

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**



# **Antihemostatické účinky klišťecích slin**

Bakalářská práce

**Hana Chytráčková**

Školitel: doc. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

České Budějovice 2012

Chytráčková H., 2012: Antihemostatické účinky klíštěcích slin. (Antihemostatic effects of tick saliva. Bc. thesis, in Czech). – 45 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Tick saliva contains a lot of molecules with antihemostatic properties, which can affect host's hemostatic system. These molecules are studied all over the world in various tick species and their use as therapeutic agents or vaccines is discussed.

**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 elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.**

V Českých Budějovicích dne

Podpis:

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. za velkou pomoc při vyhledávání důležitých informací do mé bakalářské práce a za spoustu užitečných rad při jejím psaní. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za podporu.

## **Obsah:**

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Cíle práce.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Klíšťata.....</b>	<b>1</b>
1.2.1 Rozdělení klíšťat.....	1
1.2.2 Stavba těla.....	2
1.2.3 Rozmnožování .....	3
1.2.4 Získávání potravy .....	3
1.2.5 Choroby přenášené klíšťaty .....	4
1.2.5.1 Klíšťová encefalitida .....	4
1.2.5.2 Lymská nemoc (borelióza).....	4
1.2.5.3 Horečka skalistých hor .....	5
1.2.5.4 Krymsko-konžská hemoragická horečka .....	5
1.2.5.5 Omská hemoragická horečka .....	5
1.2.5.6 Tularémie .....	6
1.2.5.7 Virus Eyach .....	6
1.2.5.8 Virus Powassan .....	6
1.2.5.9 Louping ill .....	6
1.2.5.10 Ostatní choroby přenášené klíšťaty.....	6
1.2.6 Klíšťové toxikózy .....	7
<b>2. HEMOSTÁZA .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Vasokonstrikce.....</b>	<b>7</b>
<b>2.2 Trombocytární složka hemostatického systému.....</b>	<b>8</b>
2.2.1 Trombocyty.....	8
2.2.2 Morfologie trombocytu.....	8
2.2.3 Funkce trombocytu .....	9
<b>2.3 Plasmatická složka hemostatického systému .....</b>	<b>10</b>
2.3.1 Plasmatický koagulační systém .....	10
2.3.1.1 Koagulační faktory .....	11
2.3.1.1.1 FI – fibrinogen.....	11
2.3.1.1.2 FII – protrombin .....	11
2.3.1.1.3 FIII – tkáňový faktor (tromboplastin).....	11
2.3.1.1.4 FIV – kalciové ionty .....	11
2.3.1.1.5 FV – proakcelerin .....	12
2.3.1.1.6 FVII – prokonvertin.....	12
2.3.1.1.7 FVIII – antihemofilický faktor A .....	12

2.3.1.1.8 FIX – Christmas faktor .....	13
2.3.1.1.9 FX – Stuart – Prover faktor .....	13
2.3.1.1.10 FXI – PTA (plasma thromboplastin antecedent) .....	13
2.3.1.1.11 FXII – Hagemanův faktor .....	14
2.3.1.1.12 FXIII – fibrin stabilizující faktor .....	14
2.3.1.2 Tromboplastinogeneze .....	14
2.3.1.2.1 Vnitřní cesta koagulační kaskády .....	14
2.3.1.2.2 Vnější cesta koagulační kaskády .....	15
2.3.1.3 Trombinkonverze .....	15
2.3.1.4 Fibrinogeneze .....	15
2.3.2 Fibrinolytický systém .....	16
2.3.2.1 Plasminogen .....	17
2.3.2.2 Plasmin .....	18
2.3.2.3 Fibrin degradační produkty (FDP) .....	18
2.3.3 Inhibitory koagulace .....	18
2.3.4 Inhibitory fibrinolýzy .....	19

### **3. LÁTKY V KLÍŠTĚCÍCH SLINÁCH PŮSOBÍCÍ NA HEMOSTATICKÝ SYSTÉM HOSTITELE..... 19**

3.1 Látky bohaté na glycin, prolin, nebo podobné kolagenu .....	19
3.2 Muciny .....	20
3.3 Antigen 5 (AG5) a jemu podobné proteiny .....	20
3.4 Ixodegriny .....	20
3.5 Proteiny obsahují Kunitzovu doménu .....	21
3.6 Proteiny se serpinovou doménou .....	22
3.7 Cystatiny .....	23
3.8 Thyropiny .....	23
3.9 Hirudin/madanin/variegin .....	24
3.10 Proteiny „basic tail“ .....	24
3.11 Karboxypeptidázové inhibitory .....	25
3.12 Lipocaliny .....	25
3.13 16-kDa proteiny .....	26
3.14 Enzymy .....	26
3.15 Nepeptidické složky klíštěcích slin .....	26

### **4. PŮSOBENÍ KLÍŠTĚCÍCH SLIN NA HEMOSTÁZU HOSTITELE..... 27**

<b>4.1 Inhibice trombocytů .....</b>	<b>27</b>
4.1.1 Inhibice před aktivací agregace trombocytů .....	27
4.1.2 Inhibice po aktivaci agregace trombocytů .....	27
4.1.3 Inhibice po agregaci trombocytů .....	27
<b>4.2 Inhibitory koagulace.....</b>	<b>27</b>

4.2.1 Inhibitory faktoru Xa .....	27
4.2.2 Inhibitory vnější cesty aktivace koagulační kaskády (TFPI).....	28
4.2.3 Přímé inhibitory trombinu .....	28
<b>5. DISKUZE .....</b>	<b>28</b>
<b>6. ZÁVĚR .....</b>	<b>34</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>35</b>

# 1. Úvod

## 1.1 Cíle práce

- Popsat a zhodnotit vliv klíštěcích slin na hemostázu hostitele.
- Charakterizovat jednotlivé molekuly s antihemostatickou aktivitou.
- Porovnat antihemostatickou aktivitu u různých druhů klíšťat.

## 1.2 Klíšťata

### 1.2.1 Rozdělení klíšťat

Klíšťatovci jsou řád ze třídy pavoukoců, podtřídy roztočů. Patří do něj tři čeledi. Největší čeledí jsou klíšťatovití (*Ixodidae*, tvrdá klíšťata), mezi které patří rody jako *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes*, nebo *Rhipicephalus*. Tyto rody jsou rozšířené po celém světě. U nás se nejčastěji vyskytuje klíště obecné (*Ixodes ricinus*), ale na některých místech jižní Moravy se můžeme setkat i s klíšťaty rodů *Dermacentor* a *Haemophysalis*. Čeleď klíšťákovití (*Argasidae*, měkká klíšťata) čítá 193 druhů. Její zástupci parazitují převážně na ptácích, ale mohou napadat i lidi. Patří mezi ně rody *Antricola*, *Argas*, nebo *Ornithodoros*. Čeleď *Nuttalliellidae* se skládá z jednoho druhu, *Nuttalliella namaqua*. Tento druh se vyskytuje pouze v jižní Africe. Všechny čeledi tohoto řádu jsou ektoparazité, živí se krví (Hoogstraal, 1956).



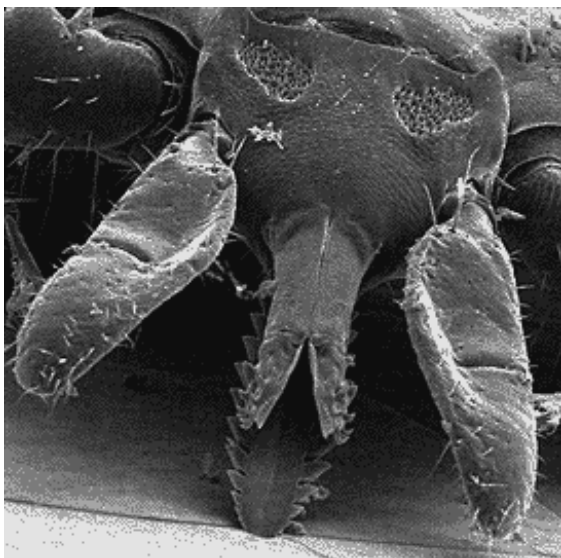
**Obr. 1:** Samec a samice druhu *Ixodes ricinus*.

zdroj: <http://www.arthropods.de/arachnida/acari/ixodidae/ixodesRicinus02.htm>

### 1.2.2 Stavba těla

*Ixodidae* a *Argasidae* odlišuje několik znaků. Hlavním z nich je pevný hřbetní štít, který *Argasidae* nemají. Hlava (*capitulum*) u *Ixodidae* je dobře viditelná, směřuje dopředu. *Argasidae* mají hlavu pod tělem.

Stavba těla klíšťat se podobá stavbě těla ostatních roztočů. Tělo má dvě části, přední hlavu (*capitulum*) a zadní část (*idiosoma*). Dospělé klíště a nymfa mají 8 nohou, larva pouze 6. Na koncích nohou mají smyslový tzv. Hallerův orgán, který je nejspíše orgánem čichu a pravděpodobně slouží k nalezení kořisti. Dýchací otvory, stigmata, vyúsťují za posledním párem nohou. Pro klíšťata čeledi *Ixodidae* je typický pevný hřbetní štítek, který u menších samců pokrývá celý hřbet, u větších samic a nedospělých jedinců pouze jeho část. Na hlavě jsou ústní části klíšťat. Skládají se ze tří viditelných částí, dvě vysoce pohyblivé palpy, mezi nimi pár chelicer a ve středu hypostom, hrubý „jazýček“, který proniká kůží hostitele při krmení. Kromě toho slinné žlázy klíšťat vylučují lepidlu podobnou substanci (cement), která pomáhá držet klíště v místě, kam se přisálo. Při krmení jsou klíšťata schopná pozřít až 200-600x více krve, než byla jejich váha před krmením. Vnější povrch klíštěte je proto uzpůsoben tomuto několikanásobnému zvětšení.



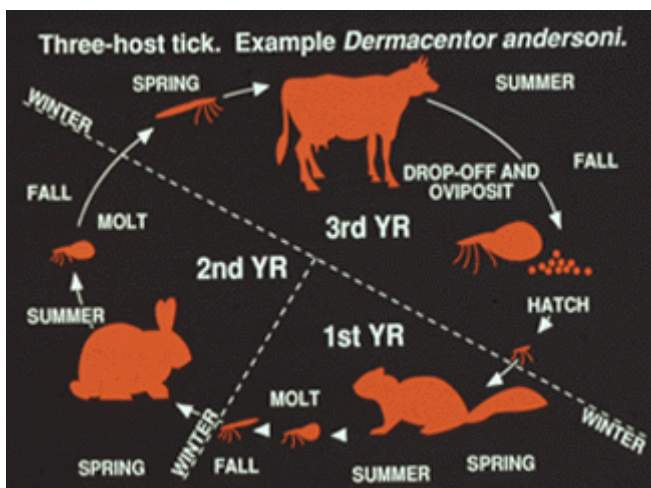
**Obr. 2:** Ústní ústrojí klíštěte pod elektronovým mikroskopem.

zdroj: <http://www.imagine-green.com/tick.html>



### 1.2.3 Rozmnožování

Klíšťata jsou stejně jako ostatní roztoči gonochoristé. Samička klíštěte naklade kolem 3000 vajíček. Za svého života klíště prochází třemi základními stádii. Některá klíšťata mají pouze jediného hostitele, na kterém se vyvinou všechna tři stadia. Jiné druhy mají hostitele dva, jednoho pro stádium larvy a nymfy a druhého pro dospělé. Nejčastěji jsou ale hostitelé tři (Singh a Girschick, 2003). Larvy obvykle sají na malých savcích, jako jsou hlodavci, a ptácích. Po krmení hostitele opustí a na zemi se z nich vyvinou nymfy. Nymfy se krmí na větších hostitelích, jako jsou králíci, kuny a jiné menší šelmy. Po nakrmení se nymfa vyvine v dospělého a najde si nového, většího hostitele, jako například vysokou zvěř, dobytek, nebo člověka. Poté si na svém hostiteli najde jedince opačného pohlaví, samička naklade vajíčka a celý cyklus začne od začátku.



**Obr. 3:** Životní cyklus a střídání hostitelů u klíštěte rodu *Dermacentor*.

zdroj: <http://entomology.ucdavis.edu/faculty/rbkimsey/tickbio.html>

### 1.2.4 Získávání potravy

Klíšťata se živí krví svého hostitele. Tento způsob získávání potravy se označuje jako hematofagie a vyvinul se nezávisle u přibližně 15 000 druhů ze 400 rodů hematofágních členovců. Klíšťata jsou ektoparazité, tedy parazité vnější, proto potřebují proniknout kůží hostitele, aby se dostali k cévě. K tomu mají speciálně uzpůsobené sací ústrojí, které je však odlišné u pomalu sajících a rychle sajících druhů, stejně jako poškození způsobené hostiteli. Krvácení způsobené poškozením cév hostitele způsobí, že se aktivují imunitní a hemostatické obranné mechanismy. Klíšťata z čeledi *Ixodidae* se krmí pomalu, mohou na

svém hostiteli parazitovat týden i déle a poškozování je postupné. Často vznikne hematom. Předpokládá se, že poškození je způsobeno neutrofily, které migrují do místa sání, kde se degranulují a vznikne zánět (Ribeiro, 1987). Naproti tomu *Argasidae* se krmí rychle, na hostiteli parazitují kolem 30-60 minut, do kůže hostitele pronikají poměrně hluboko a krevní ztráty jsou značné (Binnington a Kemp, 1980).

### **1.2.5 Choroby přenášené klíšťaty**

Klíšťata při svém krmení mohou přenášet některé virové nebo bakteriální nákazy, které napadají lidi i zvířata. Většinou jsou přenašeči těchto chorob tvrdá klíšťata, možná kvůli jejich mnohem delší době krmení. V České republice se nejčastěji setkáme s klíštětem obecným (*Ixodes ricinus*). Tento druh přenáší flavivirus způsobující klíšťovou encefalitidu (TBE) a lymskou nemoc (boreliózu).

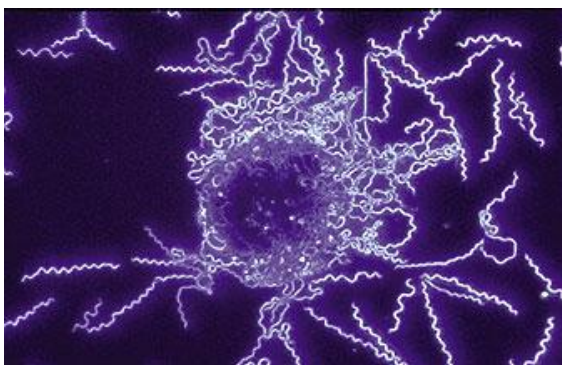
#### **1.2.5.1 Klíšťová encefalitida**

Toto onemocnění napadá mozek. V první fázi se projevuje bolestmi hlavy a mírně zvýšenou teplotou, lze ji snadno zaměnit za chřipku. Ve druhé fázi dochází u 80 % pacientů k rozvinutí meningoencefalitidy, dezorientaci, poruchám vědomí, poruchám motorických funkcí. Často zůstávají neurologické nebo neuropsychiatrické následky, jako ochrnutí nebo snížení intelektu. Úmrtnost se liší podle subtypu onemocnění. Existují 3 subtypy tohoto onemocnění, evropský, sibiřský a dálně-východní. Evropský subtyp je nejmírnější, úmrtnost se drží pod 1%. Dálně-východní (Ruský) subtyp dosahuje úmrtnosti až 35%. Na tuto nákazu neexistuje specifická léčba, používá se pouze podpůrná léčba mírnící projevy. Ve velmi těžkých případech se podává interferon. Existuje však účinná vakcína.

