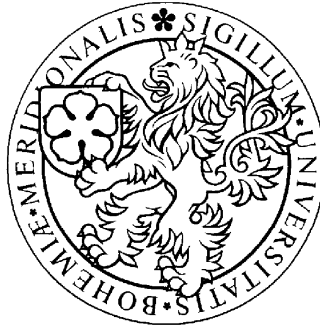


JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Biologická fakulta

Katedra obecné biologie



Vliv klíštěcích slin na produkci cytokinu MIP-2 myšimi makrofágy

Bakalářská práce

Eva Slepíčková

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

Školitel specialista: RNDr. Jiří Salát, PhD.

Slepičková E., 2007: Vliv klíštěcích slin na produkci cytokinu MIP-2 myšími makrofágy [Influence of tick saliva on cytokine MIP-2 production by murine macrophages. Bc. Thesis, in Czech] - 36 p., Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation: Aim of this study was to quantify production of murine MIP-2 and human IL-8 cytokines and to determine effects of tick saliva (SGE) on their production. The mechanism of interaction was also studied.

Tato práce byla financována grantem GA ČR č. 524/05/0811

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

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

V Českých Budějovicích dne 16. 5. 2007

.....
Eva Slepičková

Poděkování

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

1. ÚVOD	6
1.1 Vztah mezi hostitelem a parazitem	6
1.2 Cytokiny	8
1.3 Chemokiny IL-8 a MIP-2	8
1.3.1 IL-8 (interleukin-8)	9
1.3.2 MIP-2 (makrofágový zánětlivý protein-2)	9
1.4 Chemokinové receptory	10
1.4.1 Receptor pro interleukin-8	10
1.4.2 Receptor pro MIP-2	11
1.4.3 Mechanismus přenosu signálu	11
1.5 Význam neutrofilů v imunitním systému	11
1.6 Cysteinové peptidázy a jejich inhibitory	13
2. CÍL PRÁCE	15
3. MATERIÁL A METODY	16
3.1 Laboratorní zvířata	16
3.2 Buněčné suspenze	16
3.2.1 Myší buněčné linie	16
3.2.2 Myší peritoneální makrofágy	16
3.2.3 Myší splenocyty	16
3.2.4 Lidská buněčná linie	17
3.3 Příprava SGE	17
3.4 Příprava slin	17
3.5 Schéma jednotlivých pokusů	17
3.5.1 Produkce MIP-2 myšími buňkami	17
3.5.2 Produkce MIP-2 myšími buňkami za přítomnosti SGE	18
3.5.3 Produkce MIP-2 v závislosti na čase	18
3.5.4 Vliv různých SGE na produkci MIP-2 buňkami PMJ2/R	18
3.5.5 Vliv SGE na produkci MIP-2 peritoneálními makrofágy	18
3.5.6 Vliv různých SGE na produkci IL-8 buňkami THP-1	19
3.5.7 Mechanismus působení SGE na MIP-2	19
3.5.8 Mechanismus působení SGE na IL-8	19
3.5.9 Mechanismus inhibice MIP-2	19
3.5.10 Vliv rekombinantního cystatinu na produkci MIP-2 a IL-8	20
3.6 ELISA test	20
3.6.1 Stanovení cytokinu MIP-2	20
3.6.2 Stanovení cytokinu IL-8	21
3.7 Statistické zpracování	22

4. VÝSLEDKY	23
4.1 Produkce MIP-2 myšními buňkami	23
4.2 Produkce MIP-2 myšními buňkami za přítomnosti SGE.....	23
4.3 Produkce MIP-2 v závislosti na čase.....	24
4.4 Vliv různých SGE na produkci MIP-2 buňkami PMJ2/R.....	25
4.5 Vliv SGE na produkci MIP-2 peritoneálními makrofágy	26
4.6 Vliv různých SGE na produkci IL-8 buňkami THP-1	26
4.7 Mechanismus působení SGE na MIP-2	27
4.8 Mechanismus působení SGE na IL-8.....	28
4.9 Mechanismus inhibice cytokinu MIP-2	28
4.10 Vliv rekombinantního cystatinu na produkci MIP-2 a IL-8.....	28
5. DISKUSE	29
6. SOUHRN	31
7. PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK	32
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	33

1. ÚVOD

1.1 Vztah mezi hostitelem a parazitem

Parazitě si během své evoluce vyvinuli důmyslné mechanismy, které jim umožňují ovlivňovat obranný systém hostitele. Proteiny a další molekuly syntetizované a sekretované slinnými žlázami klíšťat jsou pro tyto ektoparazity zásadní, aby mohli přijímat potravu. Proces sání trvá většinou několik dní, přičemž klíště shromažďuje krev ve střevě a z něj jsou zpětně sekretovány do hostitele voda a ionty. Pro zajištění prodloužení doby sání se přirozenou součástí strategie parazita stala modulace imunitní odpovědi hostitele. Slinné žlázy produkují množství bioaktivních látek s antikoagulačními, antihemostatickými, protizánětlivými a imunosupresivními vlastnostmi, které regulují interakce mezi klíštětem a hostitelem (Ribeiro a kol. 1985). K úspěšnému sání parazita je nutné zabránit srážení krve a vzniku zánětlivé reakce. Látky obsažené v klíštěcích slinách inhibují agregaci trombocytů v místě poranění, usnadňují sání zvětšením krevního průtoku, lokálně potlačují imunitní odpověď hostitele, narušují hemostázu a také mohou usnadnit přenos nejrůznějších patogenů. Agregaci krevních destiček v místě sání zabraňují prostaglandiny (PGE_2) a apyráza (Ribeiro a kol. 1985).

Pro vývoj protektivní imunitní odpovědi je třeba, aby byl daný patogen degradován lysozomálními proteázami na kratší peptidy a prezentován pomocí MHC molekul na povrchu antigen prezentujících buněk. Bylo prokázáno, že různí intracelulární parazité blokují cestu prezentace antigenu, a tak unikají imunitnímu systému. Cystatiny hlístic potlačují funkci proteáz při zpracování antigenu, dále přispívají ke snížení proliferace T-lymfocytů hostitele a indukují protizánětlivou cytokinovou odpověď (Hartmann a Lucius 2003). Geny kódující cystatiny byly nalezeny i v souboru přepisovaných genů slinných žláz ixodidních klíšťat (Valenzuela a kol. 2002), ale o jejich přesných funkcích toho zatím mnoho nevíme.

V místě přichycení klíštěte vzniká zánětlivá reakce. Antigenní materiál z klíštěcích slin zachycují Langerhansovy buňky, které migrují do lymfatických uzlin, kde prezentují antigeny T-lymfocytům. T-lymfocyty rozlišujeme na T_H a T_C lymfocyty. T_H lymfocyty jsou podle vlastností produkovaných cytokinů rozdělovány na dvě subpopulace T_{H1} a T_{H2} (Mosmann a Coffman 1989). Pro T_{H1} subpopulaci je charakteristická sekrece cytokinů IL-2, IL-12, TNF- α a IFN- γ ; pro T_{H2} subpopulaci IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 a IL-13. V imunitní odpovědi hostitele na sání klíštěte se významně uplatňují T_{H1} cytokiny, které mají vliv na další lymfocyty a myeloidní buňky, chemotakticky působí na makrofágy, neutrofilů, bazofilů a

eozinofily. Tímto způsobem vzniká kožní bazofilní hypersenzitivita, což je typ oddálené přecitlivělosti (Mosmann a Coffman 1989). Dále dochází k produkci homocytotropních protilátek, které senzibilizují bazofily a žírné buňky (Christe a kol. 1998). Volné protilátky po kontaktu s cirkulujícími antigeny slin aktivují komplement klasickou cestou. Důležitou složkou primární imunitní reakce je také aktivace komplementu alternativní cestou, při které dochází k uvolnění anafylatoxinů. Ty jsou schopné způsobit degranulaci bazofilů, žírných buněk a tak i uvolnění v nich přítomných mediátorů, například histaminu a serotoninu. Histamin inhibuje sání a může zapříčinit až odpadnutí klíštěte (Paine a kol. 1983).

Klíšťata proto účinně modulují imunitní systém hostitele ve svůj prospěch. V jejich slinách byly objeveny proteiny vážající histamin, které blokují účinky histaminu a serotoninu uvolněných z granul bazofilů a žírných buněk (Paesen a kol. 1999). Sliny klíšťat *Ixodes dammini* (*I. scapularis*) inhibují vazbu C3b a C5b složek komplementu na povrch buněk, a tak brání aktivaci komplementu alternativní cestou (Ribeiro 1987). Navíc obsahují inhibitor hydrolýzy C3 složky komplementu a snižují tak produkci anafylatoxinu C3a, který je důležitý pro degranulaci bazofilů a žírných buněk (Ribeiro a Spielman 1986). Bylo také zjištěno, že sliny téhož druhu klíštěte potlačují funkci neutrofilů, jejich agregaci a produkci superoxidového aniontu (Ribeiro a kol. 1990). Extrakt ze slinných žláz částečně nasátých samic *Dermacentor reticulatus* snižuje aktivitu NK buněk (Kubeš a kol. 1994). NK buňky mají zásadní roli v produkci prozánětlivého cytokinu IFN- γ a vlivem jeho snížené produkce dochází k polarizaci imunitní odpovědi směrem k T_H2. Cílem strategie klíštěte je dosáhnout modulace směrem k T_H2 typu imunitní odpovědi, protože vytváří větší možnost pro jeho úspěšné sání a přežití.

Produkty slinných žláz zasahují do cytokinové kaskády, a tak ovlivňují imunitní odpověď organismu (Hajnická a kol. 2005). Extrakt ze slinných žláz klíštěte *Dermacentor andersoni* suprimuje produkci IL-1, TNF- α , IL-2 a IFN- γ (Ramachandra a kol. 1992). Dále bylo dokázáno, že extrakty ze slinných žláz různých ixodidních klíšťat (*Dermacentor reticulatus*, *Amblyomma variegatum*, *Ixodes ricinus*) snižují množství IL-8 prostřednictvím vazby molekuly obsažené ve slinách na tento cytokin (Hajnická a kol. 2001).

Mechanismus působení extraktu ze slinných žláz na produkci myšího prozánětlivého cytokinu MIP-2, funkčního homologu IL-8 nebyl zatím studován.

1.2 Cytokiny

Obecný pojem cytokiny zahrnuje různorodé skupiny regulačních molekul s převážně parakrinním, autokrinním ale i endokrinním působením. Řadíme sem např. rozsáhlou skupinu interleukinů, chemokiny, interferony, faktory nekrotizující nádory, dále kolonie stimulující a růstové faktory. V lidském organismu mají nezastoupitelnou roli v plnění širokého spektra úkolů – účastní se různých imunitních reakcí, zánětlivých procesů a regenerace tkání. Dále ovlivňují kancerogenezi, angiogenezi, řadu mozkových funkcí apod. (Racek a kol. 2006).

