

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Zavedení a optimalizace *in vivo* modelů zánětu a
jejich využití pro funkční analýzu inhibitorů
proteáz z klíčecích slin**

Diplomová práce

Bc. Adéla Chlastáková

Školitel: RNDr. Jindřich Chmelař, Ph.D.

České Budějovice 2016

Chlastáková, A., 2016: Zavedení a optimalizace *in vivo* modelů zánětu a jejich využití pro funkční analýzu inhibitorů proteáz z klíštěcích slin. [Establishment and optimization of *in vivo* models of inflammation and their use for functional analysis of tick salivary protease inhibitors. Mgr. Thesis, in Czech.] – 81 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Two murine models of acute inflammation, namely thioglycollate-induced peritonitis and carrageenan-induced paw edema, were optimized using non-steroidal anti-inflammatory drug indomethacin and corticosteroid dexamethasone. During the optimization phase, the presence of neutrophils, monocytes, macrophages, eosinophils, B cells and T cells in the peritoneal cavity at various time points after injection of thioglycollate medium was assessed via multicolor flow cytometry. Moreover, two different thioglycollate media (suppliers BD and Sigma-Aldrich) were compared for their ability to induce an inflammatory response. The optimization of thioglycollate-induced peritonitis and carrageenan-induced paw edema was followed by the evaluation of the anti-inflammatory activity of *Ixodes ricinus* cystatins G1 and G9 in both mouse models.

Prohlašuji, že svoji diplomovou 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 diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich 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 14. 12. 2016

.....
Adéla Chlastáková

Poděkování

Předně bych ráda poděkovala svému školiteli, RNDr. Jindřichu Chmelařovi, Ph.D., za zadání zajímavého tématu diplomové práce, seznámení s jednotlivými *in vivo* experimenty, asistenci při některých pokusech, připomínky při sepisování této práce a obecně za vstřícnost a ochotu kdykoli poradit či jinak pomoci. Za příležitostnou asistenci při „měření paciček“ taktéž děkuji Mgr. Janu Kotálovi. Všem lidem, na které jsem nepřetržitě narážela v laboratoři, děkuji za vytvoření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě patří velké poděkování mé rodině za jejich toleranci a podporu v průběhu mého studia.

OBSAH

1. ÚVOD	1
1.1. Klíšťata	1
1.1.1. Klíšťe obecné (<i>Ixodes ricinus</i>)	2
1.2. Účinky klíšťecích slin	3
1.2.1. Vliv klíšťecích slin a jejich složek na vybrané buňky přirozené imunity	4
1.2.1.1. Neutrofilní granulocyty	5
1.2.1.2. Makrofágy	6
1.2.1.3. Eosinofilní granulocyty	6
1.3. Cysteinové proteázy	7
1.3.1. Cysteinové katepsiny	7
1.4. Cystatiny	10
1.4.1. Cystatiny klíšťat	10
1.4.1.1. Sialostatin L	11
1.4.1.2. Sialostatin L2	12
1.5. Peritonitida navozená aplikací thioglykolátového média	12
1.5.1. Buňky myeloidní linie přítomné v peritoneální dutině myši v průběhu peritonitidy	13
1.5.1.1. Rezidentní makrofágy	13
1.5.1.2. Neutrofilní granulocyty	13
1.5.1.3. Monocyty	14
1.5.1.4. Zánětlivé makrofágy	14
1.5.1.5. Eosinofilní granulocyty	15
1.6. Otok tlapek vyvolaný podáním karagenanu	15
1.6.1. Průběh otoku tlapek	15
1.6.2. Imunitní mechanismy zahrnuté v otoku tlapek	16
1.6.2.1. Histamin, serotonin, bradykinin a prostaglandiny	16
1.6.2.2. Oxid dusnatý	17
1.6.2.3. Neutrofilní granulocyty	17
2. CÍLE PRÁCE	18
3. MATERIÁL A METODY	19

3.1. Výčet chemikálií a protilátek	19
3.2. Myši	20
3.3. Indometacin	21
3.4. Dexametazon	21
3.5. Cystatiny G1, G2, G9	21
3.6. Peritonitida navozená aplikací thioglykolátového média	22
3.6.1. Thioglykolátové médium.....	22
3.6.2. Navození peritonitidy	22
3.6.3. Peritoneální laváž	23
3.6.4. Zpracování buněk a jejich počítání.....	23
3.6.5. Průtoková cytometrie.....	24
3.7. Otok tlapek vyvolaný podáním karagenanu	26
3.8. Statistické vyhodnocení dat	26
4. VÝSLEDKY	27
4.1. Peritonitida navozená aplikací thioglykolátového média	27
4.1.1. „Gating“ strategie	27
4.1.2. Dynamika výskytu buněčných populací v peritoneálních dutinách myší v různých časových intervalech po podání TGM 1 nebo TGM 2	27
4.1.2.1. Počet živých buněk.....	27
4.1.2.2. Neutrofilní granulocyty	30
4.1.2.3. Monocyty	31
4.1.2.4. Makrofágy	33
4.1.2.5. Eosinofilní granulocyty	34
4.1.2.6. B lymfocyty.....	35
4.1.2.7. T lymfocyty	36
4.1.3. Optimalizace dávky thioglykolátového média	38
4.1.4. Testování cystatinů G1 a G9	41
4.2. Otok tlapek vyvolaný podáním karagenanu	43
4.2.1. Optimalizace.....	43
4.2.2. Testování cystatinů G1 a G9	45
5. DISKUSE	48
5.1. Peritonitida navozená aplikací thioglykolátového média	48

5.1.1.	Dynamika výskytu buněčných populací v peritoneálních dutinách myší v různých časových intervalech po podání TGM 1 nebo TGM 2	48
5.1.1.1.	Buněčné populace v peritoneálních dutinách nestimulovaných TGM.....	48
5.1.1.2.	Rezidentní makrofágy	48
5.1.1.3.	Neutrofilní granulocyty, monocyty a zánětlivé makrofágy	48
5.1.1.4.	Eosinofilní granulocyty	49
5.1.1.5.	Lymfocyty	50
5.1.1.6.	Thioglykolátová média.....	51
5.1.2.	Optimalizace dávky thioglykolátového média	51
5.1.2.1.	Indometacin a neutrofilny	52
5.1.2.2.	Indometacin a monocyty	52
5.1.2.3.	Indometacin a eosinofily	53
5.1.2.4.	Dexametazon a neutrofilny	53
5.1.2.5.	Dexametazon a monocyty	54
5.1.2.6.	Dexametazon a eosinofily	54
5.1.3.	Testování cystatinů G1 a G9	54
5.2.	Otok tlapek vyvolaný podáním karagenanu	56
5.2.1.	Optimalizace.....	56
5.2.1.1.	Průběh otoku tlapek.....	56
5.2.1.2.	Vliv indometacinu na otok tlapek	56
5.2.1.3.	Vliv dexametazonu na otok tlapek	57
5.2.2.	Testování cystatinů G1 a G9	58
6.	ZÁVĚR.....	59
6.1.	Peritonitida navozená aplikací thioglykolátového média.....	59
6.2.	Otok tlapek vyvolaný podáním karagenanu	60
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	61
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	64
9.	PŘÍLOHY	78
9.1.	Příloha 1.....	78
9.2.	Příloha 2.....	80
9.3.	Příloha 3.....	81

1. ÚVOD

1.1. KLÍŠŤATA

Klíšťata jsou krevsající, obligátní ektoparazité obojživelníků, plazů, ptáků a savců (Black a Piesman 1994). Po komárech jsou druhými nejvýznamnějšími přenašeči lidských onemocnění. Klíšťata náleží do kmene členovci (Arthropoda), podkmene klepítkatci (Chelicerata), třídy pavoukovci (Arachnida), podtřídy roztoči (Acari), řádu Parasitiformes a podřádu klíšťatovci (Ixodida) (Nava et al. 2009). Podřád klíšťatovci zahrnuje 3 čeledi: klíšťákovité (Argasidae, „měkká“ klíšťata), klíšťatovité (Ixodidae, „tvrdá“ klíšťata) a Nuttalliellidae (Black a Piesman 1994). Do čeledi Nuttalliellidae patří jediný druh, který sdílí znaky jak klíšťákovitých, tak klíšťatovitých (Mans et al. 2011).

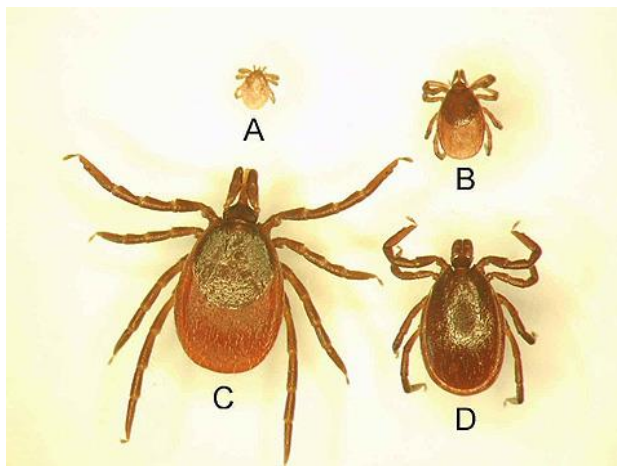
Pro klíšťatovité je typická přítomnost chitinizovaného hřbetního štítku. Klíšťákovití hřbetní štítek postrádají (Nava et al. 2009). Klíšťákovití a klíšťatovití se taktéž liší ve způsobu příjmu krve. Klíšťatovití sají na hostiteli po dlouhou dobu (několik dní až týdnů), přičemž nasají více než stonásobek své tělesné hmotnosti. Přijatou krev zahušťují sekrecí nadbytečné vody zpět do hostitele přes slinné žlázy. Klíšťákovití naopak sají velmi rychle, v řádech minut až hodin. Obecně jsou schopni nasát množství krve odpovídající dvou až desetinásobku jejich počáteční tělesné hmotnosti. Nadbytečnou tekutinu vylučují koxálními žlázami (Mans et al. 2011).

Čeď Ixodidae se dále dělí na dvě hlavní morfologické a fylogenetické skupiny – Prostriata a Metastriata. Do skupiny Metastriata spadají 4 podčeledi: Amblyomminae, Haemaphysalinae, Rhipicephalinae a Bothriocrotoninae. Skupina Prostriata zahrnuje pouze podčeď Ixodinae s jediným rodem *Ixodes* (Black a Piesman 1994, Klompen et al. 2002).

Zástupci rodu *Ixodes* jsou rozšířeni po celém světě, včetně Antarktidy. Z hlediska přenosu lidských nemocí jsou obzvláště významné 4 druhy: *Ixodes scapularis* na východě Severní Ameriky, *I. ricinus* v Evropě a západní Asii, *I. persulcatus* v severovýchodní Evropě a severní Asii, a *I. pacificus* na západě Spojených států (Nicholson et al. 2009).

1.1.1. KLÍŠTĚ OBECNÉ (*IXODES RICINUS*)

I. ricinus je nejběžnějším klíštětem ve střední Evropě (Overzier et al. 2013). Životní cyklus klíštěte obecného zahrnuje tři vývojová stádia – larvu, nymfu a dospělého jedince (samce a samici) (obr. 1). Pro larvy a nymfy je sání krve esenciální k přechodu do dalšího vývojového stádia. Pro samice je zase příjem krve nezbytným předpokladem k naklazení vajíček (Estrada-Peña 2015).

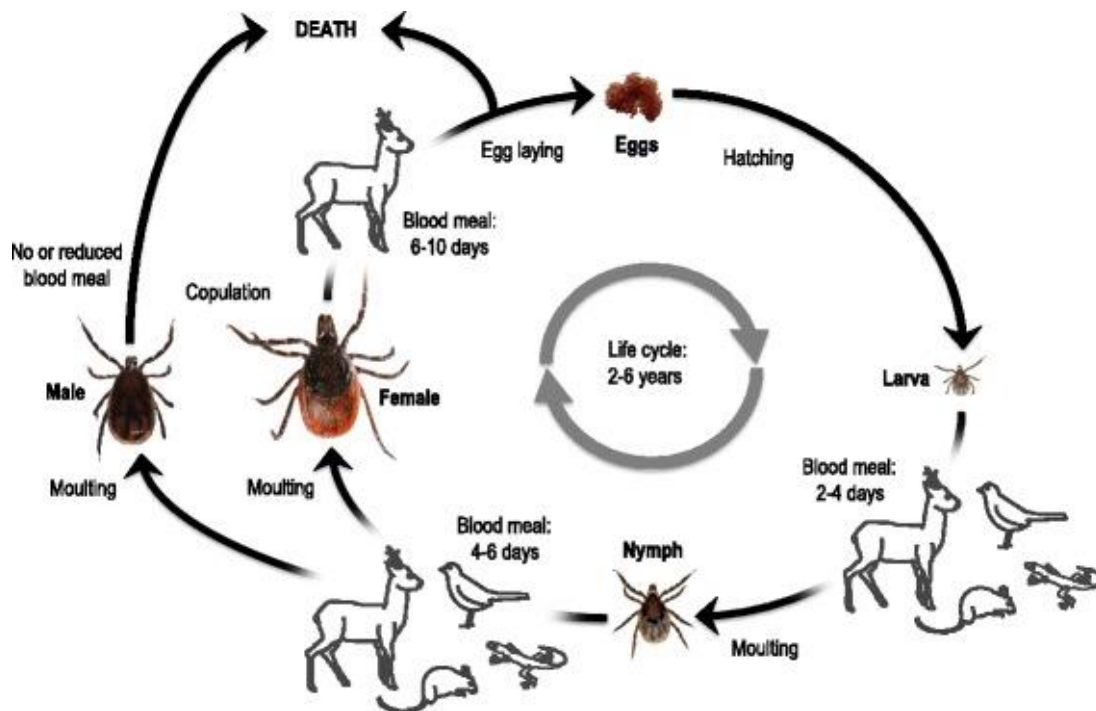


Obr. 1: Vývojová stádia klíštěte obecného: A – šestinohá larva, B – osminohá nymfa, C – samice, D – samec. Obrázek převzat z Siuda a Nowak 2006.

I. ricinus parazituje na více než 300 druzích obratlovců od savců po plazy a ptáky. Vyznačuje se trojhostitelským životním cyklem, což znamená, že každé vývojové stádium saje na jiném hostiteli (obr. 2) (Herrmann a Gern 2015). Larvy a nymfy napadají hostitele všech velikostí, upřednostňují však hlodavce, ptáky a ještěrky (Matuschka et al. 1991, Medlock et al. 2013). Dospělci sají hlavně na větších savcích, například na skotu či vysoké zvěři (Medlock et al. 2013, Overzier et al. 2013).

Klíště obecné obvykle vyčkává na hostitele od února/března do září/října (Herrmann a Gern 2015). Jakmile nalezne na hostiteli vhodné místo k sání, pomocí ozubených chelicer rozřízne pokožku a do vzniklé ranky vsune hypostom (Nuttall a Labuda 2008). Sající klíště peristaltickými pohyby injikuje do hostitele svým ústním ústrojím sliny (Estrada-Peña 2015). S postupující dobou sání se množství vylučovaných slin zvyšuje a slinné žlázy klíštěte prochází rychlou strukturální reorganizací. Velikost slinných žláz i jejich obsah se mohou během sání zvětšit až 25násobně. Jakmile je klíště nasáté a odpadne z hostitele, slinné žlázy podléhají apoptóze (Kazimírová a Štibrániová 2013).

Klíště obecné je vektorem virů, bakterií, rickettsií a prvoků způsobujících onemocnění u lidí i zvířat. Mezi nemoci přenášené tímto druhem klíštěte patří klíšťová encefalitida, lymeská borelióza, lidská granulocytární anaplasmóza, tularémie, rickettsiové skvrnité horečky a babesióza (Medlock et al. 2013).



Obr. 2: Trojhostitelský životní cyklus klíštěte obecného: Z nakladených vajíček se vylíhnou larvy, které aktivně vyčkávají ve vegetaci na hostitele. Po dokončení sání larvy odpadají z hostitele na zem a prochází metamorfózou na nymfy, které následně vyčkávají na dalšího hostitele. Nasáté nymfy odpadají na zem, kde se z nich stávají dospělí jedinci (Estrada-Peña 2015). Sající i nenasáté samice vylučují feromony, kterými lákají samce k páření (Bouman et al. 1999). K páření obvykle dochází na hostiteli. Po spáření a nasátí samice odpadají z hostitele a na chráněná místa na zemi s vysokou vlhkostí vzduchu kladou tisíce vajíček (Estrada-Peña 2015). Obrázek převzat z Herrmann a Gern 2015.

1.2. ÚČINKY KLÍŠTĚCÍCH SLIN

Přisátí klíštěte způsobí narušení pokožky a popraskání krevních vlásečnic. V reakci na mechanické poškození kůže klíštětem by u hostitele za normálních okolností došlo ke konstrikci cév, agregaci krevních destiček, aktivaci koagulační kaskády a k vytvoření zánětlivé odpovědi doprovázené svěděním nebo bolestí. Tyto obranné mechanismy hostitele by narušily sání klíštěte a vedly k jeho rejekci, což by se negativně podepsalo na

životaschopnosti a reprodukčních schopnostech klíštěte (Kazimírová 2008, Francischetti et al. 2009).

Vzdorovat obranné reakci hostitele a dokončit několik dní trvající sání klíštěti umožňuje velký počet bioaktivních proteinů a lipidů obsažených ve slinách s antiagregačními, vazodilatačními, antikoagulačními, protizánětlivými a imunomodulačními účinky. Tyto fyziologicky aktivní složky klíštěcích slin jsou diferenciatně produkovány v průběhu sání, obecně působí redundantně a ve svých účincích jsou pleiotropní (Kazimírová a Štibrániová 2013, Chmelař et al. 2016).

Látky ve slinách klíštěte nejen že umožňují sajícímu klíštěti překonat hemostatickou a imunitní odezvu hostitele, ale taktéž jsou využívány řadou patogenů přenášených klíšťaty k usnadnění přenosu z klíštěte na hostitele a k následné kolonizaci hostitele. Usnadnění přenosu patogenů na hostitele účinkem substancí ve slinách klíštěte se označuje jako slinami asistovaný přenos (SAT) (Nuttall a Labuda 2008). SAT byl poprvé popsán u viru Thogoto (Jones et al. 1987, Jones et al. 1989) a zanedlouho byl zaznamenán i v případě dalších patogenů přenášených klíšťaty včetně spirochét z komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (například Pechová et al. 2002, Zeidner et al. 2002, Macháčková et al. 2006). Prvním identifikovaným SAT faktorem (neboli molekulou ve slinách klíštěte, jež napomáhá přenosu patogenů) je protein Salp15 klíštěte *I. scapularis*. Salp15 se váže na vnější povrchový protein *B. burgdorferi* sensu stricto OspC, čímž chrání spirochétu před destrukcí zprostředkovanou protilátkami hostitele a usnadňuje jí tak kolonizaci hostitele (Ramamoorthi et al. 2005).

1.2.1. VLIV KLÍŠTĚCÍCH SLIN A JEJICH SLOŽEK NA VYBRANÉ BUŇKY PŘIROZENÉ IMUNITY

Rozhraní mezi klíštětem a hostitelem představuje pokožka. Pokožka obsahuje celou řadu buněk včetně keratinocytů, endoteliálních buněk a rezidentních leukocytů. Rezidentní leukocyty zahrnují, mimo jiné, eosinofily, žírné buňky, dendritické buňky a makrofágy. Po přísátí klíštěte se tyto buňky dostávají do bezprostředního kontaktu se slinami či hypostomem, což vyústí v uvolnění prozánětlivých cytokinů a chemokinů, a tudíž i v rekrutaci zánětlivých buněk (např. neutrofilů a monocytů) do místa sání klíštěte (Heinze et al. 2012).

1.2.1.1. NEUTROFILNÍ GRANULOCYTY

Neutrofilní granulocyty jsou prvními buňkami rekrutovanými do místa zánětu (Kruger et al. 2015). Jedná se o vysoce pohyblivé fagocyty. Fagocytované mikroorganismy neutrofilily degradují ve fagolysosomu prostřednictvím produkce reaktivních forem kyslíku (ROS), antimikrobiálních peptidů a proteáz (např. katepsinu G, neutrofilní elastázy a proteinázy 3). Neutrofilily mohou zničit patogeny i bez fagocytózy sekrecí antimikrobiálních faktorů do extracelulárního prostředí (Pham 2006). Nadto bylo zjištěno, že jaderná DNA aktivovaných neutrofilů může být extrudována do mimobuněčného prostoru, kde vytvoří „past“ schopnou zadržet a zabít bakterie (Menten-Dedoyart et al. 2012). Kromě likvidace mikroorganismů neutrofilily během časně fáze infekce produkují řadu chemokinů, kterými rekrutují další typy leukocytů (Scapini et al. 2000).

Neutrofilní granulocyty obvykle infiltrují místo sání klíštěte ve velkém počtu, a to jak během prvního sání, tak i během opakovaných sání klíšťat na téže hostiteli (Brown a Knapp 1980, Brossard a Fivaz 1982, Gill a Walker 1985, Gill 1986, Walker a Fletcher 1986, Heinze et al. 2012).

Extrakty připravené ze slinných žláz klíšťat či přímo konkrétní proteiny v klíštěcích slinách (např. ISL 929, ISL 1373, TSLPI, Salp16 Iper1 a Iper2, Ir-LBP) inhibují migraci neutrofilů buď *in vitro* směrem k chemoatraktantu, nebo *in vivo* do místa sání klíštěte (Hajnická et al. 2001, Beaufays et al. 2008, Peterková et al. 2008, Guo et al. 2009, Schuijt et al. 2011, Hidano et al. 2014). Potlačení migrace neutrofilů lze zčásti přičíst schopnosti komponent klíštěcích slin vázat důležité chemoatraktanty a aktivátory neutrofilů jako jsou IL-8 (Hajnická et al. 2001, Hajnická et al. 2005, Peterková et al. 2008) a leukotrien B₄ (LTB₄) (Beaufays et al. 2008). Proteiny ve slinách klíšťat mohou rekrutaci neutrofilů dále narušit snížením exprese β₂ integrinů na povrchu neutrofilů (Guo et al. 2009) nebo inhibicí aktivace komplementu (Schuijt et al. 2011).

Kromě potlačení migrace neutrofilů mohou klíšťata interferovat i se schopností neutrofilů fagocytovat a zabíjet mikroorganismy (Montgomery et al. 2004, Schuijt et al. 2011). Sliny, extrakty ze slinných žláz (SGE) nebo jednotlivé proteiny klíštěcích slin například redukuje produkci ROS neutrofilily (Guo et al. 2009, Menten-Dedoyart et al. 2012, Hidano et al. 2014).

Složky klíštěcích slin mohou taktéž zkracovat přežívání neutrofilů. Kupříkladu protein ve slinách klíštěte *I. ricinus* Ir-LBP (*Ixodes ricinus* leukotriene B₄-binding protein) vazbou na LTB₄ potlačuje antiapoptický účinek LTB₄ (Beaufays et al. 2008)

1.2.1.2. MAKROFÁGY

Přítomnost monocytů/makrofágů v blízkosti ústního ústrojí klíštěte byla zaznamenána během prvotního i během následných sání klíšťat na též hostiteli (Brown a Knapp 1980, Walker a Fletcher 1986, Guo et al. 2009). Makrofágy sekretují cytokiny a chemokiny, kterými mohou rekrutovat zánětlivé buňky do místa sání klíštěte (Arango Duque a Descoteaux 2014). Též jsou schopné prezentovat antigeny klíštěcích slin lymfocytům, a tak přispívat k vytvoření rezistence vůči opakovaným sáním klíšťat (Nithiuthai a Allen 1985).

Sliny, SGE nebo některé komponenty slin klíšťat inhibují různé prozánětlivé aktivity makrofágů. V první řadě klíšťata svými slinami redukuje produkci oxidu dusnatého (NO) a superoxidu (Urioste et al. 1994, Kopecký a Kuthejlová 1998, Kuthejlová et al. 2001). Dále je účinkem SGE potlačena schopnost makrofágů fagocytovat spirochéty *Borrelia afzelii* (Kýčková a Kopecký 2006). Je pravděpodobné, že právě potlačená produkce NO a superoxidu makrofágy spolu se sníženou schopností makrofágů fagocytovat spirochéty přispívá k pozorovanému zvýšenému přežívání borelií v přítomnosti SGE klíštěte *I. ricinus* (Kuthejlová et al. 2001). Mimoto sliny klíštěte *I. scapularis* a protein Iris (*Ixodes ricinus* immunosuppressor) klíštěte *I. ricinus* inhibují u makrofágů stimulovaných LPS produkci cytokinů IL-6, TNF- α a IL-12p40 a chemokinů IL-8 (Leboulle et al. 2002, Chen et al. 2012).

