

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Přírodovědecká fakulta
Katedra medicínské biologie



Vliv klíštěcích slin na produkci IL-17 myšími splenocyty

Bakalářská práce

Michaela Kotková

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

Školitel specialista: RNDr. Jiří Salát, PhD.

Kotková M., 2008: Vliv klíštěcích slin na produkci IL-17 myšími splenocyty [Influence of tick saliva on cytokine IL-17 production by murine splenocytes. Bc.Thesis, in Czech] - 37 p. Faculty of Science, University of South Bohemia in České Budějovice, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation: Aim of this study was to quantify production of IL-17 cytokine. IL-17 was induced in murine spleen cells after stimulation of the T cell receptor (TCR) through CD3 crosslinking. Further, the effect of salivary gland extract (SGE) and tick saliva on the production of IL-17 was investigated. The mechanism of the interaction was also studied.

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci 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 elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 30.4.2008

.....

Michaela Kotková

Poděkování:

Děkuji svému školiteli Doc. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. za možnost pracovat na zajímavém tématu. Dále děkuji RNDr. Jiřímu Salátovi, PhD a Bc. Veronice Slavíkové za pomoc při provádění pokusů a za množství cenných rad, které mi v průběhu této práce poskytovali.

OBSAH

1. ÚVOD	1
1.1. Klíště obecné	1
1.2. Interakce klíště-hostitel	1
1.3. Slinné žlázy klíštěte	2
1.3.1. Extrakt slinných žláz klíštěte.....	2
1.4. Cytokiny.....	4
1.4.1. Interleukiny	4
1.5. Interleukin 17	5
1.5.1. Struktura IL-17	5
1.5.2. Členové rodiny IL-17	5
1.5.3. Exprese IL-17 rodiny	6
1.5.4. Regulace exprese IL-17	7
1.5.5. IL-17 se účastní mnoha chorob	9
2. CÍLE PRÁCE	12
3. MATERIÁL A METODY	13
3.1. Laboratorní zvířata	13
3.2. Použité chemikálie	13
3.2.1. ELISA IL-17	13
3.2.2. ELISA IFN-gama	13
3.2.3. Barvení buněk	14
3.3. Příprava buněčné suspenze myších splenocytů	15
3.4. Příprava klíštěcích slin	15
3.5. Příprava SGE	15
3.6. Schéma jednotlivých pokusů	16
3.6.1. Dynamika produkce IL-17	16
3.6.2. Vliv SGE na produkci IL-17 splenocyty po stimulaci anti-CD3 protilátkou	16
3.6.3. Mechanismus působení SGE na IL-17	16
3.6.4. Vliv SGE na produkci IL-17 v závislosti na čase přidání anti-CD3 protilátky	17
3.6.5. Vliv SGE na produkci IL-17 v závislosti na čase přidání po stimulaci anti-CD3 protilátkou	17
3.6.6. Porovnání vlivu SGE a klíštěcích slin na produkci IL-17 po stimulaci anti-CD3 protilátkou	17
3.6.7. Vliv slin na produkci IL-17 a IFN-gama v závislosti na čase přidání po stimulaci anti-CD3 protilátkou	18
3.7. ELISA test	19
3.7.1. Kvantitativní stanovení cytokinu IL-17	19

3.7.2. Kvantitativní stanovení cytokinu IFN- γ	19
3.8. Zpracování výsledků	20
4. VÝSLEDKY	21
4.1. Dynamika produkce IL-17	21
4.2. Vliv SGE na produkci IL-17 splenocyty po stimulaci anti-CD3 protilátkou	21
4.3. Mechanismus působení SGE na IL-17	22
4.4. Vliv SGE na produkci IL-17 v závislosti na čase přidání anti-CD3 protilátky	23
4.5. Vliv SGE na produkci IL-17 v závislosti na čase přidání po stimulaci anti-CD3 protilátkou	24
4.6. Porovnání vlivu SGE a klíštěcích slin na produkci IL-17 po stimulaci anti-CD3 protilátkou	25
4.7. Vliv slin na produkci IL-17 a IFN-gama v závislosti na čase přidání po stimulaci anti- CD3 protilátkou	26
5. DISKUSE	28
6. ZÁVĚR	31
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	32

1. ÚVOD

1.1. Klíště obecné

Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) patří do řádu Ixodida, čeledi Ixodidae a podčeledi Ixodinae (Singh and Girschick; 2003). Je to krev sající ektoparazit, jehož životní cyklus zahrnuje tři vývojová stádia.

Dospělá samička klíštěte klade 4-5 tisíc vajíček, z nichž se nejprve vylíhnou larvy se třemi páry nohou. Larvy cizopasí zpravidla na drobných obratlovcích, například na hlodavcích (ti jsou také hlavním zdrojem přenášených chorob). Po další přeměně se z nich stávají nymfy, které mají čtyři páry končetin stejně jako dospělí jedinci. Po dalším nasátí krve přichází poslední proměna a objevuje se klíště v té podobě, v jaké je nejčastěji potkáváme. Sameček se zpravidla spokojí jen s menším množstvím krve. Na hostitele se přichycují jen proto, aby na něm vyhledali samici a spáрили se s ní. Každé ze třech vývojových stádií (larva, nymfa a dospělec - samice) saje krev jen jednou a každé z nich může napadnout i člověka (Stejskal; 1995). Klíště je významným přenašečem celé řady patogenů (viru klíšťové encephalitidy, spirochety *Borrelia burgdorferii*, *Rickettsie* spp., *Babesia* spp. a *Anaplasma* spp.) (Bellmann et al; 2003).

1.2. Interakce klíště-hostitel

Sání klíštěte je dlouhodobý proces, který může trvat několik dnů. Ústní ústrojí, které je bodavě sací (tzv. hypostom), má nazpět mířící zoubky, k nimž se přikládají bodcovité a podobně ozubené chelicery. Chelicery a hypostom tvoří tzv. chobotek (Kratochvíl; 1973). Sání předchází produkce slin a cementu, který slouží k „ukotvení“ klíštěte v kůži. Antigeny těchto sekretů zachycují Langerhansovy buňky, které je prezentují T-lymfocytům. Cytokiny uvolňované T-lymfocyty Th1 subpopulace zahajují zánětlivou a protilátkovou odpověď. Primární odpověď u naivního hostitele není dostatečně rychlá, aby postihla sající klíště. U imunního hostitele se rozvine specifická imunitní odpověď, která je charakterizovaná tvorbou protilátek a kožní bazofilní hypersenzitivní reakcí (Allen; 1973). Klíšťata na imunním hostiteli nemohou sát, špatně se svlékají nebo uhynou (Wikel and Osburn; 1982).

Místo na kůži, kde se klíště přichytí ke svému hostiteli, je kritické rozhraní klíště-hostitel-patogen. Toto místo je výrazně upraveno farmakologicky aktivními molekulami, vylučovanými v klíštěcích slinách. Pro patogeny přenášené klíšťaty je to ekologicky výhodná nika, kterou mnozí využívají (Nuttall, Labuda; 2004). Tento jev byl

označen jako slinami aktivovaný přenos (Saliva Activated Transmission, SAT) a poprvé byl popsán u Thogoto viru. Byl-li virus injikován do morčat společně s extraktem ze slinných žláz klíšťat, infikovalo se 10x více klíšťat sajících na těchto zvířatech než v případě, kdy byl virus injikován bez SGE (Jones et al.; 1992). Tento jev byl také pozorován u viru klíšťové encefalitidy (Labuda et al.; 1993) a spirochety *Borrelia burgdorferii* (Pechová et al.; 2002).

1.3. Slinné žlázy klíštěte

Slinné žlázy klíšťat jsou klíčem k úspěšnému sání klíšťat na hostiteli. Je to párový orgán umístěný v přední části klíštěte, který roste a diferencuje se, jak klíště pokračuje v sání a růstu (Ramakrishnan et al; 2005). Slinné žlázy jsou osmoregulačním orgánem, a jako takové jsou důležité pro úspěch klíšťat během prodloužené doby mimo hostitele a také během doby sání na hostiteli. Absorpce vodní páry z nenasyceného vzduchu do hygroskopické tekutiny produkované slinnými žlázami dovolí klíšťatům zůstat hydratovaná a životaschopná během mnoha měsíců mezi sáním krve. Když klíště saje, je schopné vrátit asi 70% tekutiny a iontového obsahu z krve zpět do hostitele salivací do místa přísátí. Tyto sliny obsahují mnoho bioaktivních proteinů a lipidových komponentů, které pomáhají klíštěti získat svou potravu (Bowman, Sauer; 2004).

1.3.1. Extrakt slinných žláz klíštěte

Pro dlouhodobé sání klíštěte na hostiteli je třeba faktorů sekretovaných ze slinných žláz klíštěte, které působí proti imunitní a zánětlivé odpovědi hostitele (Nuttall; 1998).

Histamin je uvolňován hostitelem do místa zánětu, aby zabránil růstu patogenů. Klíšťata sekretují protein, který se váže k volnému histaminu v místě sání a tím pravděpodobně potlačují efekt zánětlivého mediátoru. Tento protein se nazývá histamin vázící protein (histamine binding protein – HBP) (Ramakrishnan et al; 2005).

Krev hostitele musí kontinuálně téct do místa poranění, a stejně tak musí zůstat v tekutém stavu v ústním aparátu a ve střevě klíštěte. Hostitelské hemostatické mechanismy jsou potlačeny různými látkami proti shlukování krevních destiček a anti-koagulanty v klíštěcích slinách (Bowman et al.; 1997). Příkladem takového proteinu je

Salp14 (anti-coagulant salivary-gland protein) a jeho další strukturální paralogy (Ramakrishnan et al; 2005).

Během sání klíštěte dochází k aktivaci hostitelského *komplementu*. Komplement je hlavní efektor humorálního imunitního systému obratlovců. Výsledkem aktivace komplementu je uvolnění anafylatoxinů, které jako zánětlivé peptidy stimulují „vyhlí“ granulocytů, což následně vede k zničení patogena nebo infikované buňky a zvýšení prozánětlivé aktivity (Ribeiro, Spielman; 1986). Není překvapující, že klíšťaťata mají vyvinuté inhibitory komplementu.

Cytokiny jsou chemické mediátory zánětu a imunity. Interferony (IFN) jsou cytokiny superrodiny zahrnující čtyři podrodiny, z nichž IFN- α a IFN- β jsou indukovány virovou infekcí. Jsou produkovány většinou typů buněk. Infikované buňky syntetizují a uvolňují IFN a ty se pak vážou k receptorům pro IFN sousedních buněk (Nuttall, Labuda; 2004). Jedna ze studií ukázala schopnost klíšťecích slin zvýšit přenos arboviru (arthropod-borne virus) pomocí jejich účinku na anti-virový efekt myších interferonů (IFN α/β). Potlačující efekt byl nejvíce zjevný, když buňky byly inkubovány s extraktem slinných žláz klíštěte (Salivary gland extract, SGE) před infikováním virem. Zdá se, že účinek SGE je směřovaný proti receptorům IFN α/β , spíše než že přímo interaguje s IFN (Hajnická et al.; 2000).

Dále několik studií ukázalo účinek sání klíštěte, nebo produktů slinných žláz klíštěte na expresi nebo aktivitu cytokinů. Velké množství molekul sekretovaných ve slinách klíšťaťat vážou cytokiny (Hajnická; 2004). Byly zkoumány molekuly vázající cytokiny IL-2, IL-4, IL-8, MCP-1, MIP-1 α , RANTES a eotaxin. Výsledky ukázaly, že typy molekul vázající různé cytokiny, které klíšťaťata produkují, závisí na druhu a pohlaví klíštěte. *Ixodes ricinus*, vektor několika důležitých patogenů, má ve svých slinách poměrně málo molekul vázajících cytokiny. Zatímco *Dermacentor reticulatus* vyšel jako nejvíce efektivní v aktivitách proti všem výše zmíněným cytokinům (Hajnická; 2004).