Všechny cytokiny jsou uvolňovány z buněk a v minutách mohou indukovat změny v diferenciaci, migraci, sekreci nebo růstu jiných buněk a to cestou vazby na specifický receptor. Působení může být pleiotropní, kdy jeden cytokin má vliv na více typů buněk nebo redundantní, kde různé cytokiny ovlivňují jeden typ buněk. Cytokiny bývají označovány jako tzv. tkáňové hormony, přičemž hranice mezi označením cytokin a hormon je neostrá. V poslední době se totiž ukázalo, že i některé klasické hormony (ACTH, prolaktin) se mohou za určitých okolností chovat jako cytokiny a receptory zmíněných dvou skupin jsou si velmi podobné (Klener a spolupracovníci 1997). Existuje mnoho způsobů, jak klasifikovat cytokiny, ale mezi nejdůležitější patří klasifikace podle struktury a funkce. Podle struktury rozlišujeme jednak sekundární strukturu vlastního cytokinu a dále strukturu receptoru pro daný cytokin (receptorové rodiny). Podle funkce je dělíme na prozánětlivé, protizánětlivé, uplatňující se v humorální nebo buněčné imunitě, antivirové (interferony) a hematopoetické (Klener a spolupracovníci 1997).

V organismu se cytokiny vyskytují v poměrně nízkých koncentracích a pro jejich stanovení se využívá citlivých imunologických metod (ELISA testy), které jsou schopny detekovat množství těchto látek v jednotkách pikogramů.

1.3 Chemokiny IL-8 a MIP-2

Chemokiny jsou malé peptidy, které mají schopnost aktivovat a chemicky přitahovat subpopulace leukocytů a některé nehemopoetické buňky. Chemokiny se podle polohy prvních dvou spárovaných vysoce konzervovaných cysteinů sekvence aminokyselin dělí na 4 skupiny: CXC, CC, CX3C, a C (Kopydlowski a kol. 1999, Murdoch a Finn 2000). Podle primární struktury je dělíme na α -chemokiny, které ovlivňují zejména neutrofile a na β -chemokiny, působící preferenčně na monocyty. Chemokiny působí chemoatrakci různých typů leukocytů, stimulují expresi leukocytárních β_2 integrinů, zvyšují tvorbu leukotrienů a také adhezi neutrofilů k endoteliím.

1.3.1 IL-8 (interleukin-8)

Interleukin-8 je neglykosylovaný protein o molekulové hmotnosti 8 kDa a řadí se mezi chemokiny. Bylo popsáno 14 strukturálně podobných chemokinů v jejichž molekule je téměř 50% identických sekvencí aminokyselin. IL-8 je hlavním představitelem α -chemokinů (Klener a spolupracovníci 1997).

Interleukin-8 je chemotaktický faktor pro neutrofilů, působí inhibicí migrace a tím hromadění fagocytujících neutrofilů v zánětlivém ložisku. Současně působí uvolnění adhezivních molekul a degranulaci neutrofilních granulocytů s uvolněním enzymů - myeloperoxidázy a elastázy. Má angiogenní účinky. Existují 2 formy tohoto cytokinu - polypeptid tvořený 77 aminokyselinami produkují endoteliální buňky a reaktivnější polypeptid obsahující 72 aminokyselin sekretují převážně makrofágy. Zdrojem IL-8 jsou monocyty, fibroblasty, endoteliální buňky, keratinocyty, T-lymfocyty, NK buňky a trombocyty, a to především po stimulaci cytokiny IL-1 a TNF- α . Nestimulované buňky neprodukují významné množství tohoto chemokinů. Syntézu IL-8 snižují IL-4, IL-10, IL-13, TGF a glukokortikoidy (Dunlevy a Couchman 1995).

1.3.2 MIP-2 (makrofágový zánětlivý protein-2)

Jedná se o bazický protein o přibližné molekulové hmotnosti 8 kDa. Je to myší funkční homolog interleukinu-8. Podobně jako IL-8 patří do rodiny α -chemokinů a má identické účinky v aktivaci neutrofilních granulocytů. Poprvé byl izolován z myší buněčné linie RAW 264.7 stimulované lipopolysacharidem (Wolpe a kol. 1989). Jeho produkce významně stoupá za účasti cytokinů IL-1 a TNF- α (Dunlevy a Couchman 1995).

Ačkoli experimenty na buněčných kulturách odhalily mnoho typů buněk schopných produkovat MIP-2, buněčné zdroje *in vivo* nejsou jasně definovány (Matzer a kol. 2001). Autor studoval expresi mRNA tohoto cytokinu v tkáních normálních myší a infikovaných bakterií *Yersinia enterocolitica*. Výsledky prokázaly podstatnou expresi MIP-2 mRNA v kostní dřeni normálních myší, ale nikoli v dalších orgánech (slezina, plíce, játra). Bakteriální infekce způsobila pětinasobný nárůst v počtu MIP-2 pozitivních polymorfonukleárů, které se shromáždily ve slezině a byla provázena silnou produkcí slezinné MIP-2 mRNA. Zároveň trojnásobně poklesl počet buněk produkujících MIP-2 v kostní dřeni.

Jako buněčný zdroj MIP-2 jsou uváděny makrofágy, epiteliální buňky, kostní dřev, endoteliální buňky, astrocyty a žírné buňky. Rekombinantní MIP-2 působí chemotakticky na myší i lidské neutrofilů, zároveň zvyšuje expresi adhezivních molekul Mac-1 na povrchu buněk (Jerva a kol. 1997).

1.4 Chemokinové receptory

Působení chemokinů je řízeno pomocí receptorů spojených s G-proteiny. Dosud analyzované receptory spřažené s G-proteiny mají podobnou strukturu tvořenou jediným polypeptidovým řetězcem o přibližně 350 aminokyselinách, který sedmkrát prostupuje buněčnou membránou tam a zpět. N-konec je krátký, nachází se v extracelulárním prostoru a obsahuje N-vazná místa glykosylace. Intracelulární C-konec obsahuje zbytky serinů a threoninů, které fungují jako místa fosforylace pro regulaci receptoru. Mezi první a druhou extracelulární smyčkou se nachází disulfidický můstek mezi vysoce konzervovanými cysteiny. Skupina α -chemokinů sdružuje peptidy s aminokyselinovou strukturou CXC (IL-8, PF-4, GRO, NAP-2, ENA-78 a další). Pro skupinu CXC existuje celkem 5 receptorů, označují se zkratkami CXCR1 – CXCR5 (Murdoch a Finn 2000).

1.4.1 Receptor pro interleukin-8

Přítomnost receptoru pro interleukin-8 na povrchu granulocytů poprvé dokázal Peveri a kolektiv (1988). Existují 2 základní vysoce afinní receptory vázající IL-8 (Murdoch 2000). Oba receptory vykazují homologii v 77% aminokyselin.

CXCR1 (IL-8 RA) je tvořen 350 aminokyselinami, poprvé byl klonován Holmesem a kol. (1991). Specificky váže pouze IL-8, ale v poslední době se zdá, že vazby na tento receptor je schopen i GCP-2 (Murdoch a Finn 200).

CXCR2 (IL-8 RB) je tvořen 355 aminokyselinami, poprvé ho klonovali Murphy a Tiffany (1991). Kromě IL-8 a GCP-2 váže i GRO, NAP-2 a ENA-78 (Murdoch a Finn 2000).

Oba typy receptorů jsou exprimovány na všech granulocytech, monocytech, žírných buňkách, některých CD8+ T-lymfocytech a CD56+ NK buňkách. Stejně množství obou typů receptorů je přítomné na neutrofilech, ale zdá se, že monocyty a pozitivní lymfocyty exprimují více typ 2 než 1. Vazba interleukinu-8 na neutrofil rychle snižuje internalizaci expresi receptorů, která je následována proteolytickou degradací IL-8 lysozomálními enzymy. Receptor je poté recyklován a vrací se zpět na povrch membrány neutrofilu (Samanta a kol. 1990).

Navíc byl objeven ještě 3. receptor schopný vazby IL-8, tzv. receptor DARC (Duffy antigen receptor for chemokines). Má stejnou strukturu se sedmi transmembránovými doménami jako výše dva jmenované receptory, ale pravděpodobně nepracuje ve spojení s G-proteiny. Je schopný vázat jak CXC tak CC chemokiny – tj. IL-8, GRO- α , RANTES, MCP-1, MCP-3 aj. Exprimují ho endoteliální buňky, erytrocyty a T-lymfocyty a hraje

významnou roli v patogenezi malárie, protože erytrocyty, které nemají na svém povrchu DARC nemohou být napadeny *Plasmodium vivax*, původcem onemocnění (Murdoch a Finn 2000, Barnwell a kol. 1989).

1.4.2 Receptor pro MIP-2

MIP-2 se váže na lidské i myší neutrofile. Vazba na lidský receptor IL-8 RA (CXCR1) je téměř zanedbatelná. Vysokou afinitu však vykazuje při vazbě na lidský receptor IL-8 RB (CXCR2) a myší homolog tohoto receptoru (Jerva a kol. 1997).

1.4.3 Mechanismus přenosu signálu

K přenosu signálu dochází pomocí receptoru spojeného s G-proteinem. G-protein se skládá ze tří podjednotek – α , β a γ . V nestimulovaném stavu je na podjednotku α navázán GDP a G-protein je v klidu. Naváže-li se k sedminásobně transmembránovému receptoru signální molekula (ligand) dojde ke konformační změně a aktivaci G-proteinu. Podjednotka α uvolní GDP a nahradí ho GTP. To způsobí rozdělení proteinu na α podjednotku s navázaným GTP a samostatný komplex $\beta\gamma$. Obě tyto části mohou přímo interagovat s cíli v plazmatické membráně, a tak předávat signál k dalším místům určení. Takto se aktivuje enzym fosfolipáza C, která štěpí fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát na inositol-1,4,5-trifosfát (IP_3) a diacylglycerol (DAG). Tyto dvě molekuly fungují jako tzv. sekundární posílčci (Alberts a kol. 1998, Hořejší a Bartůňková 2005, Murdoch a Finn 2000).

IP_3 difunduje cytolem k endoplazmatickému retikulu, kde po navázání otvírá Ca^{2+} kanály. Vápenaté ionty proudí do cytosolu po spádu elektrochemického potenciálu. DAG zůstává součástí membrány a působí ve spojení s vápenatými ionty na aktivaci proteinkináz. Aktivovaná kináza začne fosforylovat intracelulární substráty. Fosforylací pozměněné intracelulární proteiny mohou přímo nebo zprostředkovaně ovlivňovat transkripci genů, stavbu cytoskeletu, degranulaci a sekreci superoxidových aniontů (Alberts a kol. 1998).