#### **1.2.5.2 Lymská nemoc (borelióza)**

Lymskou nemoc způsobuje bakterie rodu *Borrelia*, nejznámější z nich je *Borrelia burgdorferi*. Onemocnění u člověka způsobují 3 druhy, *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii* a *Borrelia afzelii*. Přenáší je klíšťata rodu *Ixodes*. Nejčastější projevy nákazy jsou kožní. Objevuje se *erythema migrans*, velká červená skvrna s blednoucím středem v místě kousnutí. Ostatní příznaky jako únava, slabost, lehce zvýšená teplota a bolest svalů připomínají chřipku. Bez léčby však může dojít k poškození nervového, kloubního nebo kardiovaskulárního systému. Mohou se objevit i různé autoimunní komplikace, jako artritida

resistentní na antibiotika. Počáteční stadia nemoci dobře reagují na penicilin, v pozdějších stadiích se používá doxycyklin. Zatím nebyla vyrobena účinná vakcína.



**Obr. 4:** *Borrelia burgdorferi* (autor dr. Jeffrey Nelson).

zdroj: <http://newsarchive.asm.org/jun02/topic4.asp>

### **1.2.5.3 Horečka skalistých hor**

Horečka skalistých hor je jedna z nejvážnějších infekcí Ameriky. Způsobuje jí bakterie *Rickettsia rickettsii* a je přenášena klíšťaty rodu *Dermacentor*. Bez léčby je většinou smrtelná. V prvních stadiích je těžké tuto nemoc poznat, příznaky připomínají chřipku. Později se objevuje makulopapulární vyrážka a petechiální krvácení. Léčí se doxycyklinem a chloramfenikolem.

### **1.2.5.4 Krymsko-konžská hemoragická horečka**

Tuto nemoc způsobuje rod nairovirus z čeledi bunyvirů. Přenáší jí klíšťata rodů *Hyalomma*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus*. Projevuje se horečkou, zimnicí, bolestmi hlavy, ale hlavně krvácivými příznaky, krevními výrony na kůži, zvracením krve. Specifická léčba neexistuje, podává se ribavirin.

### **1.2.5.5 Omská hemoragická horečka**

Tuto krvácivou horečku způsobuje flavivirus velmi podobný viru klíšťové encefalitidy. Přenáší jí klíšťata rodu *Dermacentor*. Rezervoárem jsou ondatry, pro které je virus vysoce patogenní. Častý je přenos na člověka alimentární cestou. Jako u krymsko-konžské krvácivé horečky je hlavním příznakem krvácení. Někdy se objeví meningitida a atypické pneumonie. Léčba je pouze podpůrná, hlavně ribavirin.

#### **1.2.5.6 Tularémie**

Tularémii způsobuje bakterie *Francisella tularensis*. Přenáší jí klíšťata rodů *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Amblyomma* a *Ixodes*. Říká se jí také zaječí nemoc, protože nejčastěji postihuje zajíce, králíky a jiné hlodavce. U člověka se projevuje podle způsobu infekce. Při infekci kožní cestou se objeví hnisavé kožní léze v místě průniku. Při infekci přes spojivku dochází k zánětům oka. Při plicní formě se nemoc projevuje kašlem, dušností a zánětem plic a pro střevní formu jsou typické bolesti břicha a průjmy. Léčí se antibiotiky.

#### **1.2.5.7 Virus Eyach**

Virus Eyach je coltivirus z čeledi reovirů. Byl izolován z klíštěte *Ixodes ricinus* na jihu Německa v roce 1976. Soudí se, že způsobuje encefalitidu a polyneuritidu, zánětlivé onemocnění nervů, i když to zatím nebylo dokázáno.

#### **1.2.5.8 Virus Powassan**

Tento flavivirus byl poprvé izolován v Kanadě roku 1958. Přenáší ho hlavně klíště *Ixodes cookei*. Spekuluje se i o přenosu klíštětem *Ixodes scapularis*. V Rusku jej přenáší i klíšťata *Ixodes persulcatus* a některé druhy rodu *Haemaphysalis*. Způsobuje poměrně těžké encefalitidy.

#### **1.2.5.9 Louping ill**

Flavivirus způsobující toto onemocnění napadá převážně ovce v Anglii a Skotsku. Přenáší jej klíště *Ixodes ricinus*. Přenos na člověka je možný i respirační cestou, ale lidské infekce jsou velmi řídké. Projevuje se podobně jako klíšťová encefalitida. Název byl odvozen ze starého skotského slova „loup“ podle příznaku této choroby, kvůli kterému ovce vyskakují do vzduchu.

#### **1.2.5.10 Ostatní choroby přenášené klíšťaty**

Klíšťata způsobují mnohem více chorob. Mezi další patří návratné horečky, které způsobují bakterie rodu *Borrelia*. Projevují se horečkou, zimnicí, bolestmi svalů, nevolností a může se objevit i vyrážka. Velmi dobře reagují na antibiotika.

Další nákazou přenášenou klíšťaty je Q horečka. Způsobuje jí bakterie *Coxiella burnetti*. Klíšťata nákazu šíří mezi ovce a kozami a lidé onemocní buď přímým kontaktem se zvířaty, nebo při požití produktů těchto zvířat, protože tyto bakterie přechází například do mléka. Projevuje se nespecifickými chřipkovými příznaky a atypickými pneumoniemi s bolestí na hrudi. Léčí se antibiotiky.

Prvok *Babesia* je také přenášený klíšťaty a napadá pouze zvířata, u kterých způsobuje onemocnění zvané babezióza. U lidí toto onemocnění nebylo prokázáno.

Klíšťata pravděpodobně přenáší i bakterie rodu *Ehrlichia* a *Anaplasma*.

### 1.2.6 Klíšťové toxikózy

Některá klíšťata mohou způsobovat hostiteli ještě další poškození, paralýzy, anafylaxi a srdeční selhání, které mají na svědomí neurotoxiny produkované klíšťaty, konkrétně lipocaliny zvané TSGP (Mans a kol., 2002). Ve slinách klíštěte se hojně vyskytují čtyři TGSP (Mans a kol., 2001; Mans a kol., 2003). TGSP2 a TGSP4 jsou prokazatelně toxiny působící na srdce. Nejčastěji jsou s klíšťovými paralýzami spojována klíšťata rodu *Dermacentor* a *Ixodes*. Naproti tomu u klíštěte *Ornithodoros moubata* TGSP2, TSGP3 a TSGP4 úplně chybí (Mans a kol., 2003).

## 2. Hemostáza

Hemostáza je proces, při kterém dochází k zastavení krvácení. Skládá se ze tří kroků, vazokonstrikce, aktivace destiček a jejich agregace a samotná koagulační kaskáda.

### 2.1 Vasokonstrikce

Při vasokonstrikci dochází k reflexnímu stažení poškozené cévy. Dochází k ní velmi rychle po poškození. Tento proces je velmi důležitý pro zastavení krvácení. Látky vyvolávající vasokonstrikci se nazývají vasokonstriktory. Patří mezi ně noradrenalin, který působí jako neurotransmitter uvolňovaný sympatickým nervovým systémem. Neurotransmitery jsou chemikálie, které přenáší impulzy od neuronů k cílové buňce. Mezi další vasokonstriktory patří tromboxan A<sub>2</sub>, který je tvořen aktivovanými trombocyty, endotelin 1, produkovaný v endotelu cév, angiotensin II a serotonin, který je obsažen

v trombocytech a funguje jako neurotransmitter. Tato látka působí hlavně na procesy spojené se změnou nálad, proto je využíván k léčbě depresí a poruch spánku. Mimo to ale působí na srážlivost a způsobuje kontrakce hladkého svalstva, například při zúžení cév. Kromě tromboxanu A<sub>2</sub> také některé další prostaglandiny mohou působit jako vasokonstriktory. Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) může působit vasokonstrikci nebo vasodilataci. To závisí na mnoha faktorech, mimo jiné na jeho koncentraci. Při vasokonstrikci je vasokonstriktor navázán na receptor a vyvolá tak zvýšení Ca<sup>2+</sup> uvnitř buněk hladkého svalstva cév. Tuto vazbu na receptor zprostředkovává regulační G-protein. Depolarizace membrány způsobí vstup Ca<sup>2+</sup> napětím řízenými iontovými kanály L typu, které způsobují svalovou kontrakci, a uvolnění dalšího Ca<sup>2+</sup> ze sarkoplasmatického retikula, což je hladké endoplasmatické retikulum uvnitř svalových buněk. Tím dochází k silnějšímu stažení svalu cévy. Již samotná vasokonstrikce dokáže u menších cév zastavit krvácení (Nakahata, 2008; Norel, 2007; Clyman a kol., 1978).

## **2.2 Trombocytární složka hemostatického systému**

### **2.2.1 Trombocyty**

Trombocyty neboli krevní destičky jsou důležitou složkou procesu srážení krve. Vznikají v kostní dřeni z obrovských buněk – megakaryocytů. Megakaryocyt je polyploidní buňka, může mít i 32 jader. Po rozpadu buňky jádra však zanikají a ze zbytků cytoplasmy se utvářejí zralé trombocyty. Z jednoho megakaryocytu vznikne až 5000 trombocytů. Produkce trombocytů je regulována trombopoetinem (TPO) z ledvin. Zralé trombocyty migrují nejprve do sleziny, kde přibližně 2/3 zůstanou uloženy jako zásoba, zatímco 1/3 pokračuje dále do cirkulace. Fyziologické hodnoty destiček v cirkulaci jsou 150 – 300 · 10<sup>9</sup>/l krve.

### **2.2.2 Morfologie trombocytu**

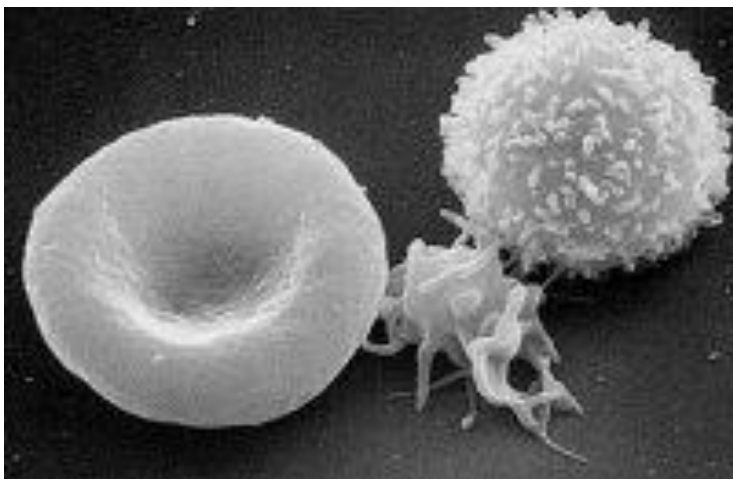
Trombocyty jsou nejmenší krevní elementy. Většina má v neaktivovaném stavu pravidelný diskoidní (bochníkovitý) tvar o průměru 2-4 μm. Některé mohou mít okrouhlý tvar s pseudopodiemi.

Na povrchu trombocytu je zevní plášť tvořený mukopolysacharidy a glykoproteiny. Na něm jsou aloantigeny jako antigeny krevních skupin (AB0), antigeny hlavního histokompatibilního komplexu (HLA) a specifický trombocytární antigen (trc-Ag). Pod zevním pláštěm je membrána, ve které jsou glykoproteiny tvořící specifická vazebná místa.

Například gp Ia tvoří vazebné místo pro kolagen, gp Ib IIIa pro von Willebrandův faktor, fibrinogen, fibronectin, gp V pro trombin.

Uvnitř trombocytu je solubilní gel (hyaloplasma), ve kterém jsou 3 typy vláken mikrotubuly, mikrofilamenta, mikrofibrily, které umožňují změnu tvaru buňky při aktivaci. Trombocyt je bezjaderný, ale obsahuje organely, mitochondrie a Golgiho komplex, proto má velice intenzivní metabolismus. Granula trombocytů se dělí na glykogenní a zásobní. Prvním typem zásobních granul jsou  $\alpha$  granula, která obsahují fibrinogen, von Willebrandův faktor, růstové buněčné faktory jako TGF  $\beta$ 1, koagulační faktory V a VIII a trombocytární faktor 4 (f4), který při uvolnění z granul podporuje krevní srážlivost mírnějším účinků heparinu a jemu podobných molekul.

Druhým typem jsou  $\delta$  granula, která obsahují ATP, ADP, kalcium a serotonin. Posledním typem jsou lysozomální granula, která obsahují lysozomální enzymy.



**Obr. 5:** Srovnání erythrocytu (vlevo), trombocytu (uprostřed) a leukocyty (vpravo).

zdroj: [http://anthro.palomar.edu/blood/blood\\_components.htm](http://anthro.palomar.edu/blood/blood_components.htm)

### 2.2.3 Funkce trombocytu

Při cévním poranění se odkryje kolagen, na který se destičky váží a zároveň jsou aktivovány sloučeninami, které vylučují poraněné buňky. Patří mezi ně ADP, kolagen, který se nachází v endoteliálních buňkách, trombin, PAF (platelet-aggregation factor) a tromboxan (Gachet a kol., 1997). Tyto látky rozpoznávají specifické receptory a spouštějí aktivaci destiček mechanismem aktivace G proteinu nebo návaem vápníku.

Aktivované destičky mění svůj tvar a přecházejí do dendritických forem s četnými výběžky.

Při spouštění těchto mechanismů dochází k aktivaci fosfolipázy C (PLC) a A2 (PLA<sub>2</sub>). To vede k expresi integrinu  $\alpha_{IIb} \beta_3$  na výběžcích trombocytů. Tento integrin váže fibrinogen nebo von Willebrandův faktor, který tvoří přes vápník můstky mezi aktivovanými destičkami a tím vzniká destičková zátka, tzv. bílý trombus. Tento proces se nazývá primární agregace (Calvete, 1994; Shattil a kol., 1997 ; Plow a kol., 2001).

Interakce fibrinogen-integrin  $\alpha_{IIb} \beta_3$  vede k degranulaci a uvolnění fosfatyldilserinu, ADP a serotoninu, který napomáhá stažení cév. Nejprve se degranulují  $\alpha$  granula, poté  $\delta$  granula. Aktivace PLA<sub>2</sub> uvolní arachidonovou kyselinu, která je přeměněna na tromboxan A<sub>2</sub>, který také účinkuje na stažení cév. Endoteliální buňky přeměňují arachidonovou kyselinu na prostacyklin PGI<sub>2</sub>, inhibitor shlukování destiček. To zabraňuje vzniku trombocytových zátek mimo poraněné místo. Degranulace a uvolnění sloučenin z granul se nazývá sekundární agregace.