Salivary gland secreted protein 15 (Salp15) je protein s imunosupresivními účinky, který napomáhá slinami aktivovanému přenosu patogenů. Salp 15 byl objevený ve slinách klíštěte *Ixodes scapularis*. Salp15 inhibuje aktivaci CD4+ T lymfocytů mechanismem, který zahrnuje represi toku Ca²⁺ iontů. Výsledkem je nižší produkce IL-

2 a jeho receptoru (Anguita et al.; 2002). *Borrelia burgdorferi* zvyšuje expresi proteinu Salp15 ve slinných žlázách infikovaného klíštěte. Salp15 je následně vázán na povrch patogena a chrání ho tak před účinky protilátek hostitele (Ramamoorthi et al.; 2005).

1.4. Cytokiny

Cytokiny jsou základní regulátory imunitního systému. Jsou to proteiny sekretované leukocyty a jinými buňkami, které působí prostřednictvím specifických receptorů na různé buňky imunitního systému i mimo něj.

Většina cytokinů je ve svých účincích pleiotropní. Často působí v kaskádě, kdy jeden cytokin indukuje tvorbu druhého, a celý cytokinový systém je do určité míry redundantní, tj. že jednotlivé cytokiny mohou být často nahrazeny jinými. Pro některé účely je zřejmě nezbytně nutné koordinované spolupůsobení několika různých cytokinů; tyto složité a doposud málo prozkoumané synergistické a antagonistické interakce v cytokinovém systému se často označují jako cytokinová síť (Hořejší, Bartůňková; 2005).

Cytokiny jsou řazeny do skupin převážně podle jejich buněčného původu a funkce, jak napovídají například názvy růstových faktorů (epidermální, fibroblastové, nervové), faktorů stimulující kolonie krevních buněk nebo nádory nekrotizujících faktorů (Šterzl).

1.4.1. Interleukiny

Do této skupiny cytokinů jsou zařazovány funkční produkty buněk imunitního systému. Do popředí zájmu se dostaly v době, kdy byl objeven interakční fenomén, spolupráce mezi T a B lymfocyty. Některé z těchto faktorů byly sekretovány lymfocyty během sekundární odpovědi při tvorbě protilátek. Uvolňovaly se z buněk specifických vůči antigenu, ale působily také na další nescifické buňky ve svém okolí. Takto byl popsán už koncem 60. let faktor aktivující lymfocyty - LAF, dále faktor stimulující lymfocyty - TSF. Později (1986) pro tyto faktory bylo přijato pojmenování interleukiny.

Interleukiny jsou faktory sice dobře definované, ale heterogenní, co se týče jejich funkčních aktivit. Některé, obdobně jako faktory růstové, jsou nezbytné pro autostimulační diferenciační procesy během embryogeneze mezenchymálních tkání (IL-3, IL-7). Některé, například IL-8, mají výrazné zánětovorné a patogenní působení. Jiné

interleukiny mají regulační vliv na tvorbu orgánových bílkovin, například na proteiny akutní fáze, jako je nervový amyloid As (A-SAA), jehož tvorba je aktivována IL-1 β , TNF a IL-6. Interleukiny mají vzájemné pozitivní (synergické) nebo útlumové působení, a to přímé, nebo zprostředkované. Například IL-1 aktivuje T lymfocyty a po jejich proliferaci se zvyšuje sekrece dalších interleukinů, především IL-2 (Šterzl).

1.5. Interleukin 17

Interleukin 17 (IL-17), neboli IL-17A, je zakládající člen skupiny cytokinů zvaných rodina IL-17. IL-17 byl původně identifikován jako transkript z myšího T-buněčného hybridomu, nazvaný CTLA8 (Rouvier et al.; 1993). IL-17 vykazuje 58% homologii s otevřeným čtecím rámcem, HSVS13, T-lymfotropického herpesviru *Herpesvirus saimiri* (virový IL-17)(Knappe et al.; 1998). Je to polypeptid o 136 AMK a molekulové váze 16 kDa, který vzniká z prekurzoru (155 AMK) odštěpením signálního peptidu (Yao et al.; 1995).

1.5.1. Struktura IL-17

Strukturálně, IL-17A nemá žádnou sekvenci podobnou jinému známému cytokinu nebo jinému savčímu proteinu. Také jeho receptor, IL-17R, není příbuzný s žádným známým cytokinovým receptorem a nemá žádné rozpoznatelné domény. Zdá se tedy, že cytokinová rodina IL-17 je zřetelným a silným ligand-receptor signálním systémem zahrnutým v kontrole imunitní odpovědi (Aggarwal, Gurney; 2002).

1.5.2. Členové rodiny IL-17

Kromě IL-17A, náleží k rodině IL-17 další členové – IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E a IL-17F. Všichni členové rodiny IL-17 mají podobnou proteinovou strukturu. Největší podobnost nesou uvnitř C-konce. Ačkoli zde není přísné zachování rozestupů, jsou tu čtyři dobře konservované cysteiny a nejméně dva další cysteiny, které se zdají být funkčně zachované, avšak s větší variabilitou rozestupů. Interleukin 17F se vyznačuje největší homologií s IL-17A, která představuje asi 40-55% identických aminokyselin (Kolls, Lindén; 2004). Čtyři konservované cysteiny v C – konci (polovina

sekvence IL-17F) tvoří cysteinový uzel v krystalové struktuře, a zajímavé je, že tato cysteinová struktura uzlu je podobná běžnému strukturálnímu motivu viděnému v několika růstových faktorech, jako jsou kostní morfogenické proteiny, TGF- β , nervový růstový faktor a růstový faktor odvozující krevní destičky. Navíc, věří se, že IL-17F tvoří homodimer spojený disulfidickým můstkem, zatímco další členové IL-17 rodiny jsou vyjádřeny jako pevně spojené dimery (Hymowitz et al.; 2001).

IL-17B a IL-17C byly identifikovány na základě sekvenční podobnosti. Stejně tak, další tři členové, IL-17D, IL-17E (také zvaný jako IL-25) a IL-17F byly primárně objeveny na základě sekvenční homologie. Tyto molekuly mají podobné molekulární váhy, 20 až 30 kDa, a překrývají se, ale jejich biologické aktivity jsou neidentické (Kawaguchi et al.; 2004).

1.5.3. Exprese IL-17 rodiny

IL-17A je silný prozánětlivý cytokin produkovaný aktivovanými paměťovými T buňkami. Funkční analýzy ukázaly jeho schopnost indukovat produkci dalších cytokinů a chemokinů: tumor necrosis faktor α (TNF- α) a IL-1 β z makrofágů; IL-6, IL-8 a vnitrobuněčnou adhezivní molekulu-1 (ICAM-1) z lidských fibroblastů; a granulocytární kolonie-stimulující faktor (G-CSF) a prostaglandiny (především PGE₂) ze synoviocytů. V chondrocytech bylo ukázáno, že IL-17 aktivuje nukleárního transkripční faktor (NF- κ B) stejně dobře jako mitogenem aktivovaná protein kináza (Li et al; 2000).

IL-17B mRNA je exprimována ve slinivce dospělého člověka, v tenkém střevě a žaludku, zatímco IL-17C mRNA není detekována v žádné tkáni dospělého jedince. Exprese IL-17C je mnohem více omezená a pouze vzácně ji můžeme najít v prostatě dospělého a ve fetální ledvině. Žádná exprese IL-17B nebo IL-17C nebyla nalezena v aktivovaných T buňkách. IL-17B a IL-17C indukují uvolnění TNF- α a IL-1 β z monocytické buněčné linie, THP-1, zatímco IL-17A má zde velmi malý efekt. V THP-1 buňkách nebyla nalezena žádná indukce IL-1 α , IL-6, IFN- γ nebo G-CSF. Fluorescenční analýza ukázala, že IL-17B a IL-17C se vážou k THP-1. Naopak IL-17B a IL-17C nejsou aktivní ve stimulaci lidských fibroblastů k produkci IL-6 a nevážou se k lidské IL-17 receptorové extracelulární doméně (Li et al; 2000).

IL-17D je vylučovaný cytokin s homologií k proteinům IL-17 rodiny. IL-17D je prioritně exprimován v kosterním svalstvu, mozku, tukové tkáni, plicích, srdci a ve slinivce. Působením rekombinantním IL-17D (rIL-17D) na endoteliální buňky, stimulovalo produkci IL-6, IL-8 a GM-CSF (Starnes et al.; 2002).

Exprese IL-17E je dosti nízká, ale může být detekována pomocí PCR v různých periferních tkáních. IL-17E má silný prozánětlivý efekt *in vitro* i *in vivo*, indukuje produkci IL-8. Projev IL-17E indukuje patologické změny v mnoha tkáních, zvláště v játrech, srdci a plicích, charakterizovaný smíšenou zánětlivou buněčnou infiltrací, epiteliální hyperplasií a hypertrofií. Tedy, IL-17E se zdá být unikátní pleiotropický cytokin, který se angažuje v systémové Th2 odpovědi s tkáňově specifickými imunologickými a patologickými změnami (Aggarwal, Gurney; 2002).

Exprese IL-17F je mnohem komplexnější, než ostatní členové rodiny IL-17. Byly nalezeny dvě rozdílné isoformy lidského interleukinu 17F – kratší a delší (Kawaguchi et al.; 2001). IL-17F je demonstrován v aktivovaných monocytech. IL-17F je schopný podporovat produkci IL-6, IL-8 a G-CSF z široké škály buněk. IL-17A a IL-17F mají značný stupeň sekvenční homologie a funkční podobnosti. Přesto některé typy tkání, včetně jater, plic, vaječníků a fetálních jater, exprimují pouze IL-17F. IL-17F má ve srovnání s IL-17A širší tkáňovou distribuci a více různorodé biologické funkce (Kawaguchi et al.; 2004).

1.5.4. Regulace exprese IL-17

IL-17 je vytvářen primárně, ne-li výlučně, T buňkami. Zjistilo se, že obě CD4+ i CD8+ T buňky mohou produkovat IL-17. Jako mnoho cytokinů, tak i IL-17 je rychle indukován v primárních T buňkách po stimulaci T-buněčného receptoru (TCR) přes CD3 molekulu. Pomocí IL-23 je možné zvýšit CD3-indukovanou expresi IL-17. Nicméně, produkce IL-17 může nastat autonomně v T buňkách, takže žádné dendritické buňky ani IL-23 není potřeba pro podporu krátkodobé produkce IL-17 (Liu et al.; 2005).

IL-23 indukuje diferenciaci nezralých CD4+ T buněk na pomocné T buňky (Th17/Th_{IL-17}), které produkují IL-17A, IL-17F, IL-6 a TNF- α , ale ne IFN- γ a IL-4 (Iwakura, Ishigame; 2006). IL-23 je heterodimerický cytokin, který sdílí jednu podjednotku, p40, s IL-12 (Aggarwal et al.; 2003). Bylo ukázáno, že transgenní over-exprese druhé komponenty interleukinu-23, p19, byla dostatečná k indukci zánětu a předčasné smrti (Wiekowski et al.; 2001).

Liu a kolektiv zkoumali kinetiku sekrece IL-17 ve slezinných buňkách (Sb) a buňkách lymfatických uzlin (bLU) v odpovědi na standardní T buněčný stimul, včetně agonistických protilátek k CD3 a CD28 molekulám. Receptorové zesílení anti-CD3 protilátkou, vyvolalo u Sb/bLU sekreci detekovatelného množství interleukinu-17. Šest hodin po stimulaci se jeho produkce rapidně zvýšila a pak ještě vzrostla za 72 hodin stimulace. Stimulace anti-CD28 protilátkou samotnou neindukovala produkci IL-17 (Liu et al.; 2005). Tento model se překvapivě odlišoval od produkce IL-2, která byla dramaticky zvýšena po stimulaci CD28 molekuly. Naproti tomu, stimulací CD3 molekuly nebyl získán žádný IL-2 (Liu et al.; 2005).

