napadnout hostitelské erytrocyty s různými receptorovými polymorfismy. Regulační oblasti *P. falciparum* obsahují polymorfismy, z nichž některé jsou zastoupené v endemických oblastech a vznikly jako důsledek selektivní síly malárie na lidský genom. Příkladem jsou GPB-nulové varianty a genetické polymorfismy GYPB u Afričanů [Dankwa a kol., 2017]. Dále S-s-U mutace, Henshaw s variabilní sekvencí prvních 5 aminokyselin a Miltenbergerovy mutace, které mají rekombinaci mezi GPA a GPB. Miltenbergerovy mutace vždy vedou ke ztrátě GPB [Mayer a kol., 2009].

Pro posouzení invazního profilu kmene *P. falciparum* existuje test invaze znázorněný na obr. 8, který se provádí v jamkových destičkách. Kultura *P. falciparum* v kruhovém stádiu je ošetřena enzymy – neuraminidázou, trypsinem a chymotrypsinem, a je vložena do růstového média, kde se ponechá dozrát do pozdního trofozoitového nebo schizontního stádia. Enzymy ošetřená kultura, která tvoří dárcovské buňky, se přidá k akceptorovým buňkám v poměru 80:20 a hodnotí se parazitémie. Parazitémie se stanovuje po jediném kole invaze buď mikroskopicky z počtu 500 až 2000 erytrocytů nebo průtokovou cytometrií buněk barvených fluorescenční barvou SYBR green. Poměr 80:20 umožňuje použít omezený počet kultivovaných erytrocytů a zároveň poskytne rozumnou a měřitelnou parazitémii. Úspěšnost testu závisí na účinné léčbě neuraminidázou, trypsinem a chymotrypsinem tak, aby se zabránilo reinvazi do dárcovských buněk, dále na počítání akceptorových buněk a počáteční parazitémii v dárcovské kultuře (ideálně 2,5 % parazitémie). Testy jsou

nastaveny na 0,5% hematokrit a všechny akceptorové buňky se počítají hemocytometrem před nastavením testu [Dankwa a kol., 2017].



**Obr. 8: Schéma invazního testu.** Upraveno dle [Dankwa a kol.,2017].

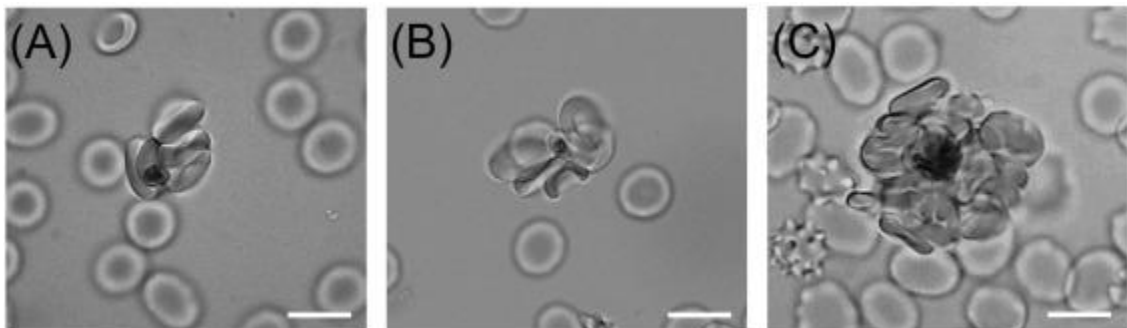
### 3.1 Rozetování

Rozetování je proces adherence neinfikovaných erytrocytů k erytrocytu infikovanému rodem *Plasmodium*. Červené krvinky se formují do shluků a tvoří útvary připomínající rozety neboli růžice. Rozetování má vliv na přežití a zdatnost parazita malárie. Existují 2 hlavní hypotézy, které tento vliv vysvětlují. První hypotézou je, že rozetování neinfikovaných krvinek chrání infikované červené krvinky od imunitního systému hostitele. Druhou hypotézou je rozetou asistovaná invaze, která předpokládá, že rozetování usnadňuje setkání nově vzniklých merozoitů s receptivními neinfikovanými erytrocyty navázanými na schizont. Druhá hypotéza byla zpochybněna u *P. vivax*, jelikož přednostně tvoří růžice se zralými červenými krvinkami a nikoli retikulocyty a merozoity. *P. vivax* napadají výhradně retikulocyty. *P. falciparum* může napadat normocyty i retikulocyty a není tedy zpochybněno, že rozetování může zlepšit úspěšnost invaze merozoitů u tohoto druhu. Tvorba rozet je častější u *P. vivax* než u *P. falciparum* [Lee a kol., 2014].

Klasicky jsou rozety kategorizovány podle velikosti, ligandů odvozených od parazitů a receptorů odvozených od hostitele. Velikost závisí na počtu neinfikovaných erytrocytů přilnutých k infikovaným a částečně závisí i na typech zahrnutých ligandů. Různé velikosti rozet jsou zobrazeny na obr. 9. Zúčastněné ligandy jsou proteiny odvozené od parazitů, které jsou volně exprimovány na povrchu infikovaného erytrocytu a mohou být adsorbovány na cytoadherující

neinfikovaný erytrocyt [Lee a kol., 2014; Lee a kol., 2022]. Nejvýznamnější adhezí molekulou parazita je specifický člen rodiny erytrocytárního membránového proteinu 1 (PfEMP1) *P. falciparum*. PfEMP1 je vysokomolekulární protein (200-300 kDa) obsahující více extracelulárních domén bohatých na cystein (DBL domény) [Adams a kol., 2013].

Obrovská rozeta je definována jako rozetový komplex s účastí více než 10 neinfikovaných erytrocytů. Tvorba růžice *P. vivax* se zvyšuje s vyžíváním parazita. V kruhovém stádiu parazita je tvorba téměř nulová a je reprezentována až časným trofozoitovým stádiem. Rychlost rozetování je nejvýraznější mezi časným a pozdním trofozoitovým stádiem [Lee a kol., 2014; Lee a kol., 2022].



**Obr. 9: Velikosti rozet tvořených erytrocyty infikovanými *Plasmodium falciparum*.** (A) Malá růžice zahrnující 1 až 4 neinfikované červené krvinky. (B) Středně velká růžice zahrnující 5 až 10 neinfikovaných červených krvinek. (C) Obří růžice zahrnující více než 10 neinfikovaných červených krvinek. Upraveno dle [Lee a kol., 2022].