Aktivované destičky mimo jiné vylučují i spoustu prozánětlivých molekul, jako TGF $\beta$  (transforming growth factor) a interleukin 1 $\beta$ , který aktivuje bílé krvinky. Indukují expresi tkáňového faktoru (TF), spolupracují s imunitním systémem, podporují monocyty a neutrofile. P-selektin produkovaný destičkami podporuje interakce mezi neutrofilem, destičkami a endotelem. Kromě toho produkují PAI-1, významný inhibitor fibrinolytického systému.

## **2.3 Plasmatická složka hemostatického systému**

Koagulační kaskáda se skládá ze dvou základních systémů. První je lokální hemokoagulace, tedy srážení krve. Druhou je fibrinolytický systém, který rozkládá vzniklé tromby a udržuje tak rovnováhu.

### **2.3.1 Plasmatický koagulační systém**

Hlavní složkou plasmatického koagulačního systému je 12 koagulačních faktorů označených FI-FXIII. FVI neexistuje, kdysi byl považován za akcelerin, ale bylo zjištěno, že se jedná o nefunkční formu FV. Většina z nich se vyskytuje ve formě zymogenů, enzymatickou aktivitu získávají až po aktivaci. Kromě FVII, který se v plasmě vyskytuje v aktivní formě, protože se po vazbě s FIII dokáže sám aktivovat (Davie a kol., 1991).



### **2.3.1.1 Koagulační faktory**

#### **2.3.1.1.1 FI – fibrinogen**

FI, fibrinogen, je glykoprotein, který je běžně rozpuštěný v plasmě. Kromě jeho zásadní funkce při srážení krve je jedním z proteinů akutní fáze, které se účastní obrany proti infekci, například při zánětu. Syntetizuje se v játrech, 20mg/den. Je tvořený třemi párovými řetězci  $A\alpha$ ,  $B\beta$  a  $\gamma$ . Části řetězců A a B, které se označují jako fibrinopeptidy, při aktivaci odpadnou. V krvi se vyskytuje jako zymogen. Aktivní forma FIa se nazývá fibrin a patří mezi serinové proteázy. Je aktivován trombinem a vznikají tak monomery fibrinu, které postupně polymerizují a tvoří pevnou síť.

#### **2.3.1.1.2 FII – protrombin**

Protrombin je plazmatický glykoprotein. V krvi se vyskytuje ve formě zymogenu. Je syntetizován v játrech za přítomnosti vitamínu K. Tento vitamín ovlivňuje aktivitu karboxylázy při přeměně kyseliny glutamové na gamma-karboxyglutamovou kyselinu. Bez přítomnosti vitamínu vzniká pouze prekurzor zvaný PIVKA II (protein induced in vitamin K absence). Všechny faktory závislé na vitamínu K mají podobnou strukturu (FII, FVII, FIX a FX). Skládá se ze dvou řetězců, lehkého (N-terminálního) a těžkého. Při aktivaci komplexem protrombinázou (FXa, FVa, membránové fosfolipidy,  $Ca^{2+}$  ionty) je polypeptidový řetězec štěpen na N-konci na dvou místech, kdy je odstraněn aktivační peptid. Těžký řetězec je přímo aktivní enzym, trombin (FIIa), který patří mezi serinové proteázy.

#### **2.3.1.1.3 FIII – tkáňový faktor (tromboplastin)**

FIII je glykoprotein, nezbytný pro zahájení přeměny protrombinu na trombin. Skládá se ze tří domén. První doména, která je umístěna vně buňky, váže faktor VIIa. Druhou doménou je doména transmembránová, a třetí je doména cytoplasmatická, která je uvnitř buňky.

#### **2.3.1.1.4 FIV – kalciové ionty**

Vápník je pro organismus důležitý v mnoha směrech. Tady se ve formě  $Ca^{2+}$  uplatňuje hned na několika místech koagulační kaskády. Tvoří komplex zvaný tenáza, který se uplatňuje ve vnější i vnitřní cestě koagulační kaskády. V obou případech aktivuje FX. Je

součástí i komplexu protrombinázy, který aktivuje přeměnu protrombinu na trombin, a FV. Aktivuje FXIII, který stabilizuje fibrinovou síť a sám stabilizaci také napomáhá.

#### **2.3.1.1.5 FV – proakcelerin**

FV je nazýván také labilní faktor. Je to glykoprotein syntetizovaný v játrech a v megakaryocytech. Po rozpadu megakaryocytu zůstává v granulích trombocytů. V jeho molekule je pevně navázán Ca. Po jeho odstranění ztrácí FV svou biologickou aktivitu. Sám není enzymaticky aktivní, působí pouze jako kofaktor. Při aktivaci se rozštěpí na dva řetězce, lehký a těžký, které jsou nekovalentně vázány  $\text{Ca}^{2+}$  ionty. Účastní se přeměny protrombinu na trombin, je součástí komplexu protrombinázy, kde zesiluje účinek FXa. Může být inhibován proteinem C.

#### **2.3.1.1.6 FVII – prokonvertin**

FVII je glykoprotein syntetizovaný v játrech za přítomnosti vitamínu K. Je jedním z faktorů protrombinového komplexu. Za jeho nepřítomnosti vzniká pouze nefunkční prekurzor PIVKA VII. Je tvořen dvěma řetězci, lehkým a těžkým. Dokáže sám sebe aktivovat na FVIIa po vazbě s FIII. V komplexu s FIII se účastní aktivace FX vnější cestou koagulace. Tento komplex se nazývá tenáza (FVIIa, FIII, tkáňové fosfolipidy a  $\text{Ca}^{2+}$ ).

#### **2.3.1.1.7 FVIII – antihemofilický faktor A**

FVIII je glykoprotein syntetizovaný v játrech, bez enzymatické aktivity, stejně jako FV. Patří mezi bílkoviny akutní fáze zánětu. FVIII je heterodimer. Tvoří ho dva nekovalentně tvořené řetězce, těžký a lehký. V plazmě se nachází FVIII s antigenními a koagulačními vlastnostmi navázaný na nosič – von Willebrandův faktor, který napomáhá adhezi a agregaci trombocytů. Z této vazby se vymaní vazbou na fosfolipidy. Volný FVIII je aktivován na FVIIIa trombinem nebo FXa. Je součástí komplexu zvaného tenáza pro vnitřní cestu koagulace (FIXa, FVIII, trombocytární faktor 3 a  $\text{Ca}^{2+}$ ). Nedostatek tohoto faktoru způsobuje hemofilii typu A, která se projevuje krvácením po operacích nebo úrazech, které trvá delší dobu než je obvyklé, nebo spontánním krvácením, nejčastěji do kloubů, svalů, podkoží a výjimečně i do CNS. Lidé s tímto onemocněním trpí silnou bolestí a otokem kloubů, často se u nich spontánně tvoří podlitiny a objevuje se krvácení z nosu, anémie a

krv v moči. Projevy nemoci mohou být různé intenzity. Postižení jsou převážně muži, ženy jsou pouze přenašečky, protože se nemoc přenáší ve formě vadné alely na chromosomu X.

#### **2.3.1.1.8 FIX – Christmas faktor**

Tento faktor patří do protrombinového komplexu. FIX je syntetizován v játrech za přítomnosti vitamínu K. Bez tohoto vitamínu vzniká pouze nefunkční prekurzor PIVKA IX. V plasmě je přítomen jako zymogen, po aktivaci získává charakter serinové proteázy. Je aktivován FXIa a podílí se na aktivaci FX, je součástí komplexu tenázy. Byl pojmenován podle Stephena Christmase, u kterého byla roku 1952 zjištěna hemofilie typu B způsobena deficitem FIX. Proto se někdy označuje jako antihemofilický faktor B. Hemofilie B se projevuje stejně jako hemofilie A.

#### **2.3.1.1.9 FX – Stuart – Prover faktor**

FX je pojmenován podle prvních dvou pacientů, u kterých byl zjištěn jeho deficit. Je syntetizován v játrech za přítomnosti vitamínu K. Bez vitamínu vzniká jen nefunkční prekurzor PIVKA X. FX patří do protrombinového komplexu. Tento faktor má klíčové postavení v koagulační kaskádě. Je aktivován vnitřní nebo vnější tenázou a spolu s FV,  $Ca^{2+}$  a membránovými fosfolipidy tvoří komplex zvaný protrombináza, který způsobuje přeměnu protrombinu na aktivní trombin. Je relativně stabilní, protože se během procesu koagulace nespotřebává.

#### **2.3.1.1.10 FXI – PTA (plasma thromboplastin antecedent)**

FXI je glykoprotein syntetizovaný v játrech. V neaktivní formě cirkuluje v dimerické struktuře – 2 symetrické polypeptidové řetězce. Je aktivován FXIIa a jeho aktivní forma (FXIa) zpětně reguluje aktivaci FXII. Po aktivaci způsobuje přeměnu FIX na FIXa. Je nazýván také antihemofilický faktor C, protože jeho deficit způsobuje hemofilii typu C. Toto onemocnění je vzácné. Spontánní krvácení způsobuje zřídka, projevuje se hlavně zvýšeným krvácením po úrazech a operacích, které trvá delší dobu, než by mělo. Jde o autozomálně recesivní poruchu, postihuje obě pohlaví.

#### **2.3.1.1.11 FXII – Hagemanův faktor**

FXII je glykoprotein syntetizovaný v játrech. Vyskytuje se ve formě zymogenu, po aktivaci se stává serinovou proteázou. Je nazýván také kontaktní faktor, protože se aktivuje při adsorpci na povrchy, jako kolagen, buněčné fragmenty, in vitro sklo nebo azbest, při které dojde ke změně terciální struktury. Zahajuje tak vnitřní cestu aktivace koagulační kaskády. FXIIa aktivuje přeměnu FXI na FXIa. Byl pojmenován podle prvního pacienta, u kterého byl zjištěn jeho deficit.

#### **2.3.1.1.12 FXIII – fibrin stabilizující faktor**

FXIII je glykoprotein, který je syntetizován v játrech. V plasmě cirkuluje jako tetramer  $A_2B_2$  ve formě zymogenu. Řetězce A mají enzymatickou aktivitu, jsou obsaženy v trombocytech a po aktivaci trombocytů uvolněny do plasmy, řetězce B jsou tvořeny nosičovou bílkovinou a volně se vyskytují v plasmě. Při aktivaci se odštěpí malý peptid z řetězce A trombinem a výsledný FVIIIa působí jako transglutamináza. Pro aktivaci jsou nutné  $Ca^{2+}$  ionty. FXIII se podílí na tvoření křížových můstků (vazby  $\gamma$ -glutaminy- $\epsilon$ -aminolysyl) ve fibrinové síti a vytváří se tak pevná nerozpustná sraženina. Je znám také jako Laki-Lorandův faktor, podle vědců, kteří poprvé uvažovali o jeho existenci v roce 1948.

### **2.3.1.2 Tromboplastinogeneze**

V této fázi koagulace se tvoří aktivátor protrombinu, což vede k aktivaci FX. K tomu může dojít dvěma způsoby, buď při aktivaci vnější, nebo vnitřní cestou.

#### **2.3.1.2.1 Vnitřní cesta koagulační kaskády**

Tato cesta aktivace začíná kontaktem s negativně nabitým smáčivým povrchem. In vivo jím bývá většinou poškozený endotel, bazální membrána nebo nejčastěji kolagen. Tento kontakt aktivuje FXII na FXIIa. Tato reakce vyžaduje HMWK (high-molecular-weight kininogen). Plasmatický protein pre-kalikrein je přeměněn na kalikrein. Kalikrein způsobí přeměnu HMWK na bradykinin, který se podílí na cévní propustnosti, rozšíření cév a vzniku zánětu. Mimo to je kalikrein účinný aktivátor FXII. FXIIa aktivuje FXI ( $FXI \rightarrow FXIa$ ), který aktivuje FIX ( $FIX \rightarrow FIXa$ ) a zároveň zpětnou vazbou dále stimuluje aktivaci FXII. FIXa

spolu s FVIII,  $\text{Ca}^{2+}$  a trombocytárním faktorem 3 (trc-f3) tvoří komplex zvaný tenáza, který aktivuje FX ( $\text{FX} \rightarrow \text{FXa}$ ). V tomto bodě se sbíhají obě cesty koagulace (Colman, Schmaier, 1997).

#### **2.3.1.2.2 Vnější cesta koagulační kaskády**

Vnější cestu startuje tkáňový faktor (FIII), který se vyskytuje v hlubších vrstvách stěny cév, kontaktem s FVII. FVII se dokáže sám aktivovat na FVIIa a aktivovat FX, ale příliš pomalu. Proto se na aktivaci FX ( $\text{FX} \rightarrow \text{FXa}$ ) podílí ve formě tenázy, spolu s FIII, tkáňovými fosfolipidy a  $\text{Ca}^{2+}$ , což reakci značně urychlí.

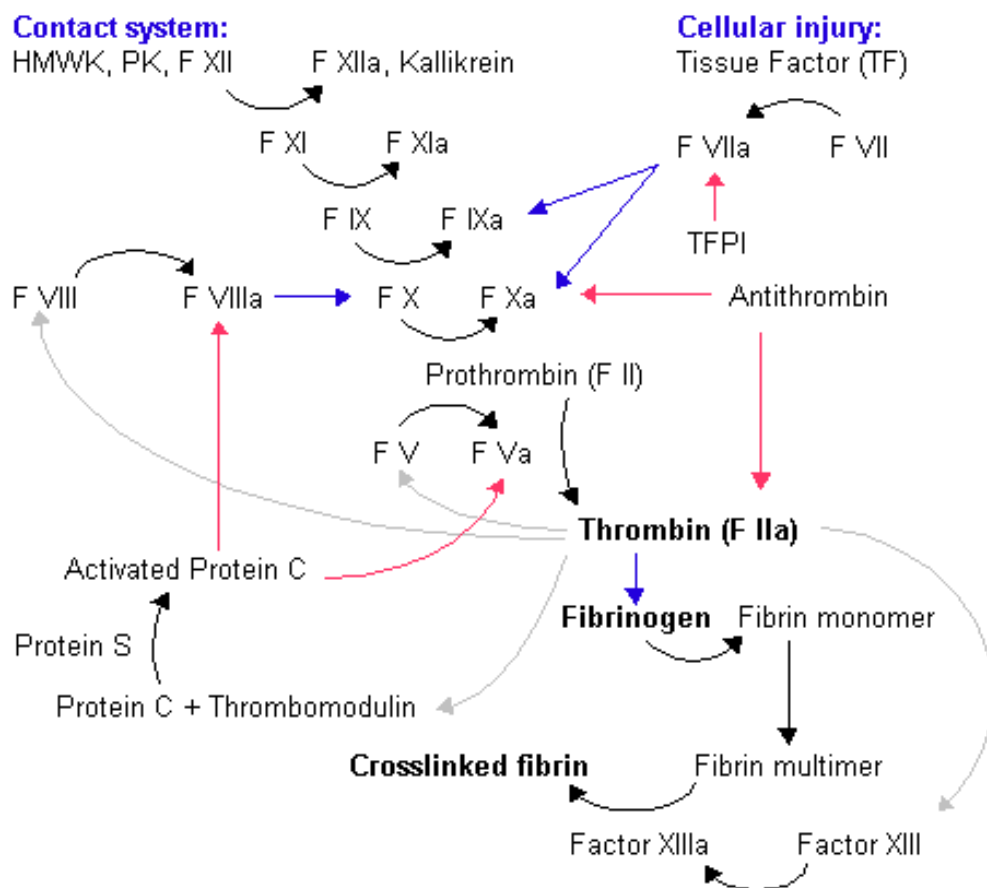
#### **2.3.1.3 Trombinkonverze**

Od aktivace FXa pokračují obě cesty stejně. Dalším krokem je přeměna protrombinu (FII) na trombin (FIIa). Na přeměně se podílí komplex aktivátorů protrombinu, který je tvořen FXa, fosfolipidy (destičky),  $\text{Ca}^{2+}$  a FV, který se na celé reakci podílí jako urychlující kofaktor. Některé faktory jsou posléze v játrech upravovány a přeměněny na aminokyselinu  $\gamma$ -karboxyglutamovou (Gla), která umožňuje interakci  $\text{Ca}^{2+}$  s destičkovými fosfolipidy. K tomu je nutný dostatek vitamínu K.