Po určité době je GTP vázaný na α podjednotku hydrolyzován na GDP, komplex α podjednotky s GDP se odpoutá od enzymu, spojí se opět s dimerem $\beta\gamma$ a receptorem, a tak se obnoví původní stav (Murdoch a Finn 2000).

1.5 Význam neutrofilů v imunitním systému

Neutrofilní granulocyty (polymorfonukleáry) tvoří 60 - 70% celkového počtu bílých krevních buněk. Jedná se o základní buňky nespecifické imunity a hlavní buňky zánětlivé

reakce. Mají segmentované jádro a v jejich cytoplazmě se vyskytuje velké množství granul obsahujících lytické a baktericidní enzymy. V krvi přežívají jen krátce, přibližně 6 až 12 hodin. Periferních neutrofilů je asi 7% z celkového množství, zbývajících 93% je v kostní dřeni, odkud se průběžně vyplavují, takže se v oběhu udržuje stálé množství (Hořejší a Bartůňková 2005).

Jejich význam spočívá především ve schopnosti chemotaxe a fagocytózy – jako první migrují do místa zánětlivé reakce, účastní se likvidace patogenu a jsou součástí hnisu. Společně s eosinofilními granulocyty, monocyty a makrofágy je označujeme jako profesionální fagocyty. V místě zánětu adherují k vaskulárním endoteliím pomocí receptorů, poté dochází k řízenému přesunu neutrofilů do extravaskulárního prostoru, kde fagocytují invadující mikroorganismy (Hořejší a Bartůňková 2005).

Neutrofilů se zachycují na povrchu endoteliálních buněk, kde se pod vlivem zánětlivých cytokinů exprimují adhezivní molekuly. Jako první se projeví interakce mezi selektiny a sacharidovými strukturami na povrchu neutrofilů (zejména oligosacharidem zvaným sialyl-Lewis^x antigen). Tato prvotní reverzibilní adhezivní interakce, tzv. rolling (kutálení), pohyb neutrofilů zpomalí. Pokud je přítomen v okolí zánětlivý signál (např. cytokin nebo chemokin) dochází v další fázi k vazbě povrchových adhezních molekul neutrofilů, tzv. β_2 integrinů (LFA-1, Mac-1) na povrchový glykoprotein endoteliálních buněk ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1; CD54). Tato vazba je již ireverzibilní a způsobí průnik neutrofilů do místa zánětlivé reakce ve tkáni (Hořejší a Bartůňková 2005). Do místa zánětu fagocyty směřují různé chemotaktické faktory. Hlavní chemotaktickou látkou pro neutrofilů je cytokin (chemokin) interleukin-8 (Klener a spolupracovníci 1997).

Během fagocytózy dochází k výraznému vzestupu v oxidativním metabolismu. Tato reakce se označuje jako tzv. respirační (oxidativní) vzplanutí, které je zprostředkováno aktivací NADPH oxidázy. Ta katalyzuje reakci, při níž NADPH reaguje s kyslíkem za vzniku NADP⁺ a superoxidového radikálu (O_2^-). Z něj pak dalšími reakcemi vzniká tzv. singletový kyslík, peroxid vodíku a hydroxylový radikál. Reaktivní kyslíkové radikály (ROI) jsou oxidačními činidly, které mají negativní vliv na struktury biopolymerů mikroorganismů, narušují aktivitu jejich enzymů a poškozují DNA (Hořejší a Bartůňková 2005).

Polymorfonukleáry produkují i řadu cytokinových mediátorů a kolonie stimulujících faktorů, včetně IL-1, IL-3, IL-6, IL-12, TNF (Matzer a kol. 2001) a G-CSF.

1.6 Cysteinové peptidázy a jejich inhibitory

Cysteinové peptidázy sdružují skupinu proteolytických enzymů, které štěpí peptidické vazby. Existují ve všech organismech, patří sem endoproteázy i exoproteázy a obecně mají nezastupitelnou úlohu v intracelulárním katabolismu peptidů a proteinů, zpracování proenzymů a prohormonů, odbourávání kolagenu. Dále se účastní imunitní odpovědi - zpracování antigenu a zánětu (Hartmann a Lucius 2003). Funkce těchto proteáz je regulována cystatiny. Cystatin vytváří společně s proteázou těsný ekvimolární reverzibilní komplex (Bobek a Levine 1992) a blokuje její aktivní místo. Inhibitorová forma zajišťuje ochranu tkání před destruktivní proteolýzou vlastního, bakteriálního a virového původu. Podle aminokyselinových sekvencí (pořadí) se rozdělují inhibitory cysteinových proteáz do tří hlavních rodin (Hartmann a Lucius 2003).

První rodinu (stefiny) tvoří neglykosylované jednodoménné proteiny, které postrádají disulfidické můstky a signální sekvence. Jsou převážně intracelulární a charakteristické zástupce představují lidské cystatiny A a B. Druhá rodina (cystatiny) zahrnuje proteiny s disulfidickými můstky a typickými signálními sekvencemi. Převažují v tělních tekutinách, ale najdeme je i v tkáních. Do této skupiny patří lidské cystatiny C, D, S, SA a SN. Ve třetí rodině (kininogeny) se nachází multifunkční proteiny s disulfidickými můstky. Jejich syntéza probíhá v játrech, odkud se vylučují do krve, kde společně s α_2 -makroglobulinem představují hlavní inhibitory cysteinových proteáz.

V poslední době se ukazuje, že cystatiny hrají důležitou roli ve vztahu mezi hostitelem a parazitem. Nejprozkoumanější imunomodulační účinky jsou popisovány na cystatinech hlístic. Různé cystatiny parazitických hlístic inhibují aktivitu cysteinových proteáz, přispívají ke snižování proliferace T-lymfocytů hostitele, potlačují zánětlivou odpověď a indukují tvorbu protizánětlivých cytokinů. Typickou odezvou je polarizace směrem k T_H2 typu odpovědi za markantního zvýšení produkce interleukinu-10 a tvorby NO myšimi makrofágy (Schierack a kol. 2003).

Geny kódující inhibitory cysteinových proteáz byly nalezeny v souboru přepisovaných genů různých ixodidních klíšťat (Valenzuela a kol. 2002). Karim a kol. (2005) prokázal funkční význam cystatinu pro úspěšné sání druhu *Amblyomma americanum* za použití RNA interference. Při přerušení exprese cystatinu se snížila schopnost sání. Pouze nízké procento klíšťat bylo schopné dokončit sání a naklást vajíčka.

V roce 2005 dokázal Kato a kol. schopnost lidského cystatinu A (inhibitor obsažený v potu) blokovat produkci interleukinu-8 lidskými keratinocyty stimulovanými cysteinovými

proteázami. IL-8 se od ostatních cytokinů odlišuje svou schopností specificky aktivovat neutrofilní granulocyty.

Potlačení zánětlivé reakce spolu s produkcí imunomodulačních molekul významně usnadňuje přenos patogenu. Tento jev byl nazván slinami aktivovaný přenos – SAT (saliva activated transmission). SAT není typický jen pro klíšťata, ale i další krev sající vektory. Imunosuprese v místě sání umožňuje patogenu snadno kolonizovat nového hostitele a zároveň klíštěti zvyšuje objem nasáté krve. Jak již bylo uvedeno výše, průvodním jevem slinami aktivovaného přenosu je produkce T_H2 cytokinů za současné suprese T_H1 cytokinové odpovědi.

2. CÍLE PRÁCE

- kvantifikace MIP-2 ELISA metodou

- testování vybraných myších linií makrofágových buněk a peritoneálních makrofágů na produkci MIP-2

- hodnocení vlivu extraktu ze slinných žláz (SGE) a slin klíštěte *Ixodes ricinus* na produkci MIP-2 a IL-8

- hodnocení vlivu rekombinantních cystatinů na produkci MIP-2 a IL-8

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Laboratorní zvířata

V práci byly použity inbrední myši kmenů BALB/c (Velaz, Česká republika), C57BL/6J (Velaz, Česká republika) a klíšťata *Ixodes ricinus* (chov Parazitologický ústav, AVČR, České Budějovice). Myši byly chovány ve standardních podmínkách při teplotě 22°C a 65 % vlhkosti vzduchu. Standardní granulovaná strava a voda byly k dispozici *ad libitum*.

3.2 Buněčné suspenze

3.2.1 Myší buněčné linie

V pokusech byly použity kultury P388/D1, PMJ2/R a WEHI (oddělení Imunologie parazitóz, PaÚ AVČR, České Budějovice).

P388/D1 jsou nediferencované myší krevní buňky s rychlým růstem a nízkou adhezí, z hlediska vývoje se jedná o nediferencované makrofágy. PMJ2/R je makrofágová linie získaná transformací makrofágů myší C57BL virem J2. Tyto buňky částečně adherují. WEHI je adherující makrofágová linie. Buňky byly kultivovány v termostatu při 37°C. Kultury se uchovávají zamražené v tekutém dusíku.

Kultivační médium: RPMI 1640 (Sigma) + 5 % BOFES (Sigma) + 1 % L-glutamin (Sigma) + 1 % antibiotika (Sigma) + 0,1 % 2-merkapt ethanol (Sigma)

3.2.2 Myší peritoneální makrofágy

Peritoneální makrofágy byly získány výplachem peritoneální dutiny myši vychlazeným RPMI 1640 médiem o objemu 5 ml.

Kultivační médium: RPMI 1640 (Sigma) + 5 % BOFES (Sigma) + 1 % L-glutamin (Sigma) + 1 % antibiotika (Sigma) + 0,1 % 2-merkapt ethanol (Sigma)

3.2.3 Myší splenocyty

Suspenze splenocytů byla připravena z myší sleziny protlačením přes sítko do vychlazeného RPMI 1640 média bez přídavku séra za trojnásobného promytí.

Kultivační médium: RPMI 1640 (Sigma) + 5 % BOFES (Sigma) + 1 % L-glutamin (Sigma) + 1 % antibiotika (Sigma) + 0,1 % 2-merkapt ethanol (Sigma)

3.2.4 Lidská buněčná linie

Buňky THP-1 jsou monocytární linií s rychlým růstem. Kultivační médium: RPMI 1640 (Sigma) + 10 % BOFES (Sigma) + 1 % L-glutamin (Sigma) + 1 % antibiotika (Sigma) + 0,1 % 2-merkapt ethanol (Sigma)

3.3 Příprava SGE

Slinné žlázy byly vypreparovány ze 6 dní nasátých samic *Ixodes ricinus*. Z vypitvaných žláz uchovaných ve zkumavce s 1ml PBS byl připraven homogenát sonikací na ultrazvukovém homogenizátoru po dobu 30 sekund a amplitudě 4 μ m. Ke každému SGE byl přidán inhibitor proteáz (Protease inhibitor cocktail, Sigma) ředěný 1:500. Vzniklá suspenze byla centrifugována při 14000 otáčkách a 4°C po dobu 30 minut pro odstranění nerozpustné frakce. Poté byla stanovena koncentrace proteinu v supernatantu (Bradford 1976). Extrakty ze slinných žláz se uchovávají zamražené při -70°C.