Cytoadherenci erytrocytů zprostředkovává „rozetující se ligand“. Je to protein bohatý na kyselinu glutamovou z *P. falciparum* (PfGARP) a je vysoce exprimován trofozoitovými a schizontovými stádii. Vyvolává shlukování erytrocytů do struktur růžic prostřednictvím interakce s proužkem 3. Dále může ke shlukování dojít prostřednictvím interakce EBA-175 a glykoforinu A. Některé faktory ze séra hostitele mohou také přispívat k rozetování. Patří sem neimunní imunoglobulin M, komplementový faktor D, imunoglobulin G proti proužku 3, inzulinu podobný růstový faktor vázající faktor 7 (IGFBP7), von Willebrandův faktor a trombospondin-1. Tyto faktory usnadňují tvorbu rozety a posilují vazbu mezi buňkami v komplexech růžic [Lee a kol., 2022].

Rozlišujeme 3 typy rozet v závislosti na vzájemných vazbách. Rozeta typu 1 odráží přímou interakci mezi receptorem rozety odvozeným od hostitele



a rozetovým ligandem odvozeným od parazita. Rozeta typu 2 zahrnuje faktory odvozené od hostitele, které samy o sobě nezprostředkují tvorbu růžice. Rozeta typu 3 je umožněna proteiny odvozenými od parazitů a dosahuje obřích velikostí [Lee a kol., 2022].

Rozety fyzicky brání procesu fagocytózy. Větší velikost rozety je problémem pro pohlcení infikované buňky fagocytom, a proto je potřeba, aby se na pohlcení podílelo více fagocytů. Proto pacient s malárií, který přechovává parazity se zvýšeným sklonem k rozetování, může trpět vyčerpáním fagocytů. Paraziti mohou také vnímat příchozí fagocyty detekcí proteinů vylučovaných fagocyty např. IGFBP7, kdy paraziti okamžitě začnou tvořit další rozety [Lee a kol., 2022].

Dalším fenoménem rozetování je, že umožňují sekvestraci parazitů, aby unikli slezinné filtraci. Glykoprotein CD36 zprostředkovává cytoadherenci infikovaných červených krvinek k mikrovaskulárnímu endotelu a zabrání tak odstranění parazitů uvnitř sleziny [Fonseca a kol., 2015]. Přítomnost sekvestrovaných infikovaných krvinek v mikrovaskulatuře brání průtoku krve a může vést k hypoxii a metabolické acidóze. Ty přispívají k život ohrožující malárii. Další rozetování zvyšuje riziko ischemického poškození. Mezi faktory, které slouží jako ochrana před život ohrožující malárií, patří krevní skupina 0 a nedostatek komplementového receptoru 1. Ty snižují schopnost *P. falciparum* tvořit růžice [Adams a kol., 2013]. Dále rozetování chrání parazity v pozdním stádiu před antimalariky [Lee a kol., 2022].

### **3.1.1 Slezinná filtrace**

Lidská slezina funguje jako filtrační jednotka, díky které jsou odbourávány poškozené a přestálé krevní buňky a případně také patogeny přítomné v krvi. Všechny fyziologické buňky v krevním oběhu jsou dostatečně deformovatelné na to, aby prošly červenou pulpou a mohly se vrátit do oběhu. Stárnoucí, poškozené a infikované buňky nejsou schopny projít slezinou a jsou zde zadržovány, destruovány a fagocytovány [Lee a kol., 2022].

V červené pulpě jsou přítomné makrofágy, jejichž úkolem je právě eliminovat patogeny přenášené krví a aktivovat imunitní systém. Jsou vybaveny velkým množstvím receptorů pro rozpoznávání vzorů (PRR), které rozpoznávají molekulární vzory asociované s patogeny (PAMP) a molekulární vzory

asociované s poškozením (DAMP). Zapojení *toll-like* receptoru (TLR) molekulami patogenu je zásadní pro indukci prozánětlivého genu a proteinové exprese u makrofágů, což vede k přirozené imunitní aktivaci [Fonseca a kol., 2015].

TLR rozpoznávají i DAMP při poškození tkáně. Příkladem jsou proteiny tepelného šoku (HSP), které jsou signálem endogenního poškození, kdy se uvolňují molekuly buňkami ve stresu nebo nekrotické buněčné smrti. Tyto molekuly se váží na TLR2 a TLR4 v makrofázích a indukují produkci prozánětlivých cytokinů a expresi kostimulačních molekul. TLR2 a TLR4 dokážou také rozpoznat složky extracelulární matrix jako je fibronectin. Fibronectin je glykoprotein vylučovaný fibroblasty uvnitř sleziny a může být produkován během malárie, kdy dochází k hlubokým změnám mikroarchitektury sleziny po akutní infekci, což vede k akumulaci fibroblastů [Fonseca a kol., 2015]. Dalším DAMP je chromatinový protein s vysokou mobilitou HMGB1. Je to nehistonový jaderný protein, který má vliv na organizaci DNA. Jakmile se uvolní, váže se na membránové receptory a formuje imunitní a metabolické reakce [Chen a kol., 2023]. Uvolňování HMGB1 prostřednictvím makrofágů sleziny nastává po rozsáhlé apoptóze slezinných buněk, což je běžně pozorováno při sepsích. Typicky je hojná apoptóza pozorována například u malárie hlodavců. U lidské malárie jsou hladiny endogenního HMGB1 v séru významně vyšší [Fonseca a kol., 2015].

### 3.2 Oxidační stres

Rod *Plasmodium* má mnoho antioxidantních enzymů, které mu umožňují přežít uprostřed oxidačního náporu hostitele. Základní složkou reakce hostitele na infekci je produkce reaktivních forem kyslíku hostitelskými fagocyty. Nadměrné množství těchto volných radikálů může zprostředkovat zánět a způsobit rozsáhlé poškození hostitelských buněk a tkání. Parazitickou degradací hemoglobinu infikovaných erytrocytů se tvoří volný hem a uvolňuje se na konci replikačního cyklu, čímž se zhoršuje oxidační zátěž hostitele a přispívá to k závažnosti život ohrožujících komplikací [Vasquez a kol., 2021].