Po aktivaci je protrombin postupně štěpen na trombin. Z jeho N-konce je odštěpen fragment 1-2. Vzniklý pretrombin je dále štěpen a upravován na trombin, který rozdělí fragment 1 a fragment 2. Fragment 1 působí jako kompetitivní inhibitor konverze protrombinu, fragment 2 se váže na FV. Trombin mimo jiné aktivuje trombocyty a FXIII.

#### **2.3.1.4 Fibrinogeneze**

Poslední a nejdůležitější částí celé koagulační kaskády je přeměna fibrinogenu (FI) na fibrin (FIa). V první proteolytické fázi přeměny trombin štěpí fibrinogen. Dochází k oddělení fibrinopeptidů A a B. Vznikne tak profibrin (monomer fibrinu). V polymerizační fázi monomery fibrinu spontánně polymerizují a postupně tvoří síť. Tato síť zatím není pevná, lze ji snadno rozbít, protože ji drží pohromadě jen slabé vazebné interakce. Třetí fáze je stabilizační. Účastní se jí FXIIIa, aktivovaný fibrinem a  $\text{Ca}^{2+}$ . Fibrin je přeměněn do podoby prostorové sítě, která je stabilní a pevná. Do hotové sítě se zachytí krevní elementy a vytvoří tak konečnou sraženinu (trombus). Nakonec za pomoci trombocytů dojde k retrakci (smrštění) sraženiny a uvolní se sérum.

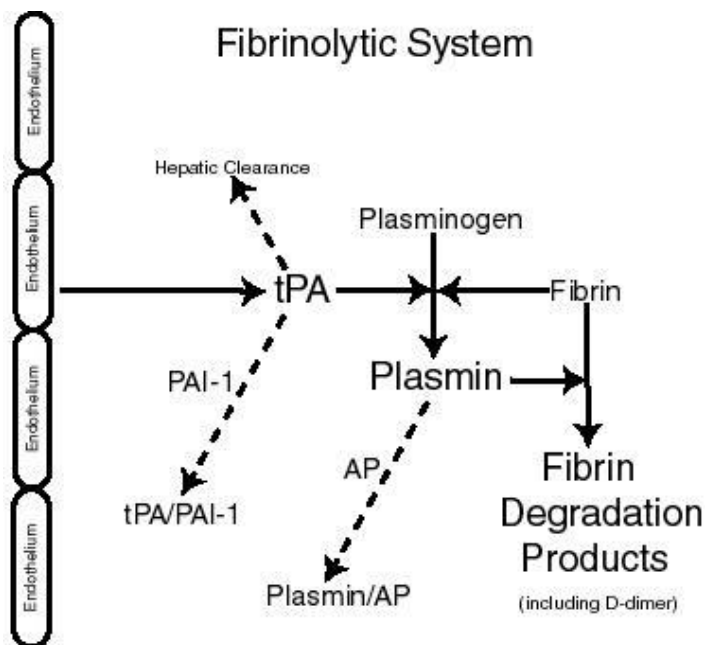


**Obr. 6:** Schématické znázornění koagulační kaskády.

zdroj: <http://www.hepcentro.com.br/exames.htm>

### 2.3.2 Fibrinolytický systém

Vzniklou sraženinu je třeba odstranit. Fibrinolytický systém nejprve odstraňuje přebytečný fibrin během koagulace a později rozpouští trombus. Hlavní složkou fibrinolytického systému je plasminogen (Cesarman-Maus a Hajjar, 2005; Collen a Lijnen, 2005).



**Obr. 7:** Schématické znázornění fibrinolýzy.

zdroj:[http://depts.washington.edu/labweb/dept/staff/bios/hemostas/introfibsyst\\_figure\\_1.html](http://depts.washington.edu/labweb/dept/staff/bios/hemostas/introfibsyst_figure_1.html)

### 2.3.2.1 Plasminogen

Plasminogen je jednořetězcový glykoprotein tvořený v játrech. In vivo se vyskytují dvě formy. Glu-plasminogen má na svém N-konci glutamin. Po odštěpení polypeptidu vzniká lys-plasminogen, který má na N-konci lysin a je citlivější na působení aktivátorů. Existuje několik typů aktivátorů plasminogenu. Aktivace je zaměřena na fibrin, protože se na něj plasminogen a tPA vážou.

Aktivátory plasminogenu mohou být vnitřní, tělu vlastní, nebo vnější. První skupinou vnitřních aktivátorů jsou tkáňové aktivátory (tPA), které jsou syntetizovány a skladovány v endotelu. Druhou skupinou jsou plasmatické aktivátory. Tyto aktivátory jsou ve všech sekretech. Jejich hlavní význam je v zamezení ucpaní vývodů žláz. Patří mezi ně urokináza (uPA), která se tvoří v ledvinných buňkách a udržuje ledvinové kanálky průchodné.

Významný vnější aktivátor je bakteriální streptokináza. Tento protein není enzym a je produktem  $\beta$ -hemolytického streptokoka. Komplex streptokinázy a plasminogenu dokáže aktivovat přeměnu dalšího plasminogenu na plasmin.

### 2.3.2.2 Plasmin

Plasmin je serinová protéza. V cirkulaci je navázán v komplexu plasmin-antiplasmin. Při kontaktu s fibrinem se plasmin z vazby uvolní a naváže se na fibrin, případně fibrinogen. Díky účinkům plasminu se fibrin začne rozpadat na jednotlivé fragmenty, FDP (fibrin-degradační produkty).

### 2.3.2.3 Fibrin degradační produkty (FDP)

Při štěpení fibrinogenu plasminem vznikají nehomogenní fragmenty. Lýza řetězců probíhá v pořadí  $A\alpha$ - $B\beta$ - $\gamma$ . Fragmenty se nazývají X, Y, D a E. Dva vzniklé D fragmenty mají na zbytcích řetězců  $\alpha$  a  $\beta$  vazebná místa. Díky tomu jsou schopny vázat se na monomery fibrinu a působí tak jako inhibitor polymerace. Fragment E má specifická místa pro vazbu trombinu a působí tak jako antitrombin.

Stabilizovaný fibrin je hůře štěpitelný. Rozklad trvá déle. Nejdříve se štěpí řetězce  $\beta$  a  $\gamma$ . Vzniká řetězec E a dva řetězce D (D-dimer). Fragmenty jsou postupně degradovány na malé peptidy a vyloučeny močí.

### 2.3.3 Inhibitory koagulace

Mezi tři nejvýznamnější antikoagulanty patří TFPI (tissue factor pathway inhibitor), antitrombin III (AT III) a protein C.

TFPI je jednořetězcový polypeptid se schopností blokovat vznik komplexu FVIIa/TF. V prvním kroku se naváže do komplexu TFPI/FXa a ve druhém kroku inaktivuje FVIIa navázaný na TF. Před účinnou inaktivací koagulace tímto způsobem se však musí objevit nějaký FXa (Adams, 2012).

Antitrombin III (AT III) je glykoprotein syntetizovaný v játrech a endotelu, který se váže na trombin, FXa a další faktory, které mají serinové akční centrum (tedy všechny kromě FV, FVIII a FXIIIa). Významným kofaktorem urychlujícím reakci je v tomto případě heparin. Heparin se váže na antitrombin, který změní konformaci a odhalí aktivní centrum, na které se naváže trombin (komplex TAT – trombin-antitrombin), nebo jiný koagulační faktor, a tím je inaktivován (Rezaie, 2000).

Trombomodulin je protein v endoteliálních buňkách. Váže se na trombin. Tento komplex aktivuje protein C.



Protein C je serinová protéza syntetizovaná v játrech. K syntéze je nutná přítomnost vitamínu K. Aktivní protein C tvoří komplex se svým kofaktorem proteinem S, který nemá žádnou enzymatickou aktivitu. Tento komplex inaktivuje FVa a FVIIIa (Estmon, 2003).

### 2.3.4 Inhibitory fibrinolýzy

Aktivátory plasminogenu jsou rychle a účinně inhibovány. Inhibitor aktivátoru plasminogenu 1 (PAI-1), známý také jako serpin E1 (serine protease inhibitor), tvoří přibližně 65% všech antifibrinolytických složek plasmy. Aktivitu tohoto inhibitoru reguluje interakce s vitronektinem, který napomáhá stabilizaci PAI-1 (Dellas a Loskutoff, 2005).

Dalším regulátorem fibrinolýzy je TAFI (thrombin-activable fibrinolysis inhibitor), karboxypeptidáza B2. TAFI odštěpí lysin z konců plasminu a zabraňuje tak navázání plasminu na fibrin (Mosnier a Bouma, 2006).

Hlavním inhibitorem fibrinolytického systému je  $\alpha_2$ -antiplasmin. Váže se na plasmin a tvoří s ním stabilní komplex. Teprve po vyčerpání  $\alpha_2$ -antiplasminu se začne projevovat rychle účinkující  $\alpha_2$ -makroglobulin, který inhibuje plasmin a kalikrein.

## 3. Látky v klíštěcích slinách působící na hemostatický systém hostitele

### 3.1 Látky bohaté na glycin, prolin, nebo podobné kolagenu

Tyto látky neovlivňují hemostázu hostitele přímo, ale určitým způsobem se na tomto ovlivnění podílejí. Tato velká skupina se ještě dále dělí na pravděpodobně „pokožkové“ (cuticle) proteiny, proteiny bohaté na alanin, kolageny, malé a velké GGY(glycin-glycin-tyrozin) peptidy, GYG proteiny ve velké míře u klíštěte rodu *Rhipicephalus*, „cementový“ protein metastriát podobný pavoučímu, malé kolagenu podobné peptidy specifické pro klíšťata rodu *Ixodes*, metastriáta a proteiny specifické pro *Argasidae*, podobné kolagenním peptidům rodu *Ixodes*. Pokožkové a kolagenní proteiny jsou pravděpodobně důležité pro základní funkce organismu, jako součást extracelulární matrix slinných žláz a část dýchacího systému. Jiné proteiny pravděpodobně slouží jako klíštěcí „cement“. Produkce „cementu“ se liší u různých druhů tvrdých klíšťat podle toho, zda jsou metastriátní nebo prostriátní. Metastriátní klíšťata mají menší ústní ústrojí, proto produkují hodně cementových proteinů,

aby se udržela v kůži hostitele. Prostriátní klíšťata mají delší ústní ústrojí, proto k udržení se nepotřebují cementu tolik (Grigor'eva, 2002; Alekseev a kol., 1995, Alekseev a kol., 1996). Ostatní proteiny se podobají epidermálním proteinům hostitele. Některé cementové proteiny metastríát by se daly využít na výrobu vakcín.

### 3.2 Muciny

Tyto glykoproteiny bohaté na serin nebo threonin se mohou také účastnit přichycení klíšťete k hostiteli a samotného krmení (Hansen a kol., 1998). O mechanismu jejich funkce se předpokládá, že pokryjí chitinové části ústního ústrojí klíšťete nebo místo sání. Některé z nich obsahují zřetelné chitin-vázající domény. Spoustu glykoproteinů ze skupiny mucinů lze nalézt i u savců, kde tvoří součást membrán a endoplasmatického retikula, nalézají se na sliznicích a jejich charakteristickou vlastností je schopnost tvořit gelovité substance, jako například hlen.

### 3.3 Antigen 5 (AG5) a jemu podobné proteiny

AG5 patří do skupiny CAP proteinů, do které mimo jiné patří proteiny bohaté na cystein a proteiny spojené s patogenezí 1 (cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, pathogenesis-related 1 proteins). AG5 a podobné proteiny lze nalézt ve slinných žlázách mnoha hematofágních organismů, hmyzu a klíšťat (Anderson a kol., 2006; Arca a kol., 2005; Arca a kol., 2007; Calvo a kol., 2004; Calvo a kol., 2006; Calvo a kol., 2007; Campbell a kol., 2005; Charlab a kol., 1999; Ribeiro a kol., 2007). Mají spoustu rozmanitých funkcí, působí endokrinně nebo parakrinně. U klíšťat zatím žádná funkce těchto proteinů nebyla objevena, ale u plžů rodu *Conus* mají specifickou proteázovou aktivitu. Některé obsahují RGD doménu a působí jako inhibitory agregace destiček (Xu a kol., 2008). Jsou i v hadích jedech, kde blokují vápníkové iontové kanály a způsobují uvolnění hladkého svalstva. Patří mezi ně i neurotoxiny jedovatého ještěra *Heloderma horridum* (Nobile a kol., 1996).