1.2.1.3. EOSINOFILNÍ GRANULOCYTY

Eosinofily jsou u zdravých jedinců přítomny v nízkém počtu. Ke zvýšení množství eosinofilů v krvi a tkáních však dochází při parazitárních onemocněních a alergických zánětech. Eosinofily sekretují řadu cytokinů, chemokinů, růstových faktorů a lipidových mediátorů zahrnutých v rozvoji i odeznívání zánětlivého procesu a v reparaci tkání (Isobe et al. 2012, Davoine a Lacy 2014).

Eosinofily infiltrují místo sání klíštěte nezávisle na tom, zda klíšťata sají na hostiteli poprvé či opakovaně. Větší počet eosinofilů je nicméně v blízkosti ústního ústrojí klíštěte přítomen v případě opakovaného vystavení hostitele sajícím klíšťatům (Brown a Knapp 1980, Brossard a Fivaz 1982, Gill a Walker 1985, Gill 1986, Walker a Fletcher 1986, Ushio et al. 1995, Krause et al. 2009). Někteří autoři předpokládají, že právě eosinofily společně s basofily a žírnými buňkami přispívají k rejekci klíštěte hostitelem (Gill a Walker 1985).

V současné době neexistuje moc vědeckých studií zabývajících se účinky klíštěcích slin na eosinofily. Nicméně se zdá, že klíšťata mohou prostřednictvím svých slin inhibovat migraci eosinofilů do místa sání. Extrakty ze slinných žláz mnoha druhů klíšťat totiž obsahují

komponenty schopné vázat chemotaktické faktory pro eosinofily jako jsou RANTES (CCL5) a eotaxin (CCL11) (Hajnická et al. 2005, Vančová et al. 2007). Příkladem konkrétního proteinu s antichemokinovou aktivitou je Evasin 4 klíštěte *Rhipicephalus sanguineus*. Tento protein váže a neutralizuje většinu CC chemokinů včetně RANTES a eotaxinů (CCL11, CCL24 a CCL26) (Déruaz et al. 2013).

1.3. CYSTEINOVÉ PROTEÁZY

Proteázy jsou enzymy katalyzující hydrolýzu peptidových vazeb v polypeptidickém řetězci (Perišić Nanut et al. 2014). Dle místa, ve kterém štěpí peptidický řetězec, se proteázy dělí na exopeptidázy a endopeptidázy (Otto a Schirmeister 1997). Exopeptidázy štěpí polypeptidický řetězec na jeho N-konci (aminopeptidázy) nebo C-konci (karboxypeptidázy), kdežto endopeptidázy katalyzují hydrolýzu peptidových vazeb uvnitř polypeptidického řetězce (Perišić Nanut et al. 2014). Proteázy též mohou být rozděleny dle reaktivních skupin přítomných v aktivním místě na, mimo jiné, serinové proteázy, cysteinové proteázy, aspartátové proteázy a metaloproteázy (Grzonka et al. 2001).

Cysteinové proteázy mají ve svých aktivních místech trojici aminokyselin cystein, histidin a asparagin (Verma et al. 2016). Jedná se o proteiny s molekulovou hmotností přibližně 21–30 kDa, jež většinou vykazují nejvyšší hydrolytickou aktivitu při pH 4–6,5 (Grzonka et al. 2001). Aby se předešlo nekontrolované proteolýze, aktivita cysteinových proteáz je regulována na úrovni transkripce, translace, degradace proteinů a aktivace zymogenů. Navíc existují specifické inhibitory cysteinových proteáz (Grzonka et al. 2001, Turk et al. 2012).

Cysteinové proteázy jsou přítomné u virů, bakterií, prvoků, rostlin, hub a savců. Nejdůležitějšími cysteinovými proteázami savců jsou cytoplazmatické kalpainy a lysosomální katepsiny (Otto a Schirmeister 1997).

1.3.1. CYSTEINOVÉ KATEPSINY

Katepsiny patří do největší a nejlépe charakterizované rodiny cysteinových proteáz, C1 rodiny enzymů podobných papainu (Turk et al. 2012). U lidí bylo identifikováno celkem 11 cysteinových katepsinů, a to katepsiny B, C, F, H, K, L, O, S, V, W a X (Verma et al. 2016).

Cysteinové katepsiny jsou zejména endopeptidázy (Fonović a Turk 2014). Liší se mezi sebou expresí i specifitou, což přispívá k jejich rozdílným fyziologickým funkcím (Perišić Nanut et al. 2014). Většina katepsinů je exprimovaná ve všech tkáních, pouze katepsiny K, S, V a W jsou vázány jen na určité typy buněk a tkání (Fonović a Turk 2014). Způsob štěpení substrátu, distribuce a některé funkce jednotlivých cysteinových katepsinů jsou shrnuty v tabulce I.

Katepsiny vyžadují pro dosažení optimální aktivity redukující, mírně kyselé prostředí. Takové podmínky panují například v lysosomech. Proto bylo na cysteinové katepsiny zpočátku nahlíženo jako na vnitrobuněčné enzymy zodpovědné za nescifickou degradaci intracelulárních a extracelulárních proteinů v endosomech a lysosomech (Turk et al. 2012).

Avšak později vyšlo najevo, že katepsiny mohou být za určitých podmínek uvolňovány do cytosolu, translokovány na buněčný povrch nebo sekretovány do mimobuněčného prostoru. Díky tomu se mohou kromě proteolýzy v endosomech a lysosomech účastnit celé řady důležitých fyziologických procesů včetně prezentace antigenů MHC glykoproteiny II. třídy, remodelace kostí, diferenciaci keratinocytů, angiogeneze, apoptózy a aktivace prohormonů a proenzymů. Na druhou stranu zvýšení exprese a aktivity katepsinů se zdá být asociované s rozvojem různých patologických stavů, například kardiovaskulárních chorob, obezity, revmatoidní artritidy, osteoartritidy, periodontitidy, Alzheimerovy choroby a rakoviny. V případě rakoviny hrají katepsiny důležitou roli v progresi a invazi nádorů (Conus a Simon 2010, Turk et al. 2012, Fonović a Turk 2014).

Tab. I: Distribuce, způsob štěpení substrátu a vybrané funkce cysteinových katepsinů.

NÁZEV	ZPŮSOB ŠTĚPENÍ SUBSTRÁTU	DISTRIBUCE	FUNKCE
katepsin B	endopeptidáza karboxydipeptidáza	všudypřítomný	apoptóza zprostředkovaná lysosomy degradace komponent ECM TLR signalizace produkce TNF- α prezentace antigenů MHC II
katepsin C	aminodipeptidáza	všudypřítomný	aktivace serinových proteáz asociovaných s funkcemi NK buněk, cytotoxických T lymfocytů, žírných buněk a neutrofilů
katepsin F	endopeptidáza	všudypřítomný	TLR signalizace prezentace antigenů MHC II
katepsin H	endopeptidáza aminomonopeptidáza	všudypřítomný	degradace komponent ECM
katepsin K	endopeptidáza	převážně v osteoklastech a synoviálních fibroblastech	TLR signalizace degradace komponent ECM a remodelace kostí
katepsin L	endopeptidáza	všudypřítomný	TLR signalizace prezentace antigenů MHC II vývoj CD4 ⁺ T lymfocytů degradace komponent ECM odbourávání kostní tkáně osteoklasty
katepsin O	–	všudypřítomný	–
katepsin S	endopeptidáza	převážně v antigen prezentujících buňkách	TLR signalizace degradace komponent ECM prezentace antigenů MHC II
katepsin V	endopeptidáza	thymus varlata	prezentace antigenů MHC II vývoj CD4 ⁺ T lymfocytů
katepsin W	–	cytotoxické T lymfocyty NK buňky	funkce cytotoxických T lymfocytů a NK buněk
katepsin X	karboxymonopeptidáza a karboxydipeptidáza	všudypřítomný	aktivace a migrace T lymfocytů adheze makrofágů maturace dendritických buněk

(–) není známo

Použité zkratky: CD – cluster of differentiation (diferenciační skupina), ECM – extracelulární matrix, MHC – hlavní histokompatibilní komplex, MHC II – MHC glykoprotein II. třídy, NK – natural killer („přirozený zabiják“), TLR – toll-like receptor, TNF – tumor necrosis factor (faktor nádorové nekrózy).

Údaje převzaty z Colbert et al. 2009, Conus a Simon 2010, Fonović a Turk 2014.

1.4. CYSTATINY

Cystatiny jsou reverzibilní, pevně se vážající a kompetitivní inhibitory cysteinových proteáz patřících do rodin C1 (proteázy podobné papainu) a C13 (legumainové proteázy) (Ochieng a Chaudhuri 2010, Magister a Kos 2013). Jsou přítomné u obratlovců, bezobratlých, rostlin i prvoků (Schwarz et al. 2012). Cystatiny jsou si evolučně příbuzné – spadají do tzv. cystatinové superrodiny. Jednotliví členové cystatinové superrodiny se dělí na základě podobnosti primárních sekvencí, molekulové hmotnosti, počtu disulfidových vazeb a subcelulární lokalizace do 3 hlavních skupin. Tyto 3 skupiny zahrnují cystatiny 1. typu (stefiny), cystatiny 2. typu a cystatiny 3. typu (kininogeny) (Oliveira et al. 2003).

Cystatiny 1. typu (stefiny) jsou neglykosylované inhibitory o zhruba 100 aminokyselinových zbytcích a molekulové hmotnosti přibližně 11 kDa. Jedná se hlavně o intracelulární proteiny bez signální sekvence a disulfidových vazeb (Oliveira et al. 2003, Ochieng a Chaudhuri 2010).

Cystatiny 2. typu jsou proteiny o molekulové hmotnosti 13–15 kDa tvořené přibližně 115 aminokyselinovými zbytky. Součástí jejich molekuly je signální sekvence a dvě disulfidové vazby. Cystatiny 2. typu jsou obecně neglykosylované, existují ale výjimky. Na rozdíl od stefinů jsou sekretovány mimo buňku a nachází se hlavně v biologických tekutinách (Oliveira et al. 2003, Schwarz et al. 2012).

Cystatiny 3. typu zahrnují kininogeny krevní plazmy. Kininogeny jsou větší a komplexnější než cystatiny 1. a 2. typu. Jedná se o proteiny s molekulovou hmotností 60–120 kDa a zhruba 355 aminokyselinovými zbytky. Obvykle jsou glykosylované, obsahují osm disulfidických můstků a tři domény cystatinů 2. typu, z nichž dvě vykazují inhibiční aktivitu. Cystatiny 3. typu jsou podobně jako cystatiny 2. typu sekretovány mimo buňku (Oliveira et al. 2003, Ochieng a Chaudhuri 2010, Schwarz et al. 2012).

Vedle cystatinů 1., 2. a 3. typu byla popsána řada proteinů podobných cystatinům, které navzdory vysoké sekvenci homologii s cystatiny nejsou schopné inhibovat aktivitu cysteinových proteáz. Mezi tyto proteiny patří například fetuiny a glykoprotein bohatý na histidin (Grzonka et al. 2001, Ochieng a Chaudhuri 2010, Turk et al. 2012).

1.4.1. CYSTATINY KLÍŠŤAT

Cystatiny 1. i 2. typu byly identifikovány u řady klíšťat náležících do čeledi Argasidae a Ixodidae. Intenzivněji jsou studovány cystatiny 2. typu, protože jsou na rozdíl od stefinů

sekretovány mimo buňky. Klíštěcí cystatiny jsou potentními inhibitory cysteinových proteáz podobných papainu, nedokážou však účinně inhibovat legumainové proteázy.

Přítomnost cystatinů byla zjištěna ve slinných žlázách a/nebo střevech klíšťat. Klíštěcí cystatiny mají řadu funkcí. Potlačují imunitní reakci hostitele na sání klíštěte, jsou zahrnuté v přirozené imunitě klíštěte a taktéž se účastní regulace trávení krve a embryogeneze (Schwarz et al. 2012).

Mezi funkčně charakterizované cystatiny klíšťat náležících do rodu *Ixodes* patří sialostatin L a sialostatin L2 klíštěte *I. scapularis*. V této práci pak byly dále ve dvou myších modelech akutního zánětu testovány na případné protizánětlivé účinky cystatiny G1 a G9 klíštěte *I. ricinus*.

1.4.1.1. SIALOSTATIN L

Sialostatin L (SialoL) je cystatin 2. typu exprimovaný ve slinných žlázách klíštěte *I. scapularis*. Cystatinu byl dán název sialostatin L, protože inhibuje katepsin L. Vedle katepsinu L má sialoL schopnost inhibovat papain a katepsiny V, C a S (Kotsyfakis et al. 2006, Kotsyfakis et al. 2007).

SialoL potlačuje proliferaci cytotoxických T lymfocytů *in vitro* (Kotsyfakis et al. 2006).

Dále sialoL redukuje maturaci dendritických buněk navozenou LPS a inhibuje proteolýzu invariantního řetězce. Inhibice degradace invariantního řetězce má za následek narušenou schopnost dendritických buněk prezentovat antigeny CD4⁺ T lymfocytům. Proto sialoL taktéž interferuje s antigen specifickou proliferací CD4⁺ T lymfocytů. Díky potlačení proliferace CD4⁺ T lymfocytů v reakci na specifický antigen se předpokládá, že sialoL je schopen zabránit vzniku autoimunitních onemocnění. Například u myši trpících roztroušenou sklerózou podání sialoL oddálilo nástup nemoci a zmírnilo její symptomy (Sá-Nunes et al. 2009).

Navíc sialostatin L inhibicí produkce IL-9 Th9 lymfocyty a žírnými buňkami zabraňuje rozvoji experimentálně navozeného astmatu (Horká et al. 2012, Klein et al. 2015).

Kromě interakce s aktivitami CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů sialoL tlumí akutní zánětlivou reakci. Po intraplantární aplikaci karagenanu (CAR) bylo totiž pozorováno zmenšení otoku tlapek u těch myší, jimž byl CAR podán spolu se sialoL. SialoL taktéž inhiboval migraci neutrofilů do tlapek myši v reakci na podání CAR (Kotsyfakis et al. 2006).

1.4.1.2. SIALOSTATIN L2

Sialostatin L2 (SialoL2) je stejně jako sialostatin L cystatin 2. typu exprimovaný ve slinných žlázách klíštěte *I. scapularis*. SialoL2 má podobnou aminokyselinovou sekvenci jako sialoL a taktéž vykazuje obdobnou afinitu pro katepsiny L a V. Na druhou stranu však sialostatin L2 není tak účinným inhibitorem katepsinů C a S jako sialoL.

Kromě afinity ke katepsinům C a S se sialoL a sialoL2 dále liší v antigenicitě a dynamice transkripce v průběhu sání klíštěte. S postupující dobou sání klíštěte na hostiteli se transkripty sialoL2 hromadí ve slinných žlázách, kdežto množství transkriptů sialoL mírně klesá. Z toho lze usuzovat, že sialostatin L2 napomáhá klíštěti dokončit sání, a to pravděpodobně modulací imunitní odpovědi hostitele. Skutečně řada klíšťat, v nichž byla potlačena exprese sialoL a sialoL2 pomocí RNA interference, nebyla schopná dokončit sání a následně zemřela. Klíšťata, kterým se podařilo dokončit sání na hostiteli, měla sníženou hmotnost oproti kontrolní skupině a také nakladla menší počet vajíček (Kotsyfakis et al. 2007). Narušená schopnost sát krev byla pozorovaná i u nymf klíštěte *I. scapularis* vzápětí po jejich přísátí na morčata imunizovaná sialoL2 (Kotsyfakis et al. 2008).

Sialostatin L2 nejen že napomáhá úspěšnému sání klíštěte, ale taktéž podporuje přenos spirochét *B. burgdorferi* z klíštěte na hostitele (Kotsyfakis et al. 2010).

V následujících dvou podkapitolách (1.5. a 1.6.) budou charakterizovány dva myší modely akutního zánětlivého procesu – peritonitida navozená aplikací thioglykolátového média (thioglycollate-induced peritonitis) a otok tlapek vyvolaný podáním karagenanu (carrageenan-induced paw edema). Právě tyto dva *in vivo* modely totiž byly v této práci užity k testování protizánětlivých účinků cystatinů G1 a G9.

1.5. PERITONITIDA NAVOZENÁ APLIKACÍ THIOGLYKOLÁTOVÉHO MÉDIA

Peritonitida se, jakožto klasický experimentální model akutního zánětu, užívá k hodnocení migrace leukocytů do peritoneální dutiny. Zánětlivé odpovědi se nejčastěji dosahuje intraperitoneálním podáním 1 ml 3% nebo 4% thioglykolátového média (TGM).

V nestimulované peritoneální dutině myši se nacházejí hlavně B lymfocyty, T lymfocyty a rezidentní makrofágy (Ray a Dittel 2010). Účinkem zánětlivého či infekčního

stimulu nicméně dochází k dramatické změně v počtu buněk a zastoupení jednotlivých buněčných populací v peritoneální dutině (Cassado Ados et al. 2015). Aplikace TGM vyústí v masivní příliv neutrofilů a monocytů. Monocyty následně diferencují v tzv. zánětlivé makrofágy. Tento zánětlivý proces je dále doprovázen zvýšenými hladinami prozánětlivých cytokinů v peritoneální tekutině (Wan et al. 2009).

1.5.1. BUŇKY MYELOIDNÍ LINIE PŘÍTOMNÉ V PERITONEÁLNÍ DUTINĚ MYŠI V PRŮBĚHU PERITONITIDY

1.5.1.1. REZIDENTNÍ MAKROFÁGY

Funkcí rezidentních peritoneálních makrofágů je udržování fyziologických podmínek v peritoneální dutině a v případě potřeby zahájení akutní zánětlivé odpovědi (Cassado Ados et al. 2015). Rezidentní makrofágy jsou totiž schopny zachytit zánětlivý podnět a v reakci na něj stimulovat migraci neutrofilů produkcí chemokinů MIP-2 (macrophage inflammatory protein 2) a KC (keratinocyte chemoattractant) (Cailhier et al. 2005). Kromě migrace neutrofilů navozují rezidentní makrofágy i migraci monocytů sekrecí chemokinů MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) (Henderson et al. 2003).

Krátce po podání TGM dojde k vymizení rezidentních makrofágů z peritoneální dutiny. Tato tzv. „macrophage disappearance reaction“ je pravděpodobně způsobena migrací makrofágů do omenta (tukové tkáň tvořené dvojitou vrstvou mezoteliálních buněk, jež spojuje žaludek, slinivku břišní, slezinu a tlusté střevo). Později se rezidentní makrofágy navracejí do peritoneální dutiny, aby se zde spolu se zánětlivými makrofágy podílely na ukončení (rezoluci) zánětlivého procesu (Okabe a Medzhitov 2014, Cassado Ados et al. 2015). Tyto navrátilivší se rezidentní makrofágy intenzivně proliferují, dokud opět nedosáhnou počtu, v jakém byly v peritoneální dutině přítomny před vznikem zánětu (Davies et al. 2011).

1.5.1.2. NEUTROFILNÍ GRANULOCYTY

Neutrofilly jsou prvními buňkami, které se po podání TGM objevují v peritoneální dutině myši. Migrují zejména v reakci na chemokiny KC a MIP-2, přičemž využívají β_2 integriny LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1) a Mac-1 (macrophage-1 antigen) spolu s $\alpha_4\beta_1$ integrinem (Call et al. 2001, Henderson et al. 2001).

Úkolem neutrofilů je fagocytovat invadující mikroorganismy a jiné cizorodé částice, co pronikly do organismu. Později během odeznívání zánětu neutrofilly podléhají apoptóze a

vzniklá apoptotická tělíska jsou fagocytována sousedními zánětlivými makrofágy. Malý počet neutrofilů, co není eliminován programovanou buněčnou smrtí, migruje do spádových lymfatických uzlin (Gautier et al. 2013). Apoptotické neutrofile se podílí na utlumení zánětlivé reakce například produkcí annexinu A1. Annexin A1 inhibuje další akumulaci neutrofilů v místě zánětu potlačením migrace neutrofilů a stimulací jejich apoptózy. Taktéž podporuje rekrutaci monocytů a odstranění apoptotických buněk makrofágy (Scannell et al. 2007, Sugimoto et al. 2016).

1.5.1.3. MONOCYTY

Monocyty, jejichž migrace je umožněna expresí $\alpha_4\beta_1$ integrinu, jsou rekrutovány do peritoneální dutiny současně s neutrofiley. Reagují zejména na chemokin MCP-1, který je vzápětí po injikaci TGM uvolňován rezidentními makrofágy a mezoteliálními buňkami peritonea. Rekrutované monocyty postupně diferencují a maturují v zánětlivé makrofágy. Během maturace dochází ke zvětšování velikosti a granularity buněk a ke zvyšování exprese F4/80 antigenu (Henderson et al. 2003).

1.5.1.4. ZÁNĚTLIVÉ MAKROFÁGY

Zánětlivé makrofágy vzniklé z monocytů jsou schopné v reakci na signály okolního mikroprostředí v průběhu zánětlivé odpovědi měnit svůj fenotyp. Dvěma obecně uznávanými typy aktivovaných makrofágů jsou M1 (klasicky aktivované) makrofágy a M2 (alternativně aktivované) makrofágy. M1 makrofágy jsou producenty ROS, NO a prozánětlivých cytokinů, a tudíž jsou spojené s rozvojem zánětu a destrukcí tkání. M2 makrofágy na druhou stranu vykazují protizánětlivý fenotyp asociovaný s hojením ran a angiogenezi (Italiani a Boraschi 2014).

V průběhu peritonitidy se v peritoneální dutině nejprve nachází M1 makrofágy, ale později jsou M1 makrofágy vystřídány M2 makrofágy s některými rysy M1 makrofágů. Tyto hybridní M1/M2 makrofágy označované jako makrofágy rezoluční fáze (resolution-phase macrophages) napomáhají znovuosídlení peritoneální dutiny lymfocyty a návratu k homeostáze. To je dáno mimo jiné tím, že rozpoznávají a fagocytují apoptotické buňky, syntetizují mastné kyseliny, které se účastní protizánětlivých a reparačních procesů, a produkují chemotaktické faktory pro B a T lymfocyty (Bystrom et al. 2008, Stables et al. 2011).

Zánětlivé makrofágy jsou z peritoneální dutiny posléze odstraněny zejména prostřednictvím apoptózy, ačkoli během odeznívání zánětu dochází v menší míře i k vycestování makrofágů do lymfatických uzlin (Gautier et al. 2013).

1.5.1.5. EOSINOFILNÍ GRANULOCYTY

Eosinofily se dostávají do peritoneální dutiny po podání TGM s určitým zpožděním. To je dáno tím, že chemokiny zprostředkovávající rekrutaci eosinofilů jsou produkovány leukocyty, které migrují do peritoneální dutiny před eosinofily. Dominantní roli v akumulaci eosinofilů v peritoneální dutině hraje zejména chemoatraktant LTB₄ (Tager et al. 2000). Eosinofily napomáhají odeznění zánětu sekrecí látek lipidové povahy s protizánětlivými a hojivými účinky. Mimo jiné produkují protektin D1, který inhibuje migraci neutrofilů, stimuluje fagocytózu apoptotických buněk makrofágy a podporuje vycestování fagocytů do lymfatických uzlin a sleziny (Schwab et al. 2007, Yamada et al. 2011).

1.6. OTOK TLAPEK VYVOLANÝ PODÁNÍM KARAGENANU

Otok myších tlapek je modelem akutní zánětlivé odpovědi, kterého se v čím dál větší míře užívá k testování účinků kandidátních protizánětlivých léků, ke studiu mechanismů zahrnutých v zánětlivém procesu a k hodnocení bolesti v místě zánětu (Nečas a Bartošíková 2013). Pro otok tlapek je charakteristické zvýšení vaskulární permeability vedoucí k extravazaci tekutiny a proteinů a k akumulaci leukocytů v zánětlivém ložisku (Posadas et al. 2004). Za účelem navození otoku tlapek se intraplantárně do zadních tlapek myši aplikuje čerstvě připravený roztok 1–3% karagenanu ve fyziologickém roztoku v dávce 50–150 µl na tlapku (Nečas a Bartošíková 2013). Nárůst velikosti zadní tlapy myši v důsledku otoku vyvolaného injekcí CAR je k vidění na obrázku 3.