Zajímavý rys IL-17 je, že se zdá být produkován primárně paměťovými T buňkami. Ačkoli produkce IL-17 není omezená buď na Th1 nebo Th2 subpopulaci, paměťové buňky se zdají být primárním producentem tohoto cytokinu u lidí a u myši (Aggarwal et al; 2003). Fakt, že IL-17 je paměťový cytokin vytvářený pouze T buňkami, zahrnuje jeho roli ve zpětné odpovědi. A stejně jako pro-zánětlivé cytokiny IL-1 β a TNF- α aktivuje IL-17 přirozenou imunitní odpověď v počátečních stádiích infekce (Liu et al.; 2005).

Spojení IL-23/IL-17 hraje důležitou roli v rozvoji chronického zánětu a v hostitelské obraně proti bakteriální infekci;

1) U chronické infekce, antigenem stimulovaná dendritická buňka a makrofág produkují IL-23, který podporuje rozvoj Th17 buněk. Th17 buňky produkují IL-17, který zvýší T buněčnou proliferaci a spouští silnou zánětlivou odpověď indukcí produkce několika různých prozánětlivých mediátorů. IL-23 také působí na dendritické buňky a makrofágy autokrinním/parakrinním mechanismem pro stimulaci produkce prozánětlivých cytokinů, jako jsou IL-1, IL-6 a TNF- α (Iwakura, Ishigame; 2006).

2) Proti bakteriální infekci, IL-23 je rychle produkován aktivovanými makrofágy a dendritickými buňkami v místě infekce. IL-23 poté aktivuje lokální populace Th17 buněk a další buňky produkující IL-17, jako například CD8+ T lymfocyty. Produkce IL-17 těmito buňkami indukuje produkci G-CSF ze stromálních buněk. IL-23/IL-17/G-CSF cesta zvýší odvod neutrofilů do místa infekce. Tím přispívá k zničení extracelulárních bakterií (Iwakura, Ishigame; 2006).

1.5.5. IL-17 se účastní mnoha chorob

Zdá se, že členové rodiny IL-17 hrají aktivní roli v zánětlivých chorobách, autoimunitních chorobách, v obraně hostitele proti cizím patogenům a také v rakovině. To ukazuje členy IL-17 rodiny a jejich receptory jako potenciální cíle pro budoucí farmakoterapie (Kolls, Lindén; 2004). Většina experimentálních důkazů naznačuje, že rodina IL-17 podporuje lokální zánět tkáně, převážně navozením uvolnění pro-zánětlivých a neutrofilů-mobilizujících cytokinů (Fossiez et al.; 1996). Bylo zjištěno, že IL-17A, a nejspíše také IL-17F, podporují granulopoézu (Schwarzenberger et al.; 1998), akumulaci a aktivaci neutrofilů v plicích (Lindén et al.; 2000), kloubech (Lotz et al.; 1996), centrálním nervovém systému a v tkáni střeva (Kolls and Lindén; 2004).

IL-17 a plicní choroby; Alergické astma je charakterizováno lokální Th2 imunitní odpovědí zahrnující změny remodelingu včetně epiteliální hypertrofie, subepiteliální fibrózu, hyperplazii pohárkových buněk a hyperreaktivitu dýchacích cest. Současné studie podaly důkaz, že IL-17A a IL-17F jsou zahrnuty v těchto patologických jevech (McParland et al.; 2003). Bylo zjištěno, že IL-17A je schopen indukovat expresi dvou mucinových genů, MUC5AC a MUC5B, v bronchiálních epiteliálních buňkách. Over-exprese IL-17F také ústí v expresi mucinového genu a také v hyperplazii pohárkových buněk (Kawaguchi et al.; 2004). V obstrukčních chorobách dýchacích cest, včetně bronchiálního astmatu a chronické obstrukční plicní choroby, je hlavní charakteristikou akumulace neutrofilů v dýchacích cestách (Lindén et al.; 2000). Odvod neutrofilů do dýchacích cest je regulován přes síť chemokinů, jejichž důležitým zdrojem jsou bronchiální epiteliální buňky a vaskulární endoteliální buňky (Kolls et al.; 2003). Neutrofilů uvolní mediátory, které přispějí k poškození plicní tkáně. Neutrofilů mohou také produkovat volné kyslíkové radikály, které způsobí zvýšení transkripce mRNA silného neutrofilního chemoatraktantu IL-8 v bronchiálních epiteliálních buňkách (Jorens et al.; 1992). Navíc, mohou neutrofilů uvolnit pro-zánětlivý cytokin TNF- α (tumor necrosis faktor α), jehož zvýšená produkce je nalézána u obstrukčních chorob dýchacích cest. Tento cytokin může způsobit nadměrnou přecitlivělost bronchiálních hladkých svalů, pravděpodobně přes uvolnění CXC chemokinů IL-8 z bronchiálních epiteliálních buněk (Lindén; 2003).

IL-17A a IL-17F indukují také několik pro-fibrotických cytokinů, například IL-6, IL-11 a TGF- β . Tyto cytokiny byly nalezeny u pacientů s astmatem (Chakir et al.; 2003).

Celkem vzato, IL-17 je zahrnut v plicních onemocněních a zánětech v mnoha stupních, částečně díky indukci dalších cytokinů a chemokinů.

IL-17 a anti-mikrobiální aktivita; Současné poznatky, na základě studií *in vitro*, ukazují zahrnutí IL-17 v hostitelských obranných mechanismech (Kawaguchi et al.; 2004). IL-17A a IL-17F jsou zahrnuty v obranných mechanismech hostitele proti gram-negativním bakteriím, jako je *Klebsiella pneumoniae* (Ye et al.; 2001). Podobná pozorování jsou také u endotoxinů jako takových (Larrison et al.; 2000). IL-17A indukuje expresi lidského β -defensinu-2 (hBD-2) a makrofágového pro-zánětlivého proteinu 3 (MIP-3). Oba, hBD-2 a MIP-3, jsou nezbytné komponenty přirozené imunity dýchacích cest. Proto, stimulační efekt IL-17A na expresi hBD-2 a MIP-3, spolu s jeho aktivitou v odvodu neutrofilů a jejich aktivaci, ukazuje důležitou roli IL-17A v hostitelské obraně v rámci přirozené imunitní odpovědi. Bylo zjištěno, že myši, kterým chybí receptor pro IL-17A, IL-17R, nejsou schopné rozvinout imunitní odpověď na infekci *Klebsiella pneumoniae* v dýchacích cestách (Ye et al.; 2001). To je nejspíš díky nápadně sníženému odvodu neutrofilů do broncho-alveolárního prostoru souvisejícím se sníženou slezinnou granulopoetickou odpovědí na infekci a zmenšení lokální G-CSF produkci (Ye et al.; 2001).

IL-17 a rheumatoid artritida; Revmatická artritida je charakterizovaná chronickým zánětem a destrukcí kostí a chrupavky (Aggarwal et al.; 2002). Strukturální změny spojené s chorobou jsou částečně způsobené zvýšením produkce NO. IL-17 stimuluje produkci NO a dalších katabolických enzymů v lidských chrupavkách, a tím způsobuje snížení proliferace chondrocytů a syntézy proteoglykanů (Honorati et al.; 2001). Navíc, IL-17 spolu s IL-1 β a TNF stimuluje osteoblasty k sekreci cytokinů jako jsou GM-CSF a IL-6, které způsobují destrukci chrupavky a zvyšují tak ničení kloubu (van Bezooijen et al.; 2002). Použitím protilátek proti IL-17 je možné snížit antigenem indukovanou artritidu. Bylo to dokázáno pokusem na myších *in vivo*, kdy po podání anti-IL-17 protilátky došlo ke zmírnění kloubního poškození a také ke snížení IL-6 v myším séru (Lubberts et al.; 2004).

IL-17E v alergických reakcích; Další člen rodiny IL-17, IL-17E, indukuje expresi rozdílné sady cytokinových genů a je zahrnut v Th2 typu imunitní odpovědi. Over-exprese IL-17E ústí v eosinofilii dýchacích cest a ve zvýšení hladin IL-5, IL-13 a IgE

v séru. Navíc, epiteliální buňky dýchacích cest produkují více hlenu po intraperitoneálním podání rekombinantu IL-17E (Kawaguchi et al.; 2004).

Mnoho experimentů dokázalo, že členové rodiny IL-17 jsou zapojeny do specifických zánětlivých procesů vedoucích k mobilizaci granulocytů. Role IL-17A , a částečně také IL-17F, je podpora granulopoézy, akumulace a aktivace neutrofilů v plicích, kloubech, centrálním nervovém systému a střevní tkáni. IL-17A a IL-17F jsou také důležitými hráči v hostitelské obraně proti patogenům. To umisťuje IL-17A a IL-17F do rozhraní mezi přirozenou a získanou imunitou. IL-17E je zase důležitou komponentou v alergických reakcích. Specifické zahrnutí členů IL-17 rodiny v různých chorobách je předurčuje být cílem pro další studie terapeutického využití blokování nebo regulace funkce těchto proteinů.

2. CÍLE PRÁCE

- indukce IL-17 v myších splenocytech pomocí anti-CD3 protilátky
- dynamika produkce IL-17
- hodnocení vlivu extraktu ze slinných žláz a slin klíštěte *Ixodes ricinus* na produkci IL-17

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Laboratorní zvířata

V práci byly použity inbrední myši kmene C3H (Charles River, Germany) a klíšťata *Ixodes ricinus* (chov Parazitologický ústav, BC AVČR, České Budějovice).

3.2. Použité chemikálie

3.2.1. ELISA IL-17

K pokusu byla použita komerčně dostupná sada Mouse IL-17A ELISA Ready-SET-Go!, eBioscience (Cat.No. 88-7371-88). Tato sada obsahovala všechny nezbytné reagensie a pufr pro kvantitativní změření myšního IL-17A proteinu metodou ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).

Komponenta	Upřesnění
Vazebná protilátka	purifikovaná protilátka anti-mouse IL-17A
Detekční protilátka	biotin-konjugovaná protilátka
Standard	rekombinantní cytokin IL-17A pro vytvoření standardní křivky a kalibraci vzorku, koncentrace 1 µg/ml
ELISA/ELISPOT vazebný pufr	před použitím se rozředil v 1l dH ₂ O a přefiltroval přes filtr 0,22 µm
Ředící roztok	5x koncentrovaný
Enzym	enzym streptavidin peroxidáza HRP
Substrátový roztok	tetramethylbenzidin (TMB)
Stop roztok	2M H ₂ SO ₄

3.2.2. ELISA IFN-gama

K pokusu byly použity komerčně připravená purifikovaná protilátka (BD Pharmingen, USA; Cat.No. 551216), biotin-konjugovaná protilátka (BD Pharmingen, USA; Cat.No. 554410) a rekombinantní cytokin IFN-γ (R&D Systems, UK; Cat.No.

485-MI) pro kvantitativní změření myšního IFN- γ proteinu metodou ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).