Obecně je oxidační stres definován jako nerovnováha mezi zvýšenými hladinami reaktivních forem kyslíku (ROS), které mají ve vnějším obalu nepárové elektrony a nízkou aktivitou antioxidantních mechanismů. Zvýšený oxidační stres vyvolává poškození buněčných struktur a může potenciálně zničit tkáně. ROS

jsou také zapojeny do základních buněčných procesů, včetně produkce energie mitochondriemi, signalizace a oxidačního vzplanutí v buňkách přirozené imunity. Mezi tyto buňky patří neutrofilů a makrofágů, které aktivují nikotinamidadeninukleotidfosfát za vzniku vysokých koncentrací ROS ve fagozomu, které vedou ke smrti mikroba. Za fyziologických podmínek je zvýšený oxidační stres při stárnutí a cvičení. U patologických stavů při zánětlivých onemocnění, neurodegenerativních onemocnění, cukrovky či kardiovaskulárních onemocnění [Preiser, 2012; Vasquez a kol., 2021].

Během krevního stádia infekce se hladina oxidačního stresu detekuje stanovením koncentrace malondialdehydu nebo lipidového peroxidu, který vzniká jako důsledek oxidace nenasycených lipidů a odráží hladiny volných radikálů v krevním oběhu. Pokles antioxidantů během malárie dokazuje ztrátu rovnováhy mezi volnými radikály a antioxidační kapacitou. ROS vyvolává sekreci cytokinů, jako jsou tumor nekrotizující faktor (TNF), interleukin-6 (IL6) a interleukin-1 $\beta$  (IL1- $\beta$ ), indukovanou aktivací makrofágů a dendritických buněk a poskytuje první signál nezbytný pro aktivaci zánětu [Vasquez a kol., 2021]. Druhým signálem je aktivační signál parazita. Tento druhý signál podporuje sestavení proteinového komplexu inflamazómu, kterého se dosáhne autokatalýzou kaspázy-1, následným štěpením pro-IL1- $\beta$  a uvolněním bioaktivního IL1- $\beta$ . Hladiny cytokinů se zvyšují se zvyšující se závažností onemocnění [Ty a kol., 2019]. Mezi další biomarkery oxidačního stresu patří např. superoxidodismutáza, TNF, kataláza a glutathionperoxidáza [Kavishe a kol., 2017].

Antigeny *P. falciparum* indukují produkci ROS polymorfonukleárními a mononukleárními leukocyty. Stimulace granulocytů pomocí TNF vede k vysoké produkci ROS a bylo prokázáno, že u dětí je to spojeno s kratší dobou filtrace parazitů. Dále bylo prokázáno, že u dětí s těžkou malárií jsou hladiny cytokinů vyšší než u nekomplikované malárie. ROS může zhoršit patologii tohoto onemocnění, např. anémii v důsledku masivní hemolýzy nebo případnou metabolickou acidózu v důsledku sníženého okysličení tkání [Kavishe a kol., 2017]. Oxidační stres také přispívá k sekvestraci infikovaných krvinek v mozkové mikrovaskulatuře indukcí zvýšené exprese endoteliálních adhezních molekul [Vasquez a kol., 2021].

### 3.2.1 Hem

Rod *Plasmodium* konzumuje hemoglobin v infikovaných krvinkách jako zdroj aminokyselin. Destrukci hemoglobinu vzniká hem, který produkuje ROS prostřednictvím svého atomu železa. Toto železo podporuje produkci hydroxylového radikálu Fentonovou reakcí, která může vyvolat poškození parazita i hostitele. Kvůli zabránění tohoto poškození přeměňuje *Plasmodium* hem na hemozoin. Hemozoin je intracelulární agregát molekul hemu, tvoří krystalickou strukturu a díky tomu nezpůsobuje oxidační poškození [Vasquez a kol., 2021].

### 3.2.2 Xantinoxidáza

Enzym xantinoxidáza (XO) vytváří reaktivní formy kyslíku superoxid a peroxid vodíku, protože štěpí hypoxantin na xantin, a nakonec na kyselinu močovou. XO také podporuje zrání a sekreci cytokinů v dendritických buňkách a zvyšuje schopnost těchto buněk aktivovaných parazitem indukovanou proliferaci T lymfocytů. Cytokiny TNF a IL8 projevují významnou závislost s aktivitou XO, což prokazuje zapojení tohoto enzymu do zánětu vyvolaného malárií. Pacienti se zvýšenou aktivitou XO vykazují vysoké hladiny zánětlivých cytokinů a vyšší výskyt cerebrální malárie [Ty a kol., 2019; Vasquez a kol., 2021].

## 3.3 Těžká malárie

Těžká malárie je multisystémové onemocnění. Je spojena s imunologickou expresí cirkulujícího inhibitoru erythropoézy, který funkčně antagonizuje účinek erythropoetinu. Zahrnuje další patologie včetně laktátové acidózy, mozkové malárie a těžké anémie [Lamikanra a kol., 2007]. Obvykle je způsobena *P. falciparum*, kdy zralé formy tohoto parazita mohou adherovat k vaskulárnímu endotelu různých orgánů jako jsou srdce, mozek, plíce, ledviny, játra a poté i podkožní tuková tkáň a placenta. Během svého 48hodinového životního cyklu se mohou 24 hodin izolovat v hluboké mikrovaskulatuře těchto orgánů a způsobit tak složitější diagnózu [Autino a kol., 2012].

### 3.3.1 Malarická anémie

Malarická anémie zahrnuje zvýšené odbourávání cirkulujících erytrocytů a jejich sníženou produkci v kostní dřeni [Lamikanra a kol., 2007]. Dyserythropoézu způsobuje fagocytóza hemozoinu makrofágy kostní dřeni,

a to buď přímou akumulací v kostní dřeni s tvorbou toxických látek nebo přirozenou imunitní odpovědí. Zrání erytroblastů je narušeno změněným metabolismem železa a produkcí hemoglobinu [Autino a kol., 2012].

Infikované červené krvinky se sníženou deformovatelností a změněnými povrchovými charakteristikami jsou rychle sekvestrovány slezinou, což zapříčiní anémii. Zvýšená destrukce i neinfikovaných erytrocytů je význačným rysem malarické anémie. Parazitní antigeny mohou adherovat k neinfikovaným erytrocytům, což vede k navázání komplementu na erytrocyt a následnému odstranění z oběhu. K neinfikovaným erytrocytům mohou také adherovat i proteiny obsahující hostitelský cíl/exportní prvek *Plasmodia* (HT/PEXEL), které se uvolňují do plazmy na konci intraerytrocytárního cyklu a zapříčinit taktéž odstranění z oběhu [Lamikanra a kol., 2007; Haldar a kol., 2009].

Anémie má velmi rychlý nástup a je definována jako koncentrace hemoglobinu nižší jak 5 g/dl. Vyskytuje se nejčastěji v oblastech s vysokým přenosem malárie a postihuje hlavně malé děti a těhotné ženy [Lamikanra a kol., 2007].