3.4 Příprava slin

Sliny byly připravené ze samic *Ixodes ricinus*, které sály 6 – 7 dní. Klíšťata byla fixována na podložní sklíčka. Produkce slin do mikrokapilár (Sigma) nasazených na hypostom byla indukována aplikací roztoku pilocarpinu v alkoholu na hřbetní stranu klíšťat a inkubací v termostatu při 37°C. Sliny byly získány po 3 hodinách vyprázdněním mikrokapilár. Poté byla stanovena koncentrace proteinu ve vzorku (Bradford 1976). Sliny se uchovávají zamražené při -70°C.

3.5 Schéma jednotlivých pokusů

3.5.1 Produkce MIP-2 myšimi buňkami

V pokusu byly použity buněčné linie WEHI, P388/D1, PMJ2/R, peritoneální makrofágy z myši BALB/c a splenocyty. K určení počtu buněk bylo využito Bürkerovy komůrky. Bylo odebráno požadované množství buněčné suspenze, která se centrifugovala 10 minut při 1000 otáčkách a 4 °C. Supernatant byl odstraněn a k buňkám bylo přidáno čerstvé médium tak, aby v každé jamce 96-jamkového panelu (TPP, Švýcarsko) bylo vždy 1×10^5 buněk ve 200 μ l v případě linií WEHI, P388/D1, PMJ2/R a peritoneálních makrofágů. V případě splenocytů bylo naneseno 1×10^6 buněk. Do určitých jamek bylo přidáno 10 μ l lipopolysacharidu (LPS), tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 2 μ g/ml. Poté byl panel vložen do termostatu a

inkubován při 37°C a 3,5 % CO₂. Supernatanty byly odebrány v časových intervalech 24 a 48 hodin a testovány ELISA metodou.

3.5.2 Produkce MIP-2 myšimi buňkami za přítomnosti SGE

Schéma pokusu bylo obdobné výše uvedenému. Buňky byly nasazeny ve 100 µl média, v dalších 100 µl byl přidán extrakt ze slinných žláz (SGE) o konečné koncentraci 5 µg/ml nebo médium. Buňky byly stimulovány lipopolysacharidem, jehož výsledná koncentrace byla 0,714 µg/ml. LPS byl vždy přidán po 2 hodinách působení SGE na buňky. Vzorky byly odebrány v časovém intervalu 24 hodin a dále testovány.

3.5.3 Produkce MIP-2 v závislosti na čase

Byla použita buněčná linie PMJ2/R. Testované jamky obsahovaly 1×10^5 buněk v 200 µl média. Do některých jamek bylo přidáno 10 µl LPS v konečné koncentraci 1 µg/ml. Supernatanty byly odebírány v časových intervalech 1, 2, 3, 6, 8, 10, 12, 24, 32 a 48 hodin.

3.5.4 Vliv různých SGE na produkci MIP-2 buňkami PMJ2/R

Jednotlivé jamky obsahovaly 1×10^5 buněk ve 100 µl média. V dalších 100 µl byly přidány jednotlivé extrakty ze slinných žláz v konečné koncentraci 5 µg/ml. Část jamek byla po dvouhodinové preinkubaci s SGE stimulována LPS s výslednou koncentrací 10 ng/ml. Součástí kontrol byly inhibitory proteáz. Vzorky byly odebrány v časovém intervalu 3 hodiny.

3.5.5 Vliv SGE na produkci MIP-2 peritoneálními makrofágy

Byla připravena suspenze buněk peritoneálního náplavu z šesti myší kmene C57BL/6J. Množství makrofágů bylo určeno jako 20 % bílých krevních buněk, což je standardní procentuální zastoupení makrofágů v suspenzi buněk peritoneálního náplavu (tento údaj byl získán předchozí analýzou na průtokovém cytometru). Do jednotlivých jamek bylo nasazeno 6×10^5 buněk ($1,2 \times 10^5$ makrofágů), které byly inkubovány přes noc v termostatu při 37°C a 3,5 % CO₂. Druhý den bylo médium odsáto a buňky 2x promyty RPMI 1640, čímž došlo k odstranění většiny neadherovaných buněk a v jamkách zůstaly převážně makrofágy. K makrofágům bylo poté přidáno 100 µl čerstvého média. Součástí pokusu byly jamky kde byly ponechány buňky celého náplavu, pouze bylo opatrně odsáto médium a k buňkám bylo přidáno 100 µl čerstvého média. V dalších 100 µl byly přidány SGE a sliny v konečné koncentraci 10 µg/ml, dále inhibitory proteáz a médium. Buňky byly stimulovány LPS o výsledné koncentraci 100 ng/ml. Vzorky byly odebrány po dvou hodinách.

3.5.6 Vliv různých SGE na produkci IL-8 buňkami THP-1

V pokusu byla použita lidská buněčná linie THP-1. Byla připravena buněčná suspenze tak, aby v každé jamce panelu bylo 1×10^5 buněk ve 100 μl . V dalších 100 μl byly přidány jednotlivé extrakty o výsledné koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$. Buňky byly stimulovány pomocí LPS o koncentraci 100 ng/ml. Supernatanty byly odebrány v časovém intervalu 6 hodin.

3.5.7 Mechanismus působení SGE na MIP-2

V pokusu byl použit produkt buněk PMJ/2R již obsahující MIP-2, který byl získán předchozí stimulací těchto buněk pomocí LPS o koncentraci 10 ng/ml. Vzorek byl odebrán v časovém intervalu 3 hodiny, koncentrace cytokinu (0,4 ng/ml) byla určena ELISA metodou. Dále byl použit rekombinantní MIP-2 protein (PeproTech) o koncentraci 0,6 ng/ml. K supernatantu nebo rekombinantu o objemu 800 μl s přítomným cytokinem byly přidány vybrané druhy SGE o výsledné koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$. Kontrola obsahovala inhibitory proteáz ve stejné koncentraci jako v SGE a PBS. Výsledný zásobní roztok byl rozdělen po 120 μl do mikrokumavek (Eppendorf). Část byla inkubována při laboratorní teplotě (22°C), část v termostatu (37°C). Po tříhodinové inkubaci byly jednotlivé vzorky testovány ELISA metodou.

3.5.8 Mechanismus působení SGE na IL-8

Pokus byl připraven analogickým způsobem jako v předchozí kapitole. Buňky THP-1 byly stimulovány LPS o koncentraci 100 ng/ml. Po šesti hodinách byl odebrán supernatant, koncentrace v něm přítomného cytokinu IL-8 (0,7 ng/ml) byla stanovena ELISA metodou. Dále byl použit rekombinantní IL-8 (BioSource, Belgie) o koncentraci 0,8 ng/ml. Ve vlastním pokusu byl testován produkt buněk i rekombinantní cytokin a to při 22°C a 37°. Vzorky byly odebrány po šesti hodinách.

3.5.9 Mechanismus inhibice MIP-2

Do mikrokumavek bylo nasazeno 4×10^5 PMJ2/R buněk ve 400 μl média. V dalších 400 μl byl přidán SGE 141 v konečné koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ nebo kontrola obsahující inhibitory proteáz ve stejné koncentraci jako v SGE a PBS. Po dvouhodinové preinkubaci s SGE byly buňky 5x promyty RPMI médiem. Poté bylo nanášeno vždy 1×10^5 buněk ve 200 μl do jamek 96-jamkového panelu a k polovině bylo přidáno 10 μl LPS v konečné koncentraci 10 ng/ml.

Po tříhodinové inkubaci byly odebrány supernatanty, které byly dále testovány na množství přítomného MIP-2 proteinu.

3.5.10 Vliv rekombinantního cystatinu na produkci MIP-2 a IL-8

Do každé jamky bylo přidáno 1×10^5 buněk ve 100 μl . Ve stejném objemu byl do určených jamek přidán cystatin, dále aktin a SGE vždy s výslednou koncentrací 10 $\mu\text{g/ml}$. Supernatanty byly odebrány po třech hodinách v případě PMJ2/R buněk a po šesti hodinách u THP-1 buněk. Rekombinantní cystatin z klíštěte *O. moubata* použitý v pokusu byl připraven Mgr. Lenkou Grunclovou.

3.6 ELISA test

3.6.1 Stanovení cytokinu MIP-2

Roztoky:

- vazebný roztok: PBS (0,8 g NaCl, 0,29 g Na_2HPO_4 , 0,2 g KH_2PO_4 , 0,02 g KCl ve 100 ml deionizované vody)
- promývací roztok: PBS s 0,5% Tween-20
- blokovací roztok: 10% PTS v PBS
- ředící roztok: 1% PTS v PBS s 0,05% Tween-20
- substrátový roztok: 10 ml fosfocitrátového pufru pH 5 (1,84 g $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0,51 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ve 100 ml deionizované vody) + 4 mg OPD (Sigma) + 4 μl H_2O_2
- zastavovací roztok: 2M H_2SO_4

K určení množství cytokinu MIP-2 v jednotlivých supernatantech byl použit komerční kit pro kvantifikaci cytokinů (PeproTech). Vlastní testování probíhalo v 96-jamkových mikrotitračních deskách (Nunc F Maxisorp) podle dodaného návodu.

Nejprve se na dno každé jamky navázala záchytná protilátka o koncentraci 0,5 $\mu\text{g/ml}$, objemu 50 μl a nechala se inkubovat ve vlhké komůrce (uzavřené nádobě se dnem pokrytým navlhčeným filtračním papírem) přes noc při laboratorní teplotě. Druhý den byly jamky 4x promyty promývacím roztokem a poté do nich bylo nanášeno 300 μl blokovacího roztoku, který slouží k vyblokování nespecifických míst. Blokování probíhalo 1 hodinu ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě. Poté byly jamky opět 4x promyty, byly přidány jednotlivé supernatanty testovaných vzorků a rekombinantní protein jako standard v objemu 100 μl . Standard byl dvojkovou řadou ředěn z 10 ng/ml až na nulovou koncentraci a výsledky byly

později využity k sestrojení kalibrační křivky. Vzorčky byly inkubovány 2 hodiny ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě. Následně byly jamky 4x promyty a do každé jamky byla přidána detekční (biotinylovaná) protilátka o koncentraci 0,25 µg/ml, objemu 50 µl. Detekční protilátka se opět inkubovala po dobu 2 hodin ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly jamky 4x promyty a dále inkubovány se 100 µl avidin peroxidázy ředěné 1:2000, která po třiceti minutách označila navázanou detekční protilátku. Poté byly jamky 4x promyty a do jamek byl přidán substrátový roztok o objemu 100 µl, který byl připraven těsně před použitím a vše bylo ponecháno ve tmě. Peroxid vodíku - substrát pro peroxidázu - uvolnil kyslík, který oxidoval chromogen OPD a vznikla charakteristická barevná reakce. Vývoj barvy byl zastaven přidáním 100 µl 2M H₂SO₄ do každé jamky a následně byly odečteny hodnoty absorbance na vertikálním spektrofotometru (Multiskan MCC/340, Finsko) při vlnové délce 490 nm.