Komponenta	Upřesnění
Vazebná protilátka	purifikovaná protilátka anti-mouse IFN- γ
Detekční protilátka	biotin-konjugovaná protilátka
Standard	rekombinantní cytokin IFN- γ pro vytvoření standardní křivky a kalibraci vzorku, koncentrace 20 $\mu\text{g/ml}$
Vazebný roztok	uhličitanový pufr pH 9,4 (0,43 g NaHCO_3 , 0,53 g Na_2CO_3 ve 100 ml dH_2O)
Ředící roztok	roztok PBS s 10% PTS
Enzym	streptavidin peroxidáza HRP, ředění 1:1000
Substrátový roztok	fosfo-citrátový pufr: 10 ml dH_2O , 4 mg OPD, 4 μl H_2O_2 (30%)
Stop roztok	2M H_2SO_4

3.2.3. Barvení buněk

Pro barvení myších slezinných buněk byl použit Cell Counting Kit-8 (Sigma-Aldrich, Švýcarsko), a to 10 μl na jamku 96-jamkového panelu. Cell Counting Kit-8 (CCK-8) obsahuje ve vodě rozpustnou sůl tetrazolium 8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodná sůl]. Tato sůl je redukována dehydrogenásami v buňkách na oranžově zbarvený produkt, formazan. Množství formazanového barviva je přímo úměrné počtu živých buněk. Konkrétní hodnoty lze získat měřením barvených buněk na spektrofotometru (Multiskan MCC/340) při vlnové délce 450 nm.

3.3. Příprava buněčné suspenze myších splenocytů

Buněčná suspenze byla připravena z myší sleziny. Slezina byla zhomogenizována protlačením přes sítko a promíchána s médiem RPMI 1640. Splenocyty byly třikrát centrifugovány po 10 minutách při 1.000 g. Po každé centrifugaci byly promyty čerstvým základním médiem RPMI 1640.

Promyté splenocyty byly doplněny kultivačním médiem a nasazeny do jamek 96-jamkové mikrotitrační destičky (TPP, Švýcarsko) v množství 10^6 buněk ve 100 μ l.

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

3.4. Příprava klíštěcích slin

Sliny byly získány ze samic klíštěte *Ixodes ricinus*, které sály na morčatech po dobu 6-7 dní. Nasátá klíšťata se zafixovala na podložní sklíčko a na hypostom jim byla nasazena tenká kapilára. Slinění bylo vyvoláno aplikací 1-2 μ l roztoku pilocarpinu v alkoholu (5mg do 100 μ l ethanolu) na hřbet klíštěte. Takto připravená klíšťata byla umístěna do termostatu při teplotě 37°C. Po dvou hodinách se sliny z kapiláry přenesly do mikrozkušavky. Sliny se uchovávají zmražené při teplotě -70°C.

3.5. Příprava SGE

Slinné žlázy byly izolovány z 20 samic klíštěte *Ixodes ricinus*, které sály na morčatech 6-7 dní. Z vypitvaných žláz uchovaných ve zkumavce s 1 ml PBS byl připraven homogenát sonikací na ultrazvukovém homogenizátoru. Ke každému SGE byly přidány inhibitory proteáz (Protease inhibitor cocktail, Sigma) ředěný 1:500. Vzniklá suspenze byla centrifugována při 14.000 g po dobu 30 minut z důvodu odstranění nerozpustné frakce. Poté byla stanovena koncentrace proteinu v supernatantu, která bývá 400-500 μ g/ml. SGE se uchovávají zamražené při teplotě -70°C.

3.6. Schéma jednotlivých pokusů

3.6.1. Dynamika produkce IL-17

K pokusu byly použity myší splenocyty. K určení počtu buněk bylo použito Bürkerovy komůrky. K promytým slezinným buňkám bylo přidáno kultivační médium tak, aby v každé jamce 96-jamkové destičky bylo 10^6 buněk ve 100 μ l. Buňky byly stimulovány přidáním 50 μ l anti-CD3 protilátky v konečné koncentraci 2 μ g/ml pro produkci IL-17. Jako kontrola byla vytvořena triplikace jamek s buňkami bez stimulace anti-CD3 protilátkou. Poté byla destička inkubována v termostatu při teplotě 37°C a 3,5% CO₂. Supernatanty byly odebírány v časových intervalech 2, 4, 8, 24, 48 a 72 hodin, vždy ze tří jamek, a testovány metodou ELISA.

3.6.2. Vliv SGE na produkci IL-17 splenocyty po stimulaci anti-CD3 protilátkou

Jednotlivé jamky obsahovaly 10^6 buněk ve 100 μ l, které byly stimulovány přidáním 50 μ l anti-CD3 protilátky a dále k nim bylo přidáno 50 μ l SGE v konečných koncentracích 20, 5 a 1 μ g/ml vždy v triplikaci. SGE byl přidán ve stejném čase jako anti-CD3 protilátka, tj. v čase nula. Pro kontrolu byla vytvořena triplikace jamek s buňkami stimulovanými anti-CD3, ale bez přidání SGE. Součástí kontroly byly také inhibitory proteáz, které byly přidávány ve stejných koncentracích jako SGE. Supernatanty byly odebrány po 48 hodinách a testovány metodou ELISA.

Na základě výsledků právě popsaného pokusu byl proveden tentýž pokus znovu, jen s jinými koncentracemi SGE, a to konkrétně 10, 1 a 0,1 μ g/ml. Ostatní parametry a postup byly zachovány.

3.6.3. Mechanismus působení SGE na IL-17

K pokusu byl použit rekombinantní IL-17A (eBioscience, USA) 2 μ l v 1 ml ředícího roztoku, který byl 2 hodiny preinkubován s SGE o koncentracích 10, 1 a 0,1 μ g/ml. Stejný postup byl proveden i s inhibitory proteáz v koncentracích odpovídajících SGE v užitých ředěních. Poté bylo množství IL-17 stanoveno metodou ELISA.

3.6.4. Vliv SGE na produkci IL-17 v závislosti na čase přidání anti-CD3 protilátky

Byly připraveny triplikace jamek s myšími splenocyty v množství 10^6 buněk ve 100 μ l na jamku. Čas, kdy byla k buňkám přidána anti-CD3 protilátka pro indukci IL-17, byl nazván časem nula.

V čase -2 hodin bylo do první trojice jamek přidáno 50 μ l SGE o konečné koncentraci 10 μ g/ml.

Po dvou hodinách, tj. v čase 0, bylo do první trojice jamek přidáno 50 μ l anti-CD3 protilátky. Ta byla rovněž přidána do druhé a třetí triplikace jamek. Dále bylo ve stejnou dobu přidáno 50 μ l SGE o stejné koncentraci do druhé triplikace .

Po dalších dvou hodinách, tj v čase +2 hodin, bylo přidáno po 50 μ l SGE do jamek třetí triplikace.

Součástí kontroly byly inhibitory proteáz, které byly přidávány ve stejných koncentracích a stejných časových intervalech jako SGE. Supernatanty byly odebrány po 24 hodinách od času nula a testovány metodou ELISA.

3.6.5. Vliv SGE na produkci IL-17 v závislosti na čase přidání po stimulaci anti-CD3 protilátkou

Jednotlivé jamky obsahovaly 10^6 buněk ve 100 μ l, které byly stimulovány přidáním 50 μ l anti-CD3 protilátky. Dále k nim byl přidán 50 μ l SGE v konečné koncentraci 10 μ g/ml. Do první triplikace byl SGE přidán ve stejném čase jako anti-CD3 protilátka, tj. v čase nula. Do druhé triplikace se SGE nanese 2 hodiny od stimulace buněk, tj v čase +2 hodiny. Do dalších triplikací byl SGE přidáván v časech +4, +8 a +12 hodin. Pro kontrolu byly vytvořeny triplikace jamek s buňkami bez stimulace anti-CD3 protilátkou a s buňkami stimulovanými anti-CD3, ale bez SGE. Součástí kontroly byly také inhibitory proteáz, které byly přidávány ve stejných koncentracích jako SGE a stejných časových intervalech jako SGE. Supernatanty byly odebrány po 24 hodinách a testovány metodou ELISA.

3.6.6. Porovnání vlivu SGE a klišťecích slin na produkci IL-17 po stimulaci anti-CD3 protilátkou

Do každé jamky bylo připraveno 10^6 myších slezinných buněk ve 100 μ l media. Buňky byly stimulovány přidáním 50 μ l anti-CD3 protilátky (2 μ l a-CD3 v 1 ml media)

pro produkci IL-17. Dále bylo do jamek přidáno 50 μ l SGE tak, aby výsledné koncentrace byly 10, 1, 0,1 a 0,01 μ g/ml v časovém intervalu +8 hodin od stimulace buněk anti-CD3 protilátkou. Do jiných jamek byly přidány klíštěcí sliny po 50 μ l o stejných konečných koncentracích a ve stejném časovém intervalu jako SGE. Supernatanty byly odebrány po 24 hodinách a testovány metodou ELISA.

Součástí pokusu bylo také promytí jedné trojice jamek s buňkami stimulovanými anti-CD3 protilátkou po 1 hodině inkubace v termostatu. Cílem bylo zjistit, zda stačí krátkodobá stimulace buněk anti-CD3 protilátkou a zda produkce IL-17 dále probíhá bez další stimulace. Součástí kontroly byly buňky bez stimulace anti-CD3 protilátkou.

3.6.7. Vliv slin na produkci IL-17 a IFN-gama v závislosti na čase přidání po stimulaci anti-CD3 protilátkou

V příslušných jamkách mikrotitrační destičky bylo po 10^6 splenocytů ve 100 μ l média, které byly stimulovány přidáním 50 μ l anti-CD3 protilátky. Poté bylo do každé jamky přidáno po 50 μ l klíštěcích slin v konečné koncentraci 10 μ g/ml. Sliny byly přidávány v časových intervalech 0, +2, +4, +8, +12 a +16 hodin od stimulace anti-CD3 protilátkou. Supernatanty byly odebrány po 24 hodinách od času nula a testovány metodou ELISA na IL-17 a IFN-gama.

Součástí tohoto pokusu bylo také barvení buněk po odebrání supernatantů pro stanovení výše zmíněných cytokinů. Buňky se barvily pomocí Cell Counting Kit-8, a to 10 μ l barvy na jamku. Po hodině inkubace v termostatu byl obsah jamek změřen na spektrofotometru při vlnové délce 450 nm. Cílem pokusu bylo zjistit, zda mají sliny vliv na proliferaci buněk. Je možné, že navázání klíštěcích slin na buňky inhibuje jejich dělení, proto se snižuje i množství vyprodukovaného cytokinu.

3.7. ELISA test

3.7.1. Kvantitativní stanovení cytokinu IL-17

Vazebná protilátka byla naředěna tak, že 48 µl protilátky bylo přidáno do 12 ml vazebného roztoku a po 50 µl byla napipetována do příslušných jamek 96-jamkové destičky (NUNC Maxisorp 96). Destička byla inkubována přes noc ve vlhké komůrce při teplotě 4°C.

Druhý den byly jamky 5x promyty promývacím roztokem a poté vyblokovány 100 µl ředícího roztoku. Po jedné hodině inkubace ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě byly jamky opět promyty a do příslušných jamek bylo napipetováno po 50 µl testovaných vzorků. Dále byla vytvořena kalibrační křivka naředěním standardu IL-17 dvojkovou řadou ze 2 ng/ml až na nulovou koncentraci. Uzavřená destička byla inkubovaná 2 hodiny při laboratorní teplotě nebo přes noc při 4°C.

Třetí den byly jamky 5x promyty promývacím roztokem a bylo přidáno po 50 µl na jamku naředěné detekční protilátky. Ředění bylo provedeno tak, že 48 µl protilátky bylo přidáno k 12 ml ředícího roztoku. Destička byla inkubovaná při laboratorní teplotě 1 hodinu. Poté byla destička opět promyta a do jamek bylo pipetováno po 50 µl naředěného konjugátu Avidin peroxidázy, a to ve stejném ředění jako u předchozí protilátky. Destička byla uzavřena a inkubována 30 minut při laboratorní teplotě. V dalším kroku byly jamky promyty 7x. Poté bylo přidáno po 50 µl substrátového roztoku do každé jamky a destička byla inkubována 15 minut ve tmě. Vývoj barevné reakce byl zastaven přidáním H₂SO₄ po 25 µl na jamku a následně byly změřeny hodnoty absorbance na spektrofotometru (Multiskan MCC/340) při vlnové délce 450 nm.