Vyšetření kostní dřene u dětí s těžkou malárií prokazuje hypercelularitu, mírnou erytroidní hyperplazii a abnormální rysy pozdních erytroidních progenitorů. Existuje také určitá závislost mezi malarickou anémií a mikronutriční malnutricí, kdy nedostatek vitaminů A, E, zinku, železa, riboflavinu a folátu může zhoršovat anémii [Autino a kol., 2012].

### **3.3.2 Mozková malárie**

Závažnější forma malárie může vést k mozkovým komplikacím. Mozkovou neboli cerebrální malárii můžeme diagnostikovat u pacientů, kteří nejsou schopni lokalizovat bolestivý podnět, mají periferní asexuální parazitémii a nemají žádné jiné identifikované příčiny encefalopatie. Mezi počáteční klinické projevy patří bolesti hlavy, záchvaty a změny v duševní aktivitě, poté se onemocnění projevuje těžkou poruchou vědomí (sopor, koma). V patogenezi cerebrální anémie dochází ke zvýšení propustnosti hematoencefalické bariéry pro proteiny. Dochází k poškození mikrovaskulárního endotelu, což vede k úniku cytokinů, antigenů malárie a dalších škodlivých molekul přes hematoencefalickou bariéru do mozkového parenchymu. To vede k aktivaci mikroglíí, aktivaci a apoptóze

astrocytů. V důsledku vaskulární obstrukce dochází ke snížení lokální spotřeby kyslíku v mozku a následné hypoxii [Luzolo a kol., 2019].

Cerebrální malárie by měla být zvažována u každého pacienta v kómatu s anamnézou horečky, který byl v postižené oblasti v posledních 2 měsících od nástupu příznaků. Může se zde projevit i retinopatie charakteristická skvrnitým bělením sítnice a změnami barev cév. Makulární bělení je znázorněno na obr. 10. Běžným rysem je retinální krvácení. Při klinickém vyšetření zjistíme, že retinální krevní cévy obsahují mnoho dehemoglobizovaných parazitovaných červených krvinek. Oko se vyšetřuje oftalmoskopií, kterou rozlišujeme na přímou a nepřímou. Nepřímý oftalmoskop poskytuje širší zorné pole. Specifické znaky pro cerebrální malárii jsou vidět přes rozšířenou zornici, které lze dosáhnout pomocí tropikamidu nebo 1% očními kapkami či přidáním 2,5% fenylefrinu. Širší zorné pole umožňuje vizualizaci periferní sítnice, kde jsou situovány unikátní cévní změny [Beare a kol., 2006].



**Obr. 10: Závažné makulární bělení obklopující foveolu dítěte s cerebrální anémií.** Plná šipka označuje makulární bělení, nevybarvená šipka označuje oslnění. Upraveno dle [Dondorp, 2005].

### 3.3.3 Placentární malárie

Placentární malárie je spojena s předčasným porodem, zvýšeným rizikem potratu, intrauterinní růstovou retardací, nízkou porodní hmotností a fetální anémií. Je častá u *P. falciparum* a méně častá u *P. vivax*. Existuje však i smíšená placentární infekce obou těchto druhů. Rizikovými faktory pro rozvoj této malárie jsou věk ženy do 25 let a první těhotenství, kdy je buňkami zprostředkovaná

imunitní odpověď velmi nízká kvůli udržení placenty. Riziko dále stoupá v průběhu prvního a druhého trimestru těhotenství. Během placentární malárie jsou infikované erytrocyty sekvestrovány v placentě, kdy PfEMP1 přilne k trofoblastickému endotelu prostřednictvím chondroitin sulfátu A a cukrů jako jsou glykozaminoglykany, případně kyselina hyaluronová a hromadí se v intervilózních prostorech. Přítomnost infikovaných krvinek v těchto prostorech aktivuje mononukleární buňky, dochází k uvolnění chemokinů, fagocytárních buněk a zvýšení hodnot TNF a IL-10. Zvýšené zánětlivé reakce v infikované placentě vedou k oxidačnímu stresu a následně indukované smrti placentárních buněk [Autino a kol., 2012; Sharma a Shukla, 2017].

Hustota parazitů v placentě oproti periferní krvi je vyšší. Zvětšení tloušťky bazální membrány trofoblastu, perivilózní fibrinoidní depozita a syncytiální zauzlování způsobují redukci transportu kyslíku a živin k plodu, což vede k intrauterinní růstové retardaci. Ukládání malarického pigmentu vede ke zčernání placenty [Sharma a Shukla, 2017].

ATPázová plazmatická membrána transportující  $\text{Ca}^{2+}$  4 (ATP2B4) je gen kódující hlavní kalciovou pumpu plazmatické membrány erytrocytů  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPázu typu 4 (PMCA4), jehož genetická variace může narušit expresi PMCA4 nebo ovlivnit vývoj parazita. Běžný polymorfismus ATP2B4 slouží jako ochranný faktor proti malárii v těhotenství [Goheen a kol., 2017].

### 3.3.4 Poškození plic

U těžké malárie dochází i k akutnímu poškození plic (ALI) a syndromu akutní respirační tísně (ARDS). ARDS je dobře známou komplikací pozorovanou hlavně u infekce *P. falciparum*. Může se objevit kdykoliv během infekce, antimalarické léčby i po ní, když byla snížena parazitémie a je zhoršován přetížením tekutinami. Patogeneze poškození plic u *P. falciparum* je spojena s poškozením vyvolaným cytokiny nebo účinky sekvestrace parazitovaných krvinek. U dětí s cerebrální malárií bylo prokázáno, že k sekvestraci dochází v plicích, avšak v menší míře než v mozku, kůži nebo střevě. U *P. vivax* může být ARDS způsobeno porušenou regulací produkce cytokinů. U nekomplikované malárie mají pacienti mírné poškození plicních funkcí např. obstrukce malých dýchacích cest, snížená výměna plynů, zhoršená alveolární ventilace a zvýšená plicní fagocytární aktivita [Autino a kol., 2012].