3.6.2 Stanovení cytokinu IL-8

Roztoky:

- vazebný roztok: uhličitanový pufr pH 9,4 (0,43 g NaHCO₃, 0,53 g Na₂CO₃ ve 100 ml deionizované vody)
- promývací roztok: PBS s 0,5% Tween-20
- blokovací roztok: 10% PTS v PBS
- ředící roztok: 10% PTS v PBS
- substrátový roztok: 10 ml fosfocitrátového pufru + 4 mg OPD (Sigma) + 4 µl H₂O₂
- zastavovací roztok: 2M H₂SO₄

K určení množství cytokinu IL-8 v jednotlivých supernatantech byl použit komerční kit pro kvantifikaci cytokinů (BioSource, Belgie). Vlastní testování probíhalo v 96-jamkových mikrotitračních deskách (Nunc F Maxisorp) podle dodaného návodu.

Nejprve se na dno každé jamky navázala záchytná protilátka o koncentraci 1 µg/ml, objemu 50 µl a nechala se inkubovat přes noc při teplotě 4°C. Druhý den byly jamky 1x promyty promývacím roztokem a poté do nich bylo nanášeno 300 µl blokovacího roztoku. Blokování probíhalo 1 hodinu při laboratorní teplotě. Poté byly z jamek odstraněny blokovací roztok a byly přidány jednotlivé supernatanty testovaných vzorků a rekombinantní protein jako standard v objemu 100 µl. Standard byl dvojkovou řadou ředěn z 5 ng/ml až na nulovou koncentraci a výsledky byly později využity k sestrojení kalibrační křivky. Současně se vzorky byla přidána i detekční protilátka o koncentraci 0,04 µg/ml a objemu 50 µl.

Následovala inkubace po dobu 2 hodin za stálého třepání při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly jamky 5x promyty a dále inkubovány se 100 μ l avidin peroxidázy ředěné 1:6000, která po třiceti minutách označila navázanou detekční protilátku. Poté byly jamky 5x promyty byl přidán substrátový roztok o objemu 100 μ l, který byl připraven těsně před použitím a vše bylo ponecháno ve tmě. Vývoj barevné reakce byl zastaven přidáním 100 μ l 2M H₂SO₄ a následně byly odečteny hodnoty absorbance na vertikálním spektrofotometru (Multiskan MCC/340, Finsko) při vlnové délce 490 nm.

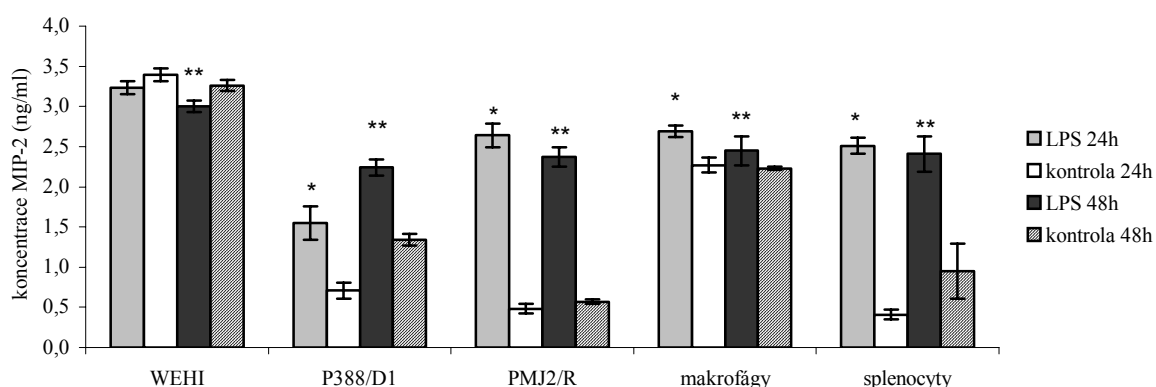
3.7 Statistické zpracování

Všechny pokusy byly prováděny v triplicacích, v programu Microsoft Excel byly vypočteny průměry a směrodatné odchylky, které byly použity pro vytvoření grafů. Statistické analýzy probíhaly pomocí Studentova t-testu a analýzou variance (jednocestná ANOVA) v programu Statistica 7. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami byly v grafech označeny hvězdičkou.

4. VÝSLEDKY

4.1 Produkce MIP-2 myšími buňkami

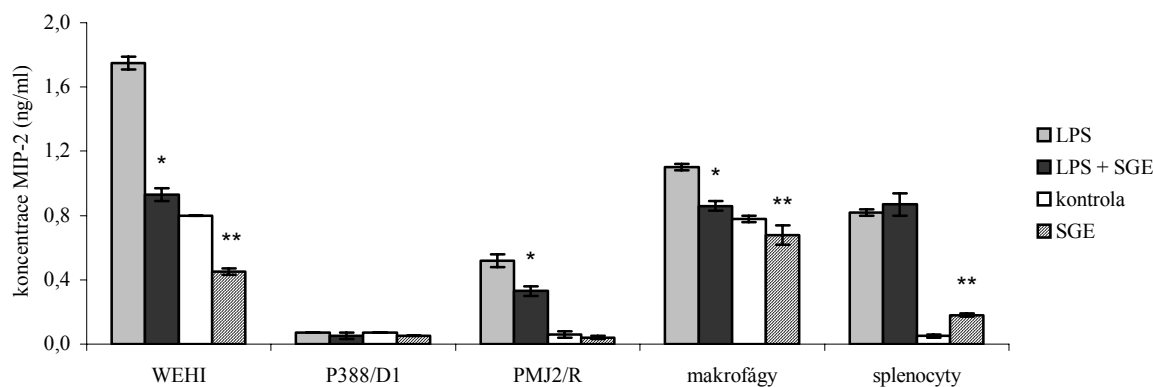
Prvním cílem bylo určit, jestli myší buněčné linie, peritoneální makrofágy a splenocyty aktivované lipopolysacharidem (LPS) produkují prozánětlivý cytokin MIP-2 (graf 1). Schéma pokusu popisuje kapitola 3.5.1. Na stimulaci LPS reagovaly všechny typy buněk (nejlépe PMJ2/R a splenocyty) s výjimkou linie WEHI. V případě buněk PMJ2/R a splenocytů došlo po indukci LPS až k šestkrát vyšší produkci cytokinu oproti nestimulované kontrole. Toto zvýšení produkce MIP-2 po aktivaci LPS bylo statisticky významné u linií P388/D1, PMJ2-R a splenocytů. Odběr ve 24. a 48. hodině se příliš nelišil v množství produkovaného MIP-2, proto byly vzorky v dalších pokusech odebírány v čase 24 hodin po stimulaci LPS.



Graf 1: Produkce cytokinu MIP-2 myšími buňkami za přítomnosti lipopolysacharidu. Koncentrace LPS: 2 µg/ml. * statisticky významný rozdíl oproti skupině kontrola 24h, ** statisticky významný rozdíl oproti skupině kontrola 48h ($P < 0,05$).

4.2 Produkce MIP-2 myšími buňkami za přítomnosti SGE

Bylo zjišťováno, jak dané typy buněk reagují na stimulaci LPS za současné přítomnosti extraktu ze slinných žláz (Graf 2). Plán pokusu zachycuje kapitola 3.5.2. Na stimulaci endotoxinem reagovaly opět všechny druhy buněk, vyjma linie P388/D1. Vlivem SGE došlo k výraznému poklesu množství MIP-2 v případě stimulovaných buněčných linií WEHI a PMJ2/R, a to o 46 % a 36 %. Produkce byla potlačena i u peritoneálních makrofágů, kde úbytek činil 21 %. V případě linie WEHI byl současně zaznamenán statisticky významný rozdíl u nestimulovaných buněk v přítomnosti SGE. Snížení nebylo zaznamenáno u splenocytů. Splenocyty v přítomnosti extraktu ze slinných žláz zvyšovaly produkci MIP-2.



Graf 2: Produkce cytokinu MIP-2 myšími buňkami za přítomnosti extraktu ze slinných žláz a lipopolysacharidu. Koncentrace SGE: 5 µg/ml; LPS: 0,714 µg/ml. * statisticky významný rozdíl oproti skupině LPS, ** statisticky významný rozdíl oproti skupině kontrola ($P < 0,05$).

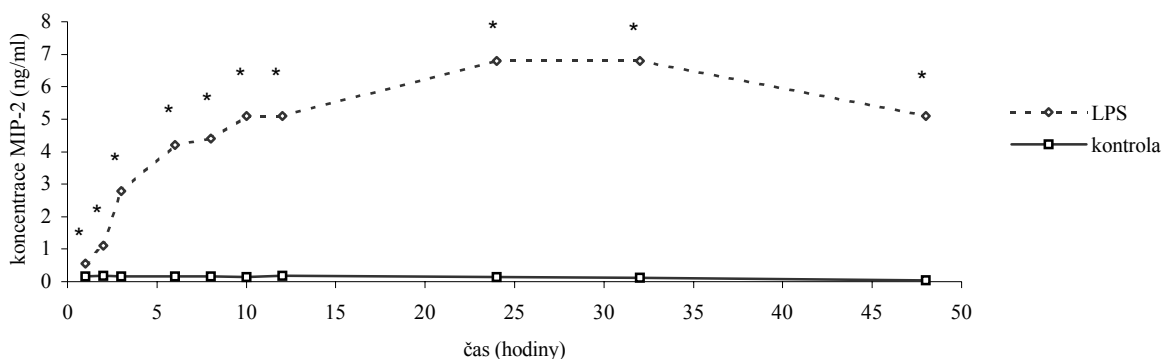
V dalších testech byly součástí kontrol ve skupinách s SGE inhibitory proteáz. Inhibitory proteáz neměly vliv na snížení množství MIP-2. Buňky PMJ2/R byly určeny nejlepší linií schopnou reagovat na stimulaci LPS a ovlivnění SGE. Bohužel tuto schopnost popíraly další pokusy, kde hodnoty koncentrace cytokinu MIP-2 ve vzorcích obsahujících SGE odpovídaly hodnotám kontrolních buněk. Proto bylo dalším krokem testování vybraných druhů SGE na buňkách PMJ2/R.