### 3.4 Ixodegriny

Tyto látky jsou pojmenovány podle klíšťat rodu *Ixodes*, u kterého byly poprvé objeveny (*I.pacificus* a *I.scapularis*). Jsou bohaté na aminokyselinu cystein, předpokládá se, že mají RGD (arginin-glycin-asparagová kyselina) a KGD (lysin-glycin-asparagová kyselina) domény. Hemostatický systém hostitele ovlivňují tak, že reagují s fibrinogenem a přerušují

jeho vazbu na trombocyty a tak fungují jako inhibitor destiček, zabraňující vzniku primární zátky (Francischetti a kol., 2005). Peptidy obsahující RGD domény byly pojmenovány variabilin podle tvrdého klíštěte *Dermacentor variabilis*, savignygrin podle měkkého klíštěte *Ornithodoros savignyi* a disagregin, kterému chybí RGD, byl objevený u měkkého klíštěte *Ornithodoros moubata*. Variabilin působí jako účinný antagonist fibrinogenového receptoru glykoproteinu GP IIb-IIIa (integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ). Tento receptor se nachází na trombocytech. Kromě toho funguje také jako antagonist vitronektinového receptoru  $\alpha_v\beta_3$  (integrin alfaVbeta3). Vitronektin se váže na inhibitor aktivátoru plasminogenu 1 (PAI -1) a reguluje tak proteolýzu. Je také součástí trombocytů. Obsahuje RGD sekvenci. Jeho receptor je integrin složený z integrinu  $\alpha_V$  a integrinu  $\beta_3$ . Tento receptor je exprimován na trombocytech (Wang a kol., 1996). Savignygrin působí také jako inhibitor trombocytů. Dokáže inhibovat agregaci trombocytů, ačkoliv již byla aktivována ADP, kolagenem, peptidem aktivujícím trombinový receptor a epinefrinem a destičky již prošly změnou tvaru. Inhibuje také ATP receptory P2 ( $\alpha$ -CD41), fibrinogenový receptor (GP IIb-IIIa) a adhezi trombocytů k fibrinogenu. Savignygrin nejspíše působí specificky pouze na receptor GP IIb-IIIa (integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ), protože neinhibuje adhezi osteosarkomových buněk s receptorem  $\alpha_v\beta_3$  k vitronektinu nebo fibrinogenu (Mans a kol., 2002). Disagregin inhibuje agregaci destiček aktivovanou ADP, kolagenem, epinefrinem a dalšími aktivátory, stejně jako tomu je u savignygrinu. Při inhibici agregace se váže na fibrinogenový receptor. Inhibuje adhezi trombocytů k fibrinogenu, částečně inhibuje adhezi k fibronektinu a velmi málo působí na adhezi ke kolagenu (Karciewski a kol., 1994; Karciewski a Connolly, 1997). Ixodegriny rodu *Ixodes* se od těchto liší tím, že mají aminokyselinu cystein lemující RGD doménu. Ixodegrin I, specifický pouze pro rod *Ixodes* také vykazuje značnou strukturní podobnost s neurotoxiny hadů čeledi *Elapidae*. Stejně jako předchozí působí jako inhibitor agregace trombocytů.

### 3.5 Proteiny obsahují Kunitzovu doménu

Většina těchto proteinů inhibuje S1 (serinové) proteázy, kterými je většina faktorů koagulační kaskády. Kunitzova doména je bohatá na disulfidy, může mít tři a u některých druhů i více disulfidických můstků. Obsahuje také 6 specificky umístěných cysteinů, které tvoří disulfidické můstky typické pro BPTI (bovine pancreatic trypsin inhibitor). U těchto proteinů je protisrážlivá aktivita dokázána. Objevují se proteiny s více Kunitzovými doménami a interagují například s FXa a protrombinázovým komplexem.

Proteiny skupiny Monolaris mají jednu Kunitzovu doménu. Patří mezi ně trombinový inhibitor savignin, anti-FXa peptidy klíšťat *Ornithodoros moubata* a *Ornithodoros savignyi*, zvané TAP (tick anticoagulant peptide) a FXaI (FXa inhibitor). Savignin je trombinový inhibitor, inhibuje pouze agregaci trombocytů aktivovanou trombinem, agregaci aktivovanou ADP nebo kolagenem nikoliv. Váže se na inhibitor  $\alpha$ -trombinu (Mans a kol., 2002). TAP je specifický inhibitor faktoru Xa (Waxman a kol., 1990).

Skupina Bilaris/Ixolaris má dvě Kunitzovy domény. Z této skupiny je znám inhibitor TF a tedy inhibitor vnější cesty aktivace koagulační kaskády ixolaris klíštěte *Ixodes scapularis* (Monteiro a kol., 2004; Nazareth a kol., 2006; Francischetti a kol., 2002), antitrombin klíštěte *Amblyomma hebraeum*, a boophilin, antitrombin klíštěte *Boophilus microplus*. Ixolaris vykazuje značnou podobnost s TFPI (tissue factor pathway inhibitor). Inhibuje vnější cestu aktivace koagulační kaskády tím, že se váže na FXa nebo FX a inhibuje komplex FVIIa/TF (tenázu vnější cesty). Rozdíl mezi ixolarisem a TFPI je ve způsobu vazby na FXa. TFPI se váže na aktivní centrum FXa, zatímco tvorba komplexu ixolaris-FXa je zprostředkována přes vazebné místo pro heparin (na FXa), díky tomu klesá aktivita FXa v protrombinovém komplexu (Nazareth a kol., 2006). Antitrombin klíštěte *Amblyomma hebraeum*, pojmenovaný amblin, vykazuje velkou podobnost s TFPI a ixolarisem klíštěte *Ixodes scapularis* (Lai a kol., 2004). I jejich účinky jsou velmi podobné. Boophilin neovlivňuje pouze trombin, ale i ostatní látky s proteolytickou aktivitou, serinové proteázy jako trypsin a plasmin (Macedo-Ribeiro a kol., 2008).

Z proteinů, které mají tři a více Kunitzových domén, je zatím charakterizován pouze jeden. Pentalaris klíštěte *Ixodes scapularis* vykazuje podobnost s TFPI a inhibuje FVIIa/TF. Váže se na FXa i FX, nikoliv však na FVII. Ve vysokých koncentracích může inhibovat i FIX (Francischetti a kol., 2004).

Existují i proteiny s modifikovanými Kunitzovými doménami. Jeden z nich, pojmenovaný ornithodorin, byl objevený u klíštěte *Ornithodoros moubata*. Je to účinný a vysoce selektivní trombinový inhibitor (van de Locht a kol., 1996).

### **3.6 Proteiny se serpinovou doménou**

Serpiny jsou proteiny se schopností inhibovat serinové proteázy a tím ovlivňovat koagulační kaskádu. Existují extracelulární i intracelulární serpiny. Byly zjištěny u více druhů hematofágních organismů. Například u komárů rodu *Aedes* inhibují FXa (Stark a kol.,

1998). Serpin zvaný IRIS, podle objevení u klíštěte *Ixodes ricinus*, je známý svými imunosupresivními vlastnostmi, které z něj dělají velmi nadějnou látku při vývoji vakcíny. Tento serpin obsahuje klíčku reaktivního centra (RCL), která je nutná k interakci serpinů a serinových proteáz. Ovlivňuje hemostázu tím, že přerušuje koagulaci a fibrinolýzu přes anti-proteolytickou RCL doménu. Jeho antihemostatické účinky jsou zatím poměrně málo prozkoumané (Prevot a kol., 2006).

### 3.7 Cystatiny

Cystatiny jsou inhibitory cysteinových proteáz. Skládají se z cysteinových zbytků vázaných disulfidickými můstky. Inhibují hlavně peptidázy patřící do skupiny C1 (papainové peptidázy) a C13 (legumainové peptidázy). Dělí se na cystatiny typu 1, které jsou intracelulární, a cystatiny typu 2, které jsou extracelulární. Cystatiny typu 1 se nachází v cytosolu mnoha typů buněk a můžou se objevit v malých koncentracích i v tělních tekutinách. Jsou to jednořetězcové látky, které tvoří přibližně 100 cysteinových zbytků, ale nemají disulfidické můstky. Cystatiny typu 2 jsou převážně extracelulární a nachází se ve většině tělních tekutin. Cystatiny typu 3 jsou multidoménové proteiny, u savců tuto skupinu označujeme jako kininogeny. Mimo tyto tři skupiny existují ještě neklasifikované cystatiny.

U klíštěte *Ixodes scapularis* byly charakterizovány dva cystatiny typu 2, pojmenované sialostatin L a sialostatin L2. Sialostatin L byl pojmenován podle své funkce, inhibuje cathepsin L. Jím inhibované cysteinové proteázy mají vliv na proteolýzu, proto ji cystatiny ovlivňují. Mají protizánětlivé a imunosupresivní účinky (Kotsyfakis a kol., 2006; Kotsyfakis a kol., 2007).

### 3.8 Thyropiny

Thyropiny obsahují dvě TY (threonin-tyrozin) domény. Inhibují cysteinové proteázy a vážou „spoluhračce“ heparinu. Thyropiny byly odvozeny od proteinu s jednou TY doménou, který byl objeven u klíštěte *Ornithodoros moubata*. Ostatní proteiny tohoto typu byly zjištěny u klíšťat *Rhipicephalus microplus*, *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma cajennense* a *Amblyomma variegatum*. Jejich funkce zatím není známá. (citace!)

### 3.9 Hirudin/madanin/variegin

Madaniny jsou relativně malé antitrombiny, objevené ve slinných žlázách klíštěte *Haemaphysalis longicornis*. Byly nazvány madanin 1 a madanin 2. Jsou to velmi malé molekuly, mají jen 7-kDa. Bylo zjištěno, že inhibují přeměnu fibrinogenu na fibrin aktivovanou trombinem, trombinem katalyzovanou aktivaci FV a FVII a trombinem indukovanou agregaci trombocytů. Předpokládaný mechanismus této inhibice je takový, že se madanin 1 a 2 váže na molekulu trombinu, přesněji na její vazebné místo pro anion 1 (anion-binding exosite 1) a interaguje s fibrinogenem, FV, FVII a trombinovým receptorem na trombocytech, které také mají vazebné místo pro anion (Iwanaga a kol., 2003). Podobné látky byly objeveny i u klíštěte *Dermacentor andersoni*.

Hirudin je peptid objevený ve slinných žlázách lékařsky využívaných pijavic (*Hirudo medicinalis*). Má silné antikoagulační účinky. Působí jako inhibitor trombinu, váže se na něj a zabraňuje tak zniku sraženiny, případně sraženinu rozpouští (Fields, 1991).

Proteiny podobné hirudinu byly předpokládány u klíštěte *Amblyomma variegatum* (Kazimirova a kol., 2002). Kódující sekvence tohoto proteinu byla objevena v roce 2004. Protein by se měl skládat z přibližně 200 aminokyselin. Příbuzný, ale mnohem kratší protein (pouze 32 aminokyselin) zvaný variegin byl již dříve objeven u *Amblyomma variegatum*. Ukázalo se, že jde o inhibitor trombinu, na který se váže s vysokou specifitou. Delší proteiny jsou varieginu velmi podobné, protože se v nich objevují varieginové sekvence. Mimo to jsou příbuzné madaninům. Všechny tyto látky se vyskytují pouze u tvrdých metastriátních klíšťat.

### 3.10 Proteiny „basic tail“

Tyto proteiny se nazývají „basic tail proteins“, (BTP), protože většina z nich má základní C(karboxy)-konec nebo ocas, tedy je zakončena karboxylovou skupinou –COOH. Některé z nich však mohou mít kyselý „ocas“ (–COO<sup>-</sup>) a některým úplně chybí (Ribeiro a kol., 2006). Tento konec nejspíš napomáhá interakci s fosfolipidy na povrchu aktivovaných trombocytů a žírných buněk. „Basic tail“ proteiny lze nalézt u měkkých i tvrdých klíšťat. Některé z nich byly objeveny u klíštěte *Ixodes scapularis* (Narasimhan a kol., 2002) a *Ixodes pacificus*, kde se uplatňují proti srážení krve hostitele. Protein označovaný jako gi|49286982 má RGD doménu a mohl by se chovat jako inhibitor agregace destiček (Francischetti a kol., 2009).

Basic tail proteiny vykazují podobnost s exogenními antikoagulanty jako je Salp 14 klíštěte *Ixodes scapularis*, který působí jako inhibitor FXa.

### 3.11 Karboxypeptidázové inhibitory

Tyto proteiny jsou doposud téměř neprozkoumané. Poprvé byly objeveny u klíštěte *Rhipicephalus bursa*. Popsány byly i u druhů *Haemaphysalis longicornis*, *Dermacentor andersoni* a *Rhipicephalus microplus*. Působí jako inhibitory fibrinolýzy inhibicí plasmatických karboxypeptidáz N a B (Arolas a kol., 2005). Karboxypeptidáza N, bradykinin, způsobuje dilataci (rozšíření) cév a zvyšuje cévní propustnost. Karboxypeptidáza B je známá také jako trombinem aktivovatelný inhibitor fibrinolýzy (thrombin-activable fibrinolysis inhibitor, TAFI).

### 3.12 Lipocaliny

Lipocaliny jsou proteiny schopné přepravovat malé hydrofobní molekuly, díky jejich struktuře antiparalelního  $\beta$ -barelu s +1 topologií. Uvnitř dutiny je vazebné místo pro hydrofobní ligandy.

Byly zjištěny ve slinách klíšťat a ploštic z podčeledi *Triatominae*, kteří jsou stejně jako klíšťata hematofágní. U těchto ploštic bylo zjištěno, že mohou přepravovat NO, vázat adenosin, histamin, serotonin, negativně nabitě fosfolipidy a působí proti srážení krve (Zhang a kol., 1998; Isawa a kol., 2000; Ribeiro a kol., 1995).

U klíšťat váží histamin, serotonin, imunoglobulin, působí proti komplementu a mají vlastnosti toxinu. Tvrdá klíšťata mají proteiny vázající histamin (HPB1-3), které regulují zánětlivou reakci při dlouhém krmení. Byly objeveny u klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus* (Paesen a kol., 1999; Paesen a kol., 2000).

U měkkých klíšťat byly jako lipocaliny určeny moubatin a čtyři proteiny, ve slinách velmi hojné, zvané TSGP (Mans a kol., 2001; Mans a kol., 2003). Moubatin byl objeven u klíštěte *Ornithodoros moubata*. Působí jako specifický inhibitor kolagenem indukované agregace trombocytů. Dva z TSGP proteinů jsou mimo jiné toxiny, způsobující klíšťové toxikózy, které mohou vést k paralýze, anafylaktickému šoku a selhání srdce, u klíštěte *Ornithodoros savignyi* (Mans a kol., 2002). Podobnost s TSGP s moubatinem naznačuje, že by i tyto proteiny mohly mít hemostatickou aktivitu, zatím to však není nijak vědecky podloženo.

### 3.13 16-kDa proteiny

Tato rodina zahrnuje 14 proteinů, z toho 13 bylo odvozeno od klíšťat *Ixodes scapularis* a *Ixodes pacificus* a jsou vzdáleně příbuzné jednomu proteinu *Dermacentora andersoni*. Jsou bohaté na cystein jsou vzdáleně podobné klíštěcím antitrombinům. Jejich funkce zatím nebyla nijak vědecky potvrzena (Francischetti a kol., 2009).

### 3.14 Enzymy

Sliny klíšťat obsahují spoustu enzymů, které napomáhají krmení. Apyráza (ATP-difosfatáza) je vápníkem aktivovaný enzym. Blokuje aktivaci trombocytů. Apyráza byla nalezena ve slinách hematofágních členovců, zejména klíšťat. Prokázána byla u měkkých klíšťat druhů *Ornithodoros moubata* a *Ornithodoros savignyi*, a tvrdého klíštěte druhu *Ixodes scapularis* (Ribeiro et al., 1985; Ribeiro et al., 1991; Mans et al., 1998). Kromě toho je apyráza schopná rozbít již vzniklý agregát trombocytů odstraněním ADP (Mans a kol., 2000).