3.7.2. Kvantitativní stanovení cytokinu IFN-γ

Nejprve byla naředěna vazebná protilátka, a to 4 µl protilátky do 2 ml vazebného roztoku a po 50 µl byla napipetována do příslušných jamek 96-jamkové destičky (NUNC Maxisorp 96). Destička byla inkubována přes noc ve vlhké komůrce při teplotě 4°C.

Druhý den byly jamky 5x promyty promývacím roztokem a poté byly vyblokovány 200 µl ředícího roztoku PBS s 10% PTS. Po jedné hodině inkubace ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě byly jamky opět 5x promyty a do příslušných jamek bylo nanášeno po 50 µl testovaných vzorků a rekombinantní cytokin jako

standard ředěný dvojkovou řadou z 10 ng/ml až na nulovou koncentraci pro vytvoření kalibrační křivky. Uzavřená destička byla inkubována 6 hodin při laboratorní teplotě nebo přes noc při 4°C.

Třetí den byly jamky 5x promyty promývacím roztokem a bylo přidáno po 50 µl na jamku naředěné detekční protilátky. Ředění bylo provedeno přidáním 4 µl biotinylované protilátky k 1 ml ředícího roztoku. Destička byla inkubována při laboratorní teplotě 1 hodinu. Poté byla destička opět promyta a do jamek bylo napipetováno po 100 µl naředěného konjugátu streptavidin peroxidázy, a to 1:1000. Destička byla uzavřena a inkubována 30 minut při laboratorní teplotě. V dalším kroku byly jamky 7x promyty. Poté bylo přidáno po 100 µl substrátového roztoku do každé jamky a destička byla inkubována 15 minut ve tmě. Substrátový roztok byl vždy připraven těsně před použitím. Během této doby peroxid vodíku uvolní kyslík, který oxiduje chromogen OPD a vznikne tak charakteristická barevná reakce. Vývoj barevné reakce byl zastaven přidáním H₂SO₄ po 50 µl na jamku a následně byly změřeny hodnoty absorbance na spektrofotometru (Multiskan MCC/340) při vlnové délce 450 nm.

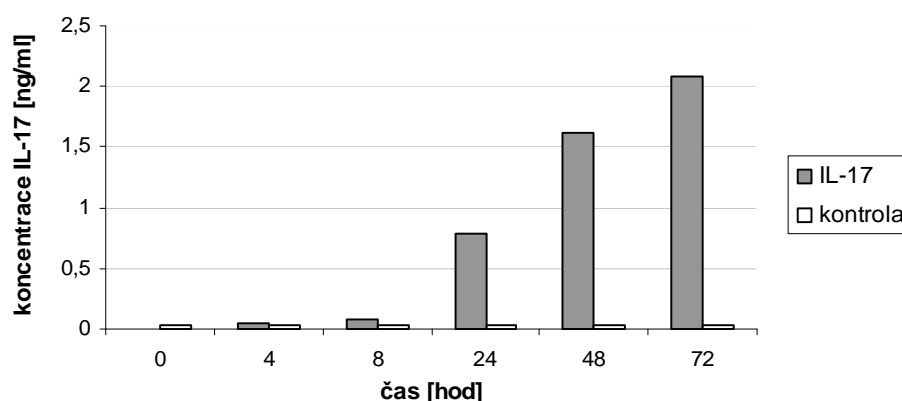
3.8. Zpracování výsledků

Všechny vzorky jednotlivých pokusů byly nasazovány v triplikacích. Průměry a směrodatné odchylky byly spočítány pomocí programu Microsoft Excel. Rovněž grafy byly vytvořeny pomocí programu Excel. Statistické vyhodnocení bylo provedeno programem Statistika 7. Použitým testem byla analýza variace (jednocestná ANOVA).

4. VÝSLEDKY

4.1. Dynamika produkce IL-17

Prvotním cílem bylo určit dynamiku produkce interleukinu-17 myšími splenocyty po jejich stimulaci anti-CD3 protilátkou (graf 1). Byla pozorována malá produkce IL-17 již po 4 a 8 hodinách po stimulaci. Rápidní nárůst byl zaznamenán po 24 hodinách, kdy byl téměř desetinásobný. Dále množství cytokinu rostlo po dvojnásobcích, až do 72 hodin od stimulu. Jako kontrola byly použity buňky bez stimulace anti-CD3 protilátkou.

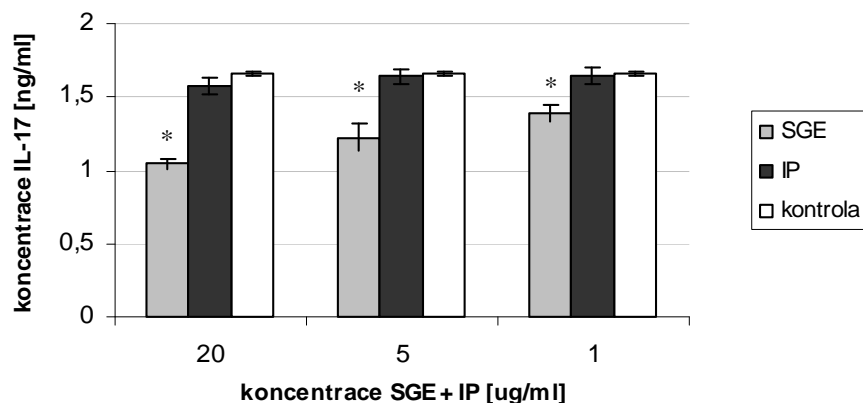


Graf 1: Produkce cytokinu IL-17 stimulovanými myšími splenocyty anti-CD3 protilátkou (2 $\mu\text{g/ml}$).

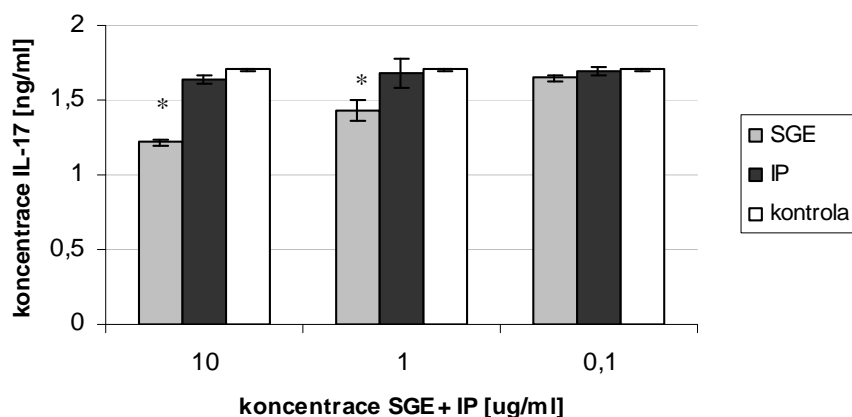
4.2. Vliv SGE na produkci IL-17 splenocyty po stimulaci anti-CD3 protilátkou

Tento pokus měl za cíl zjistit, jak se bude měnit produkce IL-17 po přidání extraktu ze slinných žláz klíštěte (SGE), o různých koncentracích, ke stimulovaným splenocytům (graf 2A, B). Schéma pokusu popisuje kapitola 3.6.2. K nejvýraznějšímu poklesu množství IL-17 došlo u SGE o koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$, konkrétně o 37%. K mnohem menší, přesto stále značné inhibici došlo také u SGE o koncentraci 1 $\mu\text{g/ml}$ (o 15,5%). Z tohoto důvodu byl proveden tentýž pokus znovu, jen s menšími koncentracemi SGE (graf 2B). I zde bylo markantní potlačení produkce IL-17, konkrétně u SGE o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$, kde úbytek činil 29%. Nejmenší koncentrace SGE (0,1 $\mu\text{g/ml}$), která byla použita, inhibovala jen nepatrně. Rozdíl byl pouhé 3 procenta.

Součástí kontrol obou testů byly inhibitory proteáz v koncentracích shodných s koncentracemi v SGE. Inhibitory proteáz měly na snížení množství IL-17 minimální, takřka zanedbatelný vliv.



Graf 2A: Vliv extraktu slinných žláz na produkci IL-17 splenocyty po stimulaci anti-CD3 protilátkou; koncentrace SGE: 20, 5 a 1 $\mu\text{g/ml}$; koncentrace anti-CD3: 2 $\mu\text{g/ml}$; IP = inhibitory proteáz; * statisticky významný rozdíl oproti kontrole ($p < 0,05$).

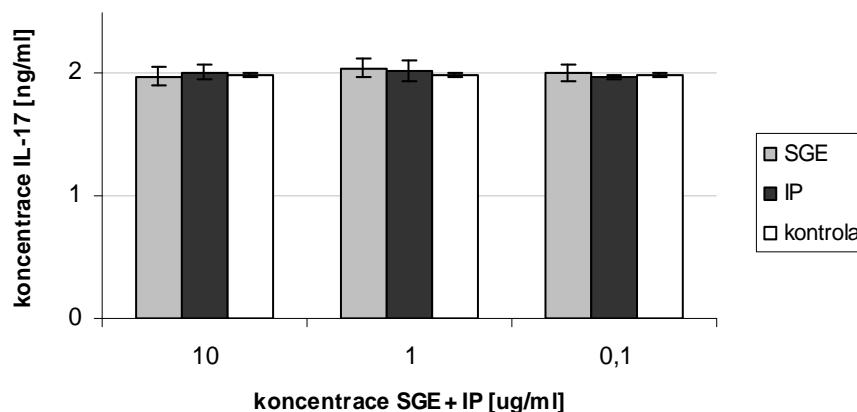


Graf 2B: Vliv extraktu slinných žláz na produkci IL-17 splenocyty po stimulaci anti-CD3 protilátkou; koncentrace SGE: 10, 1 a 0,1 $\mu\text{g/ml}$; koncentrace anti-CD3: 2 $\mu\text{g/ml}$; IP = inhibitory proteáz; * statisticky významný rozdíl oproti kontrole ($p < 0,05$).

4. 3. Mechanismus působení SGE na IL-17

Jak ukázal předchozí pokus, množství IL-17 značně klesne po přidání extraktu ze slinných žláz klíštěte. Otázkou ovšem bylo, zda se SGE váže přímo na interleukin-17, nebo zda ovlivnění produkce IL-17 je dáno interakcí SGE s buňkami. Postup pokusu popisuje kapitola 3.6.3. Výsledek zobrazuje graf 3. K pokusu byl použit rekombinantní IL-17. Jak je z grafu patrné, jeho množství se neměnilo po přidání SGE ani inhibitorů

proteáz, které byly součástí kontroly. Z toho plyne, že SGE se váže na buňky a tím inhibuje produkci IL-17.

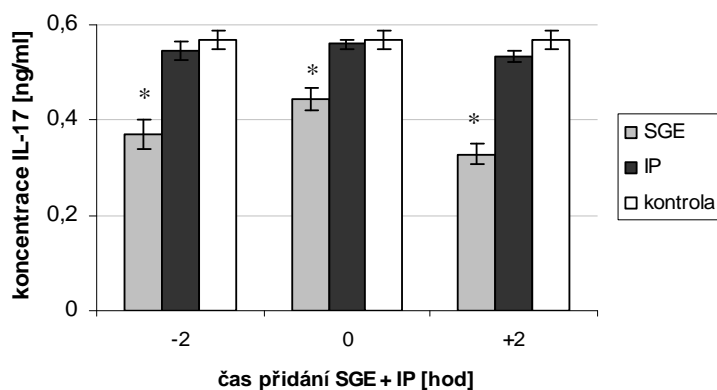


Graf 3: Mechanismus působení extraktu slinných žláz na interleukin 17; koncentrace rekombinantního IL-17: 2 µg/ml; koncentrace SGE: 10, 1 a 0,1 µg/ml; IP = inhibitory proteáz.