Pro vyloučení kontaminace extraktů mikroorganismy, které by mohly zkreslit výsledek reakce, byly všechny vzorky přefiltrovány přes filtr o velikosti pórů 0,22 µm (Millex GP, Millipore). Neméně důležité bylo také stanovit vlastní produkci cytokinu MIP-2 v jednotlivých časových intervalech.

4.3 Produkce MIP-2 v závislosti na čase

V tomto pokusu byla sledována produkce MIP-2 v jednotlivých časových intervalech. Schéma pokusu zachycuje kapitola 3.5.3. Výsledek popisuje graf 3. Samotné buňky (neaktivované LPS) vykazují v porovnání se stimulovanými mnohem nižší hodnoty produkce. V první hodině byl rozdíl mezi nestimulovanými a LPS aktivovanými buňkami více než trojnásobný, během druhé hodiny byl tento vzestup již šestinásobný. Maximálního rozdílu bylo dosaženo v 24. hodině, kde se hodnoty stimulovaných buněk od nestimulovaných lišily více než 48-krát.

Vzrůstající trend v produci MIP-2 u stimulovaných buněk je patrný mezi 1. až 6. hodinou, poté zůstává množství MIP-2 téměř konstantní. Díky tomuto výsledku byla optimální dobou odběru dalších testů určena 3. hodina.

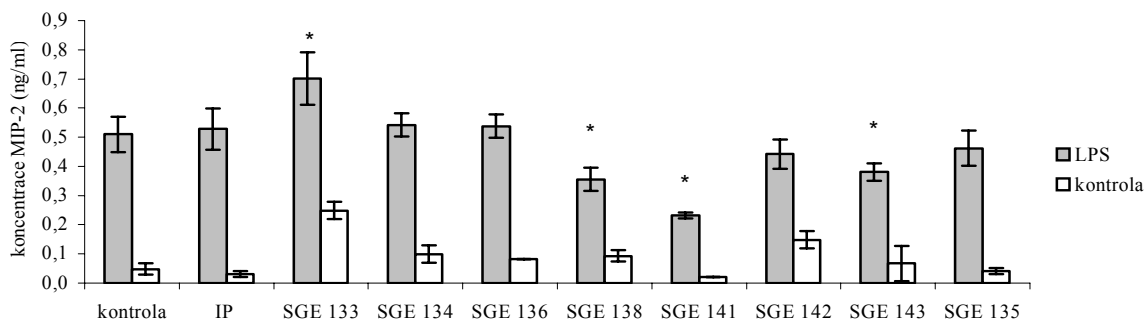


Graf 3: Produkce cytokinu MIP-2 stimulovanými a nestimulovanými buňkami PMJ v závislosti na čase. Koncentrace LPS: 1 µg/ml. * statisticky významný rozdíl oproti skupině kontrola (P<0,05).

Dále jsem zjišťovala jaká nejnižší koncentrace LPS je ještě schopná stimulovat PMJ buňky. Buňky byly stimulovány lipopolysacharidem o koncentraci 1 až 1000 ng/ml, supernatanty byly odebírány ve 3. a 24. hodině. Nejnižší koncentrace stimulující buňky odpovídala 10 ng/ml, proto byla tato koncentrace používána v dalších testech.

4.4 Vliv různých SGE na produkci MIP-2 buňkami PMJ2/R

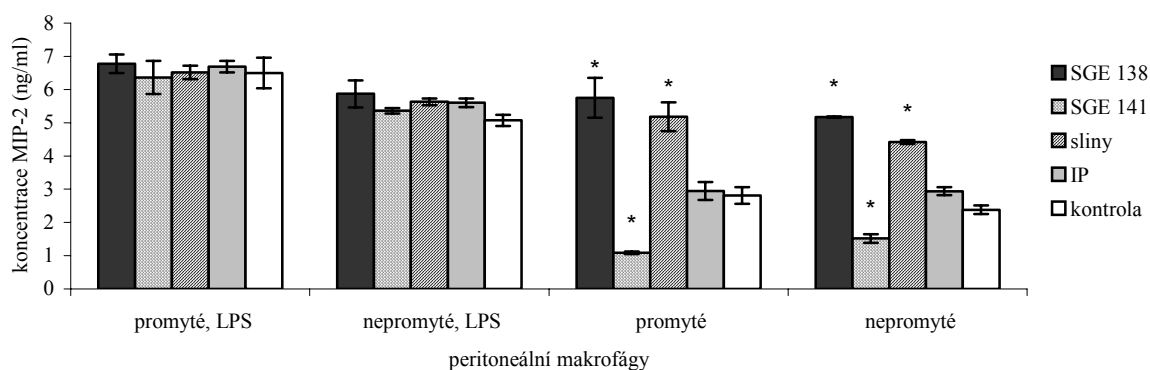
Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, jak jednotlivé extrakty ze slinných žláz ovlivňují produkci MIP-2 buňkami PMJ2/R. Schéma pokusu popisuje kapitola 3.5.4. Z následujícího grafu (graf 4) vyplývá, že SGE 138, 141 a 143 mají schopnost snižovat množství cytokinu MIP-2. Vlivem SGE 138 došlo k poklesu koncentrace MIP-2 o 30 %, v případě SGE 143 o 25 % vůči kontrole. Nejvýraznější úbytek (55 %) byl pozorován u SGE 141. SGE 133 statisticky významně zvyšuje koncentraci MIP-2. U ostatních extraktů nebyla zaznamenána suprese.



Graf 4: Testování vlivu různých extraktů slinných žláz na produkci cytokinu MIP-2 buňkami PMJ2/R v časovém intervalu 3 hodiny. Koncentrace SGE: 5 µg/ml; LPS: 10 ng/ml. IP = inhibitory proteáz. * statisticky významný rozdíl oproti skupině kontrola (P<0,05).

4.5 Vliv SGE na produkci MIP-2 peritoneálními makrofágy

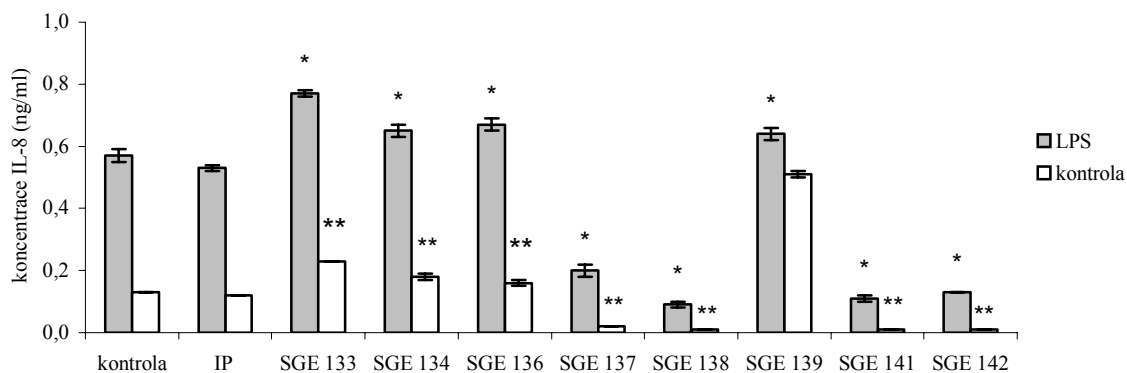
V tomto pokusu byl sledován vliv SGE na produkci MIP-2 peritoneálními makrofágy (graf 5). Postup pokusu je popsán v kapitole 3.5.5. Nebyl zaznamenán rozdíl v produkci cytokinu mezi aktivovanými a kontrolními buňkami. Významně se nelišily ani hodnoty mezi promytými makrofágy a nepromytými buňkami celkového peritoneálního náplavu. Jen v případě nestimulovaných buněk měl SGE 141 schopnost suprimovat produkci MIP-2, a to jak u promytých tak i nepromytých buněk. Tento pokles byl statisticky významný a odpovídal snížení o 61 % u promytých a o 36 % u nepromytých buněk. Zároveň byl u nestimulovaných buněk pozorován výrazný vzestup produkce MIP-2, a to v případě SGE 138 vzhledem ke kontrole. U promytých buněk tento nárůst v množství MIP-2 odpovídal zvýšení o 104 %, v případě nepromytých o 117%. Statisticky významné zvýšení bylo zaznamenáno také v případě slin a SGE 133. Pokus byl dvakrát opakován se srovnatelnými výsledky.



Graf 5: Testování vlivu různých extraktů slinných žláz na produkci cytokinu MIP-2 peritoneálními makrofágy v časovém intervalu 3 hodiny. Koncentrace SGE: 10 μ g/ml; stimulace LPS: 100 ng/ml. IP = inhibitory proteáz. * statisticky významný rozdíl oproti skupině kontrola ($P < 0,05$).

4.6 Vliv různých SGE na produkci IL-8 buňkami THP-1

Snížení množství v přítomnosti SGE bylo zaznamenáno v případě cytokinu IL-8 produkovaného lidskou monocytární linií THP-1 (Graf 6). Schéma pokusu vystihuje kapitola 3.5.6. Statisticky významné snížení koncentrace IL-8 bylo zaznamenáno u čtyřech z osmi testovaných SGE. V případě SGE 137 se jednalo o 65 % pokles. U SGE 138, SGE 141 a SGE 142 byl pozorován pokles v uvedeném pořadí o 84%, 80% a 77% v případě buněk stimulovaných LPS. Buňky neaktivované LPS vykazovaly také statisticky významné snížení množství MIP-2 za přítomnosti výše uvedených SGE. Ostatní SGE statisticky významně zvyšovaly množství přítomného IL-8, a to v průměru o 13 až 34 %.

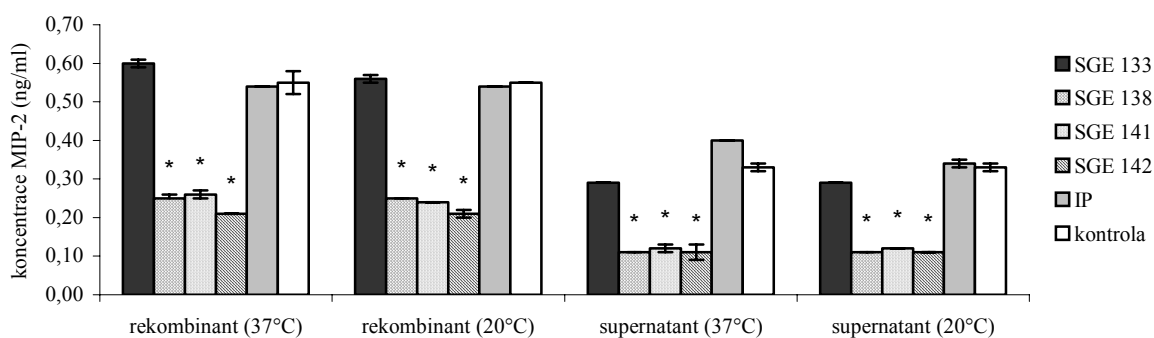


Graf 6: Testování vlivu různých extraktů slinných žláz na produkci cytokinu IL-8 buňkami THP-1 v časovém intervalu 6 hodin. Koncentrace SGE: 10 μ g/ml; LPS: 100 ng/ml. IP = inhibitory proteáz. * statisticky významný rozdíl oproti skupině kontrola LPS, ** statisticky významný rozdíl oproti skupině kontrola ($P < 0,05$).