Poškození plic bylo pozorováno u myši infikovaných kmeny *P. berghei*. 60 % myši mělo dušnost, obstrukci dýchacích cest a hypoxémii. Byly nalezeny patologické nálezy jako pleurální výpotek, plicní hemoragie a edém. To dokazuje roli zánětu ve vývoji ALI a ARDS. Pozorování upozornilo na možnou roli několika faktorů jako jsou intracelulární adhezivní molekuly ICAM-1, receptor faktoru aktivujícího destičky, receptor urokinázy, neutrofilů, vaskulární endoteliální růstový faktor, ukládání hemozoinu, sekvestrace parazitů, aktivita sodíkového kanálu a T lymfocyty. Myši, které zemřely, měly těžší plíce v průměru o 40 %, což naznačuje edém. Měly zarudlé plíce a pleurální výpotek. Histologické změny byly charakterizovány alveolárním edémem a krvácením se zánětlivou infiltrací s převažujícími neutrofilů a makrofágy v alveolárních i intersticiálních místech a destrukcí alveolárních sept. Myši, které byly usmrceny 20. den po infekci, měly plíce zašedlé bez pleurálního výpotku. Měly ztmavenou slezinu i játra, těžkou anémií a intersticiální pneumonií s mononukleárními zánětlivými buňkami. U myši byl prokázán charakteristický znak pro lidi, a to přítomnost acelulárních eozinofilních membrán, které přilnuly k alveolárním kanálkům i stěnám a hyalinním membránám [Ortolan a kol., 2014; Autino a kol., 2012].

### 3.3.5 Poškození ledvin

Ledvinové komplikace nastávají hlavně v důsledku hemodynamických změn a imunitní odpovědi. Účinek parazita v ledvinách byl prokázán antigeny detekovanými v glomerulech. Úmrtnost na akutní selhání ledvin (ARF) je vysoká. ARF je častější u neimunních dospělých a starších dětí a většinou je způsobena *P. falciparum*. *P. malariae* je parazit, který nejčastěji přispívá ke vzniku glomerulonefritidy. Onemocnění ledvin je primárně způsobeno abnormalitami červených krvinek a mezi klinické projevy onemocnění patří proteinurie a mikroalbuminurie. Hlavním histologickým průkazem je glomerulonefritida, akutní tubulární nekróza a intersticiální nefritida [Autino a kol., 2012; Silva a kol., 2017].

Na patogenezi poškození ledvin se podílejí endoteliální aktivace, které vedou k uvolnění cytokinů, včetně tromboxanu, katecholaminů, endotelinu a dalších zánětlivých mediátorů. Při infekci způsobené *P. malariae* dochází k aktivaci komplementu s depozity imunitních komplexů, což vede ke glomerulonefritidě. V důsledku intenzivního parazitismu u infekce



*P. falciparum* vede hemodynamická nestabilita k akutní tubulární nekróze. Závažnější poškození ledvin je spojeno s kortikální nekrózou, kdy nelze obnovit funkce ledvin a dochází k rozvoji konečného stádia onemocnění ledvin. Chronické poškození ledvin je spojeno s pacienty s opakujícími se infekcemi [Autino a kol., 2012; Silva a kol., 2017].

Akutní poškození ledvin způsobené *P. falciparum* zahrnuje oligoanurii a to ve 46-76 % případů, dále těžkou metabolickou acidózu a hyperkatabolický stav. Rizikovými faktory u poškození ledvin jsou pokročilý věk, hyperbilirubinémie, sekundární infekce a potřeba inotropních léků. Faktory související s mortalitou zahrnují věk, hyperkalémii, leukocytózu, žloutenku a oligoanurii. Tento druh parazita je spojen s tubulární nekrózou, zánětlivým intersticiálním infiltrátem, edémem a odlitkovou nefropatií. Existují nové biomarkery, které detekují akutní poškození ledvin, protože kreatinin byl ve 31 % případů v normě. Řadí se sem lipokalin spojený s neutrofilní gelatinázou a molekuly poškození ledvin, které detekují poškození dříve než tradiční markery, jako je například kreatinin. Glomerulární léze u infekce jsou charakterizovány mezangiální proliferací s mírnou expanzí mezangiální matrix a ukládáním granulárního eozinofilního materiálu v endotelu, mezangiu a Bowmanově pouzdře [Autino a kol., 2012; Silva a kol., 2017].

U akutního poškození ledvin způsobeného *P. malariae* se vyskytuje proteinurie přibližně v 46 % případů. Hladiny komplementu jsou v normě a depozita imunitních komplexů vedou k mezangiokapilární glomerulonefritidě a v některých případech k nefrotickému syndromu. Klinické projevy zahrnují buď neškodný obraz s mírnou proteinurií, bez poruchy funkce ledvin nebo závažný obraz s přetrvávající proteinurií nebo nefrotickým syndromem. Elektronovým mikroskopem bylo prokázáno ztlustění glomerulárních kapilárních stěn způsobené subendoteliálními depozity a imunofluorescencí granulární depozita přes endotel. Rychle progresivní glomerulonefritida se vyskytuje v endemických oblastech a neexistuje pro ni specifický klinický obraz. U starších pacientů je příležitostně pozorována mikrohematurie a hypertenze, která se považuje za pozdní projev. Onemocnění glomerulů se může rozvinout i přes eliminaci parazita a způsobit chronické onemocnění ledvin detekovatelné po 3 až 5 letech od primární infekce [Autino a kol., 2012; Silva a kol., 2017].

Vzácnou, ale závažnou komplikací u těžké malárie je horečka černé vody. Mezi její charakteristické znaky patří horečka, intravaskulární hemolýza, hemoglobinurie, tmavá moč a časté akutní selhání ledvin. Poškození ledvin zde způsobuje masivní hemolýza [Autino a kol., 2012].

Léčba při onemocnění ledvin zahrnuje vhodná antimalarika a podpůrná opatření, kam se řadí korekce hydroelektrolytických poruch, náhrada tekutin a dialýza. Dialýza je nutná až ve 46-76 % případů [Silva a kol., 2017].

### **3.3.6 Poškození jater**

Játra se na malarickém onemocnění podílí ve dvou fázích: pre-erytrocytární a erytrocytární. V první fázi hraje roli vazba merozoitového cirkumsporozoitového proteinu (CSP-A) s tryptofanem regulovaným atenuačním proteinem (TRAP) na hepatocytech. V této fázi nabývají játra minimálního poškození. V erytrocytární fázi dochází ke vzniku žloutenky, buď přímo infekcí – malarická hepatitida, intravaskulární hemolýza parazitovaných krvinek nebo nepřímo – mikroangiopatická hemolýza spojená s diseminovanou intravaskulární koagulopatií, antimalariky indukovaná hemolýza. Intravaskulární hemolýza erytrocytů způsobuje nekonjugovanou hyperbilirubinémii s mírnou až středně těžkou žloutenkou. Konjugovaná hyperbilirubinémie indikuje dysfunkci hepatocytů. Histologie jater při malárii prokázala městnání a zduřelé hepatocyty, centrizonální nekrózu, hyperplazii Kupfferových buněk, usazování hnědého pigmentu, steatózu, cholestázu, portální infiltraci lymfocyty, parazitované erytrocyty a submasivní nekrózu. Pacienti mají často zvýšený výskyt hypoglykemie a trombocytopenie [Autino a kol., 2012; Fazil a kol., 2013].