1.6.1. PRŮBĚH OTOKU TLAPEK

Injikace karagenanu způsobí vznik edému, pro který je typický bifázický průběh. Během první fáze (0–24 h po aplikaci CAR) se vytváří otok o nízké intenzitě, jehož velikost nezávisí na dávce podaného karagenanu. Ve druhé fázi (24–96 h po injekci CAR) dosahuje edém obvykle vyšší intenzity ve srovnání s první fází a projevuje závislost na dávce podaného

karagenanu. První a druhá fáze se taktéž liší zastoupením typů buněk v místě zánětu. Za 4 h po aplikaci CAR v tlapece převládají neutrofilové, kdežto mezi 48 a 72 h po injekci CAR byla zaznamenána intenzivní akumulace makrofágů, eosinofilů a lymfocytů. V průběhu druhé fáze otoku tlapek je navíc zvýšené množství cirkulujících leukocytů a krevních destiček. Jak edém ve druhé fázi zánětu, tak i leukocytóza a trombocytóza dosahují maxima zhruba za 72 h po aplikaci CAR (Henriques et al. 1987).



Obr. 3: Otok tlapek vyvolaný podáním karagenanu. Normal: Zadní tlapka myši, do níž nebyl injikován CAR. Control: Zadní tlapka myši, do níž bylo subkutánně injikováno 100 μ l 1% CAR. Obrázek převzat z Gupta et al. 2015.

1.6.2. IMUNITNÍ MECHANISMY ZAHRNUTÉ V OTOKU TLAPEK

1.6.2.1. HISTAMIN, SEROTONIN, BRADYKININ A PROSTAGLANDINY

V akutní zánětlivé odpovědi na injekci CAR je zahrnuta celá řada mediátorů. Zvýšenou vaskulární permeabilitu a vznik otoku mají na svědomí histamin, serotonin (5-hydroxytryptamin), bradykinin a prostaglandiny. (Posadas et al. 2004). Prostaglandiny jsou látky se silnými vazodilatačními účinky, které ale málo zvyšují cévní permeabilitu. Na druhou stranu bradykinin a histamin výrazně zvyšují vaskulární permeabilitu, ale nejsou účinnými vazodilatátory. Dle tzv. hypotézy dvou mediátorů je exsudativní účinek histaminu a bradykininu zesilován vazodilatační aktivitou prostaglandinů (Williams 1977).

1.6.2.2. OXID DUSNATÝ

Dalším důležitým mediátorem v otoku tlapek je oxid dusnatý. NO svou vazodilatační aktivitou přispívá ke vzniku otoku (Salvemini et al. 1996). Navíc bylo zjištěno, že NO zvyšuje tvorbu prozánětlivých prostaglandinů (Salvemini et al. 1993). NO taktéž reaguje se superoxidem za vzniku peroxynitritu (ONOO^-). Peroxynitrit je jakožto molekula s velkými oxidačními účinky schopný způsobit peroxidaci lipidů a poškození buněk. Případný rozpad peroxynitritu může vyústit v tvorbu dalších toxických molekul (Beckman et al. 1990, Pacher et al. 2007).

1.6.2.3. NEUTROFILNÍ GRANULOCYTY

Akumulace neutrofilů v tlapkách a jejich aktivace taktéž přispívá k formaci otoku tlapek. Neutrofilly totiž mimo jiné produkují reaktivní formy kyslíku, jako jsou superoxidové anionty (O_2^-) a hydroxylové radikály (Bannister et al. 1982). Superoxidové anionty přispívají k peroxidaci lipidů, zvyšují vaskulární permeabilitu a poškozují tkáň. Dále superoxidové anionty zprostředkovávají migraci neutrofilů, neboť jejich odstranění způsobilo inhibici otoku tlapek a potlačení infiltrace tlapek neutrofilly (Salvemini et al. 1996). Nadto, jak je uvedeno v podkapitole 1.6.2.2., tvorba O_2^- v přítomnosti NO vede ke vzniku cytotoxického peroxynitritu (Beckman et al. 1990).

2. CÍLE PRÁCE

- Zavedení a optimalizace *in vivo* modelů akutního zánětu (peritonitida navozená aplikací thioglykolátového média, otok tlapek vyvolaný podáním karagenanu), kterých by bylo možno využít při studiu protizánětlivých účinků klišťecích imunomodulačních proteinů.
- Otestování protizánětlivých účinků cystatinů G1 a G9 klišťete *Ixodes ricinus* v optimalizovaných modelech.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. VÝČET CHEMIKÁLIÍ A PROTILÁTEK

Seznam chemikálií a protilátek užívaných při provádění jednotlivých experimentů je uveden v tabulce II.

Tab. II: Chemikálie a protilátky použité během experimentální práce.

NÁZEV	VÝROBCE	KATALOGOVÉ ČÍSLO
alternativní thioglykolátové médium (TGM 1)	Sigma-Aldrich	70157-100G
azid sodný	Avondale Laboratories Limited	nezjištěno
blokátor Fc receptorů	eBioscience	14-0161-81
BSA (30%)	Biosera	SA-296/100
dexametazon	Sigma-Aldrich	D4902-100MG
Difco™ tekuté thioglykolátové médium (TGM 2)	BD	225640
Dulbeccův PBS (10x)	Biosera	XC-S2066/500
Gibco® PBS (10x); pH 7,4	Thermo Fisher Scientific	70011036
halotan	Sigma-Aldrich	B4388-125ML
chlorid sodný	PENTA	16610-31000
indometacin	Sigma-Aldrich	18280-5G
isotypová kontrola APC	eBioscience	17-4321-81
isotypová kontrola FITC	eBioscience	11-4031-81
isotypová kontrola PE	eBioscience	12-4321-81
isotypová kontrola PE-Cy7	eBioscience	25-4321-82
isotypová kontrola PerCP-Cy5.5	eBioscience	45-4031-80
karagenan	Sigma-Aldrich	22049-5G-F
lív rafinovaný; 96,4%	LIHO - Blanice spol. s.r.o.	1170
minerální olej	Sigma-Aldrich	M5904-500ML

propidium jodid	eBioscience	00-6990-42
protilátka proti CD3e značená FITC	eBioscience	11-0031-82
protilátka proti CD4 značená APC	eBioscience	17-0041-82
protilátka proti CD8a značená PE-Cy7	eBioscience	25-0081-81
protilátka proti CD11b značená FITC	BD Biosciences	557396
protilátka proti CD19 značená PE	eBioscience	12-0193-81
protilátka proti CD45 značená PerCP-Cy5.5	eBioscience	45-0451-82
protilátka proti F4/80 antigenu značená PE-Cy7	eBioscience	25-4801-82
protilátka proti Ly-6C značená APC	eBioscience	17-5932-80
protilátka proti Ly-6G značená PE	BD Biosciences	551461
protilátka proti Siglec-F značená PerCP-Cy5.5	BD Biosciences	565526
roztok pro lýzu erytrocytů (1x)	eBioscience	00-4333-57
trypanová modř	Sigma-Aldrich	T6146-25G
voda pro buněčné kultury bez pyrogenů	Biosera	LM-T1707/1000
deionizovaná voda	Sigma-Aldrich	W4502-1L

3.2. MYŠI

V experimentech byly užívány samice inbredního kmene C57BL/6N dodávané firmou Velaz (Praha, Česká republika). Stáří myši v době pokusů se pohybovalo v rozmezí 8–13 týdnů. Myši byly chovány ve zvěřinci v budově C Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity při teplotě 20–22 °C, relativní vlhkosti vzduchu zhruba 30 % a řízené fotoperiodě 12/12. Krmeny byly komerční granulovanou směsí pro hlodavce a napájeny sterilní destilovanou vodou s pH upraveným na hodnotu 3 přidáním 1M kyseliny chlorovodíkové. Krmivo i voda byly podávány *ad libitum*. Myši nebyly užívány v *in vivo* experimentech ihned po dovozu, nýbrž jim byl poskytnut čas k adaptaci na nové prostředí (minimálně 2 týdny).

Všechny experimenty byly provedeny v rámci schváleného pokusu na zvířatech MŠMT 19085/2015-3.

3.3. INDOMETACIN

Indometacin (INDO) patří mezi nesteroidní protizánětlivé léky běžně užívané k tlumení bolesti a zánětu (Ong et al. 2007). V řadě studií byla zaznamenána schopnost indometacinu inhibovat migraci neutrofilů *in vivo* (Errasfa a Russo-Marie 1989, Garjani et al. 2008, Pereira et al. 2009, Olabissi et al. 2011).

Zásobní roztok INDO o koncentraci 10 mg/ml byl připravován vždy maximálně den před zahájením pokusu rozpuštěním v 96,4% ethanolu. Ze zásobního roztoku byly následně odebrány konkrétní dávky pro přidání do thioglykolátového média nebo karagenanu. V případě peritonitidy bylo potřebné množství zásobního roztoku INDO dále ředěno fyziologickým roztokem (0,9% roztok NaCl v deionizované vodě (Sigma-Aldrich)) pro dosažení inokulační dávky 10 ml/kg tělesné hmotnosti myši.

3.4. DEXAMETAZON

Dexametazon (DEX) je steroidní protizánětlivý lék patřící mezi kortikoidy (Longui 2007). Kortikoidy jsou široce a úspěšně využívány k léčbě řady akutních a chronických zánětlivých onemocnění jako jsou astma a různé autoimunitní choroby (Barnes 1998, Schäcke et al. 2004). Dexametazon je schopný inhibovat *in vivo* migraci neutrofilů (například Errasfa a Russo-Marie 1989, Hannon et al. 2003, Nonato et al. 2012), monocytů (Meacock a Kitchen 1976, Getting et al. 1997) i eosinofilů (Zuany-Amorim et al. 1993, Das et al. 1997, Teixeira et al. 1998).

Pro užití v pokusech byl DEX připravován stejným způsobem jako indometacin (viz podkapitola 3.3.).

3.5. CYSTATINY G1, G2, G9

Rekombinantní cystatiny G1, G2 a G9 klišťete *I. ricinus* byly k *in vivo* pokusům poskytnuty v rámci spolupráce Katedry medicínské biologie s Laboratoří genomiky a proteomiky vektorů na Parazitologickém ústavu AV ČR. Cystatiny byly přečištěny od LPS smluvní výzkumnou organizací ARVYS Proteins (Trumbull, USA). Uchovávány byly při teplotě -75 °C.

3.6. PERITONITIDA NAVOZENÁ APLIKACÍ THIOGLYKOLÁTOVÉHO MÉDIA

3.6.1. THIOGLYKOLÁTOVÉ MÉDIUM

K navození peritonitidy byla užívána dvě thioglykolátová média (TGM) od různých výrobců – alternativní thioglykolátové médium od firmy Sigma-Aldrich (TGM 1) a Difco™ tekuté thioglykolátové médium od firmy BD (TGM 2). Obě thioglykolátová média byla připravována jako 3% rozpuštěním ve vodě pro buněčné kultury (Biosera) a následně byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min. Sterilní thioglykolátová média byla uchovávána ve stínu při pokojové teplotě s polootevřeným víčkem za účelem umožnění oxidace. TGM 1 bylo dovoleno oxidovat minimálně 14 dní, než bylo použito k navození peritonitidy. TGM 2 obsahovalo na rozdíl od TGM 1 redoxní indikátor resazurin, jenž je v redukované formě bezbarvý a v oxidované formě růžový. Proto se TGM 2 krátce po přípravě rozdělilo na dvě rozdílně zbarvené části. K indukci peritonitidy byla užívána horní oxidovaná (tedy růžová) část média.

3.6.2. NAVOZENÍ PERITONITIDY

Peritonitida byla u myši indukována intraperitoneální injekcí 1 ml 3% TGM 1 nebo 1 ml 3% TGM 2 či případně 200 µl 3% TGM 2. V některých experimentech byly myšim kromě TGM intraperitoneálně podávány i indometacin, dexametazon či rekombinální cystatiny. V těchto případech byly myši napřed zváženy s přesností na gramy a 30 min, 1 h nebo 24 h před injekcí TGM jim bylo aplikováno příslušné množství léků či cystatinů ve fyziologickém roztoku tak, aby výsledný objem inokulační dávky byl 10 ml/kg tělesné hmotnosti myši. Léky či cystatiny byly většinou ve stejném množství taktéž podány zároveň s TGM. Vyzkoušeny byly následující kombinace thioglykolátového média, indometacinu, dexametazonu a cystatinů G1/G9:

- INDO (2 mg/kg, 10 ml/kg myši) i.p. 1 h před podáním TGM 2, INDO (2 mg/kg) současně s i.p. aplikací 1 ml 3% TGM 2
- INDO (5 mg/kg, 10 ml/kg myši) i.p. 24 h před podáním TGM 1, INDO (5 mg/kg, 10 ml/kg myši) i.p. 30 min před podáním TGM 1, i.p. aplikace 1 ml 3% TGM 1
- INDO (5 mg/kg, 10 ml/kg myši) i.p. 30 min před podáním TGM 2, INDO (5 mg/kg) současně s i.p. aplikací 200 µl 3% TGM 2

- DEX (5 mg/kg, 10 ml/kg myši) i.p. 1 h před podáním TGM 2, DEX (5 mg/kg) současně s i.p. aplikací 200 μ l 3% TGM 2
- G1/G9 (2 mg/kg, 10 ml/kg myši) i.p. 1 h před podáním TGM 2, G1/G9 (2 mg/kg) současně s i.p. aplikací 200 μ l 3% TGM 2

K injikaci 1 ml TGM 1 nebo TGM 2 byly užívány injekční stříkačky o objemu 1 ml s jehlami 27 G. K aplikaci menších objemů TGM, léků a cystatinů byly použity 1 ml inzulinové injekční stříkačky s integrovanou jehlou 30 G.

3.6.3. PERITONEÁLNÍ LAVÁŽ

Po uplynutí příslušného časového úseku (2, 4, 8, 24, 48, 72 nebo 96 h) od intraperitoneální injekce thioglykolátového média byly myši uspany kombinací minerálního oleje a halotanu v poměru 1 : 1 a následně byly usmrceny zlomením vazů. Usmrcené myši byly přichyceny špendlíky k polystyrenové destičce. Kůže na břicho byla rozříznuta nůžkami a opatrně oddělena od pobřišnice. Pakliže došlo k neúmyslnému proříznutí peritonea, vzniklý otvor byl uzavřen pomocí peánu. K výplachu peritoneální dutiny byly užívány dvě 10 ml injekční stříkačky s jehlami 23 G, obě naplněné 5 ml ledově chladného PBS. Nejprve byla skrze tukovou tkáň v blízkosti reprodukčních orgánů zavedena první injekční stříkačka a veškerý její obsah byl vyprázdněn do peritoneální dutiny. Zhruba 1 ml PBS byl vzápětí nasán zpět do stříkačky. Následně byla do druhé strany peritoneální dutiny vsunuta druhá injekční stříkačka. Obsah druhé stříkačky byl postupně injikován do peritoneální dutiny, zatímco do prvně zavedené, téměř prázdné stříkačky byl současně nasáván z peritoneální dutiny PBS s buněčným infiltrátem. Obecně se dařilo z peritoneální dutiny zpětně získávat 8–9 ml PBS. Výplachy byly během zpracovávání dalších myší i následných manipulací s buňkami uchovávány na ledu v centrifugačních zkumavkách o objemu 15 ml.

3.6.4. ZPRACOVÁNÍ BUNĚK A JEJICH POČÍTÁNÍ

Výplachy peritoneálních dutin jednotlivých myší byly centrifugovány při 500 g a 4 °C po dobu 5 min. Po vylití supernatantu byly buněčné pelety resuspendovány v 500 μ l roztoku pro lýzu erytrocytů. Následovala 30 s inkubace při pokojové teplotě. Po skončení inkubace byly buňky v lyzačním roztoku dolity do 15 ml ledově chladným PBS a opět centrifugovány při 500 g a 4 °C po dobu 5 min. Po stočení byl supernatant odlit a buněčné pelety byly dle své velikosti nejčastěji resuspendovány buď v 500 μ l, nebo 1 ml FACS pufru (destilovaná voda, 0,1% azid sodný, 0,1% BSA, 1x Gibco® PBS).

Pro rozlišení živých a mrtvých buněk byly vzorky smíchány s 0,5% vodným roztokem trypanové modři. Buňky byly počítány v Bürkerově nebo Neubauerově komůrce pod světelným mikroskopem při 100násobném zvětšení. Vždy byl určován počet živých i mrtvých buněk.

3.6.5. PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE

K 100 μ l FACS pufru s buňkami bylo přidáno 10 μ l 100x naředěného blokátoru Fc receptorů. Po 5 minutové inkubaci na ledu byly buněčné suspenze dále smíchány buď s fluorescenčně značenými protilátkami, nebo s příslušnými isotypovými kontrolami. Protilátky i isotypové kontroly byly předředěny 20x rozpuštěním ve FACS pufru a k suspenzím buněk byly přidány v takovém množství, aby protilátky byly v konečném výsledku naředěné 500x a isotypové kontroly 400x. Protilátky užívané k rozpoznání jednotlivých buněčných populací myeloidní a lymfoidní linie jsou uvedené v tabulce III. Po přidání protilátek a isotypových kontrol byly vzorky inkubovány 30 min ve tmě při teplotě 4 °C. Po skončení inkubace byl ke všem vzorkům přidán 1 ml FACS pufru. Následovala centrifugace při 500 g a 4 °C po dobu 5 min. Supernatant byl odlit a pelety byly resuspendovány v 500 μ l FACS pufru. Nakonec bylo ke všem vzorkům vyjma těch s isotypovými kontrolami přidáno 5 μ l propidium jodidu (PI) pro odlišení živých a mrtvých buněk.

Procentuální zastoupení buněčných populací v jednotlivých vzorcích bylo zjišťováno pomocí průtokového cytometru BD FACSCanto™ II (BD Biosciences) a softwaru BD FACSDiva™. Nastavení průtokového cytometru (napětí na fotodetektorech) je uvedené v tabulce IV.

Spojením analýzy vzorků na průtokovém cytometru s počítáním buněk pod světelným mikroskopem byly nakonec stanoveny počty jednotlivých buněčných populací ve vzorcích.

Tab. III: Protilátky užívané k identifikaci jednotlivých buněčných populací myeloidní a lymfoidní linie. V tabulce jsou uvedeny fluorochromy, jimiž byly protilátky značené, povrchové antigeny rozeznávané jednotlivými protilátkami a buněčné populace, k jejichž identifikaci byly protilátky zejména použity.

PROTILÁTKA	FLUOROCHROM	ROZPOZNÁVANÝ POVRCHOVÝ ANTIGEN	BUNĚČNÁ POPULACE
MYELOIDNÍ LINIE			
1	FITC	CD11b	buňky myeloidní linie
2	PE	Ly-6G	neutrofily
3	APC	Ly-6C	monocyty
4	PE-Cy7	F4/80 antigen	makrofágy
5	PerCP-Cy5.5	Siglec-F	eosinofily
LYMFOIDNÍ LINIE			
1	PerCP-Cy5.5	CD45	leukocyty
2	PE	CD19	B lymfocyty
3	FITC	CD3e	T lymfocyty
4	APC	CD4	CD4 ⁺ T lymfocyty
5	PE-Cy7	CD8a	CD8 ⁺ T lymfocyty

Tab. IV: Napětí na fotodetektoch průtokového cytometru.

MYELOIDNÍ LINIE		LYMFOIDNÍ LINIE	
PARAMETR	NAPĚTÍ (V)	PARAMETR	NAPĚTÍ (V)
FSC	250	FSC	260
SSC	418	SSC	420
APC (Ly-6C)	440	APC (CD4)	440
FITC (CD11b)	400	FITC (CD3e)	600
PE (Ly-6G)	400	PE (CD19)	400
PE-Cy7 (F4/80)	604	PE-Cy7 (CD8a)	780
PE - Texas Red (PI)	663	PE-Texas Red (PI)	663
PerCP-Cy5.5 (Siglec-F)	605	PerCP-Cy5.5 (CD45)	605

3.7. OTOK TLAPEK VYVOLANÝ PODÁNÍM KARAGENANU

Před započítáním experimentů byly myši zváženy s přesností na gramy a velikost jejich levých tlapek byla změřena prostřednictvím mikrometru (Mitutoyo, číslicový krok 0,001 mm, přesnost $\pm 2 \mu\text{m}$, katalogové číslo 227-201). Otok levých tlapek byl indukován intraplantární injekcí 40 μl 1% λ -karagenanu. 1% karagenan (CAR) byl vždy připravován maximálně den před začátkem pokusu rozpuštěním ve fyziologickém roztoku (0,9% roztok NaCl v deionizované vodě (Sigma-Aldrich)). Některým skupinám myši byl CAR aplikován spolu s indometacinem (2 mg/kg), dexametazonem (1 mg/kg nebo 2 mg/kg) či rekombinantními cystatiny G1/G2/G9 (1 mg/kg nebo 2 mg/kg). K intraplantárnímu podání karagenanu byly užívány inzulinové injekční stříkačky o objemu 1 ml s integrovanou jehlou 30 G.

2, 4, 6, 24, 48, 72 a 96 h po injekci karagenanu byla měřena velikost tlapek mikrometrem. Po uplynutí posledního časového intervalu (72 nebo 96 h) byly myši uspány kombinací minerálního oleje a halotanu v poměru 1 : 1 a následně byly usmrceny zlomením vazů.

Nárůst velikosti tlapek (v %) v jednotlivých časových intervalech byl počítán pomocí vzorce:

$$\frac{B-A}{A} * 100$$

kde A je velikost tlapy před podáním CAR a B je velikost tlapy 2, 4, 6, 24, 48, 72 nebo 96 h po podání CAR.

3.8. STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ DAT

Všechny výsledky jsou vyjádřeny jako aritmetický průměr \pm střední chyba průměru (SEM). Statistická analýza dat byla provedena v případě 2 skupin prostřednictvím Studentova *t*-testu (nepárového) a v případě 3 a více skupin prostřednictvím jednocestné analýzy variance (one-way ANOVA) následované Tukeyovým HSD (honestly significant difference) *post-hoc* testem. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou značeny hvězdičkami (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). K vyloučení případných extrémních hodnot byl užíván Dean-Dixonův test se zvolenou hladinou významnosti 0,05.

4. VÝSLEDKY

4.1. PERITONITIDA NAVOZENÁ APLIKACÍ THIOGLYKOLÁTOVÉHO MÉDIA

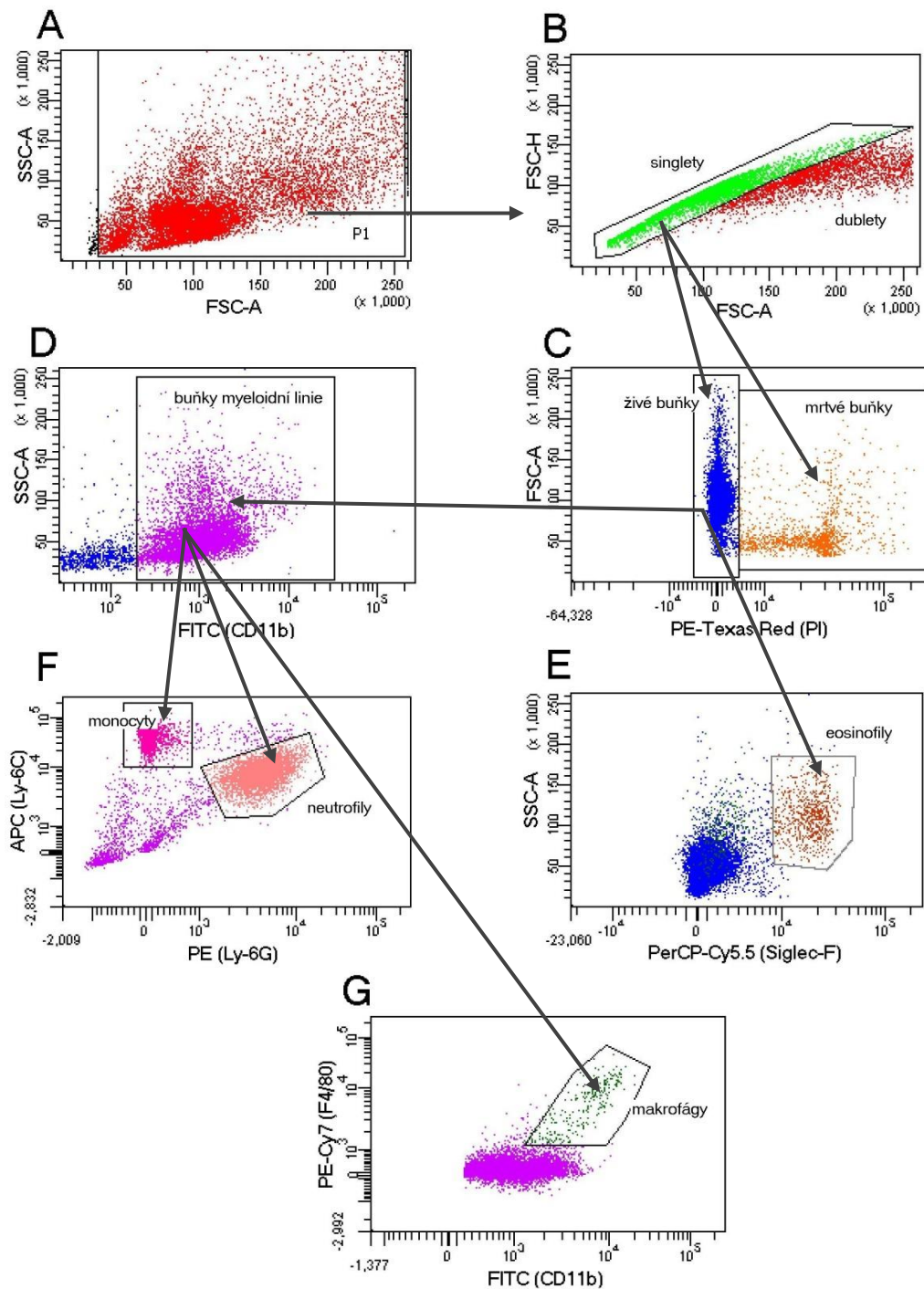
4.1.1. „GATING“ STRATEGIE

V rámci počátečních experimentů byly zvoleny vhodné kombinace protilátek proti povrchovým znakům buněk (viz tab. III), byly nastaveny detektory průtokového cytometru (viz tab. IV) a taktéž byly zavedeny strategie pro určování buněčných populací na průtokovém cytometru. Způsob postupné identifikace jednotlivých populací myeloidní linie je znázorněn na obrázku 4. Způsob postupného „gatování“ jednotlivých buněčných populací lymfoidní linie je pak uveden na obrázku 5. Zvolené „gatovací“ strategie byly následně užívány k určování procentuálního a početního zastoupení neutrofilů, monocytů, makrofágů, eosinofilů, B lymfocytů a T lymfocytů v peritoneálních dutinách myši v různých časových intervalech po intraperitoneálním podání TGM 1 nebo TGM 2. Znalosti dynamiky výskytu buněčných populací během peritonitidy pak bylo zamýšleno využít k výběru vhodných časových intervalů pro testování vlivu rekombinantních cystatinů na jednotlivé buněčné populace.