4.7 Mechanismus působení SGE na MIP-2

Byl studován mechanismus působení SGE na množství MIP-2 v supernatantu buněčných kultur a na rekombinantní cytokin (Graf 7) podle schématu pokusu uvedeném v kapitole 3.5.7. Z uvedeného grafu vyplývá, že SGE 138, 141 a 142 mají schopnost interagovat s příslušným cytokinem a výrazně snižovat jeho množství. Vlivem SGE tedy došlo ke snížení množství MIP-2 o 53% v případě rekombinantního proteinu a o 66% v případě produktu získaného stimulací buněk PMJ2/R. SGE 133 tuto schopnost nemá.

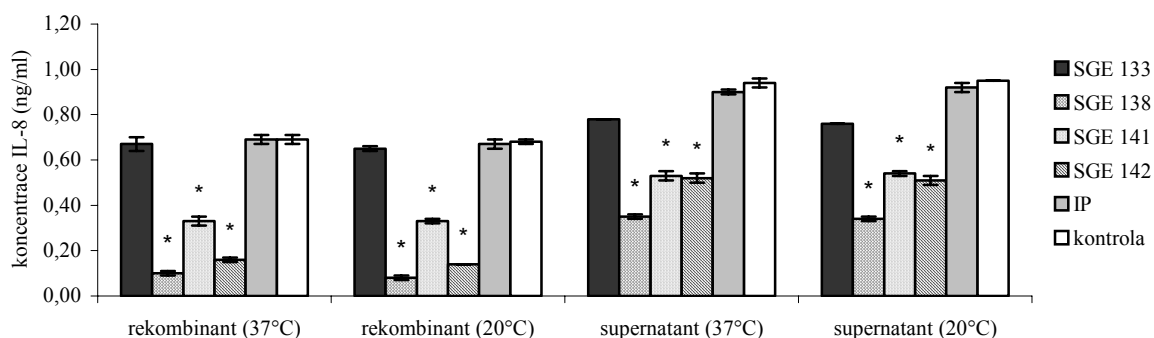
Teplota, při které byly vzorky inkubovány, neměla vliv na interakci mezi cytokinem a SGE.



Graf 7: Mechanismus působení SGE na rekombinantní cytokin MIP-2 a na cytokin přítomný v supernatantu buněčné kultury. Koncentrace SGE: 10 μ g/ml. * statisticky významný rozdíl oproti skupině kontrola ($P < 0,05$).

4.8 Mechanismus působení SGE na IL-8

Podobným způsobem jako v předcházející kapitole byl zkoumán i mechanismus působení SGE na IL-8 (Graf 8). Schéma pokusu popisuje kapitola 3.5.8. Vlivem SGE došlo ke statisticky významnému snížení množství cytokinu IL-8 přítomného v supernatantu v případě SGE 138, 141 a 142. Tento pokles byl pozorován jak u rekombinantního IL-8, tak i u produktu buněk obsahujícího IL-8 získaného předchozí stimulací buněk THP-1. Teplota, při které byly vzorky inkubovány, neměla vliv na interakci mezi cytokinem a SGE.



Graf 8: Mechanismus působení SGE na rekombinantní cytokin IL-8 a na přítomný v supernatantu buněčné kultury. Koncentrace SGE: 10 µg/ml. * statisticky významný rozdíl oproti skupině kontrola ($P < 0,05$).

4.9 Mechanismus inhibice cytokinu MIP-2

Předmětem tohoto pokusu bylo zjistit mechanismus inhibice produkce cytokinu MIP-2, zda se jedná pouze o vazbu molekuly obsažené ve slinách klíštěte na tento cytokin nebo již primární ovlivnění produkce cytokinu na buněčné úrovni. Buňky promyté po preinkubaci s SGE odpovídaly hodnotám promytých kontrolních buněk. Ke snížení množství cytokinu došlo pouze u SGE, které bylo po celou dobu inkubováno s buňkami. Ke změně nedošlo ani v případě, kdy byly buňky promyty až po společné preinkubaci SGE s LPS.

4.10 Vliv rekombinantního cystatinu na produkci MIP-2 a IL-8

Rekombinantní cystatin z klíštěte *Ornithodoros moubata* neměl suprimující účinek na produkci cytokinu MIP-2 produkovaného PMJ2/R buňkami ani na produkci cytokinu IL-8 produkovaného buněčnou linií THP-1 ve srovnání s kontrolním proteinem, kterým byl aktin z téhož klíštěte.

5. DISKUSE

Cílem této práce bylo určit vliv extraktů ze slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus* na produkci myšního prozánětlivého cytokinu MIP-2, funkčního homologu IL-8. MIP-2 je podobně jako IL-8 významným chemotaktickým faktorem pro neutrofile. Neutrofile jsou hlavním nespecifickým obranným mechanismem hostitelského organismu a pro jejich schopnost fagocytózy bývají označovány jako profesionální fagocyty. IL-8 způsobuje inhibici migrace neutrofilů, jejich adhezi k endoteliím a následně nahromadění v zánětlivém ložisku. Podobně jako MIP-2 stimuluje expresi leukocytárních β_2 integrinů (Dunlevy a Couchman 1995) a zvyšuje tvorbu leukotrienů. V místě zánětu dochází k degranulaci neutrofilních granulocytů za uvolnění různých enzymů (Klener a spolupracovníci 1997). Vliv SGE na produkci lidského cytokinu IL-8 je poměrně dobře prozkoumán, ale účinek extraktu ze slinných žláz na tvorbu MIP-2 nebyl zatím studován. Z tohoto důvodu byla většina pokusů provedena na myších buňkách produkujících MIP-2.

Prvním úkolem bylo testování vybraných myších linií makrofágových buněk a peritoneálních makrofágů na produkci MIP-2. Produkce tohoto cytokinu výrazně stoupá v přítomnosti LPS a po stimulaci buněk prozánětlivými mediátory, např. IL-1 a TNF (Kopydlowski a kol. 1999). Proto byl i mnou LPS používán k aktivaci buněk (graf 1).

Dále jsem sledovala vliv SGE na produkci MIP-2 a po získání buněčné linie THP-1 i vliv na produkci IL-8. Je známo, že produkty slinných žláz klíštěte účinně zasahují do imunitního systému hostitele, a tudíž i do cytokinové kaskády. Vlivem sání dochází k polarizaci T-lymfocytární odpovědi směrem k T_H2 za současné suprese produkce T_H1 cytokinů. Fuchsberger a kolektiv (1995) sledoval na leukocytech lidské periferní krve indukci produkce mRNA vybraných cytokinů (např. IL-1, IL-8, TNF- α , IFN- γ) pomocí LPS a její potlačení pomocí SGE částečně nasátých samic *Rhipicephalus appendiculatus*. V mých pokusech došlo ke snížení detekovatelného množství prozánětlivých cytokinů MIP-2 a IL-8, ale ne u všech šarží testovaných SGE (graf 4 a 5) a k supresi docházelo pouze v kratším časovém intervalu. To pravděpodobně souvisí s vlastní produkcí MIP-2, kde Kopydlowski a kol. (1999) zaznamenala prudký nárůst koncentrace tohoto cytokinu během první půl hodiny po stimulaci LPS, ale poté zůstávalo množství cytokinu téměř konstantní. Tento trend jsem také pozorovala (graf 3). Proto má pravděpodobně vazba molekuly obsažené ve slinách klíštěte na cytokin význam pouze v časné fázi, kdy je nutné co nejrychleji zabránit produkci IL-8, chemoatrakci neutrofilů a rozvoji zánětu. Jistou úlohu by mohla hrát variabilita jednotlivých

extraktů a v nich přítomných molekul. Možný význam má i vliv SGE na produkci TNF- α , který je stejně jako IL-8 jedním z prvních cytokinů zánětlivé reakce. Extrakty schopné suprese IL-8 se vyznačovaly i poměrně významnou schopností snižovat množství TNF- α . Podobné výsledky jsem získala i u linie THP-1 v případě tvorby IL-8, kde čtyři z osmi extraktů suprimovaly množství tohoto cytokinu. Také Hajnická a kolektiv (2001) prokázala supresi IL-8 pravděpodobně prostřednictvím vazby jedné nebo více molekul obsažených ve slinách na produkovaný cytokin. Pokud se tato molekula naváže na IL-8, zabrání mu ve vazbě na receptor, a tím inhibuje chemotaxi neutrofilů. Montgomery a kol. (2004) ovšem uvádí, že v případě slin *I. scapularis* nedochází k inhibici chemotaxe, ale ke snížení exprese β_2 integrinů na povrchu neutrofilů, a tím ke snížení adheze těchto buněk. Pokud testujeme vliv SGE na produkci cytokinu stimulovanými leukocyty a SGE je přítomen po celou dobu experimentu, nelze rozlišit, zda SGE ovlivňuje produkci nebo jen detekci cytokinu. To se dá rozlišit pouze inkubací rekombinantního cytokinu s SGE. V případě MIP-2 a IL-8 jde zřejmě o vazbu cytokinu na nějakou molekulu slin a tím jeho inaktivaci, tj. ztrátě biologického účinku. Tato aktivita klíštěcích slin (SGE) byla pozorována pro IL-2 (Gillespie a kol 2001), IL-8 (Hajnická a kol. 2001) a TNF- α (Koník a kol. 2006). Vazba molekuly z klíštěcích slin na cytokin totiž brání vazbě protilátky, a tím detekci cytokinu v ELISA testu.

Součástí práce bylo i testování rekombinantního cystatinu na produkci MIP-2 a IL-8. Ačkoli Kato a kolektiv (2005) dokázal, že lidský cystatin A inhibuje produkci IL-8, rekombinantní cystatin z klíštěte *O. moubata* použitý v mém pokusu neměl suprimující účinek na produkci cytokinů MIP-2 a IL-8, což mohlo být způsobeno druhem klíštěte.

V každém případě ovlivnění produkce časných prozánětlivých cytokinů je pro klíště důležité pro jeho úspěšné sání, protože zánět je velmi účinnou obranou vůči tomuto parazitovi. Modulace imunitní odpovědi využívají i klíšťaty přenášené patogeny, které mohou v hostiteli snadněji přežít a množit se (Nuttall 1998). Protože neutrofilů tvoří primární obrannou bariéru proti infekci, potlačení chemotaxe neutrofilů do místa zánětu může mít významný vliv na šíření infekce a může být jednou z příčin SAT efektu.