Kromě apyrázy se v klíštěcích slinách vyskytují i esterázy, glukosidázy, fosfolipázy, kináza a enzymy inaktivující anafylatoxiny, metaloproteázy, specificky působící na fibrin a fibrinogen (Francischetti a kol., 2003; Harnnoi a kol., 2007). Metaloproteázy jsou schopné hydrolyzovat některé složky extracelulární matrix, jako fibrinogen nebo fibronectin. Degradace fibrinu a fibrinogenu je spojena s inhibicí agregace trombocytů. Metaloproteázy mohou také reagovat s integriny endoteliálních buněk, a to může vést k apoptóze a inhibovat angiogenezi (Francischetti a kol., 2005).

V klíšťatech bylo objeveno mnohem více enzymů, ale ne všechny jsou ve slinách a ne všechny působí na hostitele.

### 3.15 Nepeptidické složky klíštěcích slin

Ve slinách tvrdých klíšťat můžeme najít vasodilatační látky jako PGE<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub>) a PGF<sub>2α</sub> (prostaglandin F<sub>2α</sub>). PGE<sub>2</sub> působí také jako inhibitor dendritických buněk u klíštěte *Ixodes scapularis* (Sa-Nunes a kol., 2007). Prostacyklin (PGI<sub>2</sub>) a prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) inhibují agregaci destiček. Ve svých slinách je mají klíšťata druhů *Ixodes scapularis* a *Amblyomma americanum* (Bowman et al., 1997). Některá klíšťata mají ve svých slinách endokanabinoidy, které mohou působit jako látky protizánětlivé a mírnící bolest (Fezza a kol., 2003).



## **4. Působení klíčících slin na hemostázu hostitele**

### **4.1 Inhibice trombocytů**

#### **4.1.1 Inhibice před aktivací agregace trombocytů**

Látky spouštějící agregaci destiček mohou být odstraněny nebo deaktivovány před samotnou aktivací trombocytů. ADP je hydrolyzováno apyrázou, kterou je možno zjistit u mnoha druhů hematofágních organismů (Law a kol., 1992). U organismů, které nemají apyrázu, zabraňuje sekreci ADP a tím i agregaci destiček PGI<sub>2</sub> a PGD<sub>2</sub>. Některé trombinové inhibitory také zabraňují agregaci destiček tím, že se váží receptory těchto látek. Patří mezi ně specifický inhibitor kolagenu moubatin (Waxman a Connolly, 1993).

#### **4.1.2 Inhibice po aktivaci agregace trombocytů**

Destičky po aktivaci kolagenem, ADP nebo jinými látkami mění tvar na formu s četnými výběžky. Tato forma napomáhá jejich agregaci. I po aktivaci však může být agregace destiček inhibována za pomoci látek cílených na fibrinogenové a vitronektinové receptory. Mezi tyto látky patří variabilin, savignygrin a ixodegrin, obsahující RDG domény a disagregin, kterému RDG doména chybí (Karciewski a kol., 1994; Wang a kol., 1996; Mans a kol., 2002b).

#### **4.1.3 Inhibice po agregaci trombocytů**

Již agregované trombocyty mohou být stále ještě rozpuštěny. Antagonisté glykoproteinu IIb/IIIa mohou vytlačit fibrinogen z jeho receptoru a tím umožnit rozpuštění agregátu (Mans a kol., 2002c). Další látkou schopnou rozpouštět agregát je apyráza, která působí pravděpodobně přes odstranění ADP a návrat destiček do původního diskoidního tvaru (Mans a kol., 2000). Agregované destičky také mohou být rozpuštěny proteolýzou fibrinogenu.

### **4.2 Inhibitory koagulace**

#### **4.2.1 Inhibitory faktoru Xa**

Faktor Xa hraje klíčovou úlohu v koagulační kaskádě. U FX se sbíhají vnější i vnitřní cesta aktivace koagulace. Aktivace FX vede k přeměně protrombinu na trombin a dále

k tvorbě trombu. Pokud je FXa inhibován, nedojde k přeměně trombinu a tedy ani k samotnému srážení krve. Mezi inhibitory FXa patří TAP (tick anticoagulant peptide) klíštěte *Ornithodoros moubata*, FXaI klíštěte *Ornithodoros savignyi* a protein Salp14 klíštěte *Ixodes scapularis* (Narasimhan a kol., 2004).

#### 4.2.2 Inhibitory vnější cesty aktivace koagulační kaskády (TFPI)

Tkáňový faktor (TF, FIII) startuje vnější cestu koagulační kaskády. Po kontaktu s ním dochází k aktivaci FVII a spuštění koagulační kaskády. Mezi TFPI patří Ixolaris a Pentalaris klíštěte *Ixodes scapularis* (Nazareth a kol., 2006).

#### 4.2.3 Přímé inhibitory trombinu

Tyto látky ovlivňují přímo trombin. Patří mezi ně savignin klíštěte *Ornithodoros savignyi* (Mans a kol., 2002), ornithodorin klíštěte *Ornithodoros moubata* (van de Locht a kol., 1996), amblin klíštěte *Amblyomma hebraerum* (Lai a kol., 2004), boophilin klíštěte *Boophilus microplus* (Macedo-Ribeiro a kol., 2008) a madanin 1 a 2 klíštěte *Haemaphysalis longicornis* (Iwanaga a kol., 2003).

## 5. Diskuze

Klíšťata vyvinula množství mechanismů, které ovlivňují hemostatický systém hostitele na různých úrovních. Proto pokud je nějakým způsobem klíštěti zabráněno ovlivňovat hemostázu jedním mechanismem, nahradí ho mechanismus jiný. Antihemostatické molekuly klíšťat jsou velmi podobné strukturou i funkcí antihemostatickým molekulám jiných hematofágních organismů.

Jedna skupina klíštěcích antihemostatických molekul ovlivňuje trombocyty, zabraňuje jejich agregaci, případně rozpouští agregát. Mezi takové molekuly patří enzymy apyrázy. Byly objeveny tři třídy apyráz u různých druhů hematofágních členovců. První třída patří do skupiny 5'-nukleotidáz, a byla objevena nejen u klíšťat *Boophilus microplus*, *Ornithodoros savignyi* (Mans a kol., 2000) a mnoha dalších druhů, ale i u komárů *Aedes aegypti* (Champagne a kol., 1995), hlavního přenašeče viru žluté zimnice, *Anopheles gambiae* (Lombardo a kol., 2000), který přenáší původce malárie, a ploštice *Triatoma infestans*

(Faudry a kol., 2004), která přenáší prvoka *Trypanosoma cruzi*, původce Chagasovy choroby. Do druhé třídy patří apyrázy objevené u štěnice domácí, *Cimex lectularius* (Valenzuela a kol., 1998), a pakomára *Phlebotomus papatasi* (Valenzuela a kol., 2001), který přenáší virus způsobující onemocnění zvané Pappataci fever. Apyrázy tohoto typu byly objeveny u eukaryotních organismů včetně člověka, kde plní funkci nukleotidáz (Dai a kol., 2004). Kvůli této podobnosti jsou apyrázy pro vývoj vakcín proti klíšťatům problematické, imunizace jimi by mohla u hostitele vyvolat autoimunitní reakci. Třetí třída apyráz byla objevena u blechy *Xenopsylla cheopis* a patří do skupiny CD39 nukleotidáz, které se vyskytují v endotelu (Andersen a kol., 2007).

Lipocaliny jako inhibitory agregace trombocytů se kromě klíštěte *Ornithodoros moubata* (Waxman a Connolly, 1993) vyskytují i u ploštice *Rhodnius prolixus*, která je jedním z vektorů prvoka *Trypanosoma cruzi*, původce Chagasovy choroby. Tento inhibitor je nazýván RPAI-1 (*Rhodnius prolixus* aggregation inhibitor 1) a působí jako ADP-vázající protein (Francischetti a kol., 2000). Kolagenem indukovanou aktivaci trombocytů inhibuje longicornin klíštěte *Haemaphysalis longicornis* (Cheng a kol., 1999), ale i pallidipin ploštice *Triatoma pallidipennis* (Noeske-Jungblut a kol., 1994) a triplatin ploštice *Triatoma infestans* (Morita a kol., 2006).

Ze skupiny proteinů vázající epinefrin a serotonin se u klíšťat vyskytuje TGSP-1 (Mans a kol., 2001), který váže serotonin a inhibuje agregaci trombocytů. Jsou velmi podobné amin-vázajícím proteinům (ABP) ploštice *Rhodnius prolixus*, které váží serotonin nebo epinefrin (Andersen a kol., 2003), a D7 proteinům komárů *Anopheles gambiae*, které váží serotonin a norepinefrin (Calvo a kol., 2006).

Klíšťata a ostatní hematofágní členovci nemají jen velmi podobné látky ovlivňující trombocytární složku hemostatického systému, ale i látky ovlivňující plasmatickou složku a vasokonstrikci (vasodilatanty – rozšiřují cévy, brání vasokonstrikci). Velká část těchto látek inhibuje aktivaci FX nebo trombin. Komáři podčeledi *Culicinae* vytvářejí antiFXa protein ze skupiny serpinů (Stark a James, 1996). Tato čeleď zahrnuje rod *Culex*. Komáři tohoto rodu jsou vektory například viru japonské encefalitidy nebo viru západního Nilu. Anophelin je antitrombin komára *Anopheles albimanus* a váže se na aktivní centrum trombinu i na jeho vazebné místo pro anion 1 (anion-binding exosite 1) (Francischetti a kol., 1999).

Všechny látky ovlivňující hemostatický systém hostitele, klíštěcí molekuly i molekuly ostatních hematofágních členovců mohou být teoreticky využity k vývoji nových vakcín proti těmto organismům, patogenům jimi přenášeným, stejně jako k léčbě různých nemocí.

V České republice se vyskytují dva významné patogeny přenášené klíšťaty rodu *Ixodes ricinus*, virus klíšťové encefalitidy (TBE) a bakterie rodu *Borrelia*. Kromě nich u nás klíšťata přenášejí i bakterie *Anaplasma* a *Francisella*, prvoka *Babesia* a mnoho dalších.

Proti viru klíšťové encefalitidy se používá zatím pouze vakcína založená na antigenu tohoto viru. Kromě té se testovaly i jiné vakcíny, které neobsahovaly inaktivovaný virus. Používal se cementový protein 64 P (64 TRP) ze slinných žláz klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus*, který poskytoval ochranu i proti klíšťatům *Rhipicephalus sanguineus*, *Ixodes ricinus*, *Amblyomma variegatum* a *Boophilus microplus*. Imunitní odpověď, vyvolaná tímto antigenem, byla zaměřena na antigeny střeva a slinných žláz. Při sání klíštěte na zvířeti imunizovaném tímto proteinem se mnohonásobně zvýšila zánětlivá odpověď organismu (basofily, eozinofily, lymfocyty, žírné buňky a makrofágy) (Trimnell a kol., 2005).

Proti lymské nemoci způsobované bakteriemi rodu *Borrelia* se také testovalo několik vakcín, ale žádná z nich zatím nebyla využita pro vakcinaci širšího okruhu osob. Pro vývoj těchto vakcín se využívají antigeny *Borrelií*, jako protein Osp A, který se váže na receptor ve střevě klíštěte (TROSPA) a Osp C, exprimovaný při sání klíštěte, nebo proteiny vektora. Mezi takové patří protein Salp15, vyskytující se ve slinách klíštěte. Tento protein se váže na Osp C a chrání *Borrelie* před protilátkami a komplementem (Ramamoorthi a kol., 2005). Při pokusech na myších bylo zjištěno, že se na něj váže *Borrelia burgdorferi*, a tím je zabráněno infekci. Myši imunizované Salp15 byly proti infekci odolné díky anti-Salp15 protilátkám, které komplexy *Borrelií* a Salp15 opsonizovaly (Dai a kol., 2009).

In vitro byla prokázána zesílená fagocytóza *Borrelií* vázaných na Salp15 (Dai a kol., 2009). Tyto vakcíny vypadají velmi nadějně, proto myslím, že by se již mělo přejít ke klinickým testům na dobrovolnících. Mnozí totiž považují lymskou nemoc za neškodnou oproti klíšťové encefalitidě a neuvědomují si riziko trvalého poškození nervového, kloubního nebo kardiovaskulárního systému bez léčby. Příznaky mohou být často tak nejednoznačné nebo nenápadné, že ne vždy je tato nemoc léčena včas a správně.

Klíšťata nepřenáší pouze *Borrelie* nebo virus klíšťové encefalitidy. Protein subolesin chrání proti infekci bakteriemi rodů *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Rickettsia* nebo *Babesia*, aktivuje vrozenou imunitu a posílí zánětlivou odpověď (Merino a kol., 2011). Sialostatin L2 a serpin IRIS působí protizánětlivě a tyto proteiny by se také daly využít ve vývoji vakcín proti patogenům přenášeným klíšťaty.

Vakcíny proti klíšťatům zatím využívají tak zvané skryté antigeny (antigeny buněk klíštěcího střeva), nebo imunomodulační molekuly klíštěcích slin. Látky s antihemostatickou aktivitou obsažené ve slinách by též mohly být uvažovány jako základ pro vývoj vakcín. Pokud by klíště neovlivňovalo hemostatický systém hostitele, nezabraňovalo zástavě krvácení a srážení krve, nemohlo by na hostiteli sát, krev hostitele by se srazila a to by pravděpodobně vedlo i k úhynu sajícího klíštěte a zabránilo by to i přenosu jakéhokoliv patogenu. Toto si již vědci uvědomili, antihemostatické látky se přímo nabízí pro výrobu účinné vakcíny. Tak proč zatím žádná taková vakcína nebyla vyvinuta? Na to se nabízí hned několik možných odpovědí. V slinách klíštěte bylo objeveno množství molekul s různou antihemostatickou aktivitou, stejně jako u většiny hematofágních členovců. Proto když by byl hostitel imunizován pouze jednou z těchto látek, nemuselo by to mít žádný, nebo jen velmi malý účinek. Jiné látky by tu, která by ztratila účinnost, funkčně nahradily (Valenzuela a kol., 2001). Byla by možnost imunizovat „koktejlem“ více antihemostatických molekul, ale to je velmi těžko proveditelné. Dalším důvodem, proč tyto látky nejsou využívány pro vývoj vakcín, může být jejich podobnost s látkami vlastními hostiteli. V tomto případě by imunizace nemusela mít vůbec žádný účinek, nebo by naopak mohla vyvolávat autoimunitní komplikace. U mnoha látek je tato podobnost zřejmá. Ixodegriny, které inhibují trombocyty, obsahují RGD doménu (asparagin-glycin-asparagová kyselina). Vitronektin, sérový glykoprotein vázající inhibitor aktivátoru plasminogenu 1 (PAI-1), obsahuje také tuto doménu (Wang a kol., 1996). Ixolaris vykazuje značnou podobnost s TFPI (tissue factor pathway inhibitor). Inhibuje vnější cestu koagulační kaskády vazbou na FX nebo FXa. Rozdíl mezi nimi je ve vazbě na FXa. TFPI se váže na aktivní centrum FXa, ixolaris na vazebné místo pro heparin (Nazareth a kol., 2006). I amblin klíštěte *Amblyomma hebraeum* a pentalaris klíštěte *Ixodes scapularis* jsou velmi podobné TFPI a ixolarisu (Lai a kol., 2004). Protein ze skupiny proteinů „basic tail“ označovaný gi|49286982 má také RGD doménu, jako jiné inhibitory agregace trombocytů (Francischetti a kol., 2009). Serpiny se vyskytují jak u klíšťat, tak u člověka, a i u nich lze nalézt velkou podobnost. Příkladem je

inhibitor aktivátoru plasminogenu 1 (PAI-1), který je také znám jako serpin E1 (Dellas a Loskutoff, 2005). Sialostatin L a sialostatin L2 klišťete *Ixodes scapularis* ze skupiny cystatinů jsou podobné lidským cystatinům typu 2, které se nacházejí ve většině tělních tekutin (Kotsyfakis a kol., 2006). Proto je využití těchto látek na vývoj vakcín velmi problematické.