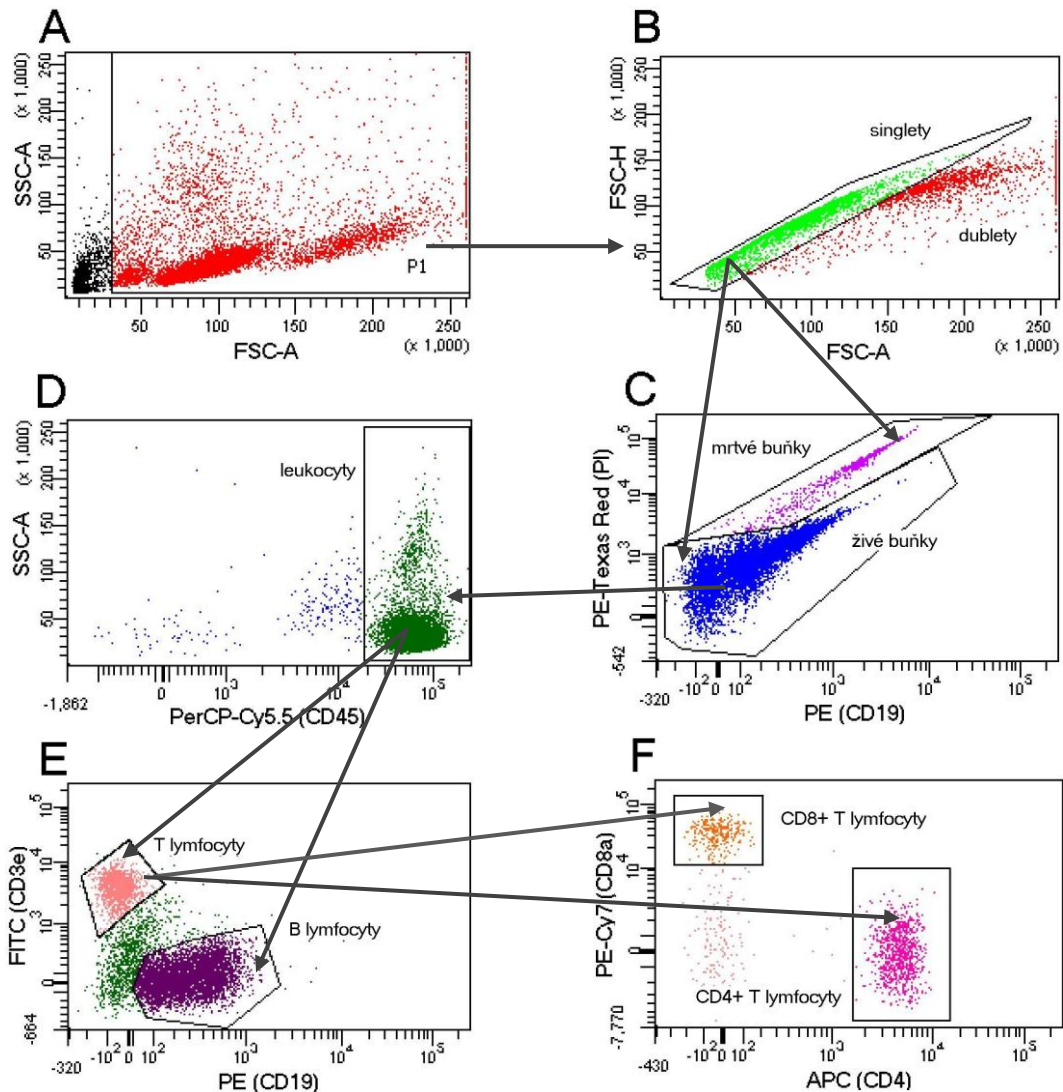
4.1.2. DYNAMIKA VÝSKYTU BUNĚČNÝCH POPULACÍ V PERITONEÁLNÍCH DUTINÁCH MYŠÍ V RŮZNÝCH ČASOVÝCH INTERVALECH PO PODÁNÍ TGM 1 NEBO TGM 2

4.1.2.1. POČET ŽIVÝCH BUNĚK

Z peritoneálních dutin myši, jimž nebylo podáno TGM (časový interval 0 h), bylo získáno přibližně $1\,700\,000 \pm 200\,000$ živých buněk. Po indukci peritonitidy injekcí 1 ml TGM 1 byl počet buněk v peritoneálních dutinách v jednotlivých časových intervalech podobný či dokonce nižší ve srovnání s počtem buněk v nestimulovaných peritoneálních dutinách (obr. 6A). Injekce 1 ml TGM 2 na druhou stranu vyústila v intenzivní migraci buněk do místa zánětu. Počet živých buněk se začal výrazně zvyšovat kolem 8. hodiny po aplikaci TGM 2 a maxima dosáhl za 48 h po podání TGM 2, kdy bylo peritoneální laváží získáno zhruba $32\,000\,000 \pm 3\,000\,000$ buněk (obr. 6B).

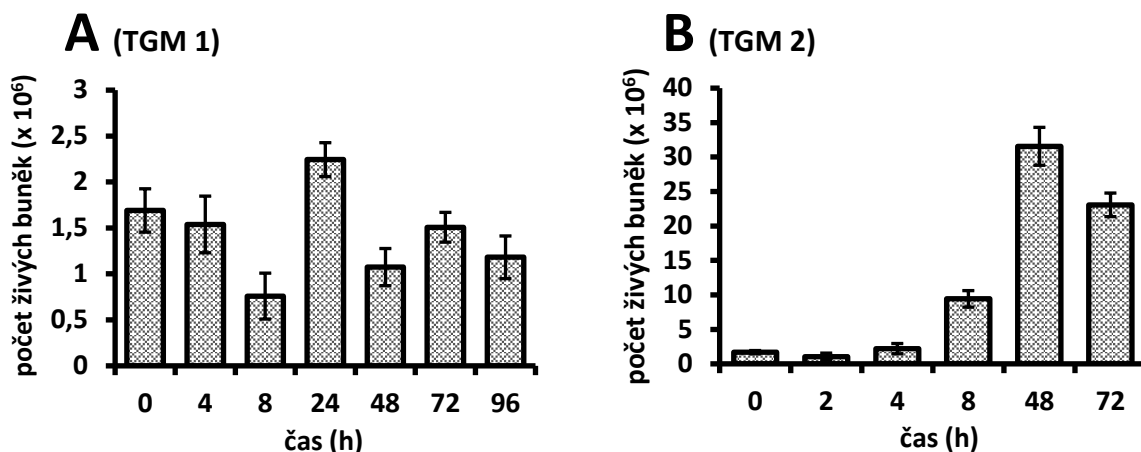


Obr. 4: Strategie „gatování“ jednotlivých buněčných populací myeloidní linie. Jedná se o buněčný infiltrát získaný z peritoneální dutiny myši 8 h po podání TGM 2. Vyloučením událostí s nejnižšími hodnotami parametru FSC byla získána populace P1 (A). Populace P1 byla rozdělena na jednotlivé buňky (singlety) a shluky dvou či více buněk (B). Singlety byly dle intenzity fluorescence PI separovány na živé a mrtvé buňky (C). Ze živých buněk byly vyčleněny na základě exprese CD11b buňky myeloidní linie (D) a na základě vysoké exprese Siglec-F eosinofily (E). Eosinofily se obecně dále vyznačovaly nízkou expresí CD11b a F4/80 antigenu a heterogenní expresí Ly-6C. Dle exprese Ly-6C a Ly-6G byly mezi buňkami myeloidní linie identifikovány neutrofilové (Ly-6C⁺, Ly-6G⁺) a monocyty (Ly-6C^{high}, Ly-6G⁻) (F). Nakonec byly dle střední až vysoké exprese F4/80 antigenu z buněk myeloidní linie vyčleněny makrofágy (G).



Obr. 5: Strategie „gatování“ jednotlivých buněčných populací lymfoidní linie. Jedná se o buněčný infiltrát získaný z peritoneální dutiny myši 96 h po i.p. aplikaci TGM 1. Vyloučením událostí s nejnižšími hodnotami FSC byla získána populace P1 (A). Populace P1 byla následně rozdělena na singlety (jednotlivé buňky) a shluky dvou a více buněk (B). Singlety byly dle intenzity fluorescence PI separovány na živé a mrtvé buňky (C). Ze živých buněk byly na základě vysoké exprese CD45 vyčleněny leukocyty (D). Z leukocytů byly dále dle exprese CD19 a CD3e separovány B lymfocyty (CD19⁺) a T lymfocyty (CD19⁻, CD3e⁺) (E). T lymfocyty byly nakonec na základě exprese CD4 a CD8a rozděleny na CD4⁺ T lymfocyty a CD8⁺ T lymfocyty (F).

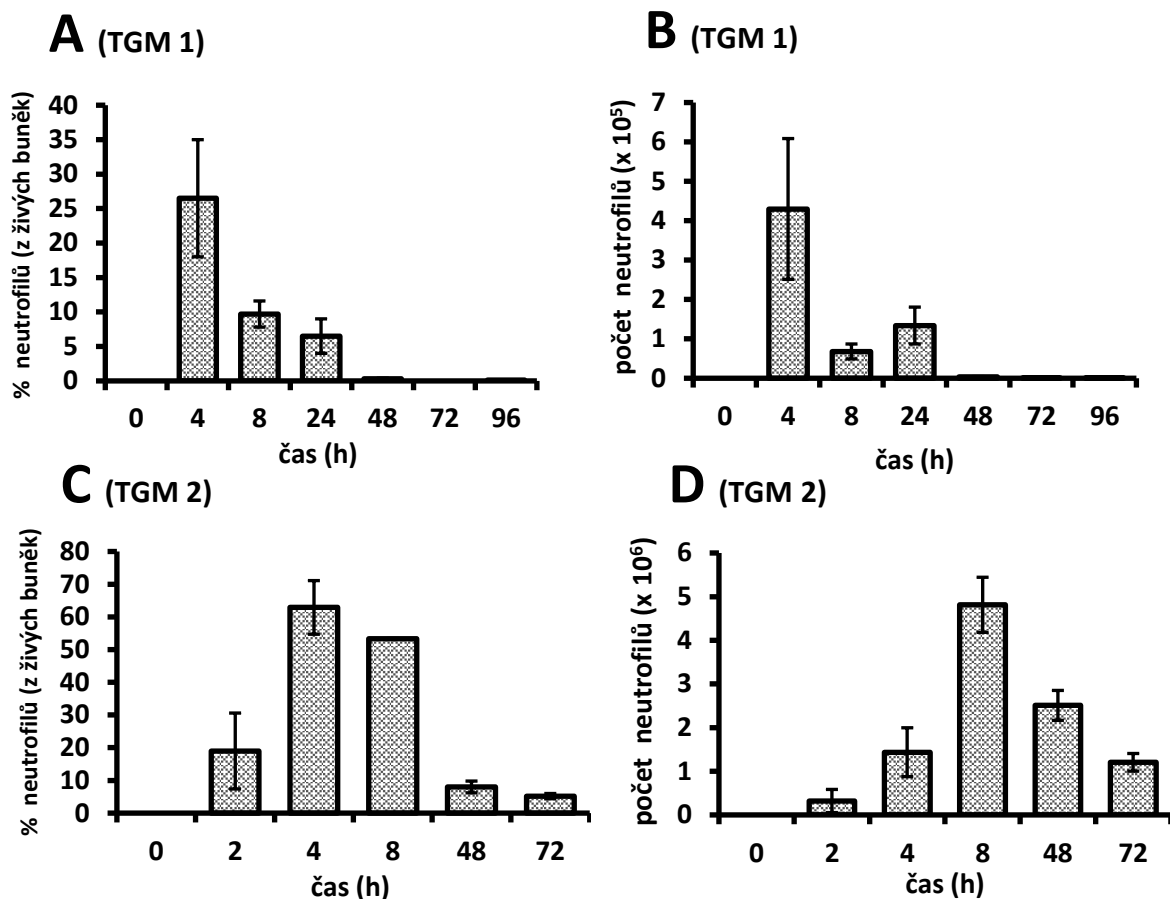
V peritoneálních dutinách bez zánětu byly přítomny hlavně B lymfocyty, T lymfocyty, rezidentní makrofágy a malé procento eosinofilů (příloha 1 – obr. 22). Intraperitoneální injikace thioglykolátového média vyústila v příliv neutrofilů, monocytů a eosinofilů do peritoneálních dutin, vymizení rezidentních makrofágů a objevení se zánětlivých makrofágů.



Obr. 6: Počet živých buněk získaných peritoneální laváží v různých časových intervalech po podání TGM: A – počet živých buněk přítomných na místě zánětu 4, 8, 24, 48, 72 a 96 h po aplikaci TGM 1; B – počet živých buněk přítomných na místě zánětu 2, 4, 8, 48 a 72 h po injekci TGM 2; 0 h – počet živých buněk v peritoneálních dutinách myši, jimž nebylo injikováno TGM. Jednotlivé skupiny byly tvořené 2–6 myšmi.

4.1.2.2. NEUTROFILNÍ GRANULOCYTY

V peritoneálních dutinách myši, jimž nebylo aplikováno TGM, nebyly zaznamenány žádné neutrofilů (příloha 1 – obr. 22). Přítomnost neutrofilů v buněčném infiltrátu byla zjištěna za 4, 8 a 24 h po injekci TGM 1, přičemž nejvyššího procentuálního ($26,5 \pm 8,5$ %) a početního ($430\,000 \pm 180\,000$) zastoupení neutrofilů bylo dosaženo za 4 h od indukce peritonitidy. Po 48 h od aplikace TGM 1 neutrofilů z místa zánětu prakticky vymizely (obr. 7A a 7B). Intraperitoneální podání TGM 2 vedlo k výraznější migraci neutrofilů, jež byla pozorovatelná již za 2 h po injekci média. Neutrofilů dosáhly nejvyššího početního zastoupení za 8 h od vyvolání peritonitidy ($4\,800\,000 \pm 630\,000$) a v peritoneálních dutinách přetrvávaly v poměrně vysokých počtech i v časových intervalech 48 h ($2\,500\,000 \pm 340\,000$) a 72 h ($1\,200\,000 \pm 200\,000$) (obr. 7D). Ačkoli nejvíce neutrofilů bylo peritoneální laváží získáno po 8 h od vyvolání peritonitidy, nejvyššího procentuálního zastoupení neutrofilů dosáhly za 4 h po injekci TGM 2 ($62,9 \pm 8,2$) (obr. 7C). Tento nesoulad je způsoben významným nárůstem procentuálního podílu monocytů v peritoneálních dutinách v 8 hodinovém intervalu oproti 4 hodinovému intervalu (příloha 1 – obr. 24A a 24B).

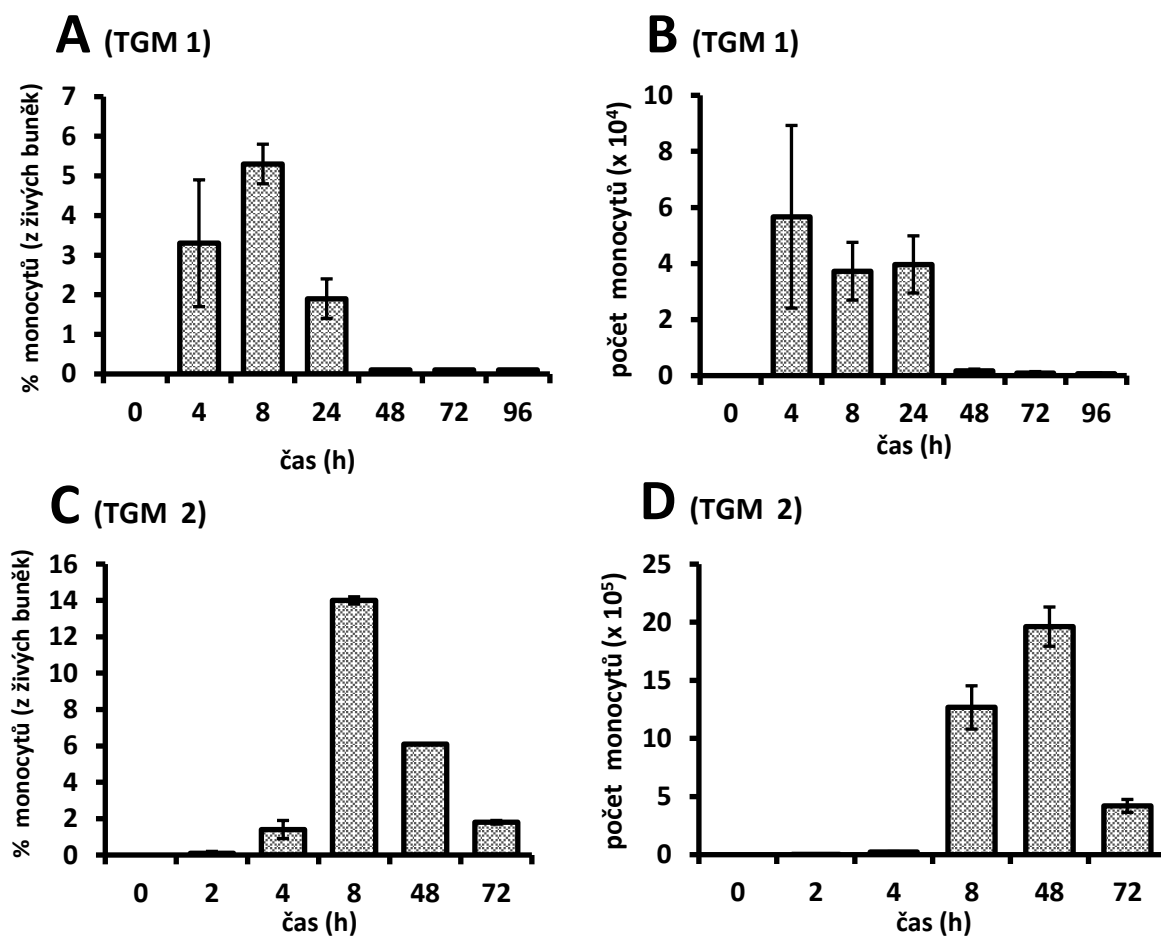


Obr. 7: Dynamika výskytu neutrofilů (buňky CD11b⁺, Ly-6G⁺) v peritoneálních dutinách myši v různých časových intervalech po aplikaci TGM: A – procentuální podíl neutrofilů ze živých buněk získaných peritoneální laváží 4, 8, 24, 48, 72 a 96 h po podání TGM 1; B – počet neutrofilů získaných peritoneální laváží 4, 8, 24, 48, 72 a 96 h po injikaci TGM 1; C – procentuální podíl neutrofilů ze živých buněk získaných peritoneální laváží 2, 4, 8, 48 a 72 h po podání TGM 2; D – počet neutrofilů získaných peritoneální laváží 2, 4, 8, 48 a 72 h po injikaci TGM 2; 0 h – procent. podíl neutrofilů z živých buněk a počet neutrofilů u myši, jimž nebylo injikováno TGM. Jednotlivé skupiny byly tvořené 2–6 myšmi.

4.1.2.3. MONOCYTY

V peritoneálních dutinách bez zánětu se nenacházely žádné monocyty (příloha 1 – obr. 22). Po intraperitoneální aplikaci TGM 1 byla přítomnost monocytů na místě zánětu zjištěna zejména v časových intervalech 4, 8 a 24 h. Počty monocytů získaných peritoneální laváží 4, 8 a 24 h po podání TGM 1 byly srovnatelné (zhruba $46\,000 \pm 12\,000$). Nejvyššího procentuálního zastoupení ($5,3 \pm 0,5\%$) dosáhly monocyty za 8 hod od navození peritonitidy (obr. 8A a 8B). Aplikace TGM 2 vyvolala intenzivnější migraci monocytů ve srovnání s užitím TGM 1. Monocyty se začaly na místě zánětu objevovat 4 h po injikaci TGM 2 a přetrvávaly zde ještě v 72 hodinovém intervalu. Nejvyššího procentuálního podílu z živých

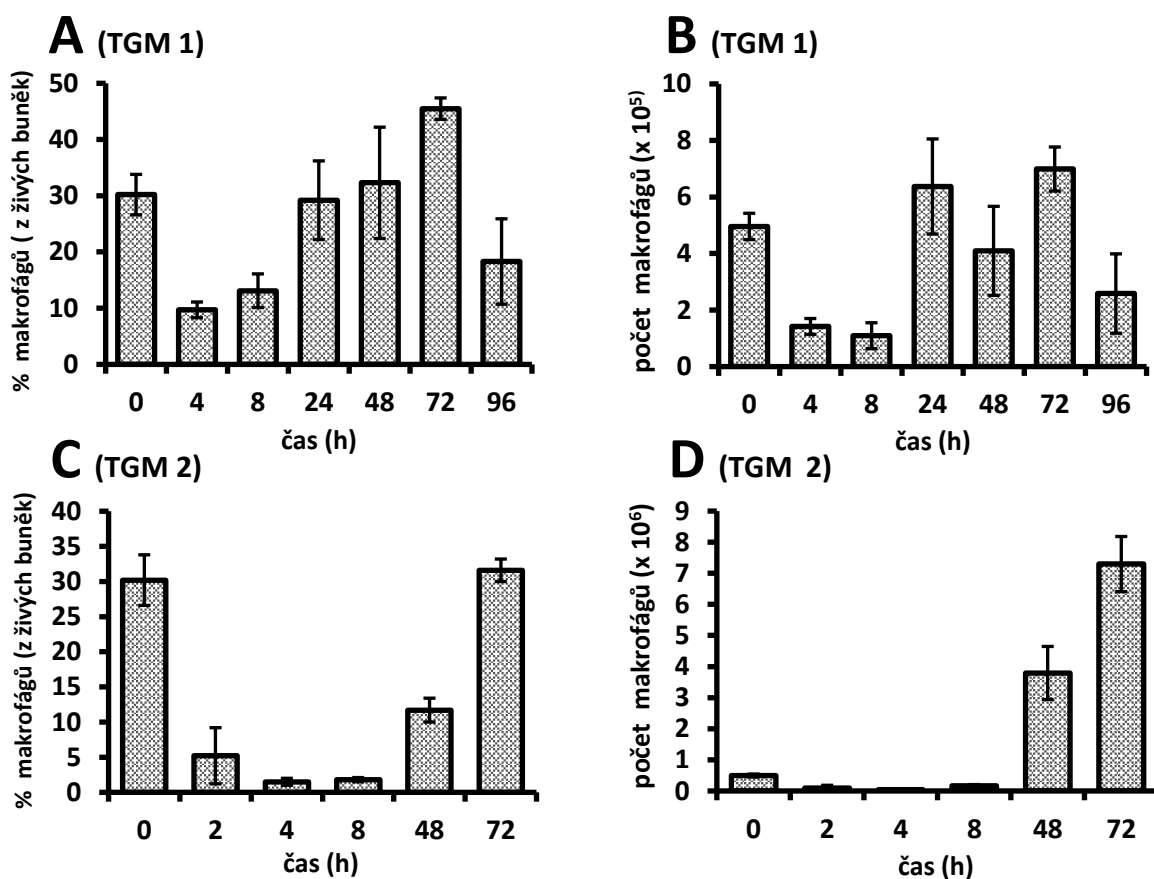
buněk ($14 \pm 0,2$ %) dosáhly monocyty v časovém intervalu 8 h. Naopak nejvyšší počet monocytů ($1\,960\,000 \pm 170\,000$) byl získán peritoneální laváží 48 h po podání TGM 2 (obr. 8C a 8D). Tento nesoulad mezi nejvyšším procentuálním a početním zastoupením monocytů je zapříčiněn nárůstem procentuálního podílu makrofágů a zejména pak eosinofilů v buněčných infiltrátech získaných 48 h po navození peritonitidy oproti infiltrátům získaným 8 h od začátku zánětu (příloha 1 – obr. 24B a 24C).