Jaterní testy by měly být prováděny spolu s včasnou diagnózou malárie způsobené *P. falciparum*. Tento druh zapříčiní až trojnásobné zvýšení hladin jaterních transamináz. Většina pacientů je léčena intravenózně či perorálně artesunátem v závislosti na závažnosti onemocnění [Autino a kol., 2012; Fazil a kol., 2013].

## 4 Léčba a prevence malárie

Po stanovení diagnózy je nutné zahájit adekvátní a okamžitou léčbu. Infekce způsobená *P. falciparum* může rychle progradovat do závažného onemocnění nebo smrti za pouhé dva dny. Pokud nelze druh přesně identifikovat, mělo by se s pacientem jednat jako s infikovaným *P. falciparum* [Griffith a kol., 2007].

Důležitým vodítkem pro správnou léčbu je cestovní anamnéza. Je významná pro výběr účinného antimalarika z hlediska rizika lékové rezistence. Každý pacient, který byl v endemické oblasti v roce předcházejícím nástupu příznaků malárie, by měl být vyšetřen na toto onemocnění. Inkubační doba se obvykle pohybuje mezi 9 a 18 dny pro *P. falciparum*, *P. vivax* a *P. ovale*, kdy však příznaky mohou nastat až po několika týdnech nebo měsících po expozici. U *P. falciparum* může být inkubační doba kratší než 7 dní. Mírné kmeny, jako je *P. vivax*, mohou způsobit první příznaky po 12 až 18 měsících od kousnutí infikovaným komárem [Griffith a kol., 2007].

Léčbou nefalciparové malárie je třídní kúra perorálně podávaným chlorochinem. U kmenů rezistentních na chlorochin se podává perorální chinin spolu s tetracyklinem, doxycyklinem nebo klindamycinem. Dále se využívá terapie založená na artemisininu (ACT). Lze využít artesunát v kombinaci se sulfadoxinem-pyrimethaminem, amodiachinem nebo meflochinem či artemether v kombinaci s lumefantrinem. Tyto léky jsou rychle účinné. Pacienti léčení na malárii způsobenou *P. falciparum* by měli být hospitalizováni alespoň na 24 hodin, protože u pacientů může dojít k náhlému zhoršení stavu, zejména na začátku léčby. U těžké falciparové malárie a infekcí komplikovaných vysokým počtem parazitů, kdy je parazitováno více než 2 % červených krvinek, by měla léčba zahrnovat intravenózní terapii [Griffith a kol., 2007; Lalloo a kol., 2007; Hanboonkunupakarn a White, 2022].

U léčby těžké malárie je zásadní obecná a podpůrná péče. U pacientů v kómatu se zajišťuje stabilizace tělesných funkcí, jako je dýchání, podávání léků a výživy, polohování kvůli snížení rizika proleženin. Jako lék se používá intravenózní chinin v kombinaci s klindamycinem nebo doxycyklinem či artesunát. Křeče se tlumí benzodiazepiny nebo fenytoinem a horečka se snižuje paracetamolem, metamizolem. Potřebná je terapie ke snížení

nitrolebního tlaku. Důležité je i předvídat komplikace, které mohou nastat typicky u jedinců trpících cerebrální malárií [Dondorp, 2005]. U malárie se může projevit hypoglykemie, kterou přípravek chininu zhoršuje, tudíž pacienti léčení tímto způsobem vyžadují pečlivé sledování [Lalloo a kol., 2007].

Hlavním pokrokem v léčbě bylo zavedení léků odvozených od artemisininu, což je sloučenina získaná z listů rostliny *Artemisia annua*. Deriváty této sloučeniny, dihydroartemisinin, artesunát a artemether, tvoří základ antimalarické léčby. Jsou nejrychleji působícími léky a jsou vysoce účinné i při podávání jednou denně. Artesunát výrazně snížil mortalitu u hospitalizovaných pacientů se závažnou malárií a oproti chininu nezhoršuje hypoglykemii. Další výhodou oproti chininu je, že deriváty artemisininu zabíjejí mladší cirkulující stádia *P. falciparum* před jejich sekvestrací. Vznikají však omezení léčby rezistencí parazita na deriváty artemisininu. Rezistence se projevuje zpomalením vymizení parazita. Počet parazitů, kteří zůstávají v oběhu po eliminaci artemisininové složky je vyšší a dochází k selekci rezistentních mutantů. Terapeutickým řešením je nasazení derivátu artemisininu se dvěma pomalu eliminovanými antimalariky – trojitá kombinace artemisininu (TACT). Mezi současně využívaná TACT se řadí artemether-lumefantrin-amodiachin a dihydroartemisinin-piperachin-meflochin. TACT jsou vysoce účinné, bezpečné a dobře tolerované [Hanboonkunupakarn a White, 2022].

Jako prevence se využívá kombinace chemoprophylaxe a vyhýbaní se kousnutí komáry. Do prevence také patří používání repelentů, insekticidů a ochranných oděvů. Pro prevenci těhotných žen se využívá dihydroartemisinin-piperachin, který se podává jednou za měsíc. Pokrok přináší vývoj vakcíny RTS,S/AS01, která by měla poskytovat ochranu dětem do 5 let [Hanboonkunupakarn a White, 2022]. Novinkou je vakcína proti malárii R21/Matrix-M, kterou jako první země schválila Ghana. Vakcína obsahuje cirkumsporozoitový protein, který je vylučovaný parazitem a je fúzovaný s povrchovým antigenem hepatitidy B. Dále je smíchán s Matrix-M, vakcinačním adjuvans vyráběným společností Novavax, který posiluje reakci imunitního systému na vakcínu. Očkování je schváleno u dětí od 5 měsíců do 3 let [Mahase, 2023].