Mimo výrobu vakcín mohou být látky obsažené v klišťecích slinách využité i k terapii mnohých onemocnění. Variabilin, savignygrin a disagregin se mohou použít místo stávajících inhibitorů glykoproteinu IIb/IIIa, které se využívají při angioplastických zákrocích (perkutánní koronární intervence), při kterých se odstraňují aterosklerotické pláty ze stěn cév. Zabraňují agregaci destiček a tvorbě sraženiny (Karczewski a Connolly, 1997). Kromě toho mohou být použity k léčbě akutního koronárního syndromu, tedy poškození koronárních arterií.

K léčbě poruch srážení krve, nadměrné srážlivosti a tvorbě trombů se dosud používají antikoagulanty jako heparin, hirudin a kumadiny (Montoya a Gajra, 2012). Heparin a jeho deriváty aktivují antitrombin III a tím inaktivují trombin, nebo FXa. Kumariny působí jako antagonisté vitamínu K, snižují tvorbu koagulačních faktorů závislých na vitamínu K. Hirudin je peptid produkovaný pijavicemi (Fields, 1991). V České republice se nepoužívá, protože je poměrně drahý. Proto by se nové léky k ředění krve daly vyrobit na základě klišťecích inhibitorů trombinu nebo FXa, jako je savignin, TAP a FXaI.

Předpokládá se, že protein ixolaris může být účinně využit k léčbě tumorů, obzvláště glioblastomu, nejagresivnějšího mozkového tumoru. Mozkové tumory patří k těm nejhorším, často jsou neoperovatelné, často velmi odolné k ostatním možným terapiím, protože léky špatně přestupují z krve do mozku a navíc mozek má velmi omezenou možnost obnovy a snadno se při zákroku poškodí. Pacienti s těmito tumory mají malé šance na uzdravení, proto by další možnou léčbu uvítali, a pokud by byla alespoň zčásti úspěšná, zachránila by spoustu těch, u nichž ostatní možnosti selhaly. Tyto nádory provází časté tromboembolické příhody a rychlá angiogeneze díky VEGF (vascular endothelial growth factor). Ixolaris inhibuje angiogenezi a tím způsobuje zastavení růstu tumoru, případně i jeho zmenšení. Mimo to zmírňuje prokoagulační stavy i u jiných druhů rakoviny, a zabraňuje tak růstu tumorů a

vzniku metastáz. Nezpůsobuje však větší krvácení, jako mnohé jiné antikoagulanty (Carneiro-Lobo a kol., 2009).

Sialostatin L je schopen silně inhibovat produkci interleukinu 9 (IL-9) T-lymfocyty, konkrétně Th lymfocyty. Tento interleukin může způsobovat astma. Proto se testuje sialostatin L pro případné využití k léčbě astmatu. Zatím není známá žádná terapie, která by astma úplně vyléčila. Současné léky se snaží dlouhodobě ho udržet pod kontrolou. Trvale se užívají protizánětlivé léky a to i v období klidu, aby se předešlo záchvatům a astmatik mohl žít normální život i s tělesnou aktivitou. Při potížích se navíc používají léky na rozšíření průdušek. Po aplikaci sialostatinu L při testech úplně vymizela plicní hyperreaktivita a eozinofilie, což jsou typické známky astmatu, proto je sialostatin slibnou látkou pro vývoj nové terapie astmatu (Horká a kol., 2012).

Další experimentální léčbou astmatu je aplikace proteinu Salp15. Alergické astma je charakteristické odpovědí Th2 buněk a produkcí IgE protilátek. K léčbě této choroby je proto nutné kontrolovat aktivitu těchto buněk. Protein Salp15 působí mimo jiné jako imunomodulační protein, který inhibuje Th buňky a jejich produkci interleukinu 2 (IL-2). U myši imunizovaných Salp15 se výrazně snížily projevy astmatu jako plicní hyperreaktivita a eozinofilie, produkce IgG a IgE protilátek a sekrece IL-2. Tento výzkum prokazuje, že i ektoparazitismus může přispívat k obranyschopnosti organismu a snižovat výskyt alergického astmatu (Paveglio a kol., 2007).

Salp15 má poměrně široké spektrum účinků. Mohl by být také potenciální novou vakcínou proti viru HIV-1, který je velmi infekční s vysokou virulencí. Virus HIV infikuje Th buňky, makrofágy a dendritické buňky. Salp15 se váže na Th buňky, překrývá vazebné místo pro povrchový glykoprotein viru, gp120. Tento glykoprotein slouží k vazbě viru na T buňku a jeho následnému proniknutí dovnitř. Salp15 inhibuje interakci mezi CD4+ a gp120. Mimoto zabraňuje tvorbě mnohojaderných syncytií mezi HL2/3 (linie HeLa buněk exprimující gp120) a buňkami s CD4+ (Juncadella a kol., 2008).

Mnoho látek z klišťecích slin může být užitečných při vývoji vakcín a léků. Lze jimi nahradit stávající léky na poruchy srážení krve, trombózy, ale i vytvořit nové léky na prozatím neléčitelné choroby. Přibývá civilizačních chorob, za které lze považovat alergie,

aterosklerózy, kardiovaskulární choroby i astma. Stále více lidí umírá na zhoubné nádory a AIDS. Proto jsou nové léky a vakcíny nutné.

## 6. Závěr

- Klíšťata vyvinula řadu mechanismů, kterými ovlivňují hemostázu hostitele na různých úrovních. Působí proti agregaci trombocytům i plasmatické složce koagulačního systému.
- Klíštěcí sliny obsahují mnoho molekul s antihemostatickou aktivitou.
- Velké množství molekul a jejich působení na různé složky hemostatického systému má své opodstatnění. Potlačení jednoho obranného mechanismu může být kompenzováno jiným mechanismem.
- Některé z klíštěcích molekul s antihemostatickou aktivitou by mohly být využity k výrobě vakcín. Pokud by klíště nemohlo ovlivňovat hemostázu vakcinovaného hostitele, krev by se srazila a klíště by uhynulo.
- Výroba takovýchto vakcín je problematická. Klíšťata mají antihemostatických molekul mnoho, proto vakcinace jednou z nich nezabrání těm ostatním ovlivňovat hemostázu hostitele. Dalším důvodem může být podobnost těchto molekul s proteiny hostitele. Vakcína by buď neúčinkovala, nebo mohla vyvolat autoimunitu.
- Některé klíštěcí antihemostatické molekuly mohou být využity k léčbě poruch koagulace (například nadměrná srážlivost) a mnoha jiných nemocí.



## 7. Literatura

- Adams M (2012): Tissue factor pathway inhibitor: new insights into an old inhibitor. *Seminars in Thrombosis and Haemostasis*, 38, 129-134.
- Alekseev AN, Arumova EA, Vasilieva IS (1995): *Borrelia burgdorferi* sensu lato in female cement plug of *Ixodes persulcatus* ticks (Acari, Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*, 19, 519-522.
- Alekseev AN, Burenkova LA, Podboronov VM, Chunikhin SP (1995): Bacteriocidal qualities of ixodid tick (Acarina: Ixodidae) salivary cement plugs and their changes under the influence of a viral tick-borne pathogen. *Journal of Medical Entomology*, 32, 578-582.
- Alekseev AN, Burenkova LA, Vasilieva IS, Dubinina HV, Chunikhin SP (1996): Preliminary studies on virus and spirochete accumulation in the cement plug of ixodid ticks. *Experimental and Applied Acarology*, 20, 713-723.
- Andersen JF, Hinnebusch BJ, Lucas DA, Conrads TP, Veenstra TD, Pham VM, Ribeiro JM (2007): An insight into the sialome of the oriental rat flea, *Xenopsylla cheopis* (Rots). *BMC Genomics*, 8, 102.
- Andersen JF, Francischetti IM, Valenzuela JG, Schuck P, Ribeiro JM (2003): Inhibition of hemostasis by a high affinity biogenic amine-binding protein from the saliva of a blood-feeding insect. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 4611-4617.
- Anderson JM, Oliveira F, Kamhawi S, Mans BJ, Reynoso D, Seitz AE, Lawyer P, Garfield M, Pham VM, Valenzuela JG (2006): Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. *BMC Genomics*, 7, 52.
- Arca B, Lombardo F, Francischetti IM, Pham VM, Mestres-Simon M, Andersen JF, Ribeiro JM (2007): An insight into the sialome of the adult female mosquito *Aedes albopictus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37, 107-127.
- Arca B, Lombardo F, Valenzuela JG, Francischetti IM, Marinotti O, Coluzzi M, Ribeiro JM (2005): An updated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Anopheles gambiae*. *Journal of Experimental Biology*, 208, 3971-3986.
- Arolas JL, Lorenzo J, Rovira A, Castella J, Aviles FX, Sommerhoff CP (2005): A carboxypeptidase inhibitor from the tick *Rhipicephalus bursa*: isolation, cDNA cloning, recombinant expression and characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 3441-3448.

- Calvete JJ (1994): Clues for understanding the structure and function of a prototypic human integrin: the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex. *Thrombosis and Haemostasis*, 72, 1-15.
- Calvo E, Andersen JF, Francischetti IM, del Capurro M, deBianchi AG, James AA, Ribeiro JM, Marinotti O (2004): The transcriptome of adult female *Anopheles darlingi* salivary glands. *Insect Molecular Biology*, 13, 73-88.
- Calvo E, Mans BJ, Andersen JF, Ribeiro JM (2006): Function and evolution of a mosquito salivary protein family. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 1935-1942.
- Calvo E, Dao A, Pham VM, Ribeiro JM (2007): An insight into the sialome of *Anopheles funestus* reveals an emerging pattern in anopheline salivary protein families. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37, 164-175.
- Campbell CL, Vandyke KA, Letchworth GJ, Drolet BS, Hanekamp T, Wilson WC (2005): Midgut and salivary gland transcriptomes of the arbovirus vector *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae). *Insect Molecular Biology*, 14, 121-136.
- Carneiro-Lobo TC, Konig S, Machado DE, Nasciutti LE, Forni MF, Francischetti IM, Sogayar MC, Monteiro RQ (2009): Ixolaris, a tissue factor inhibitor, blocks primary tumor growth and angiogenesis in a glioblastoma model. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7(11), 1855-1864.
- Cesarman-Maus G, Hajjar KA (2005): Molecular mechanism of fibrinolysis. *British Journal of haematology*, 129, 307-321.
- Charlab R, Valenzuela JG, Rowton ED, Ribeiro JM (1999): Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 96, 15155-15160.
- Champagne DE, Smartt CT, Ribeiro JM, James AA (1995): The salivary gland-specific apyrase of the mosquito *Aedes aegypti* is a member of the 5'-nucleotidase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 694-698.
- Cheng Y, Wu H, Li D (1999): An inhibitor selective for collagen-stimulated platelet aggregation from the salivary glands of hard tick *Haemaphysalis longicornis* and its mechanism of action. *Science in China. Series C, Life Sciences/Chinese Academy of Science*, 42, 457-464.

- Collen D, Lijnen HR (2005): Thrombolytic agents. *Thrombosis and Haemostasis*, 93, 627-630.
- Colman RW, Schmaier AH (1997): Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive and proinflammatory attributes. *Blood*, 90, 3819-3843.
- Clyman RI, Mauray F, Roman C, Rudolph AM (1978): PGE<sub>2</sub> is a more potent vasodilator of the lamb ductus arteriosus than is either PGI<sub>2</sub> or 6 keto PGF<sub>1</sub>alpha. *Prostaglandins*, 16, 259-264.
- Dai J, Liu J, Deng Y, Smith TM, Lu M (2004): Structure and protein design of a human platelet function inhibitor. *Cell*, 116, 649-659.
- Dai J, Wang P, Adusumilli S, Booth CJ, Narasimhan S, Anquita J, Fikrig E (2009): Antibodies against a tick protein, Salp15, protect mice from the Lyme disease agent. *Cell host & Microbe*, 6(5), 482-492.
- Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W (1991): The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulativ. *Biochemistry*, 30, 10363-10370.
- Dellas C, Loskutoff DJ (2005): Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease. *Thrombosis and Haemostasis*, 93, 631-640
- Estmon CT: The protein C pathway. *Chest*, 124, 26S-33S.
- Fezza F, Dillwith JW, Bisogno T, Tucker JS, Di Marzo V, Sauer JR (2003): Endocannabinoids and related fatty acid amides, and their regulativ, in the solivary glands of the lone star tick. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1633, 61-67.
- Fields WS (1991): The history of leeching and hirudin. *Haemostasis*, 21, 3-10.
- Faudry E, Lozzi SP, Santana JM, D'Souza-Ault M, Kieffer S, Felix CR, Ricart CA, Sousa MV, Vernet T, Teixeira AR (2004): *Triatoma infestans* apyrases belong to the 5'-nucleotidase family. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 19607-19613.
- Francischetti IM, Valenzuela JG, Ribeiro JM (1999): Anophelin: kinetics and mechanism of thrombin inhibition. *Biochemistry*, 38, 16678-16685.
- Francischetti IM, Mather TN, Ribeiro JM (2003): Cloning of a salivary gland metalloprotease and characterization of gelatinase and fibrin(ogen)lytic activities in the saliva of the Lyme dinase tick vector *Ixodes scapularis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 305, 869-875.