Obr. 8: Dynamika výskytu monocytů (buňky CD11b⁺, Ly-6C^{high}) v peritoneálních dutinách myši v různých časových intervalech po aplikaci TGM: A – procentuální podíl monocytů ze živých buněk získaných peritoneální laváží 4, 8, 24, 48, 72 a 96 h po podání TGM 1; B – počet monocytů získaných peritoneální laváží 4, 8, 24, 48, 72 a 96 h po injikaci TGM 1; C – procentuální podíl monocytů ze živých buněk získaných peritoneální laváží 2, 4, 8, 48 a 72 h po podání TGM 2; D – počet monocytů získaných peritoneální laváží 2, 4, 8, 48 a 72 h po injikaci TGM 2; 0 h – procent. podíl monocytů ze živých buněk a počet monocytů u myši, jimž nebylo injikováno TGM. Jednotlivé skupiny byly tvořené 2–6 myšmi.

4.1.2.4. MAKROFÁGY

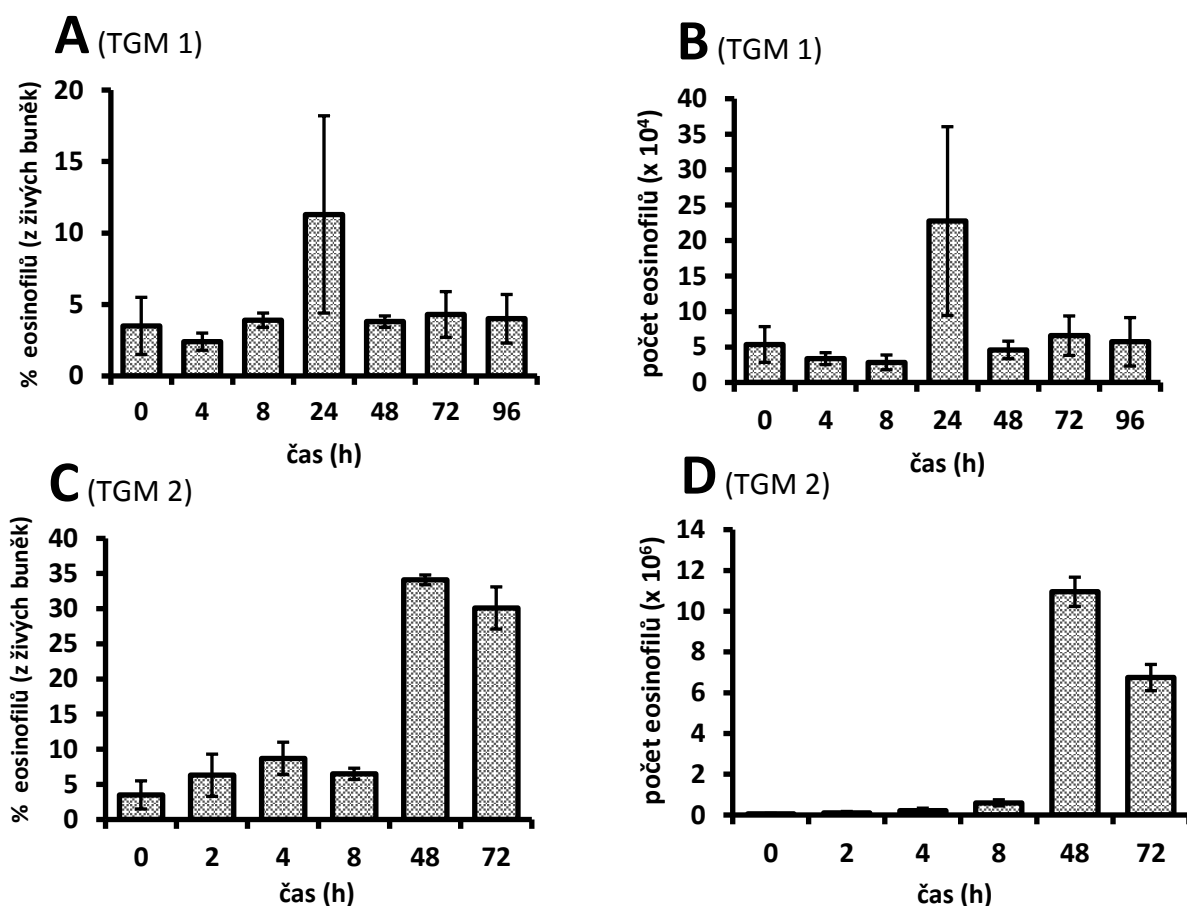
V nestimulovaných peritoneálních dutinách představovaly rezidentní makrofágy $30,2 \pm 3,6 \%$ všech živých buněk (příloha 1 – obr. 22). Krátce po intraperitoneálním podání TGM 1 došlo k částečnému vymizení rezidentních makrofágů z peritoneálních dutin. Po 24 h od indukce peritonitidy byla zaznamenána migrace zánětlivých makrofágů do místa zánětu. Zánětlivé makrofágy dosáhly nejvyššího procentuálního podílu ze živých buněk ($45,5 \pm 1,9$) v časovém intervalu 72 h (obr. 9A a 9B). Podání TGM 2 mělo za následek výraznější vymizení rezidentních makrofágů z peritoneálních dutin ve srovnání s aplikací TGM 1. Zánětlivé makrofágy se začaly ve velké míře objevovat na místě zánětu v 48 hodinovém intervalu a nejvyššího procentuálního ($31,6 \pm 1,6 \%$) a početního ($7\,300\,000 \pm 890\,000$) zastoupení ze všech námi sledovaných časových intervalů dosáhly za 72 h po injekci TGM 2 (obr. 9C a 9D).



Obr. 9: Dynamika výskytu makrofágů (buňky CD11b⁺, F4/80⁺) v peritoneálních dutinách myší v různých časových intervalech po aplikaci TGM: A – procentuální podíl makrofágů ze živých buněk získaných peritoneální laváží 4, 8, 24, 48, 72 a 96 h po podání TGM 1; B – počet makrofágů získaných peritoneální laváží 4, 8, 24, 48, 72 a 96 h po injekci TGM 1; C – procentuální podíl makrofágů ze živých buněk získaných peritoneální laváží 2, 4, 8, 48 a 72 h po podání TGM 2; D – počet makrofágů získaných peritoneální laváží 2, 4, 8, 48 a 72 h po injekci TGM 2; 0 h – procentuální podíl makrofágů ze živých buněk a počet makrofágů u myší, jimž nebylo aplikováno TGM. Jednotlivé skupiny byly tvořené 2–6 myši.

4.1.2.5. EOSINOFILNÍ GRANULOCYTY

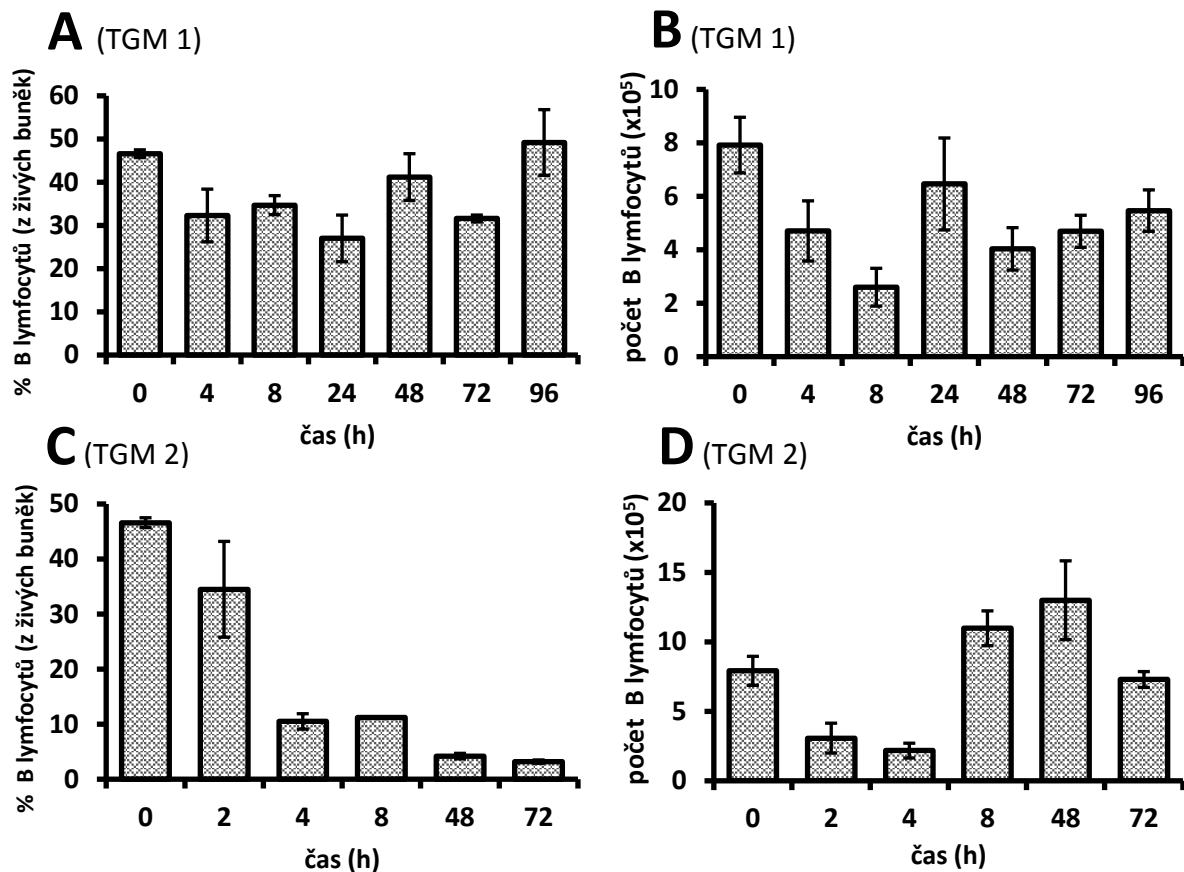
Eosinofily představovaly pouhých $3,5 \pm 2$ % všech živých buněk v peritoneálních dutinách bez zánětu (příloha 1 – obr. 22). Po injikaci TGM 1 se procentuální ani početní zastoupení eosinofilů v jednotlivých časových intervalech oproti 0 hodinovému intervalu příliš nezměnilo. Počty eosinofilů získaných peritoneální laváží se s výjimkou časového intervalu 24 h pohybovaly v řádech desetitisíců (obr. 10A a 10B). Injekce TGM 2 na druhou stranu způsobila výrazný procentuální a početní nárůst eosinofilů na místě zánětu zejména po 48 a 72 h od indukce peritonitidy. Největšího procentuálního podílu ze živých buněk ($34,1 \pm 0,7$) i nejvyššího počtu ($11\,000\,000 \pm 700\,000$) dosáhly eosinofily za 48 h od aplikace TGM 2 (obr. 10C a 10D).



Obr. 10: Dynamika výskytu eosinofilů (buňky SSC^{high}, Siglec-F^{high}) v peritoneálních dutinách myši v různých časových intervalech po aplikaci TGM: A – procentuální podíl eosinofilů ze živých buněk získaných peritoneální laváží 4, 8, 24, 48, 72 a 96 h po podání TGM 1; B – počet eosinofilů získaných peritoneální laváží 4, 8, 24, 48, 72 a 96 h po injikaci TGM 1; C – procentuální podíl eosinofilů ze živých buněk získaných peritoneální laváží 2, 4, 8, 48 a 72 h po podání TGM 2; D – počet eosinofilů získaných peritoneální laváží 2, 4, 8, 48 a 72 h po injikaci TGM 2; 0 h – procent. podíl eosinofilů ze živých buněk a počet eosinofilů u myši, jimž nebylo aplikováno TGM. Jednotlivé skupiny byly tvořené 2–6 myšmi.

4.1.2.6. B LYMFOCYTY

B lymfocyty byly nejvíce zastoupenou buněčnou populací v nestimulovaných peritoneálních dutinách ($46,6 \pm 0,9$ % všech živých buněk, viz příloha 1 – obr. 22). Injikace TGM 1 vedla k převážně mírnému snížení počtu B lymfocytů na místě zánětu oproti 0 hodinovému intervalu (obr. 11B). Procentuální podíl B lymfocytů ze živých buněk se v průběhu peritonitidy navozené TGM 1 výrazně neměnil (obr. 11A). Intraperitoneální podání TGM 2 způsobilo pokles počtu B lymfocytů v časových intervalech 2 a 4 h. Tento pokles byl následován mírným početním nárůstem B lymfocytů. Nejvyšších počtů (zhruba $1\,200\,000 \pm 140\,000$) dosáhly B lymfocyty 8 a 48 h po podání TGM 2 (obr. 11D). Procentuální zastoupení B lymfocytů v peritoneálních dutinách v průběhu peritonitidy indukované TGM 2 postupně klesalo (obr. 11C). Nesoulad mezi procentuálním podílem B lymfocytů ze živých buněk a jejich počtem 8, 48 a 72 h od vyvolání peritonitidy je v případě 8 hodinového intervalu dán velkým procentuálním zastoupením neutrofilů a monocytů (příloha 1 – obr. 24B) a v případě intervalů 48 a 72 h zase výraznou převahou eosinofilů a makrofágů (příloha 1 – obr. 24C a 24D).

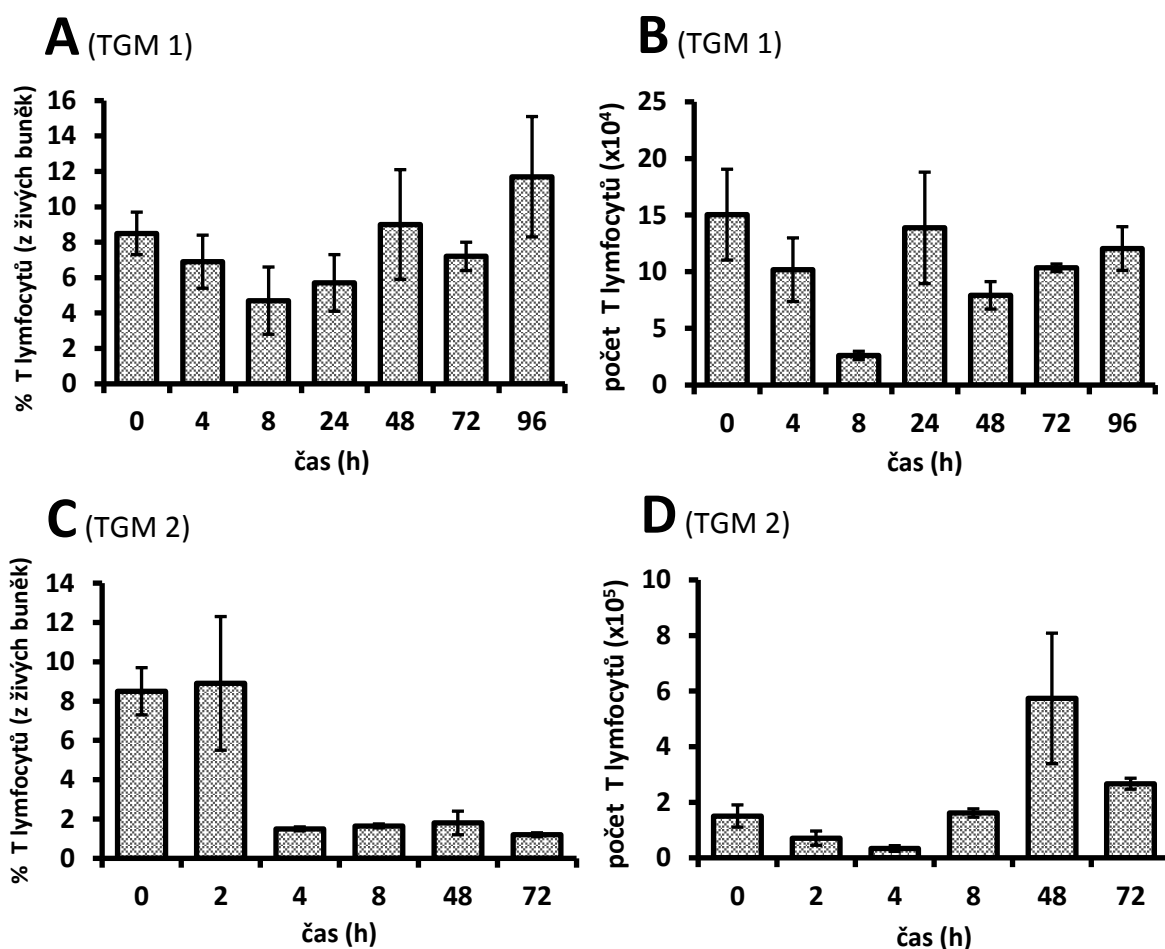


Obr. 11: Dynamika výskytu B lymfocytů (buňky CD45⁺, CD19⁺) v peritoneálních dutinách myši v různých časových intervalech po aplikaci TGM: A – procentuální podíl B lymfocytů ze živých buněk získaných peritoneální laváží 4, 8, 24, 48, 72 a 96 h po podání TGM 1; B – počet B lymfocytů získaných peritoneální laváží 4, 8, 24, 48, 72 a 96 h po injikaci TGM 1; C – procentuální podíl B lymfocytů ze živých buněk získaných peritoneální laváží 2, 4, 8, 48 a 72 h po podání TGM 2; D – počet B lymfocytů získaných peritoneální laváží 2, 4, 8, 48 a 72 h po injikaci TGM 2; 0 h – procent. podíl B lymfocytů ze živých buněk a počet B lymfocytů u myši, jimž nebylo injikováno TGM. Jednotlivé skupiny byly tvořené 2–6 myši.

4.1.2.7. T LYMFOCYTY

T lymfocyty vykazovaly v průběhu peritonitidy obdobnou dynamiku výskytu na místě zánětu jako B lymfocyty. V peritoneálních dutinách bez zánětu (0 hodinový interval) byly T lymfocyty po B lymfocytech a rezidentních makrofázích třetí nejpočetněji zastoupenou buněčnou populací (příloha 1 – obr. 22). Intraperitoneální aplikace TGM 1 nevedla k výrazným změnám v procentuálním podílu T lymfocytů ze živých buněk oproti intervalu 0 h (obr. 12A). Taktéž počty T lymfocytů (v řádech desetitisíců až statisíců) na místě zánětu byly s výjimkou intervalu 8 h srovnatelné s počty T lymfocytů v nestimulovaných peritoneálních dutinách (obr. 12B). Injikace TGM 2 vedla k poklesu procentuálního

zastoupení T lymfocytů v časových intervalech 4, 8, 48 a 72 oproti 0 hodinovému intervalu (obr. 12C). Tento pokles byl zapříčiněn přítomností velkých počtů (a tedy i velkých procentuálních podílů) neutrofilů, monocytů, makrofágů a eosinofilů v peritoneálních dutinách 4, 8, 48 a 72 h od indukce peritonitidy (příloha 1: obr. 24A–24D). Pokles počtu T lymfocytů na počátku zánětlivého procesu vyvolaného podáním TGM 2 byl vystředán mírným vzestupem v časových intervalech 8 a 48 h. Nejvyšší počet T lymfocytů ($574\,000 \pm 235\,000$) byl získán peritoneální laváží provedenou za 48 h od injekce TGM 2 (obr. 12D).



Obr. 12: Dynamika výskytu T lymfocytů (buňky CD45⁺, CD3e⁺) v peritoneálních dutinách myši v různých časových intervalech po aplikaci TGM: A – procentuální podíl T lymfocytů ze živých buněk získaných peritoneální laváží 4, 8, 24, 48, 72 a 96 h po podání TGM 1; B – počet T lymfocytů získaných peritoneální laváží 4, 8, 24, 48, 72 a 96 h po injekci TGM 1; C – procentuální podíl T lymfocytů ze živých buněk získaných peritoneální laváží 2, 4, 8, 48 a 72 h po podání TGM 2; D – počet T lymfocytů získaných peritoneální laváží 2, 4, 8, 48 a 72 h po injekci TGM 2; 0 h – procent. podíl T lymfocytů ze živých buněk a počet T lymfocytů u myši, jimž nebylo injikováno TGM. Jednotlivé skupiny byly tvořené 2–6 myši.

V peritoneálních dutinách bez zánětu byl poměr počtu CD4⁺ T lymfocytů ku počtu CD8⁺ T lymfocytů přibližně 5 : 1. Po intraperitoneální aplikaci TGM 1 tento poměr kolísal v rozmezí od 3 : 1 do zhruba 5 : 1. Po podání TGM 2 se poměr počtu CD4⁺ T lymfocytů ku počtu CD8⁺ T lymfocytů pohyboval v rozmezí od cca 4 : 1 do 7 : 1. Mezi peritonitidou navozenou TGM 1 a peritonitidou navozenou TGM 2 nebyly pozorovány žádné výrazné rozdíly v dynamice poměru počtu CD4⁺ T lymfocytů ku počtu CD8⁺ T lymfocytů v jednotlivých časových intervalech (příloha 1 – obr. 23A a 23B).

4.1.3. OPTIMALIZACE DÁVKY THIOGLYKOLÁTOVÉHO MÉDIA

Po zjištění dynamiky procentuálního a početního zastoupení neutrofilů, monocytů, makrofágů, eosinofilů, B lymfocytů a T lymfocytů v jednotlivých časových intervalech po podání TGM 1 nebo TGM 2 bylo dalším cílem upravit dávku buď TGM 1 nebo TGM 2 tak, aby se mohly projevit případné protizánětlivé účinky cystatinů G1 a G9. Dávka byla optimalizována s využitím běžně užívaných protizánětlivých léků indometacinu a dexametazonu, jež by dle literatury měly mít inhibiční účinky na migraci buněk myeloidní linie do místa zánětu (například Errasfa a Russo-Marie 1989, Das et al. 1997, Getting et al. 1997). Byly proto zkoušeny různé kombinace TGM 1, TGM 2, INDO a DEX. Tu kombinaci, při níž by došlo k inhibici migrace buněk myeloidní linie INDO a/nebo DEX, pak bylo zamýšleno použít k testování cystatinů. K optimalizaci dávky TGM byl vybrán časový interval 4 h, neboť primárním cílem bylo otestovat účinky cystatinů G1 a G9 na infiltraci neutrofilů, a právě v 4 hodinovém intervalu dosahovaly neutrofilů nejvyššího procentuálního podílu ze živých buněk ze všech testovaných časových intervalů (obr. 7A a 7C).

Jako první byla vyzkoušena kombinace 1 ml TGM 2 s indometacinem v dávce 2 mg/kg tělesné hmotnosti myši v následujícím aplikačním schématu:

- **INDO (2 mg/kg, 10 ml/kg myši) i.p. 1 h před podáním TGM 2, INDO (2 mg/kg) současně s i.p. aplikací 1 ml 3% TGM 2**

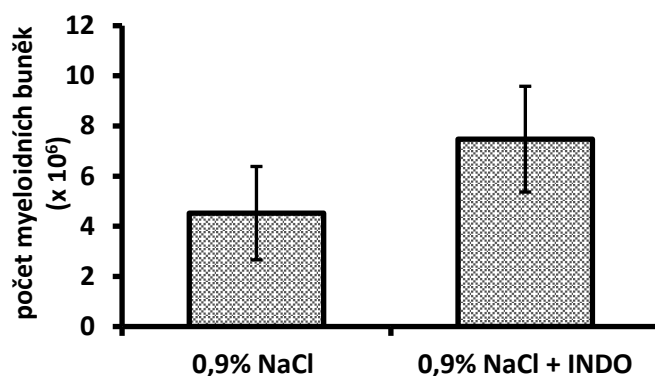
V rámci této kombinace nedošlo ke snížení počtu buněk myeloidní linie v peritoneálních dutinách myši, jimž byl podán INDO, ve srovnání s myši, jimž byl injikován pouze fyziologický roztok (obr. 13).