## ZÁVĚR

Malárie může být způsobena čtyřmi hlavními zástupci rodu *Plasmodium*, a to *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium vivax* a *Plasmodium ovale*. Závažný průběh onemocnění nebo dokonce smrt jsou nejčastěji způsobeny *P. falciparum*. Pro efektivní léčbu malárie je zásadní rychlá a přesná diagnostika, která zahrnuje identifikaci parazitů malárie nebo jejich antigenů v krvi pacienta. Jsou využívány mikroskopické průkazy v tenkém a tlustém krevním nátěru, dále PCR metody a rychlé diagnostické testy.

Pro správnou léčbu malárie je klíčová cestovní anamnéza, která je významná pro výběr účinného antimalarika. Léčba nefalciparové malárie zahrnuje třídenní kúru perorálně podávaným chlorochinem nebo kombinace artemisininových terapií. U těžké falciparové malárie a infekcí komplikovaných vysokým počtem parazitů by měla léčba zahrnovat intravenózní terapii. Důležitá je také obecná a podpůrná péče. V rámci prevence se využívá kombinace chemoprolaxe, vyhýbaní se kousnutí komáry, používání repelentů, insekticidů a ochranných oděvů. Jedinou schválenou vakcínou proti malárii je R21/Matrix-M, a to pouze v Ghaně. Očkování je pro děti od 5 měsíců do 3 let.

## POUŽITÁ LITERATURA

Adams Y., Rowe A.: The Effect of Anti-Rosetting Agents against Malaria Parasites under Physiological Flow Conditions. *Public Library of Science One*. 2013; 8 (9). DOI: 10.1371/journal.pone.0073999.

Aoki T.: A Comprehensive Review of Our Current Understanding of Red Blood Cell (RBC) Glycoproteins. *Membranes*. 2017; 7 (4): 56. DOI: 10.3390/membranes7040056.

Autino B., Corbett Y., Castelli F., Taramelli D.: Pathogenesis of malaria in tissues and blood. *Mediterranean Journal of Hematology Infectious Diseases*. 2012; 4 (1). DOI: 10.4084/MJHID.2012.061.

Baldwin M., Li X., Hanada T., Liu S., et al.: Merozoite surface protein 1 recognition of host glycoprotein A mediates malaria parasite invasion of red blood cells. *Blood*. 2015; 125 (17): 2704-2711. DOI: 10.1182/blood-2014-11-611707.

Beare A., Taylor E., Harding P., Lewallen S., Molyneux E. Malarial retinopathy: a newly established diagnostic sign in severe malaria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2006; 75 (5): 790–797. DOI: 10.4269/AJTMH.2006.75.790.

Berzosa P., Lucio A., Romay-Barja M., Herrador Z., et al.: Comparison of three diagnostic methods (microscopy, RDT, and PCR) for the detection of malaria parasites in representative samples from Equatorial Guinea. *Malaria Journal*. 2018; 17 (1): 333. DOI: 10.1186/s12936-018-2481-4.

Carter M., Essner R., Goldstein N., Iyer M.: Guide to Research Techniques in Neuroscience. *Academic Press*. 2022; 3: 227-243. DOI: 10.1016/B978-0-12-818646-6.00014-2.

Centers for Disease Control and Prevention, <https://www.cdc.gov/malaria/about/biology/#tabs-1-5> (citace z 12.2.2023).

Centers for Disease Control and Prevention, <https://www.cdc.gov/malaria/about/distribution.html> (citace z 25.1.2023).

Dankwa S., Chaand M., Kanjee U., Jiang R., et al.: Genetic Evidence for Erythrocyte Receptor Glycophorin B Expression Levels Defining a

Dominant Plasmodium falciparum Invasion Pathway into Human Erythrocytes. *Infection and Immunity*. 2017; 85 (10). DOI: 10.1128/IAI.00074-17.

Dondorp A.: Pathophysiology, clinical presentation and treatment of cerebral malaria. *Neurology Asia*. 2005; 10: 67–77. PMID: 17123967.

Fazil A., Vernekar P., Geriani D., Pant S., et al.: Clinical profile and complication of malaria hepatopathy. *Journal of Infection and Public Health*. 2013; 6 (5): 383-388. DOI: 10.1016/j.jiph.2013.04.003.

Goheen M., Campino S., Cerami C.: The role of the red blood cell in host defence against falciparum malaria: an expanding repertoire of evolutionary alterations. *British Journal of Haematology*. 2017; 179 (4): 543-556. DOI: 10.1111/bjh.14886.

Green M., Sambrook J.: Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor protocols*. 2019; 2. DOI: 10.1101/pdb.prot095182.

Griffith S., Lewis S., Mali S., Parise E.: Treatment of Malaria in the United States: A Systematic Review. *The Journal of the American Medical Association*. 2007; 297 (20): 2264–2277. DOI: 10.1001/jama.297.20.2264.

Haldar K., Mohandas N.: Malaria, erythrocytic infection, and anemia. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*. 2009; 87–93. DOI: 10.1182/asheducation-2009.1.87.

Hanboonkunupakarn B., White N.: Advances and roadblocks in the treatment of malaria. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2022; 88 (2): 374-382. DOI: <https://doi.org/10.1111/bcp.14474>.

Head D., Lee Z., Poole J., Avent N.: Expression of phosphatidylserine (PS) on wild-type and Gerbich variant erythrocytes following glycophorin-C (GPC) ligation. *British Journal of Haematology*. 2005; 129 (1): 130-137. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2005.05407.x.

Hollox E., Louzada S.: Genetic variation of glycophorins and infectious disease. *Immunogenetics*. 2022. DOI: 10.1007/s00251-022-01280-7.

Chen R., Zou J., Kang R., Tang D.: The redox protein HMGB1 in cell death and cancer. *Antioxidants & Redox Signaling*. ahead of print. 2023. DOI: 10.1089/ars.2023.0007.

Jaskiewicz E., Peyrard T., Kaczmarek R., Zerka A., et al.: The Gerbich blood group system: old knowledge, new importance. *Transfusion Medicine Reviews*. 2018; 32 (2): 111-116. DOI: 10.1016/j.tmr.2018.02.004.

Kariuki S., Williams T.: Human genetics and malaria resistance. *Human Genetics*. 2020; 139: 801–811. DOI: 10.1007/s00439-020-02142-6.

Kavishe R., Koenderink J., Alifrangis M.: Oxidative stress in malaria and artemisinin combination therapy: Pros and Cons. *The FEBS Journal*. 2017; 284 (16): 2579-2591. DOI: 10.1111/febs.14097.

Lalloo D., Shingadia D., Pasvol G., Chiodiny P., et al.: UK malaria treatment guidelines. *Journal of Infection*. 2007; 54 (2): 111-121. DOI: 10.1016/j.jinf.2006.12.003.