- Francischetti IM, Mather TN, Ribeiro JM (2004): Penthalaris, a novel recombinant five-Kunitz tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick vector of Lyme disease, *Ixodes scapularis*. *Thrombosis and Haemostasis*, 91, 886-898.
- Francischetti IM, Mather TN, Ribeiro JM (2005): Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Thrombosis and Haemostasis*, 94, 167-174.
- Francischetti IM, My Pham V, Mans BJ, Andersen JF, Mather TN, Lane RS, Ribeiro JM (2005): The transcriptome of the salivary gland of the fiale western black-legged tick *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 1142-1161.
- Francischetti IM, Ribeiro JM, Champagne D, Andersen J (2000): Purification, cloning, expression, and mechanism of action of a novel platelet aggregation inhibitor from the salivary gland of the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 12639-12650.
- Francischetti IM, Valenzuela JG, Andersen JF, Mather TN, Ribeiro JM (2002): Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood*, 99, 3602-3612.
- Francischetti IM, Sa-Nunes A, Mans BJ, Santos IM, Ribeiro JM (2009): The role of saliva in tick feeding. *Frontiers of Bioscience: a Journal and Virtual Library*, 14, 2051-2088.
- Gachet C, Hechler B, Leon C, Vial C, Leray C, Ohlmann P, Cazenave JP (1997): Activation of ADP receptors and platelet function. *Thrombosis and Haemostasis* 78, 271-275.
- Grigor'eva LA (2002): Histopathological changes in lizard skin (*Reptilia: Lacertidae*) in feeding places of tick of the genus *Ixodes* (Acari: Ixodidae). *Parazitologiya*, 36, 375-378.
- Hansen JE, Lund O, Tolstrup N, Gooley AA, Williams KL, Brunak S (1998): NetOglyc: prediction of mucin type O-glycosilation sites based on sequence kontekst and surface accessibility. *Glycoconjugate Journal*, 15, 115-130.

- Harnnoi T, Sakaguchi T, Nishikawa Y, Xuan X, Fujisaki K (2007): Molecular characterization and komparative study of 6 salivary gland metalloproteases from the hard tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, part B, Biochemistry and Molecular Biology*, 147, 93-101.
- Hoogstraal H (1956): African Ixodidea. I. Ticks of the Sudan (with special reference to Equatoria Province and with preliminary reviews of the genera *Boophilus*, *Margaropus*, and *Hyalomma*). Research report NM 005 050.29.07, Department of the Navy, 1101.
- Horká H, Staudt V, Klein M, Taube C, Reuter S, Dehzad N, Andersen JF, Kopecký J, Schild H, Kotsyfakis M, Hoffmann M, Gerlitzki B, Stassen M, Bopp T, Schmitt E (2012): The tick salivary protein sialostatin L inhibits the Th9-derived production of the asthma-promoting cytokine IL-9 and is effective in the prevention of experimental asthma. *Journal of Immunology*, 188, 2669-2676.
- Isawa H, Yuda M, Yoneda K, Chinzei Y (2000): The insect salivary protein, prolixin-S, inhibits factor IXa generation and Xase complex formation in the blood coagulation pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 6636-6641.
- Iwanaga S, Okada M, Isawa H, Morita A, Yuda M, Chinzei Y (2003): Identification and characterization of novel salivary thrombin inhibitors from the ixodidae tick, *Haemaphysalis longicornis*. *European Journal of Biochemistry*, 270, 1926-1934.
- Juncadella IJ, Garg R, Bates TC, Olivera ER, Anquita J (2008): The *Ixodes scapularis* salivary protein, salp15, prevents the association of HIV-1 gp120 and CD4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 367, 41-46.
- Karczewski J, Connolly TM (1997): The interaction of disagregin with the platelet fibrinogen receptor, glycoprotein IIb-IIIa. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 241, 744-748.
- Karczewski J, Endris RG, Connolly TM (1994): Disagregin is a fibrinogen receptor antagonist lacking Arg-Gly-Asp sequence from the tick *Ornithodoros moubata*. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 6702-6708.
- Karczewski J, Waxman L, Endris RG, Connolly TM (1995): An inhibitor from the argasid tick *Ornithodoros moubata* of cell adhesion to collagen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 208, 532-541.

- Kazimirova M, Jancinova V, Petrikova M, Takac P, Labuda M, Nosal R (2002): An inhibitor of thrombin-stimulated blood platelet aggregation from the salivary gland of the hard tick *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*, 28, 97-105.
- Koh CY, Kazimirova M, Trimnell A, Takac P, Labuda M, Nuttall P, Kini RM (2007): Variegin, a novel class of fast and tight-binding thrombin inhibitor from the tropical bont tick. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 29101-29113.
- Kotsyfakis M, Karim S, Andersen JF, Mather TN, Ribeiro JM (2007): Selective cysteine protease inhibition contributes to blood-feeding access of the tick *Ixodes scapularis*. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 29256-29263.
- Kotsyfakis M, Sa-Nunes A, Francischetti IM, Mather TN, Andersen JF, Ribeiro JM (2006): Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 26298-26307.
- Lai R, Takeuchi H, Jonczy J, Rees HH, Turner PC (2004): A thrombin inhibitor from the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. *Gene*, 342, 243-249.
- Law JH, Ribeiro JM, Wells MA (1992): Biochemical insights derived from insect diversity. *Annual Review of Biochemistry*, 64, 87-111.
- Lombardo F, Di Cristina M, Spanos L, Louis C, Coluzzi M, Arca B (2000): Promoter sequences of the putative *Anopheles gambiae* apyrase confer salivary gland expression in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 23861-23868.
- Macedo-Ribeiro S, Almeida C, Calisto BM, Friedrich T, Mentele R, Stürzebecher J, Fuentes-Prior P, Pereira PJ (2008): Isolation, cloning and structural characterisation of boophilin, a multifunctional Kunitz-type proteinase inhibitor from the cattle tick. *PLoS One*, 3, e1624.
- Mans BJ, Louw AI, Gaspar ARMD, Neitz AW (1998a): Apyrase activity and platelet aggregation inhibitors in the tick *Ornithodoros savignyi*. *Experimental and Applied Acarology*, 22, 353-366.
- Mans BJ, Louw AI, Gaspar ARMD, Neitz AW (1998b): Purification and characterization of apyrase from the tick, *Ornithodoros savignyi*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, B120, 617-624.

- Mans BJ, Coetzee J, Louw AI, Gaspar AR, Neitz AW (2000): Dissaggregation of aggregated platelets by apyrase from the tick, *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Experimental and Applied Acarology*, 24, 271-282.
- Mans BJ, Venter JD, Vrey PJ, Louw AI, Neitz AW (2001): Identification of putative proteins involved in granule biogenesis of tick salivary glands. *Electrophoresis*, 22, 1739-1746.
- Mans BJ, Louw AI, Neitz AW (2002b): Savignygrin, a platelet aggregation inhibitor from the soft tick *Ornithodoros savignyi*, presents the RGD integrin recognition motif on the Kunitz BPTI-fold. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 21371-21378.
- Mans BJ, Louw AI, Neitz AW (2002c): Dissaggregation of aggregated platelets by savignygrin, a  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 antagonist from *Ornithodoros savignyi*. *Experimental and Applied Acarology*, 27, 231-239.
- Mans BJ, Louw AI, Neitz AW (2002d): Amino acid sequence and structure modeling of savignin, a thrombin inhibitor from the tick *Ornithodoros savignyi*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32, 821-828.
- Mans BJ, Steinmann CM, Venter JD, Louw AI, Neitz AW (2002e): Pathogenic mechanisms of sand tampan toxicoses induced by the tick, *Ornithodoros savignyi*. *Toxicon*, 40, 1007-1016.
- Mans BJ, Louw AI, Neitz AW (2003b): The major tick salivary gland proteins and toxins from the soft tick, *Ornithodoros savignyi*, are part of the tick lipocalin family: implications for the origins of tick toxicoses. *Molecular Biology and Evolution*, 20, 1158-1167.
- Merino O, Almazán C, Canales M, Villar M, Moreno-Cid JA, Galindo RC, de la Fuente J (2011): Targeting the tick protective antigen subolesin reduces vector infestations and pathogen infection by *Anaplasma marginale* and *Babesia bigemina*. *Vaccine*, 29, 8575-8579.
- Monteiro RQ, Rezaie AR, Ribeiro JM, Francischetti IM (2004): Ixolaris: A factor Xa heparin binding exosite inhibitor. *Biochemical Journal*, 387, 871-877.
- Montoya RC, Gajra A (2012): Current status of new anticoagulants in the management of venous thromboembolism. *Advances in Hematology*, 2012, 856341.

- Morita A, Isawa H, Orito Y, Iwanaga S, Chinzei Y, Yuda M (2006): Identification and characterization of a collagen-induced platelet aggregation inhibitor, triplatin, from salivary glands of the assassin bug, *Triatoma infestans*. *FEBS Journal*, 273, 2955-2962.
- Mosnier LO, Bouma BN (2006): Regulation of fibrinolysis by thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, an unstable carboxypeptidase B that unites the pathways of coagulation and fibrinolysis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 26, 2445-2453.
- Nakahata N (2008): Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacology and Therapeutics*, 118, 18-35.
- Narasimhan S, Koski RA, Beaulieu B, Anderson JF, Ramamoorthi N, Kantor F, Cappello M, Fikrig E (2002): A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*. *Insect Molecular Biology*, 11, 641-650.
- Narasimhan S, Montgomery RR, Deponte K, Tschudi C, Marcantonio N, Anderson JF, Sauer JR, Cappello M, Kantor FS, Fikrig E (2004): Disruption of *Ixodes scapularis* anticoagulation by using RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 1141-1146.
- Nazareth RA, Tomaz LS, Ortiz-Costa S, Atella GC, Ribeiro JM, Francischetti IM, Monteiro RQ (2006): Antithrombotic properties of Ixolaris, a potent inhibitor of extrinsic pathway of the coagulation cascade. *Thrombosis and Haemostasis*, 96, 7-13.
- Nobile M, Noceti F, Prestipino G, Possani LD (1996): Helothermine, a lizard venom toxin, inhibits calcium current in cerebellar granules. *Experimental Brain Research*, 110, 15-20.
- Noeske-Jungblut C, Krätzschar J, Haendler B, Alagon A, Possani L, Verhallen P, Donner P, Schleuning WD (1994): An inhibitor of collagen-induced platelet aggregation from the saliva of *Triatoma pallidipennis*. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 5050-5053.
- Norel X (2007): Prostanoid receptors in the human vascular wall. *The Scientific World Journal*, 7, 1359-1374.
- Paesen GC, Adams PL, Harlos K, Nuttall PA, Stuart DI (1999): Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and free-dimensional structure. *Molecular Cell* 3, 661-671.



- Paesen GC, Adams PL, Nuttall PA, Stuart DI (2000): Tick histamine-binding proteins: lipocalins with a second binding cavity. *Biochimica Biophysica Acta*, 1482, 92-101.
- Paveglione SA, Allard J, Mayette J, Whittaker LA, Juncadella I, Anquita J, Poynter ME (2007): The tick salivary protein, Salp15, inhibits the development of experimental asthma. *Journal of Immunology*, 178, 7064-7071.
- Plow EF, Cerniewski CS, Xiao Z, Haas TA, Byzova TV (2001): AlphaIIb beta3 and its antagonism at the new millennium. *Thrombosis and Haemostasis*, 86, 34-40.
- Prevot PP, Adam B, Boudjeltia KZ, Brossard M, Lins L, Cauchie P, Brasseur R, Vanhaeverbeek M, Vanhamme L, Godfroid E (2006): Anti-hemostatic effect of a serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 26361-26369.
- Ramamoorthi N, Narasimhan S, Pal U, Bao F, Yang XF, Fish D, Anquita J, Norgard MV, Kantor FS, Anderson JF, Koski RA, Fikrig E (2005): The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature*, 436, 573-577.
- Rezaie AR (2000): Heparin-binding exosite of factor Xa. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 10, 333-338.
- Ribeiro JM, Schneider M, Guimarães JA (1995): Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Biochemical Journal*, 308, 243-249.
- Ribeiro JM, Alarcon-Chaidez F, Francischetti IM, Mans BJ, Mather TN, Valenzuela JG, Wikel SK (2006): An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36, 111-129.
- Ribeiro JM, Arca B, Lombardo F, Calvo E, Pham VM, Chandra PK, Wikel SK (2007): An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Aedes aegypti*. *BMC Genomics*, 8, 6.
- Ribeiro JM, Schneider M, Guimaraes JA (1995): Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Biochemical Journal*, 308, 243-249.
- Ribeiro JM, Makoul G, Levine J, Robinson D, Spielman A (1985): Antihemostatic, autoinflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of a tick *Ixodes dammini*. *Journal of Experimental Medicine*, 161, 332-344.

- Ribeiro JM, Endris TM, Endris R (1991): Saliva of the soft tick *Ornithodoros moubata* contains anti-platelet and apyrase activity. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100A, 109-112.
- Sa-Nunes A, Bafica A, Lucas DA, Conrads TP, Veenstra TD, Andersen JF, Mather TN, Ribeiro JM, Francischetti IM (2007): Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in *Ixodes scapularis* saliva. *Journal of Immunology*, 179, 1497-1505.
- Shattil SJ, Gao J, Kashiwagi H (1997): Not just another pretty face: regulation of platelet function at the cytoplasmic face of integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . *Thrombosis and Haemostasis*, 78, 220-225.
- Singh SK, Girschick HJ (2003): Tick-host interactions and their immunological implications in tick-borne diseases. *Current Science*, 85, 1284-1298.
- Stark KR, James AA (1998): Isolation and characterization of the gene encoding a novel factor Xa-directed anticoagulant from the Yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 1301-1311.
- Stark KM, James AA (1996): Salivary gland anticoagulants in culicine and anopheline mosquitoes (*Diptera: Culicidae*). *Journal of Medical Entomology*, 33, 645-650.
- Trimnell AR, Davies GM, Lissina O, Hails RS, Nuttall PA (2005): A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick valine. *Vaccine*, 23, 4329-4341.
- Valenzuela JG, Belkaid Y, Garfield MK, Mendez S, Kamhawi S, Rowton ED, Sacks DL, Ribeiro JM (2001): Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *Journal of Experimental Medicine*, 194, 331-342.
- Valenzuela JG, Belkaid Y, Rowton E, Ribeiro JM (2001): The salivary apyrase of the blood sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel *Cimex* family of apyrases. *Journal of Experimental Biology*, 204, 229-237.
- Valenzuela JG, Charlab R, Galperin MY, Ribeiro JM (1998): Purification, cloning, and expression of an apyrase from the bed bug *Cimex lectularius*. A new type of nucleotide-binding enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 30583-30590.
- van de Locht A, Stubbs MT, Bode W, Friedrich T, Bollschweiler C, Hoffken W, Huber R (1996): The ornithodorin-thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma? *EMBO Journal*, 15, 6011-6017.

- Wang X, B. CL, Taylor DB, Stevens SE, Gartner TK (1996): Variabilin, a novel RGD-containing antagonist of glycoprotein IIb-IIIa and platelet aggregation inhibitor from the hard tick *Dermacentor variabilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 17785-17790.
- Waxman L, Connolly TM (1993): Isolation of an inhibitor selective for collagen-stimulated platelet aggregation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Journal of Biological Chemistry* 268, 5445-5449.
- Waxman L, Smith DE, Arcuri KE, Vlasuk GP (1990): Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation Factor Xa. *Science*, 248, 593-596.
- Xu X, Yang H, Ma D, Wu J, Wang Y, Song Y, Wang X, Lu Y, Yang J, Lai R (2008): Toward an understanding of the molecular mechanism for successful blood feeding by coupling proteomics analysis with pharmacological testing of horsefly salivary glands. *Molecular and Cellular Proteomics*, 7, 582-590.