Napodruhé byl k indukci peritonitidy užit 1 ml TGM 1, neboť zánětlivý proces vyvolaný injikací TGM 1 se vyznačoval nižším počtem buněk myeloidní linie v peritoneálních dutinách ve srovnání se zánětlivým procesem způsobeným podáním TGM 2. Taktéž bylo

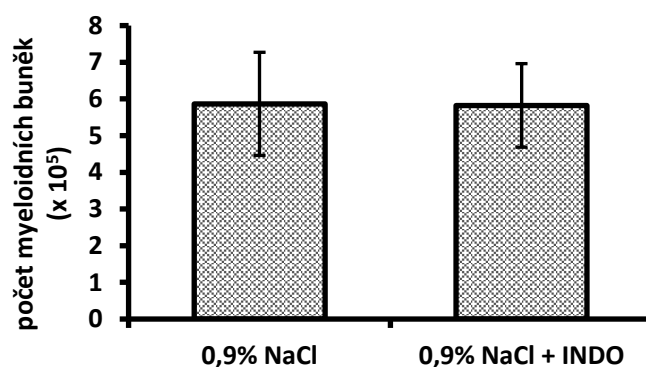
zvýšeno množství indometacinu z 2 mg/kg na 5 mg/kg tělesné hmotnosti myši a bylo upraveno dávkování INDO.

- **INDO (5 mg/kg, 10 ml/kg myši) i.p. 24 h před podáním TGM 1, INDO (5 mg/kg, 10 ml/kg myši) i.p. 30 min před podáním TGM 1, i.p. aplikace 1 ml 3% TGM 1**

Dle očekávání podání 1 ml TGM 1 ve srovnání s injekcí 1 ml TGM 2 vyústilo v nižší počet myeloidních buněk (konkrétně neutrofilů a eosinofilů) v místě zánětu (příloha 2 – obr. 25A, 25B a 25D). Avšak i přes slabší zánětlivou odpověď a jiné dávkování INDO se nepodařilo dosáhnout statisticky signifikantní inhibice migrace myeloidních buněk do peritoneálních dutin myši, jimž byl intraperitoneálně injikován indometacin (obr. 14).



Obr. 13: Počet buněk myeloidní linie získaných peritoneální laváží 4 h po injekci 1 ml TGM 2: 0,9% NaCl – skupina 3 myši, jimž spolu s TGM 2 nebyl podán INDO; 0,9% NaCl + INDO – skupina 3 myši, jimž byl spolu s TGM 2 dvakrát podán indometacin (2 mg/kg).



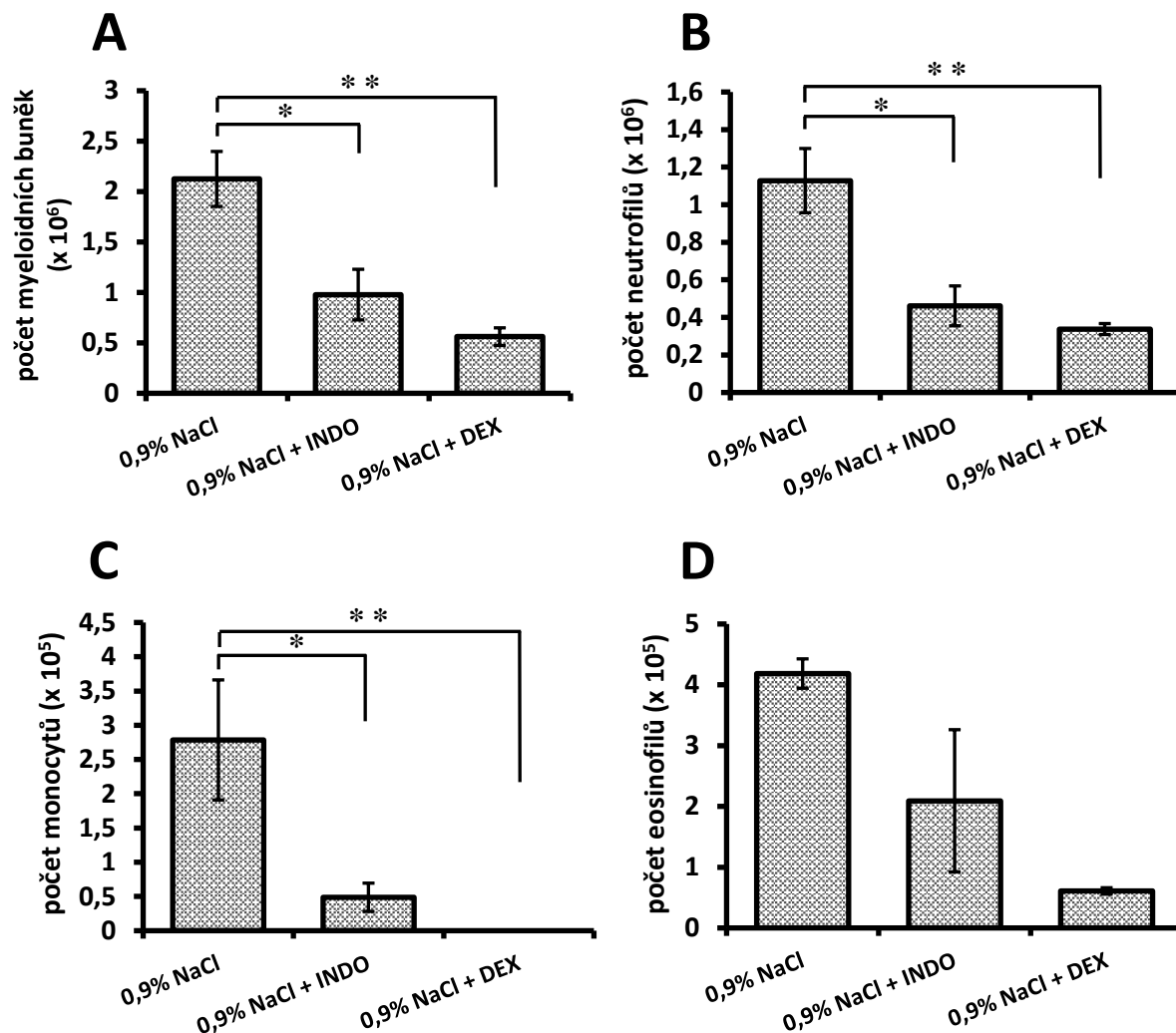
Obr. 14: Počet buněk myeloidní linie získaných peritoneální laváží 4 h po injekci 1 ml TGM 1: 0,9% NaCl – skupina 3 myši, jimž spolu s TGM 1 nebyl podán INDO; 0,9% NaCl + INDO – skupina 3 myši, jimž byl spolu s TGM 1 dvakrát podán indometacin (5 mg/kg).

K indukci peritonitidy bylo proto znovu použito TGM 2, avšak tentokrát za účelem oslabení zánětlivé odpovědi bylo na místo 1 ml TGM 2 myším injikováno pouze 200 μ l TGM 2. Opět byl podáván indometacin v množství 5 mg/kg tělesné hmotnosti myši, ovšem s pozměněným dávkováním. Vedle INDO byl nyní použit i dexametazon v dávce 5 mg/kg tělesné hmotnosti myši.

- **INDO (5 mg/kg, 10 ml/kg myši) i.p. 30 min před podáním TGM 2, INDO (5 mg/kg) současně s i.p. aplikací 200 μ l 3% TGM 2**
- **DEX (5 mg/kg, 10 ml/kg myši) i.p. 1 h před podáním TGM 2, DEX (5 mg/kg) současně s i.p. aplikací 200 μ l 3% TGM 2**

Peritonitida navozená injikací 200 μ l TGM 2 se vyznačovala vyššími počty myeloidních buněk (konkrétně neutrofilů) v místě zánětu ve srovnání s podáním 1 ml TGM 1 a nižšími počty myeloidních buněk (konkrétně neutrofilů) ve srovnání s podáním 1 ml TGM 2 (příloha 2 – obr. 25A a 25B). Překvapivě však došlo ke statisticky významnému zvýšení počtu monocytů v peritoneálních dutinách myši, jimž bylo injikováno 200 μ l TGM 2 ve srovnání s myši, kterým byl intraperitoneálně aplikován 1 ml TGM 1 nebo 1 ml TGM 2 (příloha 2 – obr. 25C). Taktéž bylo u myši injikovaných 200 μ l TGM 2 pozorováno statisticky signifikantní zvýšení eosinofilů oproti myším, kterým byl podán 1 ml TGM 1 (příloha 2 – obr. 25D).

V peritoneálních dutinách myši, jimž byl injikován INDO nebo DEX, došlo oproti myším, jimž nebyl aplikován žádný lék, ke statisticky významnému snížení počtu myeloidních buněk (obr. 15A). Konkrétně byla indometacinem a dexametazonem statisticky signifikantně potlačena infiltrace peritoneálních dutin neutrofilů (obr. 15B) a monocyty (obr. 15C). Podání INDO statisticky významně nesnížilo počet eosinofilů v peritoneálních dutinách. DEX zjevně redukoval počet eosinofilů na místě zánětu, ovšem ani toto dle jednocestné analýzy variance nebylo statisticky významné (obr. 15D). Za snížení počtu buněk na místě zánětu bylo částečně zodpovědné jejich zvýšené umírání způsobené podáním indometacinu a dexametazonu (příloha 2 – obr. 26). Z obou protizánětlivých léků migraci myeloidních buněk účinněji potlačoval DEX. Obzvláště výrazná byla inhibice migrace monocytů dexametazonem (obr. 15C).



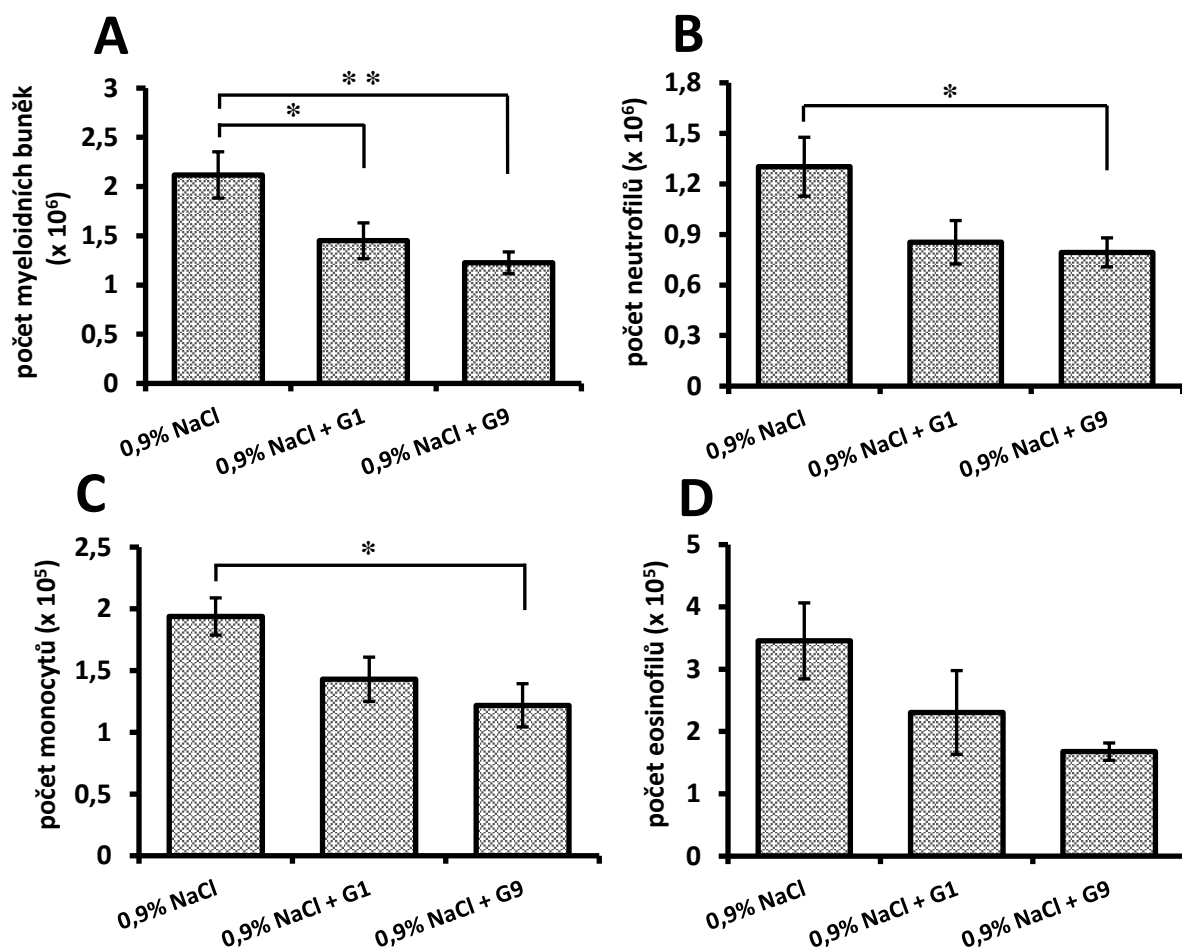
Obr. 15: Počet buněk myeloidní linie (A), neutrofilů (B), monocytů (C) a eosinofilů (D) získaných peritoneální laváží 4 h po injekci 200 μ l TGM 2: 0,9% NaCl – skupina 2 myši, jimž bylo podáno TGM 2 bez INDO a DEX; 0,9% NaCl + INDO – skupina 3 myši, jimž byl spolu s TGM 2 dvakrát podán indometacin (5 mg/kg); 0,9% NaCl + DEX – skupina 3 myši, jimž byl spolu s TGM 2 dvakrát podán dexametazon (5 mg/kg).

4.1.4. TESTOVÁNÍ CYSTATINŮ G1 A G9

Peritonitida navozená intraperitoneální injekcí 200 μ l TGM 2 byla užita k testování účinků cystatinů G1 a G9 na infiltraci místa zánětu neutrofilů, monocytů a eosinofilů. Byla vyzkoušena kombinace TGM 2 a cystatinů v následujícím aplikačním schématu:

- G1/G9 (2 mg/kg, 10 ml/kg myši) i.p. 1 h před podáním TGM 2, G1/G9 (2 mg/kg) současně s i.p. aplikací 200 μ l 3% TGM 2

V peritoneálních dutinách myši, jimž byl injikován cystatin G1 nebo cystatin G9, došlo ke statisticky signifikantnímu snížení počtu buněk myeloidní linie ve srovnání s myši, jimž nebyl podán žádný cystatin. Cystatin G9 počet myeloidních buněk snižoval účinněji než cystatin G1 (obr. 16A). Z myeloidních buněk cystatin G9 statisticky významně inhiboval migraci neutrofilů (obr. 16B) a monocytů (obr. 16C). Cystatin G1 sice mírně snižoval počet neutrofilů a monocytů v peritoneálních dutinách, ovšem toto nebylo statisticky signifikantní (obr. 16B a 16C). Ani jeden z cystatinů statisticky významně nepotlačil infiltraci místa zánětu eosinofily (obr. 16D). Na rozdíl od indometacinu a dexametazonu cystatiny G1 a G9 signifikantně nesnižovaly přežívání buněk v průběhu zánětlivého procesu (příloha 3 – obr. 27).



Obr. 16: Počet buněk myeloidní linie (A), neutrofilů (B), monocytů (C) a eosinofilů (D) získaných peritoneální laváží 4 h po injikaci 200 μ l TGM 2: 0,9% NaCl – skupina 9 myši, jimž bylo podáno TGM 2 bez cystatinů; 0,9% NaCl + G1 – skupina 9 myši, jimž byl spolu s TGM 2 dvakrát podán cystatin G1 (2 mg/kg); 0,9% NaCl + G9 – skupina 8 myši, jimž byl spolu s TGM 2 dvakrát podán cystatin G9 (2 mg/kg).

4.2. OTOK TLAPEK VYVOLANÝ PODÁNÍM KARAGENANU

4.2.1. OPTIMALIZACE

V rámci optimalizace metody bylo třeba určit dávku karagenanu, jež by se užívala k navození otoku tlapek u myší, a stanovit časové intervaly, ve kterých by se měřila velikost tlapek. Taktéž bylo třeba vybrat protizánětlivý lék, který by sloužil během testování cystatinů jakožto pozitivní kontrola inhibice otoku.

Poněvadž se v celé řadě studií otok tlapek indukuje intraplantární injikací 50 μ l 1% karagenanu (například Hannon et al. 2003, Posadas et al. 2004, Olabissi et al. 2011, Liao et al. 2013), v jednotlivých experimentech byl užíván právě 1% CAR. Pouze podávané množství karagenanu bylo sníženo z 50 μ l na 40 μ l, neboť inzulinové injekce užívané k intraplantární aplikaci CAR měly stupnici po 20 μ l.

Velikost tlapek byla měřena dle dříve popsaného postupu 2, 4, 6, 24, 48, 72 a někdy i 96 h po injikaci CAR (Posadas et al. 2004).

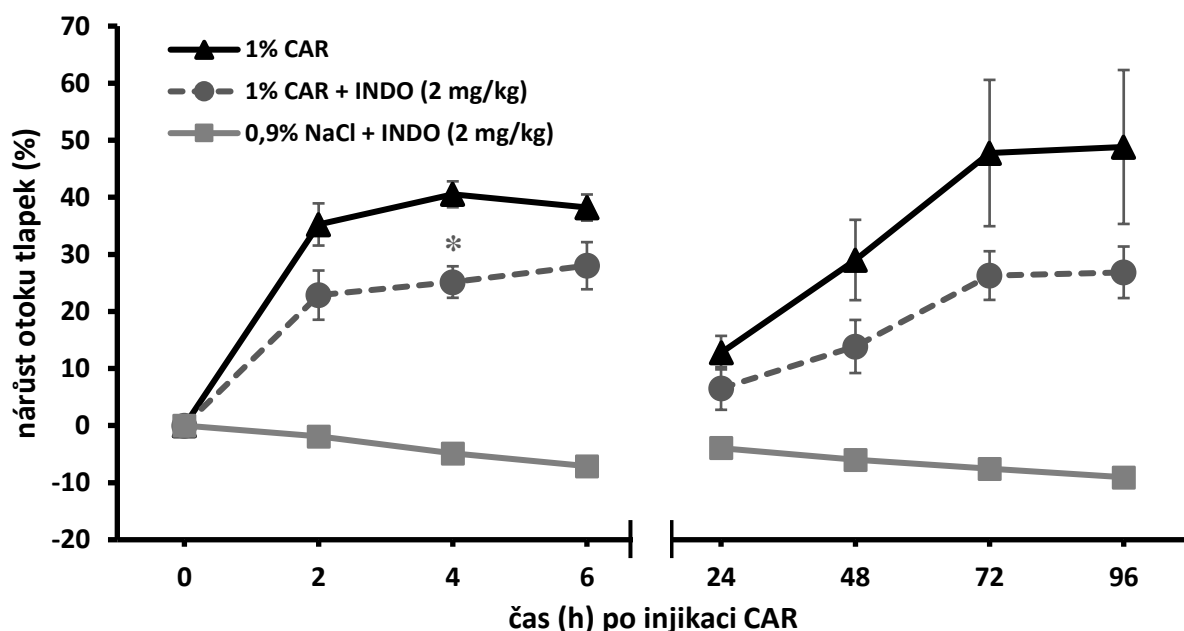
Otok tlapek navozený podáním 40 μ l 1% CAR měl bifázický průběh. Během první fáze (0–24 h od indukce zánětu) dosahoval otok nejvyšší hodnoty 4 h po podání CAR (např. obr. 18 a 20). Během druhé fáze (24–96 h od indukce zánětu) zpravidla nebylo pozorováno žádné maximum, neboť velikosti tlapek zejména 72 a 96 h po injikaci CAR si byly podobné (obr. 17 a 19). Mezi první a druhou fází většinou nebyly zaznamenány žádné výrazné rozdíly v intenzitě otoku (například obr. 17, 18 a 20).

Indometacin je hojně užíván jakožto pozitivní kontrola při testování látek s potenciálními protizánětlivými účinky na jejich schopnost potlačovat otok tlapek (například Olabissi et al. 2011, Hassimotto et al. 2013, Liao et al. 2013). U myší, jimž byl podán INDO v dávce 2 mg/kg tělesné hmotnosti spolu s CAR, skutečně došlo ke zmenšení otoku tlapek ve srovnání s myšmi, jimž byl podán CAR samotný. Redukce otoku tlapek indometacinem byla statisticky signifikantní v časovém intervalu 4 h. Intraplantární injikace 40 μ l fyziologického roztoku spolu s INDO v dávce 2 mg/kg tělesné hmotnosti myši nevedla ke zvětšení velikosti tlapek (obr. 17). Tudíž otok byl způsoben pouze podáním karagenanu.

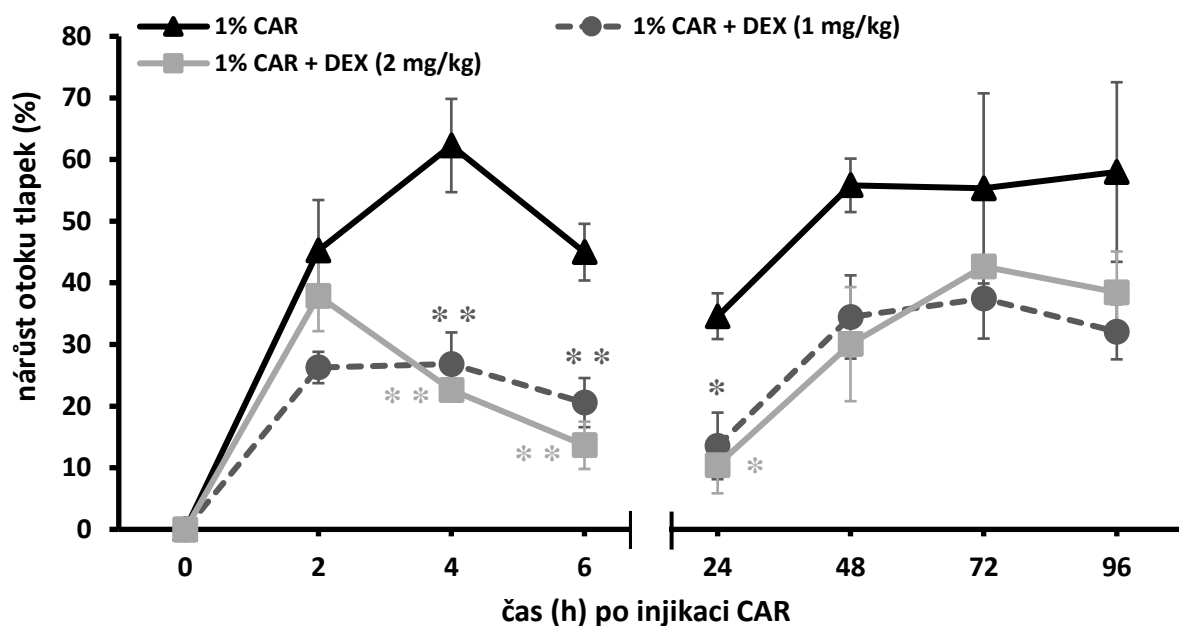
Indometacin v dávce 2 mg/kg sice redukoval otok tlapek vyvolaný podáním CAR, ovšem byl špatně rozpustný v ethanolu i karagenanu. Z toho důvodu bylo třeba vyzkoušet ještě jiný protizánětlivý lék. Vedle INDO se k potlačení otoku tlapek hojně užívá dexametazon (například Henriques et al. 1987, Hannon et al. 2003, Nonato et al. 2012). U myší, kterým byl spolu s CAR injikován DEX v dávce 1 mg/kg nebo 2 mg/kg tělesné hmotnosti, byla vskutku

pozorována výrazná inhibice otoku tlapek. Zmenšení velikosti otoku bylo ve srovnání s myši, jimž byl podán CAR bez DEX, statisticky signifikantní 4, 6 a 24 h od vytvoření zánětu. Mezi oběma dávkami DEX (1 mg/kg a 2 mg/kg) nebyly nápadné rozdíly v jejich schopnosti redukovat otok tlapek (obr. 18). DEX inhiboval otok tlapek účinněji než INDO (obr. 17 a obr. 18).

Kvůli účinnější inhibici otoku tlapek ve srovnání s INDO a také lepší rozpustnosti v karagenanu byl proto při následném testování cystatinů jakožto pozitivní kontrola užíván dexametazon.



Obr. 17: Nárůst velikosti tlapek (v %) 2, 4, 6, 24, 48, 72 a 96 h po podání CAR oproti velikosti tlapek před injekcí CAR: 1% CAR – skupina 3 myši, jimž byl injikován pouze CAR; 1% CAR + INDO – skupina 3 myši, jimž byl spolu s CAR podán indometacin v dávce 2 mg/kg; 0,9% NaCl + INDO – 1 myš, již byl spolu s fyziologickým roztokem injikován indometacin v dávce 2 mg/kg. Statisticky významný rozdíl mezi skupinami 1% CAR a 1% CAR + INDO je označen hvězdičkou.