4. 4. Vliv SGE na produkci IL-17 v závislosti na čase přidání anti-CD3 protilátky

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, zda na produkci cytokinu má nějaký vliv, je-li anti-CD3 protilátka přidána současně, dříve nebo později než SGE. Jednotlivé kroky pokusu jsou vypsány v kapitole 3.6.4. Z grafu (graf 4) jednoznačně vyplývá, že pro dosažení největšího efektu inhibice bylo třeba přidat SGE až po stimulaci buněk anti-CD3 protilátkou. V tomto případě kleslo množství IL-17 o 42%. Byl-li SGE přidán dříve než byly buňky stimulovány anti-CD3, byla produkce cytokinu snížena o 35%. Jako nejméně účinné se ukázalo přidání SGE spolu se stimulem. Zde byl pokles o pouhých 22%.

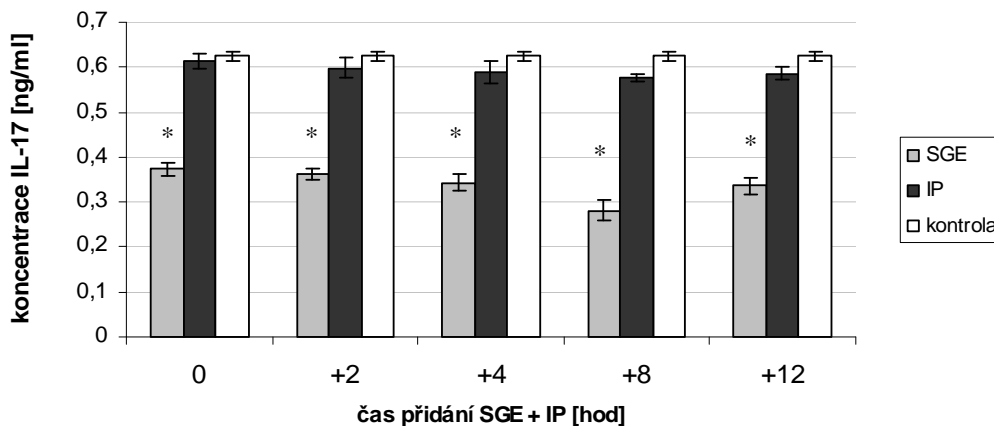
Součástí kontroly byly inhibitory proteáz. Zde byl pokles IL-17 malý, přesto potvrdil výsledky provedené s SGE. K největšímu poklesu došlo rovněž v čase +2 a k nejmenšímu v čase nula.



Graf 4: Vliv extraktu slinných žláz na produkci IL-17 v závislosti na čase přidání anti-CD3 protilátky; koncentrace anti-CD3: 2 $\mu\text{g/ml}$; koncentrace SGE: 10 $\mu\text{g/ml}$; IP = inhibitory proteáz; * statisticky významný rozdíl oproti kontrole ($p < 0,05$).

4. 5. Vliv SGE na produkci IL-17 v závislosti na čase přidání po stimulaci anti-CD3 protilátkou

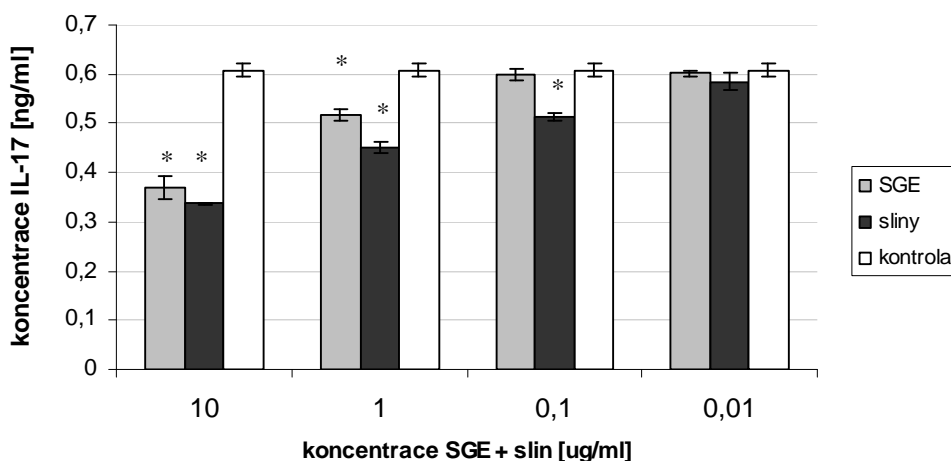
Jak ukázal předchozí pokus, nejlepší je přidat extrakt ze slinných žláz až po stimulaci buněk s anti-CD3 protilátkou. Dalším cílem bylo tedy zjistit, ve kterém čase po stimulu je nejvýhodnější SGE přidat, abychom dosáhli největšího efektu inhibice. Schéma pokusu je popsáno v kapitole 3.6.5. Výsledný graf (graf 5) ukazuje, že k největší inhibici došlo v čase +8, konkrétně o 55%. To potvrdily i inhibitory proteáz, které byly součástí kontroly. Od času 0 po +4 docházelo k pozvolnému poklesu množství stanovovaného cytokinu (o 40%, 42% a 45% v tomto pořadí). V čase +12 se hodnota produkce IL-17 opět trochu zvýšila, takže byla téměř shodná s hodnotou v čase +4.



Graf 5: Vliv extraktu slinných žláz klíštěte na produkci IL-17 v závislosti na čase přidání po stimulaci anti-CD3 protilátkou; koncentrace anti-CD3: 2 $\mu\text{g/ml}$; koncentrace SGE: 10 $\mu\text{g/ml}$; IP = inhibitory proteáz; * statisticky významný rozdíl oproti kontrole ($p < 0,05$).

4. 6. Porovnání vlivu SGE a klíštěcích slin na produkci IL-17 po stimulaci anti-CD3 protilátkou

Již byl dokázán inhibiční efekt extraktu slinných žláz, a také bylo zjištěno, že k nejvýraznějšímu poklesu IL-17 dochází v čase +8 od stimulace buněk anti-CD3 protilátkou. Předmětem dalšího pokusu bylo porovnat účinky SGE a slin na produkci IL-17. Plán pokusu je popsán v kapitole 3.6.6. Výsledek pokusu vyjadřuje graf 6. Z něj je na první pohled patrné, že sliny snížily množství IL-17 mnohem více než SGE. A to dokonce ještě při koncentraci 0,01 $\mu\text{g/ml}$, kde vliv SGE již nebyl patrný. Snížení množství cytokinu při koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ SGE i slin je o 39% a 44,5% v tomto pořadí. Výrazné rozdíly mezi SGE a slinami se udržují při všech jejich koncentracích.

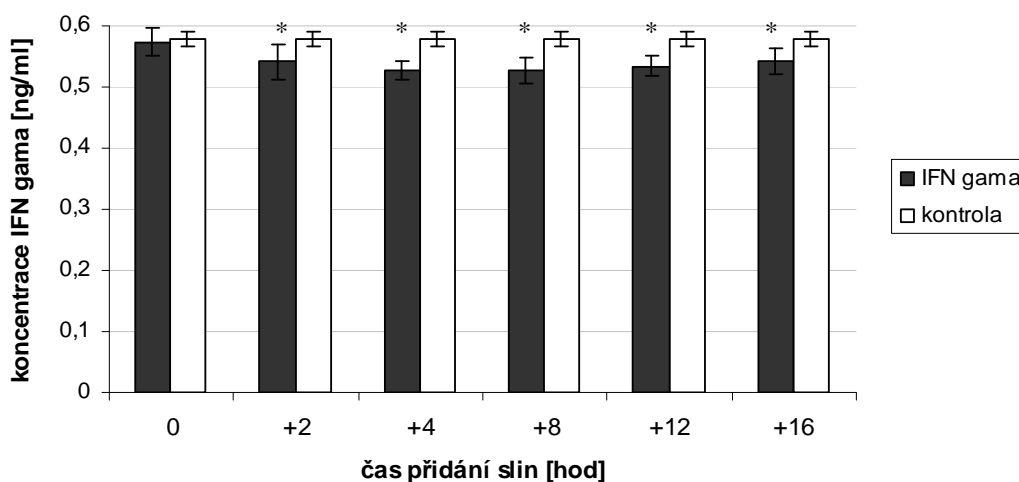


Graf 6: Porovnání vlivu extraktu slinných žláz a klíštěcích slin na produkci IL-17 po stimulaci anti-CD3 protilátkou; koncentrace anti-CD3: 2 $\mu\text{g/ml}$; koncentrace SGE: 10, 1, 0,1 a 0,01 $\mu\text{g/ml}$; koncentrace slin: 10, 1, 0,1 a 0,01 $\mu\text{g/ml}$; sliny a SGE byly přidány v čase +8 hod.; * statisticky významný rozdíl oproti kontrole ($p < 0,05$).

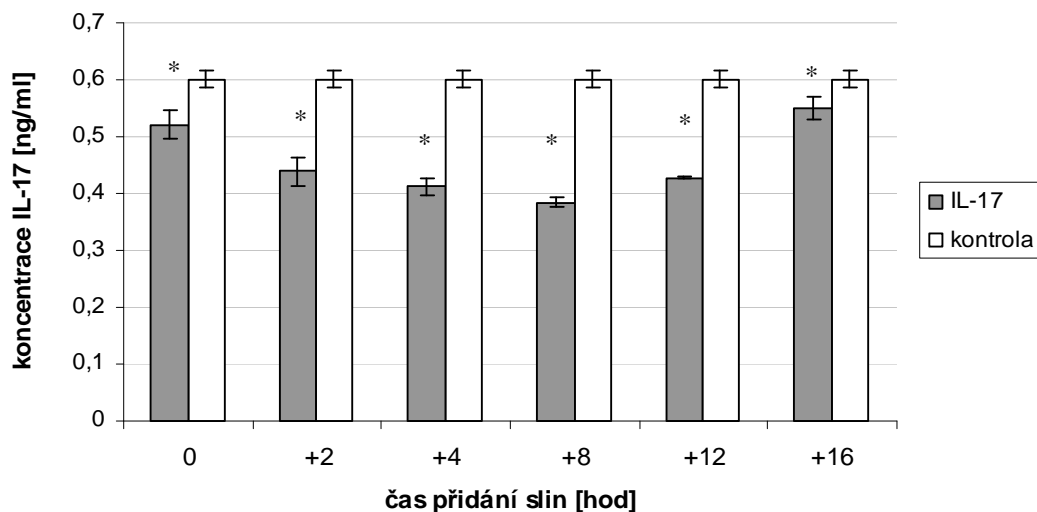
Součástí pokusu bylo promytí buněk 1 hodinu po preinkubaci s anti-CD3 protilátkou. Hodnoty promytých buněk se jen nepatrně lišily od hodnot nestimulovaných buněk. Z toho plyne, že je třeba dlouhodobější stimulace buněk anti-CD3 protilátkou.

4. 7. Vliv slin na produkci IL-17 a IFN-gama v závislosti na čase přidání po stimulaci anti-CD3 protilátkou

Vliv slin na snížení produkce IL-17 byl dokázán předchozím pokusem. Cílem tohoto pokusu bylo zjistit, zda mají klíštěcí sliny stejný účinek také na jiné cytokiny produkované myšími splenocyty stimulovanými anti-CD3 protilátkou. Pozornost byla zaměřena na interferon gama (IFN- γ). Postup pokusu je popsán v kapitole 3.6.7. Výsledné grafy (graf 7A,B) ukazují, že k největší inhibici opět došlo v čase +8, a to jak u IL-17, tak u IFN- γ . U IFN- γ je pokles v časech +4, +8 a +12 téměř shodný. Konkrétní hodnoty snížení jsou o 8%, 9% a 7,7% v tomto pořadí (graf 7A). Totéž platí i u IL-17, jen s tím rozdílem, že došlo ke snížení o 31,5%, 36% a 29% v tomto pořadí (graf 7B). Navíc je také velice silný inhibiční účinek slin v čase +2, kdy se množství IL-17 snížilo o 27%. Naproti tomu v časech 0 a +16 je množství obou cytokinů jen o něco málo nižší než hodnoty kontroly.