Pokud by se podařilo identifikovat molekulu vázající IL-8, bylo by možné připravit její rekombinantní formu, která by sloužila k imunizaci myši a následnému sledování SAT efektu. Imunizace rekombinantním proteinem by vedla k vytváření protilátek, které by samy o sobě mohly zabránit v ovlivnění neutrofilů klíštěcími slinami a případně zabránit sání. Studium imunomodulačních mechanismů je základem vývoje vakcín blokujících přenos patogenů (pathogen transmission-blocking vakcín) (Wikel a kol. 1997).

6. SOUHRN

- Byl prokázán inhibiční efekt SGE *I. ricinus* na produkci myšního prozánětlivého cytokinu MIP-2 produkovaného myší buněčnou linií PMJ2/R v případě třech z osmi vybraných SGE v časovém intervalu 3 hodiny po stimulaci LPS.
- Byl prokázán inhibiční efekt SGE *I. ricinus* na produkci lidského prozánětlivého cytokinu IL-8 produkovaného lidskou buněčnou linií THP-1 v případě čtyřech z osmi vybraných SGE v časovém intervalu 6 hodin po stimulaci LPS.
- Inhibice produkce MIP-2 a IL-8 je založena na interakci cytokinu s SGE. Ovlivnění produkce nebylo prokázáno.
- Rekombinantní cystatin klíštěte *O. moubata* nemá v porovnání s kontrolním proteinem supresivní účinek na produkci cytokinů MIP-2 a IL-8 buněčnými liniemi PMJ2/R a THP-1.

7. PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK

ACTH	- adrenokortikotropní hormon
BOFES	- bovinní fetální sérum
CD	- povrchový znak (cluster of differentiation)
CXC, CC	- typ chemokinů dle polohy spárovaných cysteinů
DARC	- receptor (Duffy antigen receptor for chemokines)
DTH	- přecitlivělost oddáleného typu (delayed-type hypersensitivity)
ELISA	- imunologická metoda (enzyme-linked immunosorbent assay)
ENA-78	- chemokin (epithelial neutrophil-activating protein-78)
GCP	- chemotaktický peptid pro granulocyty (granulocyte chemotactic peptide)
GDP / GTP	- guanosindifosfát / guanosintrifosfát
GRO	- onkogen (growth-related oncogen)
ICAM	- molekula zprostředkující adhezi (intercellular adhesion molecule)
IL	- interleukin
kDa	- kilodalton (jednotka molekulové hmotnosti)
LFA-1	- adhezní molekula (lymphocyte function-associated antigen-1)
Mac-1	- adhezní molekula (macrophage antigen-1)
MCP	- chemoatrakční peptid pro monocyty (monocyte chemoattractant peptide)
MHC	- hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
MIP	- makrofágový prozánětlivý protein (macrophage inflammatory protein)
NAP-2	- peptid aktivující neutrofile (neutrophil-activating peptide-2)
OPD	- o-fenylendiamin
PBS	- fosfáty pufovaný fyziologický roztok (phosphate buffered saline)
PF4	- destičkový faktor 4 (platelet factor 4)
PTS	- prekolostrální telecí sérum
RANTES	- chemokin (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted)
ROI	- reaktivní kyslíkové radikály (reactive oxygen intermediates)
RPMI	- kultivační médium (Roswell Park Memorial Institute)
SAT	- slinami aktivovaný přenos (saliva activated transmission)
SGE	- extract ze slinných žláz (salivary gland extract)
TGF	- transformující růstový faktor (transforming growth factor)
T _H , T _C	- pomocný (helper T-cell), cytotoxický (cytotoxic T-cell) lymfocyt
TNF	- nádory nekrotizující faktor (tumor necrosis factor)

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Barnwell J. W., Nichols M. E., Rubinstein P. 1989: In vitro evaluation of the role of the Duffy blood group in erythrocyte invasion by *Plasmodium vivax*. J. Exp. Med. 169: 1795-1802

Bobek L. A., Levine M. 1992: Cystatins - Inhibitors of cysteine proteinases. Crit. Rev. Oral. Biol. Med. 3: 307-332

Bradford M. M. 1967: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254

Dickinson D. P. 2002: Cysteine peptidases of mammals: Their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. Crit. Rev. Oral. Biol. Med. 13: 238-275

Dunlevy J. R., Couchman J. R. 1995: Interleukin-8 induces motile behavior and loss of focal adhesions in primary fibroblasts. J. Cell Science 108: 311-321

Fuchsberger N., Imanishi J., Labuda M., Kita M., Hajnická V., Nuttall P. A. 1995: Ixodid salivary gland extracts inhibit production of lipopolysaccharide-induced mRNA of several different human cytokines. Exp. Appl. Acarol. 19: 671-676

Gillespie R. D., Dolan M. C., Piesman J., Titus R. G. 2001: Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis*. J. Immunol. 166: 4319-4326

Hajnická V., Kocáková P., Sláviková M., Slovák M., Gašperík J., Fuchsberger N., Nuttall P. A. 2001: Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. Parasite Immunol. 23: 483-489

Hajnická V., Vancová I., Kocáková P. 2005: Manipulation of host cytokine network by ticks: a potential gateway for pathogen transmission. Parasitology 130: 333-342

Hartmann S., Lucius R. 2003: Modulation of host immune responses by nematode cystatins J. Parasitol. 33: 1291-1302

Holmes W. E., Lee J., Kuang W. J., Rice G. C., Wood W. I. 1991: Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. Science 253: 1278-1280

Hořejší V., Bartůňková J. 2001: Základy imunologie. Triton, Praha. 2. vydání. 30-37

- Christe M., Rutti B., Brossard M. 1998: Susceptibility of BALB/c mice to nymphs and larvae of *Ixodes ricinus* after modulation of IgE production with anti-IL-4 or anti-IFN- γ monoclonal antibodies. *Parasitol. Res.* 84: 388 – 393
- Jerva L. F., Sullivan G., Lolis E. 1997: Functional and receptor binding characterization of recombinant murine macrophage inflammatory protein 2: Sequence analysis and mutagenesis identify receptor binding epitopes. *Protein Sci.* 6: 1643-1652
- Karim S., Miller N. J., Valenzuela J., Sauer J. R., Mather T. N. 2005: RNAi – mediated gene silencing to assess the role of synaptobrevin and cystatin in tick blood feeding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334: 1336-1342
- Kato T., Takai T., Mitsuishi K., Okumura K., Ogawa H. 2005: Cystatin A inhibits IL-8 production by keratinocytes stimulated with Der p 1 and Der f 1: Biochemical skin barrier against mite cysteine proteases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116: 169-176
- Klener P. a spolupracovníci 1997: Cytokiny ve vnitřním lékařství. Grada, Praha
- Koník P., Slavíková V., Salát J., Dvorožňáková E., Kopecký J. 2006: Anti-tumour necrosis factor- α activity in *Ixodes ricinus* saliva. *Parasite Immunol.* 28: 649-656
- Kopydlowski K. M., Salkowski C. I., Cody M. J., van Rooijen N., Major J., Hamilton T. A., Vogel S. N. 1999: Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.* 163: 1537-1544
- Kubeš M., Fuchsberger N., Labuda M., Zuffová E., Nuttall P. A. 1994: Salivary gland extracts of partially fed *Dermacentor reticulatus* ticks decrease natural killer cell activity *in vitro*. *Immunology* 82: 113-116
- Matzer S. P., Baumann T., Lukacs N. W., Röllinghoff M., Beuscher H. U. 2001: Constitutive expression of macrophage-inflammatory protein 2 (MIP-2) mRNA in bone marrow gives rise to peripheral neutrophils with preformed MIP-2 protein. *J. Immunol.* 167: 4635-4643
- Montgomery R. R., Lusitani D., De Boisfleury Chevance A., Malawista S. E. 2004: Tick saliva reduces adherence and area of human neutrophils. *Infect. Immun.* 72:2989-2994
- Mosmann T. R., Coffman R. L. 1989: TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7: 145-173
- Murdoch C., Finn A. 2000: Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 95: 3032-3043

- Murphy B., Tiffany H. L. 1991: Cloning of complementary DNA encoding a functional interleukin-8 receptor. *Science* 253: 1280-1283
- Nuttall P. A. 1998: Displaced tick-parasite interactions at the host interface. *Parasitology* 116: 65-72
- Paine S. H., Kemp D. H., Allen J. R. 1983: In vitro feeding of *Dermacentor andersoni* (Stiles): effects of histamine and other mediators. *Parasitology* 86: 419-428
- Peveri P., Walz A., Dewald B., Baggiolini M. 1988: A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J. Exp. Med.* 167: 1547-1559
- Ramachandra R. N., Wikel S. K. 1992: Modulation of host-immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. *J. Med. Entomol.* 29: 818-826
- Racek J., Eiselt J., Friedecký B., Holeček V., Nekulová M., Pittrová H., Rušavý Z., Senft V., Šavlová M., Těšínský P., Verner M. 2006: *Klinická biochemie*. Galén, Praha. 2. vydání. 159-161
- Ribeiro J. M. C., Makoul G. T., Levine J, Robinson D., Spielman A. 1985: Antihemostatic, antiinflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of a tick *Ixodes dammini*. *J. Exp. Med.* 161: 332-344
- Ribeiro J. M. C., Spielman A. 1986: *Ixodes dammini*: salivary anaphylatoxin inactivating activity. *Exp. Parasitol.* 62: 292-297
- Ribeiro J. M. C. 1987: *Ixodes dammini*: salivary anti-complement activity. *Exp. Parasitol.* 64: 347-353
- Ribeiro J. M. C., Weis J. J., Telford S. R. 1990: Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. *Exp. Parasitol.* 70: 382-388
- Samanta A. K., Oppenheim J. J., Matsushima K. 1990: Interleukin-8 (monocyte-derived neutrophil chemotactic factor) dynamically regulates its own receptor expression on human neutrophils. *J. Biol. Chem* 265: 183
- Schierack P., Lucius R., Sonnenburg B., Schilling K., Hartmann S. 2003: Parasite-specific immunomodulatory functions of filarial cystatin. *Infect. Immun.* 71: 2422-2429

Valenzuela J. G., Francischetti I. M. B., Pham V. M., Garfield M. K., Mather T. N., Ribeiro J. M. C. 2002: Exploring the salivome of the tick *Ixodes scapularis*. J. Exp. Biol. 205: 2843-2864

Wikel S. K., Ramachandra R. N., Bergman D. K., Burkot T. R., Piesman J. 1997: Infestation with pathogen-free nymphs of the tick *Ixodes scapularis* induces host resistance to transmission of *Borrelia burgdorferi* by ticks. Infect. Immun. 65: 335-338

Wolpe S., Sherry B., Juers D. 1989: Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 612-616