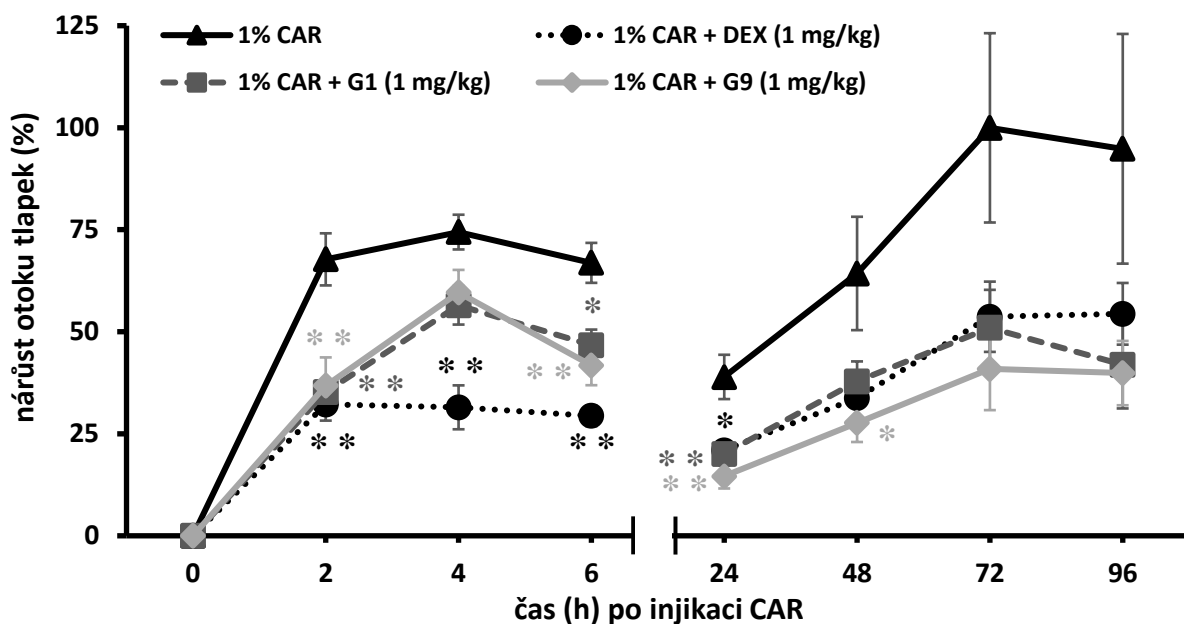


Obr. 18: Nárůst velikosti tlapek (v %) 2, 4, 6, 24, 48, 72 a 96 h po podání CAR oproti velikosti tlapek před injekcí CAR: 1% CAR – skupina 4 myši, jimž byl injikován pouze CAR; 1% CAR + DEX (1 mg/kg) – skupina 4 myši, jimž byl spolu s CAR podán dexametazon v dávce 1 mg/kg; 1% CAR + DEX (2 mg/kg) – skupina 3 myši, jimž byl spolu s CAR podán dexametazon v dávce 2 mg/kg. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami 1% CAR a 1% CAR + DEX (1 mg/kg) nebo skupinami 1% CAR a 1% CAR + DEX (2 mg/kg) jsou označeny hvězdičkami.

4.2.2. TESTOVÁNÍ CYSTATINŮ G1 A G9

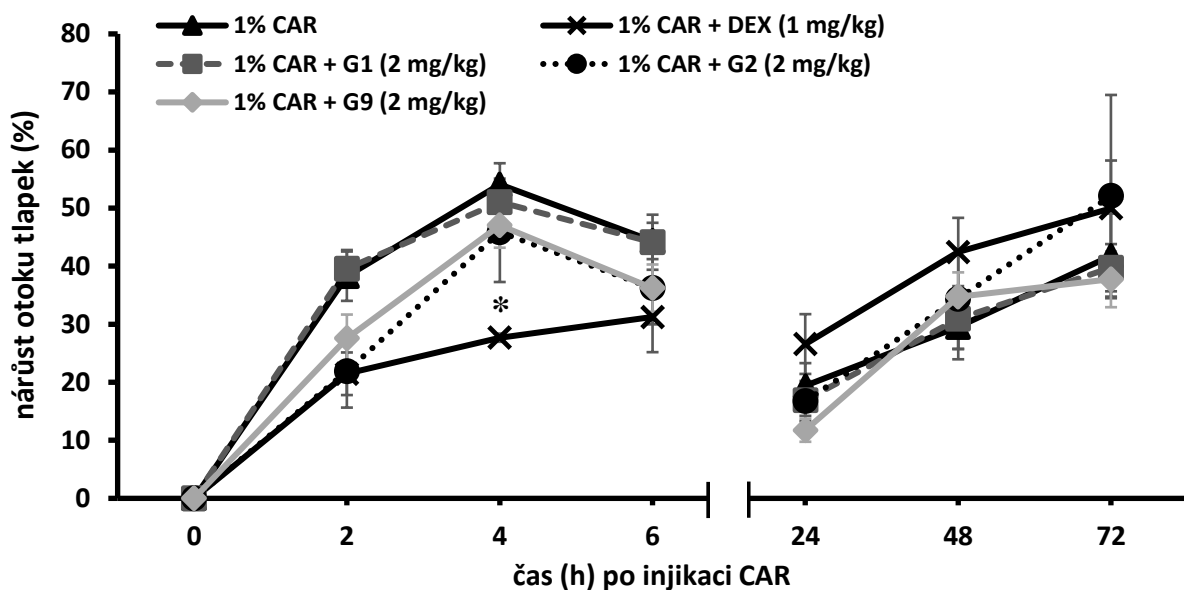
Po určení vhodné dávky CAR k navození otoku tlapek, výběru časových intervalů pro měření velikosti tlapek mikrometrem a srovnání míry zmenšení otoku INDO nebo DEX následovalo testování cystatinů G1 a G9 na jejich schopnost inhibovat otok tlapek indukovaný podáním 40 μ l 1% CAR. Jakožto pozitivní kontrola inhibice zánětlivého procesu v tlapkách byl vždy užíván DEX v množství 1 mg/kg tělesné hmotnosti myši, neboť dávka 1 mg/kg byla dostatečná k významnému snížení otoku tlapek (viz obr. 18).

Nejprve byly testovány cystatiny G1 a G9 v dávce 1 mg/kg tělesné hmotnosti myši. U myši, jimž byly injikovány cystatiny či dexametazon spolu s CAR došlo ve srovnání s myši, jimž byl podán CAR samotný, k statisticky významnému potlačení otoku tlapek v časových intervalech 2, 6 a 24 h. DEX navíc statisticky signifikantně snižoval otok tlapek v časovém intervalu 4 h a významná redukce otoku tlapek cystatinem G9 byla zaznamenána i 48 h po injekci CAR. Cystatiny G1 a G9 potlačovaly otok tlapek podobnou měrou (obr. 19).

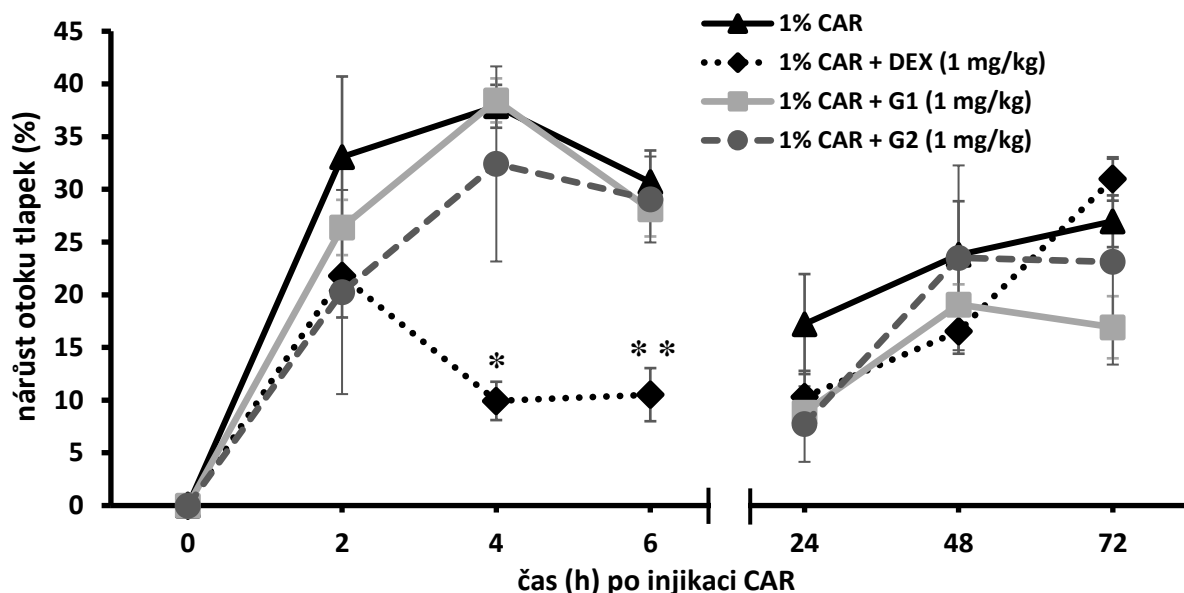


Obr. 19: Nárůst velikosti tlapek (v %) 2, 4, 6, 24, 48, 72 a 96 h po podání CAR oproti velikosti tlapek před injekcí CAR: 1% CAR – skupina 4 myši, jimž byl injikován pouze CAR; 1% CAR + DEX – skupina 4 myši, jimž byl spolu s CAR podán dexametazon v dávce 1 mg/kg; 1% CAR + G1 – skupina 4 myši, jimž byl spolu s CAR podán cystatin G1 v dávce 1 mg/kg; 1% CAR + G9 – skupina 4 myši, jimž byl spolu s CAR podán cystatin G9 v dávce 1 mg/kg. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami 1% CAR a 1% CAR + DEX, 1% CAR a 1% CAR + G1 nebo 1% CAR a 1% CAR + G9 jsou označeny hvězdičkami.

V následujících dvou experimentech, v nichž byl testován cystatin G1 v dávce 1 mg/kg či 2 mg/kg a cystatin G9 v dávce 2 mg/kg, však obdobná statisticky signifikantní redukce otoku tlapek zaznamenána nebyla (obr. 20 a 21). Dexametazon na rozdíl od cystatinů významně potlačil otok v obou experimentech. V prvním případě bylo statisticky významného snížení otoku tlapek dosaženo pouze v časovém intervalu 4 h (obr. 20), ve druhém případě pak byl otok dexametazonem významně inhibován v časových intervalech 4 a 6 h (obr. 21). Vedle dexametazonu a cystatinů G1 a G9 byl myším injikován i cystatin G2 (obr. 20 a 21). Od cystatinu G2 se, vzhledem k jiným pokusům, v nichž nevykazoval výrazné protizánětlivé účinky, neočekávalo žádné významné potlačení zánětlivého procesu v tlapkách. Podání cystatinu G2 tak mělo vyloučit případnou nespecifickou redukci otoku tlapek způsobenou podáním proteinu spolu s CAR. Cystatin G2 byl tedy použit jako negativní kontrola k cystatinům G1 a G9, u nichž byla protizánětlivá aktivita předpokládána.



Obr. 20: Nárůst velikosti tlapek (v %) 2, 4, 6, 24, 48 a 72 h po podání CAR oproti velikosti tlapek před injikací CAR: 1% CAR – skupina 4 myši, jimž byl injikován pouze CAR; 1% CAR + DEX – skupina 4 myši, jimž byl spolu s CAR podán dexametazon v dávce 1 mg/kg; 1% CAR + G1 – skupina 4 myši, jimž byl spolu s CAR podán cystatin G1 v dávce 2 mg/kg; 1% CAR + G2 – skupina 4 myši, jimž byl spolu s CAR podán cystatin G2 v dávce 2 mg/kg; 1% CAR + G9 – skupina 4 myši, jimž byl spolu s CAR podán cystatin G9 v dávce 2 mg/kg. Statisticky významný rozdíl mezi skupinami 1% CAR a 1% CAR + DEX je označen hvězdičkou.



Obr. 21: Nárůst velikosti tlapek (v %) 2, 4, 6, 24, 48 a 72 h po podání CAR oproti velikosti tlapek před injikací CAR: 1% CAR – skupina 4 myši, jimž byl injikován pouze CAR; 1% CAR + DEX – skupina 3 myši, jimž byl spolu s CAR podán dexametazon v dávce 1 mg/kg; 1% CAR + G1 – skupina 4 myši, jimž byl spolu s CAR podán cystatin G1 v dávce 1 mg/kg; 1% CAR + G2 – skupina 4 myši, jimž byl spolu s CAR podán cystatin G2 v dávce 1 mg/kg. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami 1% CAR a 1% CAR + DEX jsou označeny hvězdičkami.

5. DISKUSE

5.1. PERITONITIDA NAVOZENÁ APLIKACÍ THIOGLYKOLÁTOVÉHO MÉDIA

5.1.1. DYNAMIKA VÝSKYTU BUNĚČNÝCH POPULACÍ V PERITONEÁLNÍCH DUTINÁCH MYŠÍ V RŮZNÝCH ČASOVÝCH INTERVALECH PO PODÁNÍ TGM 1 NEBO TGM 2

5.1.1.1. BUNĚČNÉ POPULACE V PERITONEÁLNÍCH DUTINÁCH NESTIMULOVANÝCH TGM

Dle Misharina et al. lze z peritoneální dutiny nestimulované thioglykolátovým médiem získat zhruba $1-3 \times 10^6$ buněk (Misharin et al. 2012). V této práci bylo výplachem peritoneálních dutin bez zánětu obdrženo přibližně $1\,700\,000 \pm 200\,000$ živých buněk. Získané živé buňky se skládaly z přibližně 47 % B lymfocytů, 30 % rezidentních makrofágů a 8,5 % T lymfocytů. Toto procentuální zastoupení buněčných populací zhruba odpovídá tvrzení Raye a Dittelové, že živé buňky získané z nestimulovaných peritoneálních dutin myši jsou tvořené z 50–60 % B lymfocyty, z cca 30 % makrofágy a z 5–10 % T lymfocyty (Ray a Dittel 2010).

5.1.1.2. REZIDENTNÍ MAKROFÁGY

Krátce po intraperitoneální injikaci thioglykolátového média (časové intervaly 2, 4 a 8 h) došlo k značnému snížení počtu rezidentních makrofágů v peritoneálních dutinách. Tento jev, v anglicky psané literatuře označovaný jako „macrophage disappearance reaction“, běžně nastává po intraperitoneální injikaci TGM (Ghosn et al. 2010, Gautier et al. 2013). Vymizení rezidentních makrofágů je pravděpodobně způsobeno jejich migrací do omenta (Jonjić et al. 1992, Okabe a Medzhitov 2014).

5.1.1.3. NEUTROFILNÍ GRANULOCYTY, MONOCYTY A ZÁNĚTLIVÉ MAKROFÁGY

Udává se, že neutrofilů jsou prvními buňkami rekrutovanými do místa zánětu a taktéž jsou dominantní buněčnou populací během časné fáze akutního zánětlivého procesu (Ryan a Majno 1977, Kruger et al. 2015). Tomuto plně odpovídá dynamika výskytu neutrofilů v peritoneálních dutinách po injikaci TGM 2. Neutrofilů byly peritoneální laváží získány již

za 2 h po podání TGM 2 a v časových intervalech 4 a 8 h byly nejpočetněji zastoupenou buněčnou populací.

Přítomnost monocytů byla v peritoneálních dutinách zaznamenána již za 4 h od indukce peritonitidy. Po podání 200 μ l TGM 2 monocyty v časovém intervalu 4 h představovaly dokonce $8,8 \pm 1,6$ % všech živých buněk získaných peritoneální laváží. Toto pozorování je v souladu se zjištěním Hendersona et al., že monocyty migrují do peritoneálních dutin stimulovaných TGM současně s neutrofilů v reakci na MCP-1 uvolňovaný rezidentními makrofágy a mezoteliálními buňkami, které lemují peritoneum (Henderson et al. 2003). I přes podobný začátek migrace nicméně neutrofilů infiltrovaly místo zánětu rychleji a ve větších počtech než monocyty. Nejvyšší počet neutrofilů ($4\,800\,000 \pm 630\,000$ buněk) byl peritoneální laváží získán za 8 h po podání TGM 2, kdežto nejvíce monocytů ($1\,960\,000 \pm 170\,000$ buněk) bylo v peritoneálních dutinách zaznamenáno za 48 h od injekce TGM 2.

Rekrutované monocyty diferencovaly v zánětlivé makrofágy. Diferenciace monocytů v makrofágy, během níž dochází ke zvětšování velikosti a granularity buněk, ke zvyšování exprese F4/80 antigenu a MHC II a ke snižování exprese Ly-6C, byla v průběhu peritonitidy navozené TGM zaznamenána řadou autorů (Henderson et al. 2003, Ghosn et al. 2010). Přechodu monocytů v makrofágy odpovídá dynamika výskytu monocytů a zánětlivých makrofágů v časových intervalech 8, 48 a 72 h po podání TGM 2. Zánětlivé makrofágy se v peritoneálních dutinách začaly objevovat mezi 8 a 48 h od indukce peritonitidy, tedy v době, kdy docházelo k intenzivní migraci monocytů. Mezi 48. a 72. hodinou od injekce TGM 2 se počet zánětlivých makrofágů nadále zvyšoval, kdežto počet monocytů prudce poklesl, pravděpodobně právě proto, že se z nich staly makrofágy.

5.1.1.4. EOSINOFILNÍ GRANULOCYTY

V peritoneálních dutinách bez zánětu byla kromě B lymfocytů, rezidentních makrofágů a T lymfocytů zaznamenána přítomnost malého procenta eosinofilů. Dle Misharina et al. skutečně mohou zhruba 2–3% všech buněk v nestimulované peritoneální dutině tvořit neutrofilů, monocyty, žírné buňky a eosinofily (Misharin et al. 2012).

Již během prvního dne zánětlivé odpovědi indukované TGM 2 se počet eosinofilů mírně zvyšoval, avšak výrazný početní nárůst nastal až mezi 8 a 48 h od injekce TGM 2. V časovém intervalu 48 h bylo peritoneální laváží získáno cca $11\,000\,000 \pm 700\,000$ eosinofilů, v časovém intervalu 72 h pak počet eosinofilů poklesl z $11\,000\,000 \pm 700\,000$ buněk na přibližně $6\,700\,000 \pm 640\,000$ buněk. Tager et al. pozorovali podobný trend nárůstu

počtu eosinofilů v průběhu peritonitidy indukované TGM (Tager et al. 2000). Taktéž Misharin et al. zaznamenali velký počet eosinofilů v peritoneálních dutinách 72 h po injekci TGM a dále zjistili, že eosinofily jsou hlavní buněčnou populací, co kontaminuje kultury makrofágů získané výplachem peritoneálních dutin stimulovaných TGM (Misharin et al. 2012).

Opožděná migrace eosinofilů ve srovnání s migrací neutrofilů či monocytů pravděpodobně souvisí s tím, že chemoatraktanty zprostředkovávající rekrutaci eosinofilů jsou produkovány leukocyty, které migrují do peritoneální dutiny před eosinofily (Tager et al. 2000). Dominantní roli v akumulaci eosinofilů v peritoneální dutině hraje zejména leukotrien B₄, jehož zdrojem mohou být, mimo jiné, neutrofilů, monocytů, makrofágů i samotné eosinofily (Bray 1983, Tager et al. 2000).

5.1.1.5. LYMFOCYTY

Dynamika výskytu B lymfocytů a T lymfocytů v peritoneálních dutinách stimulovaných TGM 2 byla obdobná. Krátce po injekci TGM 2 došlo k poklesu obou subpopulací lymfocytů. Mezi 4. a 8. hodinou od indukce peritonitidy se ale počet B a T lymfocytů zase začal mírně zvyšovat. Tento početní nárůst korespondoval s migrací neutrofilů a monocytů do peritoneálních dutin. Nejvíce B i T lymfocytů bylo zaznamenáno v časovém intervalu 48 h. Féralová et al. pozorovali obdobnou dynamiku migrace lymfocytů do peritoneálních dutin po injekci TGM. I jim se podařilo získat nejvyšší počet lymfocytů peritoneální laváží za 48 h od podání TGM (Féral et al. 2006). Ačkoli lymfocyty byly v průběhu zánětlivého procesu vyvolaného TGM 2 rekrutovány do peritoneálních dutin, jejich migrace zdaleka nedosahovala takové intenzity jako migrace buněk myeloidní linie.

V nestimulovaných peritoneálních dutinách byl poměr počtu CD4⁺ T lymfocytů ku počtu CD8⁺ T lymfocytů zhruba 5 : 1. Po navození peritonitidy injekcí TGM 2 tento poměr kolísal v rozmezí od cca 4 : 1 do 7 : 1. V periferní krvi myší inbredního kmene C57BL/6 starých 1–5 měsíců byly v různých studiích zaznamenány následující poměry CD4⁺ T lymfocytů ku CD8⁺ T lymfocytům: cca 1 : 1 (Pinchuk a Filipov 2008), 1 : 1 až 3 : 1 (Xie et al. 2016) a 1 : 1 až 6 : 1 (Fink et al. 1992). S rostoucím věkem myší se poměr CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů snižoval (Fink et al. 1992, Pinchuk a Filipov 2008, Xie et al. 2016). Poměry počtu CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů zjištěné v této práci jsou tedy ve srovnání s výsledky výše uvedených studií analyzujících zastoupení subpopulací T lymfocytů v periferní krvi spíše vysoké a nejvíce odpovídají údajům uvedeným v poslední jmenované studii.

5.1.1.6. THIOGLYKOLÁTOVÁ MÉDIA

K indukci peritonitidy byla užita dvě různá thioglykolátová média – alternativní thioglykolátové médium od firmy Sigma-Aldrich (TGM 1) a Difco™ tekuté thioglykolátové médium od firmy BD (TGM 2). Zánětlivé odpovědi navozené injekcí TGM 1 a TGM 2 se od sebe nápadně lišily. Intraperitoneální podání TGM 2 vyvolalo ve srovnání s injekcí TGM 1 intenzivnější zánětlivý proces s výrazně vyššími počty neutrofilů, monocytů a zánětlivých makrofágů v peritoneálních dutinách. Poměrně vysoké množství neutrofilů a monocytů bylo získáno peritoneální laváží ještě 48 a 72 h po injekci TGM 2, kdežto po podání TGM 1 se v těchto časových intervalech v peritoneálních dutinách již prakticky žádné neutrofilů a monocytů nenacházely. Obě média se lišila i v dynamice výskytu eosinofilů v místě zánětu. Zatímco v rámci zánětu indukovaného intraperitoneálním podáním TGM 1 nedošlo k nápadným změnám v procentuálním a početním zastoupení eosinofilů oproti peritoneálním dutinám bez zánětu, injekce TGM 2 vedla v časových intervalech 48 a 72 h k markantní migraci eosinofilů do peritoneálních dutin.

Jak TGM 1, tak i TGM 2 se skládala ze stejného množství peptonu z kaseinu, kvasničného extraktu, dextrózy, chloridu sodného, L-cystinu a thioglykolátu sodného. TGM 2 však na rozdíl od TGM 1 obsahovalo ještě redoxní indikátor resazurin a malé množství agaru. Agar je polysacharid extrahovaný ze stejného kmene červených řas (ruduchy) jako karagenan. Karagenan se v *in vivo* experimentech běžně užívá k indukci zánětu, a tak není překvapivé, že i u agaru byly zjištěny prozánětlivé účinky. Například Avila et al. vyvolali u potkanů kmene Wistar injekcí agaru zánětlivou odpověď vyznačující se výskytem mnoha neutrofilů a monocytů/makrofágů spolu s menším množstvím lymfocytů a eosinofilů (Avila et al. 2016). V jiné studii byl zase agar užít k navození otoku tlapek u hlodavců (Okoli et al. 2007). Je tedy možné, že pozorované rozdíly mezi průběhem peritonitidy indukované TGM 1 a peritonitidy indukované TGM 2 jsou aspoň zčásti způsobené absencí agaru v TGM 1.

5.1.2. **OPTIMALIZACE DÁVKY THIOGLYKOLÁTOVÉHO MÉDIA**

Dávka TGM pro testování cystatinů G1 a G9 byla optimalizována prostřednictvím protizánětlivých léků indometacinu a dexametazonu. Oba léky byly schopné inhibovat migrace buněk myeloidní linie do peritoneálních dutin stimulovaných 200 μ l TGM 2.