Graf 5A: Vliv slin klíštěte *Ixodes ricinus* na produkci IFN- γ v závislosti na čase přidání po stimulaci anti-CD3 protilátkou; koncentrace anti-CD3: 2 μ g/ml; koncentrace slin: 10 μ g/ml; * statisticky významný rozdíl oproti kontrole ($p < 0,05$).



Graf 5B: Vliv slin klíštěte *Ixodes ricinus* na produkci IL-17 v závislosti na čase přidání po stimulaci anti-CD3 protilátkou; koncentrace anti-CD3: 2 $\mu\text{g/ml}$; koncentrace slin: 10 $\mu\text{g/ml}$; * statisticky významný rozdíl oproti kontrole ($p < 0,05$).

Součástí pokusu bylo také barvení buněk pro zjištění, zda mají sliny vliv na jejich proliferaci. Naměřené hodnoty ukázaly, že množství buněk bylo sníženo o 7% v triplikacích jamek v čase +4 a +8 hodin od přidání stimulu. Z toho plyne, že sliny mohou snižovat produkci IL-17, mimo jiné, pomocí inhibice dělení buněk.

5. DISKUSE

IL-17A je prototypový člen nové rodiny cytokinů a receptorů, jejichž vlastnosti a biologický význam je teprve v počátcích výzkumu. Mezi mnoho otázek týkajících se této rodiny patří, jak je exprese IL-17 regulována. IL-17 je primárně, ne-li výlučně, produkován T lymfocyty, například po stimulaci T buněčného receptoru anti-CD3 protilátkou (Liu et al.; 2005). Součástí mé práce bylo určení dynamiky produkce cytokinu IL-17 v daných časových intervalech. Již po osmi hodinách od stimulu bylo vyprodukováno myšími splenocyty detekovatelné množství cytokinu. Rapidní nárůst byl ovšem zaznamenán až po 24 hodinách, který dále pokračoval stejným tempem až do 72 hodin od stimulace buněk. Tyto výsledky jsou srovnatelné s výsledky Liu X.K. (2005), který k pokusu použil splenocyty izolované z C57B1/6J myši, jež také stimuloval anti-CD3 protilátkou.

Sání klíštěte na hostiteli vyvolává výraznou zánětlivou reakci. IL-17 je pro-zánětlivý cytokin, a stejně jako TNF- α a IL-1 β se účastní aktivace obranných mechanismů přirozené imunity hostitele (Liu et al.; 2005). Klíště, které se živí krví suchozemských obratlovců, se musí potýkat s imunitními mechanismy hostitele. Během sání vpravuje klíště do hostitele prostřednictvím slin látky, které inhibují hemostázu a také imunitní systém. Imunosuprese je namířena jak proti nespecifické, tak specifické odpovědi imunitního systému (Wikel, 1996).

Jednou z částí mé práce bylo porovnat inhibiční efekt různých koncentrací extraktu slinných žláz klíštěte na IL-17. Velký pokles tohoto cytokinu byl prokázán u koncentrace SGE 20 $\mu\text{g/ml}$, a to o 37%. K menšímu, přesto stále velkému, snížení došlo také při koncentraci SGE 10 $\mu\text{g/ml}$, kde úbytek činil 29%. Nejmenší použitá koncentrace SGE (0,1 $\mu\text{g/ml}$) měla také na snížení IL-17 vliv, avšak takřka zanedbatelný. Pomocí rekombinantního proteinu IL-17 jsem zjistila, že snížení množství cytokinu není způsobeno přímou vazbou SGE na cytokin, nýbrž navázáním molekul obsažených v SGE na buňky. Přesné určení, zda dochází k potlačení produkce IL-17 ve fázi transkripce či translace je otázkou pro další výzkum.

Je známo, že extrakt slinných žláz klíštěte potlačuje T buněčnou proliferaci a moduluje imunitní odpověď hostitele směrem k Th2 (Kovář et al.; 2002). Pomocí metody barvení buněk a následného změření na spektrofotometru jsem potvrdila teorii (Kovář et al.; 2001, Schoeler et al.;2000), že sliny klíštěte inhibují proliferaci T lymfocytů. Avšak ve výsledcích mého pokusu bylo snížení jen nepatrné, z čehož lze

odvodit, že inhibice dělení buněk není nejspíše jediný mechanismus potlačení produkce IL-17.

Dalším významným zjištěním bylo, že SGE (v koncentraci 10 µg/ml) nejvíce snižuje produkci cytokinu IL-17, je-li přidán až po stimulaci myších splenocytů anti-CD3 protilátkou. Přidání SGE současně nebo dvě hodiny před stimulem, má efekt inhibice produkce mnohem menší. Dalším krokem tedy bylo najít časový interval po stimulaci buněk, ve kterém dochází k největšímu poklesu produkce cytokinu IL-17. Bylo pozorováno, že nejvýhodnější je přidat SGE 8 hodin po stimulaci. V tomto čase došlo ke snížení IL-17 až o 55%. Z tohoto výsledku se dá usuzovat, že k inhibici produkce cytokinu dochází v raných fázích jeho exprese.

Ramachandra a Wikel (1992) popsali pokles v produkci IL-1, IL-2, TNF- α a IFN- γ . Bylo prokázáno, že nejenže klíšťata potlačují produkci Th1 cytokinů (IL-2, IFN- γ), ale zároveň zvyšují produkci Th2 cytokinů (IL-10, IL-4, IL-5, IL-6), které potlačují proliferaci Th1 lymfocytů a to ve prospěch Th2 populace (Schoeler and Wikel; 2001). Th1 populace lymfocytů se totiž uplatňuje v rezistenci proti klíštěti. Cytokin IFN- γ inhibuje dělení Th2 buněk. Hladinu IFN- γ klíště potlačuje (Mejri et al.; 2001). Toto tvrzení jsem si ověřila pokusem, kdy jsem ke stimulovaným myším splenocytům anti-CD3 protilátkou přidala sliny získané z 50 samic klíštěte *Ixodes ricinus*. Sliny byly přidány v koncentraci 10 µg/ml v různých časových intervalech během 24 hodin. Stejně jako výsledek stejného pokusu, provedeného s SGE, bylo prokázáno, že nejúčinnější je přidat klíštěcí sliny 8 hodin po stimulaci buněk.

Klíšťata vyvinula ve fylogenezi řadu mechanismů, které jim usnadňují sání krve tím, že potlačují nebo modulují imunitní odpověď hostitele tak, aby jim co nejméně škodila. Součástí těchto mechanismů je i protizánětlivý efekt klíštěcích slin. Řada protizánětlivých molekul v klíštěcích slinách byla již objevena (histamin-vázající molekuly Paesen G., inhibitory anafylatoxinů - Ribeiro J.) a protizánětlivý účinek klíštěcího SGE byl prokázán *in vivo* (Severinová J. et al.). Protizánětlivé účinky klíštěcích slin nepochybně souvisí s usnadněním přenosu patogenů jako je *Borrelia burgdorferi* slinami (SAT efekt, Pechová J. et al.; 2002) Pozornost byla dosud věnována účinku slin na pro-zánětlivé cytokiny produkované makrofágy (IL-1, TNF- α , IL-6, IL-12) a Th1 lymfocyty (IFN- γ). Vliv klíštěcích slin na nově objevenou subpopulaci Th buněk, Th17 linii, nebyl dosud zkoumán. Přitom IL-17 funguje jako klasický efektor přirozené imunity a indukuje expresi řady prozánětlivých mediátorů jako je IL-6, proteiny akutní fáze, G-CSF a PGE2 (Komiyama et al.; 2006). IL-17 výrazně

synergizuje s jinými pro-zánětlivými cytokiny jako je TNF- α (McAllister et al.; 2005). IL-17 je prostředkem, pomocí kterého systém adaptivní imunity komunikuje se systémem přirozené imunity při podpoře zánětu.

Z hlediska přenášených patogenů je významné, že IL-17 stimuluje mobilizaci neutrofilů pomocí indukce G-CSF a chemokinu IL-8. Myši s knockoutovaným receptorem pro IL-17 měly zvýšenou citlivost k bakteriální infekci (Miyamoto et al.; 2003). V této souvislosti je zajímavé, že povrchové lipoproteiny borelií indukují tento cytokin (Infante-Duarte et al.; 2000). Neutrolily indukované interleukinem 17 účinně ničí borelie v kůži (Xu Q. et al.; 2007).

Vzhledem k prokázanému inhibičnímu účinku klíštěcích slin na produkci IL-17 je možno předpokládat, že tato inhibice, jako součást protizánětlivých účinků klíštěcích slin, nejen usnadňuje sání klíšťatům, ale současně napomáhá přenosu patogenů, například borelií.

6. ZÁVĚR

- Pomocí anti-CD3 protilátky byla indukovaná produkce IL-17 z myších splenocytů s maximem za 72 hodin po indukci.
- Extrakt ze sliných žláz (SGE) klíštěte *Ixodes ricinus* inhiboval produkci IL-17. Maximální inhibiční efekt byl zaznamenán 8 hodin po stimulaci splenocytů anti-CD3 protilátkou.
- SGE ovlivňoval produkci IL-17 působením na produkující buňky, nikoli na samotný cytokin.
- Sliny získané z klíšťat, která sála sedm dní na hostiteli, měly ve srovnání s SGE vyšší inhibiční účinek se stejnou časovou dynamikou.
- Inhibice pro-zánětlivého cytokinu IL-17 klíštěcími slinami zřejmě usnadňuje klíšťatům sání krve a současně přenos patogenů klíšťaty.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Aggarwal S., Gurney A.L. (2002): IL-17: prototype member of an emerging cytokine family; *The Journal of Leukocyte Biology*, 71:1-8
- Aggarwal S., Ghilardi N., Xie M.H., de Sauvage F.J., Gurney A.L. (2003): Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17; *The Journal of Biological Chemistry*, 278(3):1910-1914
- Allen J.R. (1973): Tick resistance: basophils in skin reactions of resistant guinea pigs; *International Journal of Parasitology* 3:195-200
- Anguita J., Ramamoorthi N., Hovius J.W.R., Das S., Thomas V., Persinski R., Conze D., Askenase P.W., Rincón M., Kantor F.S., Fikrig E. (2002): Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4+ T cell activation; *Immunity* 16: 849-859
- Bellmann H. et al; Pavoukovci a další bezobratlí / Zoologická encyklopedie, Euromedia Group, Knižní klub, Praha 2003
- Bowman A.S., Coons L.B., Needham G.R., Sauer J.R. (1997): Tick saliva: recent advances and implications for vector competence; *Medical and veterinary entomology*, 11(3):277-85
- Bowman A.S., Sauer J.R. (2004): Tick saliva glands: function, physiology and future; *Parasitology*, 129:S67-81
- Fossiez F., Djossou O., Chornarat P., Flores-Romo L., Ait-Yahia S., Maat C., Pin J.-J., Garrone P., Garcia E., Saeland S., Blanchard D., Gaillard C., Das M.B., Rouvier E., Golstein P., Banchereau J., Lebecque S. (1996): T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines; *The Journal of Experimental Medicine*, 183(6):2593-603
- Hajnická V., Kocáková P., Slovak M., Labuda M., Fuchsberger N., Nuttall P.A. (2000): Inhibition of the antiviral action of interferon by tick salivary gland extract; *Parasite Immunology*, 22:201-206
- Honorati M.C., Meliconi R., Pulsatelli L., Cane S., Frizziero L., Facchini A. (2001): High *in vivo* expression of interleukin-17 receptor in synovial endothelial cells and chondrocytes from arthritis patients; *Rheumatology*, 40:522-27
- Hořejší V., Bartůňková J.; *Základy imunologie*; TRITON s r.o., Praha 2005