Lamikanra A., Brown D., Potocnik A., Casals-Pascual C., et al.: Malarial anemia: of mice and men. *Blood*. 2007; 110 (1): 18-28. DOI: 10.1182/blood-2006-09-018069.

Lee W., Malleret B., Lau Y., Mauduit M., et al. Glycophorin C (CD236R) mediates vivax malaria parasite rosetting to normocytes. *Blood*. 2014; 123 (18): 100-109. DOI: 10.1182/blood-2013-12-541698.

Lee W., Russell B., Rénia L.: Evolving perspectives on rosetting in malaria. *Trends in Parasitology*. 2022; 38 (10): 882-889. DOI: 10.1016/j.pt.2022.08.001.

Luzolo A., Ngoyi D.: Cerebral malaria. *Brain Research Bulletin*. 2019; 145: 53-58. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2019.01.010.

Mackay I.: Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*. 2004; 10 (3): 190-212. DOI: 10.1111/j.1198-743X.2004.00722.x.

Mahase E.: Ghana approves Oxford's malaria vaccine for children aged 5 to 36 months. *British Medical Journal*. 2023; 381: 850. DOI: 10.1136/bmj.p850.

Markoulatos P., Siafakas N., Moncany M.: Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory of Analysis*. 2002; 16 (1): 47-51. DOI: 10.1002/jcla.2058.

Mathison B., Pritt B.: Update on Malaria Diagnostics and Test Utilization. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017; 55 (7): 2009-2017. DOI: 10.1128/JCM.02562-16.



- Mayer G., Cofie J., Jiang L., Miller L.: Glycophorin B is the erythrocyte receptor of Plasmodium falciparum erythrocyte-binding ligand, EBL-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009; 106 (13): 5348-5352. DOI: 10.1073/pnas.0900878106.
- Mbanefo A., Kumar N.: Evaluation of Malaria Diagnostic Methods as a Key for Successful Control and Elimination Programs. *Tropical Medicine and Infectious Disease*. 2020; 5 (2): 102. DOI: 10.3390/tropicalmed5020102.
- Milner D.: Malaria Pathogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2018; 8 (1). DOI: 10.1101/cshperspect.a025569.
- Murray C., Gasser R. Jr., Magill A., Miller S.: Update on Rapid Diagnostic Testing for Malaria. *Clinical Microbiology Reviews*. 2008; 21 (1): 97-110. DOI: 10.1128/CMR.00035-07.
- Ortolan L., Sercundes M., Barboza R., Debone D., et al.: Predictive Criteria to Study the Pathogenesis of Malaria-Associated ALI/ARDS in Mice. *Mediators of Inflammation*. 2014. DOI: 10.1155/2014/872464.
- Paul A., Egan E., Duraisingh M.: Host-parasite interactions that guide red blood cell invasion by malaria parasites. *Current Opinion in Hematology*. 2015; 22 (3): 220-226. DOI: 10.1097/MOH.0000000000000135.
- Poti K., Sullivan D., Dondorp A., Woodrow Ch.: HRP2: Transforming Malaria Diagnosis, but with Caveats. *Trends in Parasitology*. 2020; 36 (2): 112-126. DOI: 10.1016/j.pt.2019.12.004.
- Preiser J.: Oxidative Stress. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 2012; 36 (2): 147-154. DOI: 10.1177/0148607111434963.
- Semenya A., Tran T., Meyer E., Barnwell J., Galinski M.: Two functional reticulocyte binding-like (RBL) invasion ligands of zoonotic Plasmodium knowlesi exhibit differential adhesion to monkey and human erythrocytes. *Malaria Journal*. 2012; 11: 228. DOI: 10.1186/1475-2875-11-228.
- Sharma L., Shukla G.: Placental Malaria: A New Insight into the Pathophysiology. *Frontiers in Medicine*. 2017; 4. DOI: 10.3389/fmed.2017.00117.

- Siciliano G., Alano P.: Enlightening the malaria parasite life cycle: bioluminescent Plasmodium in fundamental and applied research. *Frontiers in Microbiology*. 2015; 6. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00391.
- Silva G., Pinto J., Barros E., Farias G., et al.: Kidney involvement in malaria: an update. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De São Paulo*. 2017; 59. DOI: 10.1590/S1678-9946201759053.
- Singh S., Miura K., Zhou H., Muratova O, et al.: Immunity to Recombinant Plasmodium falciparum Merozoite Surface Protein 1 (MSP1): Protection in Aotus nancymai Monkeys Strongly Correlates with Anti-MSP1 Antibody Titer and In Vitro Parasite-Inhibitory Activity. *Infection and Immunity*. 2006; 74 (8). DOI: 10.1128/IAI.01679-05.
- Talapko J., Škrlec I., Alebić T., Jukić M., Včev A.: Malaria: The Past and the Present. *Microorganisms*. 2019; 7 (6): 179. DOI: 10.3390/microorganisms7060179.
- Tangpukdee N., Duangdee C., Wilairatana P., Krudsood S.: Malaria diagnosis: a brief review. *Korean Journal of Parasitology*. 2009; 47 (2): 93-102. DOI: 10.3347/kjp.2009.47.2.93.
- Tek B., Dempster G., Kale I.: Computer vision for microscopy diagnosis of malaria. *Malaria Journal*. 2009; 8: 153. DOI: 10.1186/1475-2875-8-153.
- Tomita M., Marchesi V.: Amino-acid sequence and oligosaccharide attachment sites of human erythrocyte glycophorin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1975; 72 (8): 2964-2968. DOI: 10.1073/pnas.72.8.2964.
- Tuteja R.: Malaria – an overview. *The FEBS Journal*. 2007; 274 (18): 4670-4679. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2007.05997.x.
- Ty M., Zuniga M., Götz A., Kayal S., et al.: Malaria inflammation by xanthine oxidase-produced reactive oxygen species. *EMBO Molecular Medicine*. 2019; 11 (8). DOI: 10.15252/emmm.201809903.
- Vasquez M., Zuniga M., Rodriguez A.: Oxidative Stress and Pathogenesis in Malaria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021; 11. DOI: 10.3389/fcimb.2021.768182.

White N.: Anaemia and malaria. *Malaria Journal*. 2018; 17: 371. DOI: 10.1186/s12936-018-2509-9.

Zimmerman P., Howes R.: Malaria diagnosis for malaria elimination. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2015; 28 (5): 446-454. DOI: 10.1097/QCO.000000000000191.