- Hymowitz S.G., Filvaroff E.H., Yin J.P., Lee J., Cai L., Risser P., Maruoka M., Mao W., Foster J., Kelley R.F., Pan G., Gurney A.L., de Vos A.M., Starovasnik M.A. (2001): IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding; *EMBO Journal*, 20:5332-41
- Chakir J., Shannon J., Molet S., Fukakusa M., Elias J., Laviolette M., Boulet L.-P., Hamid Q. (2003): Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: Effect of steroids on TGF- β , IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression; *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(6):1293-1298
- Infante-Duarte C., Horton H.F., Byrne M.C., Kamradt T. (2000): Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in the Th cells; *The Journal of Immunology* 165:6107-6115
- Iwakura Y., Ishigame H. (2006): The IL-23/IL-17 axis inflammation; *The Journal of Clinical Investigation*, 116:1218-1222
- Jones L.D., Matthewson M., Nuttall P.A. (1992): Saliva-activated transmission (SAT) of *Thogoto virus*: dynamics of SAT factor activity in the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma variegatum*, and *Boophilus microplus* ticks; *Experimental and Applied Acarology*, 13:241-248
- Jorens P.G., Richman-Eisenstat J.B., Housset B.P., Graf P.D., Ueki I.F., Olesch J. and Nadel J.A. (1992): Interleukin-8 induces neutrophil accumulation but not protease secretion in the canine trachea; *American Journal of Physiology*, 263(6):708-13
- Kawaguchi M., Onuchic L.F., Li X.D., Essayan D.M., Schroeder J., Xiao H.Q., Liu M.C., Krishnaswamy G., Germino G., Huang S. (2001): Identification of a novel cytokine, IL-17, and its expression in subjects with asthma; *The Journal of Immunology*, 167:4430-5
- Kawaguchi M., Adachi M., Oda N., Kokubu F., Huang S. (2004): IL-17 cytokine family; *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(6):1265-73
- Knappe A., Hiller Ch., Niphuis H., Fossiez F.O., Thureau M., Wittmann S., Kuhn E., Lebecque S., Banchereau J., Rosenwirth B., Fleckenstein B., Heeney J., Fickenscher H. (1998): The interleukin-17 gene of *Herpesvirus saimiri*; *The Journal of Virology*, 72(7): 5797–5801
- Kolls J.K., Kanaly S.T., Ramsay A.J. (2003): Interleukin-17: An emerging role in lung inflammation; *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 28:9-11

- Kolls J.K., Lindén A. (2004): Interleukin-17 family members and inflammation; *Immunity* 21, 467-76
- Komiyama Y., Nakae S., Matsuki T., Nambu A., Ishigame H., Kakuta S., Sudo K., Iwakura Y. (2006): IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis; *The Journal of Immunology*, 177:566-573
- Kovář L., Kopecký J., Říhová B. (2001): Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* tick polarizes the cytokine profile toward Th2 and suppresses proliferation of T lymphocytes in human PBMC culture; *The Journal of Parasitol*, 87(6): 1342-1348
- Kovář L., Kopecký J., Říhová B. (2002): Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* tick modulates the host immune response towards the Th2 cytokine profile; *Parasitology Research*, 88(12): 1066-1072
- Kratochvíl J.; Použitá zoologie I. – Bezobratlí; Státní zemědělské nakladatelství, Praha 1973
- Labuda M., Jones L.D., Williams T., Nuttall P.A. (1993): Enhancement of tick-borne *Encephalitis virus* transmission by tick salivary gland extracts; *Medical and Veterinary Entomology*, 7: 193-196
- Larsson R., Rocksén D., Lilliehook B., Jonsson A. and Bucht A. (2000): Dose-dependent activation of lymphocytes in endotoxin-induced airway inflammation; *Infection and Immunity*, 68(12):6962–69
- Li H., Chen J., Huang A., Stinson J., Heldens S., Foster J., Dowd P., Gurney A.L., Wood W.I. (2000): Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family.; *Immunology*, 97(2): 773-78
- Lindén A., Hoshino H., Laan M. (2000): Airway neutrophils and interleukin-17; *European Respiratory Journal*, 15:973-977
- Lindén A. (2003): Neutrophils, interleukin-17 and obstructive airway disease; *Allergology International*, 52:173-82
- Liu X.K., Clements J.L., Gaffen S.L. (2005): Signaling through the murine T cell receptor induces IL-17 production in the absence of costimulation, IL-23 or dendritic cells; *Molecules and Cells*, 20(3):339-47
- Lotz M., Bober L., Narula S., Dudler J. (1996): IL-17 promotes cartilage degradation; *Arthritis & Rheumatism*, 39, S120

- Lubberts E., Koenders M.I., Oppers-Walgreen B., Van Den B.L., Coenen-De Roo C.J., Joosten L.A., Van den Berg W.B. (2004): Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion.; *Arthritis Rheumatoid*, 50:650–59
- McAllister F., Henry A., Kreindler J.L., Dubin P.J., Ulrich L., Steele C., Finder J.D., Pilewski J.M., Carreno B.M., Goldman S.J., Pirhonen J., Kolls J.K. (2005): Role of IL-17A, IL-17F, and the IL-17 receptor in regulating growth-related oncogene-alpha and granulocyte colony-stimulating factor in bronchial epithelium: Implications for airway inflammation in cystic fibrosis; *The Journal of Immunology*, 175:404-412
- McParland B.E., Macklem P.T., Pare P.D. (2003): Airway wall remodeling: friend or foe?; *Journal of Applied Physiology*, 95:426-34
- Mejri N., Franscini N., Rutti B., Brossard M. (2001): Th2 polarization of the immune response of BALB/c mice to *Ixodes ricinus* instars , importance of several antigens in activation of specific Th2 subpopulations; *Parasite Immunology*, 23:61-69
- Miyamoto M., Prause O., Sjostrand M., Laan M., Lotvall J., Lindén A. (2003): Endogenous IL-17 as a mediator of neutrophil recruitment caused by endotoxin exposure in mouse airways; *The journal of Immunology*, 170:4665-4672
- Nuttall P.A. (1998): Displaced tick-parasite interactions at the host interface; *Parasitology*, 116:S65-72
- Nuttall P.A., Labuda M. (2004): Tick-host interactions: saliva-activated transmission; *Parasitology*, 209:S177-89
- Paesen G., Adams P., Harlos K., Nuttall P. and Stuart D. (1999): Tick histamine-binding proteins: Isolation, cloning, and three-dimensional structure; *Molecular Cell*, 3:661-671
- Pechová J., Štěpánová G., Kovář L., Kopecký J. (2002): Tick salivary gland extract-activated transmission of *Borrelia afzelii* spirochaetes; *Folia Parasitologica*, 49: 153-159
- 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; *Journal of Medical Entomology*, 29:818-826
- Ramakrishnan V.G., Aljamali M.N., Sauer J.R., Essenberg R.C. (2005): Application of RNA interference in tick salivary gland research; *Journal of Biomolecular Techniques*, 16:297-305

- Ramamoorthi N., Narasimhan S., Pai U., Bao F., Yang X.F., Fish D., Anguita J., Norgard M.V., Kantor F.S., Anderson J.F., Koski R.A., Fikrig F. (2005): The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host; *Nature* 436: 573-577
- Ribeiro J.M.C., Spielman A. (1986): *Ixodes dammini*: salivary anaphylatoxin inactivating activity; *Exp. Parasitology*, 62:292-297
- Rouvier E., Luciani M.F., Mattei M.G., Denizot F., Golstein P. (1993): CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a *Herpesvirus saimiri* gene; *Journal of Immunology*, 150:5445-56
- Severinová J., Salát J., Krocová Z., Řezníčková J., Demová H., Horká H., Kopecký J. (2005): Co-inoculation of *Borrelia afzelii* with tick salivary gland extract influences distribution of immunocompetent cells in the skin and lymph nodes of mice; *Folia Microbiologica*, 50(5):457-63
- Scholer G.B., Wikel S.K. (2001): Modulation of host immunity by haematophagous arthropods; *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 95:755-771
- Schoeler G.B., Bergman D.K., Manweiler S.K., Wikel S.K. (2002): Influence of soluble proteins from the salivary glands of ixodid ticks on *in-vitro* proliferative responses of lymphocytes from BALB/c and C3H/HeN mice; *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 94:507-518
- Schwarzenberger P., La Russa V., Miller A., Ye P., Huang W., Zieske A., Nelson S., Bagby G.J., Stoltz D., Mynatt R.L., Spriggs M. and Kolls J.K. (1998): IL-17 stimulates granulopoiesis in mice: use of an alternate, novel gene therapy-derived method for in vivo evaluation of cytokines; *The Journal of Immunology*, 161:6383-9
- Singh S.K., Girschick H.J. (2003): Tick-host interactions and their immunological implications in tick-borne diseases; *Current Science*, 85:1284-1298
- Starnes T., Broxmeyer H.E., Robertson M.J., Hromas R. (2002): Cutting Edge: IL-17D, a novel member of the IL-17 family, stimulates cytokine production and inhibits hemopoiesis; *The Journal of Immunology*, 169(2):642-646
- Stejskal V.; Klíšťata, komáři, blechy, vosy a jiní škůdci ohrožující zdraví; Scriptum Praha 1995
- Šterzl I.; Cytokiny – struktura a funkce I.; Oddělení klinické imunoendokrinologie, Endokrinologický ústav, Praha; www.tigis.cz/alergie/ALERG299/05sterzl.htm

- Van Bezooijen R.L., van der Wee-Pals L., Papapoulos S.E., Löwik C.W. (2002): Interleukin-17 synergises with tumor necrosis factor α to induce cartilage destruction in vitro; *Annals of the Rheumatic Diseases*, 61:870-76
- Wiekowski M.T., Leach M.W., Evans E.W., Sullivan L., Chen S., Vassileva G., Bazan J. F., Gorman D.M., Kastelein R.A., Narula S. and Lira S.A. (2001): Ubiquitous transgenic expression of the IL-23 subunit p19 induces multiorgan inflammation, runting, infertility, and premature death; *The Journal of Immunology*, 2001, 166: 7563-7570
- Wikel S.K., Osburn R.L. (1982): Immune responsiveness of the bovine host to repeated low-level infestations with *Dermacentor andersoni*; *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 76: 405-414
- Wikel S.K. (1996): Tick modulation of host cytokines; *Experimental Parasitology*, 84:304-309
- Xu Q, Seemanapalli SV, Reif KE, Brown CR, Liang FT (2007): Increasing the recruitment of neutrophils to the site of infection dramatically attenuates *Borrelia burgdorferi* infectivity; *The Journal of Immunology*, 178(8):5109-15
- Yao Z., Fanslow W.C., Seldin M.F., Rousseau A.M., Painter S.L., Comeau M.R., Cohen J.I., Sproggs M.K. (1995): *Herpesvirus saimiri* encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor.; *Immunity*, 3(6):811-21
- Ye P., Garvey P.B., Zhang P., Nelson S., Bagby G., Summer W.R., Schwarzenberger P., Shellito J.E., Kolls J.K. (2001): Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection; *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 25(3):335-40
- Ye P., Rodriguez F.H., Kanaly S., Stocking K.L., Schurr J., Schwarzenberger P., Oliver P., Huang W., Zhang P., Zhang J., Shellito J.E., Bagby G.J., Nelson S., Charrier K., Peschon J.J., Kolls J.K. (2001): Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defence.; *The Journal of Experimental Medicine*, 194:519-27
- Yujing B.I., Guangwei L., Ruifu Y. (2006): Th17 cell induction and immune regulatory effects; *Journal of Cellular Physiology*, 10:273-27