5.1.2.1. INDOMETACIN A NEUTROFILY

Indometacin (5 mg/kg) podaný 30 min před TGM 2 a poté znovu spolu s TGM 2 statisticky signifikantně inhiboval migraci neutrofilů do peritoneálních dutin ($P < 0,05$). Schopnost INDO potlačit rekrutaci neutrofilů do místa zánětu byla zaznamenána v řadě různých experimentálních modelů akutního zánětu (Errasfa a Russo-Marie 1989, Garjani et al. 2008, Pereira et al. 2009, Olabissi et al. 2011).

Ačkoli je známo, že INDO potlačuje migraci neutrofilů *in vivo*, doposud není úplně jasné, proč tomu tak je. Indometacin patří mezi nesteroidní protizánětlivé léky (NSAIDs), jejichž hlavním mechanismem účinku je inhibice cyklooxygenázy (Ong et al. 2007). Cyklooxygenáza (COX) je enzym katalyzující syntézu prostaglandinů H_2 a G_2 z kyseliny arachidonové. Prostaglandin H_2 je následně konvertován do celé řady eikosanoidů včetně prostaglandinů E_2 , D_2 , $F_{2\alpha}$, prostacyklinu a tromboxanu A_2 (Dubois et al. 1998). Prostaglandiny E_2 a $F_{2\alpha}$ napomáhají migraci neutrofilů do místa zánětu (Arnould et al. 2001, de Menezes et al. 2005, Lemos et al. 2009). INDO inhibicí COX snižuje produkci těchto prostaglandinů, což může mít za následek i potlačení migrace neutrofilů (Arnould et al. 2001, de Menezes et al. 2005, Menezes et al. 2008, Lemos et al. 2009).

Ačkoli hlavním mechanismem účinku NSAIDs je inhibice syntézy prostaglandinů, k potlačení migrace neutrofilů by mohlo docházet i jinými mechanismy, nezávislými na inhibici COX. V přítomnosti INDO bylo například pozorováno rychlé snížení exprese L-selektinu na povrchu neutrofilů, což vedlo k inhibici adheze neutrofilů k endoteliálním buňkám (Díaz-González et al. 1995).

5.1.2.2. INDOMETACIN A MONOCYTY

INDO statisticky signifikantně potlačoval vedle migrace neutrofilů i migraci monocytů vyvolanou injekcí 200 μ l TGM 2 ($P < 0,05$).

Bohužel neexistuje moc studií, jež by se zabývaly účinkem INDO na migraci monocytů *in vivo*. V několika studiích však byl zaznamenán vliv INDO na rekrutaci mononukleárních buněk, jejichž součástí jsou vedle lymfocytů právě monocyty. Dříve se předpokládalo, že některé NSAIDs mohou působením přímo na povrch mononukleárních buněk zabraňovat jejich migraci do místa zánětu (Willoughby a DiRosa 1972). Dokonce se uvádělo, že NSAIDs účinněji interferují s migrací mononukleárních buněk než s migrací neutrofilů (Nielsen a Bennedsen 1983). *In vitro* skutečně byla zaznamenána inhibice chemotaxe monocytů některými NSAIDs, inhibiční účinky konkrétně INDO ale byly slabé a

projevily se pouze při vysokých koncentracích (Nielsen a Bennedsen 1983). Na druhou stranu v experimentálním modelu pleuritidy INDO (5 mg/kg) v časovém intervalu 24 h potlačil migraci mononukleárních buněk vyvolanou injekcí karagenanu (Meacock a Kitchen 1976).

5.1.2.3. INDOMETACIN A EOSINOFILY

INDO (5 mg/kg) podaný 30 min před TGM 2 a znovu současně s TGM 2 statisticky významně snížil počet eosinofilů v peritoneálních dutinách stimulovaných 200 μ l TGM 2. Podobně INDO nepotlačil migraci eosinofilů vyprovokovanou podáním ovalbuminu do peritoneálních dutin myši senzibilizovaných ovalbuminem (Zuany-Amorim et al. 1993).

Neschopnost INDO potlačit rekrutaci eosinofilů do místa zánětu by mohla být zapříčiněna chemotaktickými účinky INDO na eosinofily (Hirai et al. 2002, Stubbs et al. 2002).

5.1.2.4. DEXAMETAZON A NEUTROFILY

DEX (5 mg/kg) podaný 1 h před TGM 2 a opět současně s TGM 2 statisticky signifikantně inhiboval migraci neutrofilů vyprovokovanou injekcí 200 μ l TGM 2 ($P < 0,01$).

Potlačení migrace neutrofilů dexametazonem bylo pozorováno v řadě modelů experimentálního zánětu včetně peritonitidy indukované karagenanem, zymosanem a glykogenem (Errasfa a Russo-Marie 1989, Getting et al. 1997, Teixeira et al. 1998, Hannon et al. 2003, Pereira et al. 2009, Nonato et al. 2012).

Existuje řada mechanismů, jimiž DEX může potlačit rekrutaci neutrofilů do místa zánětu. V první řadě dexametazon zvyšuje u cirkulujících neutrofilů a monocytů expresi annexinu A1 (Perretti a Flower 1996). V mnoha *in vitro* a *in vivo* studiích byla prokázána schopnost annexinu A1 inhibovat migraci neutrofilů (Errasfa a Russo-Marie 1989, Getting et al. 1997, Lim et al. 1998, Teixeira et al. 1998, Walther et al. 2000). Tudiž skrze stimulaci syntézy a uvolňování annexinu A1 dokáže DEX nepřímo potlačit infiltraci zánětlivého ložiska neutrofilů.

Dále je DEX schopný interferovat s rekrutací neutrofilů do místa zánětu inhibicí exprese adhezivních molekul ELAM-1 (endothelial-leukocyte adhesion molecule 1) a ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) aktivovanými endoteliálními buňkami (Cronstein et al. 1992, Tailor et al. 1999) a taktéž potlačením produkce chemokinů MIP-2 a KC (Tailor et al. 1999, Schramm et al. 2000).

5.1.2.5. DEXAMETAZON A MONOCYTY

V peritoneálních dutinách myší, jimž byl podán DEX, došlo ke statisticky významnému snížení počtu monocytů oproti myším, jimž byl podán pouze fyziologický roztok ($P < 0,01$). Taktéž v experimentálních modelech pleuritidy a peritonitidy navozené zymosanem došlo k potlačení migrace monocytů/mononukleárních buněk do místa zánětu (Meacock a Kitchen 1976, Getting et al. 1997).

Annexin A1 je schopný vedle migrace neutrofilů inhibovat i migraci monocytů. Tudíž jedním z mechanismů, jimiž DEX potlačuje rekrutaci monocytů, je stimulace exprese annexinu A1 (Getting et al. 1997). DEX dále může snižovat počet živých monocytů v zánětlivém ložisku inhibicí sekrece chemoatraktantu MCP-1 (Slavin et al. 1995, Dhawan et al. 2007) a navozením apoptózy monocytů (Schmidt et al. 1999).

5.1.2.6. DEXAMETAZON A EOSINOFILY

U myší, jimž byl podán DEX, došlo ve srovnání s myšmi, jimž byl injikován fyziologický roztok bez dexametazonu, k značnému snížení počtu eosinofilů v peritoneálních dutinách. To, že toto snížení počtu eosinofilů není dle jednocestné analýzy variance statisticky signifikantní ($P = 0,063$), je pravděpodobně způsobeno nestejným počtem myší v jednotlivých skupinách a/nebo velkou směrodatnou odchylkou indometacinové skupiny. Každopádně inhibice migrace eosinofilů DEX byla pozorována v řadě *in vivo* studií (Zuany-Amorim et al. 1993, Das et al. 1997, Teixeira et al. 1998).

DEX může snižovat počet živých eosinofilů na místě zánětu inhibicí uvolňování eosinofilů z kostní dřene (Das et al. 1997), navozením apoptózy eosinofilů (Druilhe et al. 1996) a potlačením produkce IL-5 (Rolfe et al. 1992, Okayama et al. 1994). U myší i lidí IL-5 stimuluje proliferaci a diferenciaci prekurzorů eosinofilů ve zralé eosinofily, prodlužuje přežívání eosinofilů inhibicí jejich apoptózy, má chemotaktické účinky na eosinofily, zvyšuje adhezi eosinofilů k endoteliálním buňkám a podněcuje efektorové funkce eosinofilů (Kouro a Takatsu 2009). Tedy potlačením produkce IL-5 je DEX schopný inhibovat migraci eosinofilů do místa zánětu a zároveň snižovat přežívání těch eosinofilů, jež se do zánětlivého ložiska dostaly.

5.1.3. TESTOVÁNÍ CYSTATINŮ G1 A G9

Klíšťata spolu se slinami vylučují komponenty, které jim umožňují interferovat s rekrutací neutrofilů, monocytů a eosinofilů do místa sání. V první řadě mohou složky

obsažené v klíštěcích slinách inhibovat migraci výše zmíněných buněk potlačením exprese adhezivních molekul jako jsou β_2 integriny, P-selektin a VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) (Montgomery et al. 2004, Maxwell et al. 2005, Guo et al. 2009). Dále mohou některé komponenty klíštěcích slin vázat LTB₄ (Beaufays et al. 2008) a některé chemotaktické faktory, kupříkladu MCP-1, RANTES a eotaxin (Hajnická et al. 2005), a tak inhibovat chemotaxi neutrofilů, monocytů a eosinofilů do místa sání klíštěte. Chemotaxi zánětlivých buněk může klíště dále potlačit inhibicí aktivace komplementu, neboť v rámci komplementové kaskády vznikají fragmenty C3a a C5a s chemotaktickými účinky na leukocyty (Schuijt et al. 2011).

Mezi složky klíštěcích slin s potenciálními inhibičními účinky na chemotaxi neutrofilů během zánětlivého procesu patří i cystatiny. Například lidský cystatin C inhiboval chemotaxi neutrofilů indukovanou fragmenty složek komplementu (Leung-Tack et al. 1990). Podobně sialostatin L klíštěte *I. scapularis* potlačil rekrutaci neutrofilů do zadních tlapek myši vyprovokovanou intraplantární injekcí karagenanu (Kotsyfakis et al. 2006).

V rámci této práce cystatiny G1 a G9 klíštěte *I. ricinus* statisticky významně snížily počet buněk myeloidní linie rekrutovaných do peritoneálních dutin stimulovaných TGM. Podání cystatinu G9 dále vedlo k signifikantní inhibici migrace neutrofilů vyvolané injekcí TGM ($P < 0,05$). Cystatin G1 sice také potlačil rekrutaci neutrofilů do peritoneálních dutin, ovšem toto již nebylo statisticky signifikantní ($P = 0,071$). Inhibice migrace neutrofilů cystatiny G1 a G9 v průběhu peritonitidy koresponduje s výsledky Michaely Kubíčkové, která se v rámci své bakalářské práce věnovala vlivu cystatinů na adhezi neutrofilů k vybraným proteinům ECM *in vitro*. Cystatin G9 o koncentracích 1 μM a 3 μM statisticky významně snížil adhezi neutrofilů k lamininu. Cystatin G1 o koncentraci 1 μM na druhou stranu neměl na adhezi neutrofilů k lamininu žádný vliv a určité potlačení adheze, které však nebylo významné, bylo pozorováno až při koncentraci 3 μM (Kubíčková 2016). Je tedy možné, že pozorovaná inhibice rekrutace neutrofilů během peritonitidy je, aspoň zčásti, zapříčiněna schopností cystatinů interferovat s adhezí neutrofilů k proteinům ECM.

Injekce cystatinů G1 a G9 rovněž vyústila v nižší počet monocytů v peritoneálních dutinách stimulovaných TGM (v případě G9 $P < 0,05$). Poněvadž monocyty diferencují v makrofágy (Henderson et al. 2003, Ghosn et al. 2010), cystatiny G1 a G9 by mohly snižovat vedle počtu neutrofilů a monocytů i množství zánětlivých makrofágů v zánětlivém ložisku. Počet eosinofilů ve stimulovaných peritoneálních dutinách nebyl významně ovlivněn podáním cystatinů.

5.2. OTOK TLAPEK VYVOLANÝ PODÁNÍM KARAGENANU

5.2.1. OPTIMALIZACE

5.2.1.1. PRŮBĚH OTOKU TLAPEK

Otok tlapek indukovaný podáním karagenanu měl bifázický průběh. Do zhruba 4 h od intraplantárního podání CAR se otok tlapek postupně zvětšoval, ovšem tento počáteční 4 hodinový nárůst byl vzápětí následován poklesem otoku. Během druhého dne experimentu začal otok tlapek opět narůstat a přetrvával i 4. den od injekce CAR. Henriquesová et al., Hannon et al. a Posadasová et al. pozorovali podobný bifázický průběh, byť často s rychlejším začátkem opětovného nárůstu otoku (Henriques et al. 1987, Hannon et al. 2003, Posadas et al. 2004). Jak první, tak i druhá fáze byly obdobné intenzity. Dle Henriquesové et al. velikost otoku tlapek během první fáze nezávisí na dávce podaného CAR, kdežto velikost otoku během druhé fáze se zvyšuje s rostoucí dávkou CAR (Henriques et al. 1987). Tedy pokud by k indukci otoku tlapek byl namísto 1% CAR užít např. 3% CAR, druhá fáze otoku by pravděpodobně dosahovala vyšší intenzity než první fáze.

5.2.1.2. VLIV INDOMETACINU NA OTOK TLAPEK

INDO (2 mg/kg) podaný společně s CAR statisticky signifikantně redukoval otok tlapek v časovém intervalu 4 h ($P < 0,05$). Ke zmenšení otoku tlapek INDO došlo v celé řadě studií (Sugishita et al. 1981, Henriques et al. 1987, Garjani et al. 2008, Olabissi et al. 2011, Hassimotto et al. 2013, Liao et al. 2013).

Na vzniku otoku tlapek se spolu s histaminem, serotoninem a bradykininem podílí i prostaglandiny jakožto látky se silnými vazodilatačními účinky (Posadas et al. 2004). Syntézy prostaglandinů se vedle cyklooxygenázy účastní i enzym fosfolipáza A₂. Fosfolipáza A₂ uvolňuje z fosfolipidů buněčných membrán kyselinu arachidonovou. Uvolněná kyselina arachidonová je následně konvertována COX na prostaglandin H₂, který je dalšími enzymy metabolizován na různé prostaglandiny, prostacykliny a tromboxany (Balsinde et al. 2002, Ricciotti a FitzGerald 2011). Existují dvě izofomy cyklooxygenázy. Isoforma COX-1 je konstitutivně exprimovaná v mnoha tkáních, například v krevních destičkách, ledvinách a ve střevech (Nantel et al. 1999). Je zodpovědná zejména za biosyntézu prostaglandinů zahrnutých v homeostatické regulaci. Naopak izoforma COX-2 ve většině tkání za fyziologických podmínek není exprimovaná vůbec či jenom v nízké míře, ale její expresi výrazně zvyšují

různé stimuly včetně prozánětlivých cytokinů a růstových faktorů (Dubois et al. 1998). Na rozvoji otoku tlapek se podílí obě izoformy COX (Posadas et al. 2004).

INDO je neselektivní inhibitor cyklooxygenázy, což znamená, že má schopnost inhibovat jak COX-1, tak COX-2 (Mitchell et al. 1993). Nadto bylo zjištěno, že INDO rovněž inhibuje aktivitu fosfolipázy A₂, čímž snižuje dostupné množství prekursoru prostaglandinů – kyseliny arachidonové (Kaplan et al. 1978, Franson et al. 1980). Tudíž INDO v podstatě potlačuje produkci prostaglandinů na dvou úrovních, a tím i efektivně redukuje otok tlapek. Ke snížení otoku tlapek by dále mohla přispívat schopnost INDO inhibovat infiltraci místa zánětu neutrofilů a monocytů.

5.2.1.3. VLIV DEXAMETAZONU NA OTOK TLAPEK

DEX statisticky významně snižoval otok tlapek navozený podáním 1% CAR zejména v časových intervalech 4 a 6 h. Inhibice otoku tlapek DEX byla pozorována v mnoha studiích (Henriques et al. 1987, Duncan et al. 1993, Hannon et al. 2003, Wise et al. 2008, Nonato et al. 2012, Reis et al. 2013).

Existuje řada mechanismů, jimiž DEX redukuje otok tlapek. V první řadě je DEX schopný potlačovat produkci a aktivitu fosfolipázy A₂ a COX-2 (Nakano et al. 1990, Gewert a Sundler 1995, Newton et al. 1998). Inhibicí obou enzymů DEX, podobně jako indometacin, snižuje tvorbu prostaglandinů v místě zánětu (Sudlow et al. 1996, Newton et al. 1998).

Vedle prostaglandinů k rozvoji otoku tlapek přispívají i superoxid a oxid dusnatý. Superoxidové anionty zvyšují vaskulární permeabilitu, podporují rekrutaci buněk do místa zánětu a poškozují tkáň. NO má vazodilatační účinky, zvyšuje tvorbu prozánětlivých prostaglandinů stimulací aktivity COX-1 a COX-2 a reakcí se superoxidem dává vznik peroxynitritu, který následně poškozuje buňky (Salvemini et al. 1996). Syntéza oxidu dusnatého z L-argininu je katalyzována enzymem NO syntázou (NOS). Byly rozpoznány tři izoformy NOS: neuronální NOS (nNOS), endoteliální NOS (eNOS) a indukibilní NOS (iNOS). Jak eNOS, tak i nNOS jsou konstitutivní izoformy, kdežto iNOS je syntetizována *de novo* v reakci na bakteriální endotoxiny a/nebo prozánětlivé cytokiny (Handy a Moore 1998). DEX snižuje produkci superoxidu fagocyty (Maridonneau-Parini et al. 1989) a také potlačuje tvorbu NO inhibicí exprese iNOS (Radomski et al. 1990, Kunz et al. 1996).

DEX tedy redukuje otok tlapek potlačením produkce prostaglandinů, superoxidu a NO. K potlačení produkce těchto mediátorů zřejmě přispívá i schopnost DEX inhibovat migraci zánětlivých buněk.

5.2.2. TESTOVÁNÍ CYSTATINŮ G1 A G9

Inhibiční účinky cystatinů G1 a G9 na migraci neutrofilů a monocytů pozorované v rámci peritonitidy by mohly vést ke snížení otoku tlapek. Neutrofilové produkují reaktivní formy kyslíku, jako jsou superoxidové anionty a hydroxylové radikály (Bannister et al. 1982). Monocyty, jakožto fagocytující buňky, také tvoří ROS (Weiss et al. 1978) a dále jsou prekurzory makrofágů – producentů superoxidu, prostaglandinů a oxidu dusnatého (Kunkel et al. 1982, Hartung et al. 1983, Assreuy et al. 1994). Zeslabení migrace neutrofilů a monocytů podanými cystatiny by tedy mohlo vyústit v nižší množství superoxidových aniontů, NO a prostaglandinů v tlapkách, a tím pádem i k potlačení otoku tlapek.

V počátečním experimentu bylo skutečně zaznamenáno statisticky významné snížení otoku tlapek u těch myší, jimž byly spolu s CAR podány cystatiny G1 a G9. V následujících dvou experimentech se však i přes totožnou metodiku a těsnou časovou návaznost jednotlivých pokusů tento výsledek nepodařilo zopakovat. DEX na rozdíl od cystatinu G1 významně snížil otok tlapek ve všech třech experimentech. Z toho lze usuzovat, že absence redukce otoku u myší, kterým byl podán cystatin G1, je pravděpodobně způsobena nízkou protizánětlivou aktivitou cystatinu G1. Je sice možné, že cystatin G1 skutečně snížil počet neutrofilů a monocytů rekrutovaných do tlapek, ovšem tato redukce počtu buněk ještě nemusela být dostatečná k významnému potlačení otoku tlapek. Například Kotsyfakis et al. podáním 3 μ M sialostatínu L v časovém intervalu 4 h nedosáhli statisticky významného snížení otoku tlapek. Na druhou stranu stejná koncentrace sialostatínu L byla v časovém intervalu 4 h dostatečná k statisticky významné inhibici ($P < 0,001$) rekrutace neutrofilů do tlapek (Kotsyfakis et al. 2006). Tudiž by bylo vhodné v budoucnosti vedle měření velikosti otoku tlapek hodnotit i intenzitu migrace neutrofilů do tlapek stanovením aktivity či množství myeloperoxidázy v tlapkách.

Cystatin G9 byl na rozdíl od cystatinu G1 testován pouze ve dvou experimentech, z nichž v jednom došlo k statisticky významnému snížení otoku, a ve druhém naopak významná redukce otoku tlapek zaznamenána nebyla. Tudiž o schopnosti cystatinu G9 snižovat otok tlapek zatím nelze činit žádné definitivní závěry.

6. ZÁVĚR

Během vypracování této diplomové práce byly optimalizovány dva myší modely akutního zánětu – peritonitida navozená aplikací thioglykolátového média a otok tlapek vyvolaný podáním karagenanu.

V rámci optimalizace experimentální peritonitidy byly napřed zvoleny strategie pro identifikaci neutrofilů, monocytů, makrofágů, eosinofilů, B lymfocytů a T lymfocytů na průtokovém cytometru. Zvolené strategie „gatování“ byly následně užity k zjištění dynamiky výskytu výše zmíněných buněčných populací v peritoneálních dutinách myší v různých časových intervalech po intraperitoneální injikaci dvou thioglykolátových médií od odlišných výrobců (BD a Sigma-Aldrich). Nakonec byla prostřednictvím protizánětlivých léků indometacinu a dexametazonu upravena dávka TGM pro testování cystatinů G1 a G9 v časovém intervalu 4 h.

Optimalizace otoku tlapek zahrnovala výběr vhodné dávky karagenanu pro navození zánětlivého procesu, zjištění dynamiky otoku tlapek v časových intervalech 2, 4, 6, 24, 48, 72 a 96 h po intraplantární injikaci CAR a porovnání schopnosti indometacinu a dexametazonu snížit otok tlapek. Účinnější z obou léků byl později při testování cystatinů užíván jako pozitivní kontrola potlačení otoku tlapek.

Po dokončení optimalizace peritonitidy a otoku tlapek byla v obou modelech akutního zánětu sledována protizánětlivá aktivita rekombinantních cystatinů G1 a G9 klíštěte *I. ricinus*. V případě peritonitidy byla hodnocena schopnost cystatinů G1 a G9 potlačit infiltraci peritoneálních dutin myeloidními buňkami, neutrofilů, monocytů a eosinofilů. V rámci otoku tlapek byl testován antiedematózní účinek cystatinů G1 a G9.

6.1. PERITONITIDA NAVOZENÁ APLIKACÍ THIOGLYKOLÁTOVÉHO MÉDIA

- DifcoTM tekuté thioglykolátové médium (BD) vyvolalo ve srovnání s alternativním thioglykolátovým médiem (Sigma-Aldrich) silnější zánětlivou odpověď s výrazně vyššími počty neutrofilů, monocytů, zánětlivých makrofágů a eosinofilů v peritoneálních dutinách.
- Prostřednictvím protizánětlivých léků indometacinu a dexametazonu byla k indukci peritonitidy pro testování cystatinů G1 a G9 v časovém intervalu 4 h zvolena dávka 200 μ l 3% DifcoTM tekutého thioglykolátového média (BD).

- Cystatin G1 statisticky významně inhiboval migraci myeloidních buněk do peritoneálních dutin stimulovaných TGM.
- Cystatin G9 statisticky významně inhiboval migraci myeloidních buněk, neutrofilů a monocytů do peritoneálních dutin stimulovaných TGM.

6.2. OTOK TLAPEK VYVOLANÝ PODÁNÍM KARAGENANU

- Pro indukci otoku tlapek u myši byla zvolena dávka 40 μ l 1% λ -karagenanu.
- Otok tlapek navozený podáním 40 μ l 1% CAR měl typický bifázický průběh (první fáze: 0–24 h po podání CAR, druhá fáze: 24–96 h po podání CAR).
- Pro pozitivní kontrolu potlačení otoku tlapek byl vybrán dexametazon v dávce 1 mg/kg tělesné hmotnosti myši.
- V úvodním experimentu cystatin G1 statisticky významně snížil otok tlapek. V následujících dvou opakováních daného experimentu se však schopnost cystatinu G1 redukovat otok tlapek nepodařilo potvrdit.
- Vliv cystatinu G9 na otok tlapek je z důvodu nedostatečného počtu provedených experimentů zatím nejasný.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

0,9% NaCl	fyziologický roztok
APC	allophycocyanin
AV ČR	Akademie věd České republiky
BD	Becton, Dickinson and Company
BSA	bovine serum albumin; hovězí sérový albumin
CAR	carrageenan; karagenan
CC chemokiny	skupina chemokinů, jejichž první dva konzervované cysteinové zbytky na N-konci molekuly spolu přímo sousedí
CCL	CC chemokine ligand
CD	cluster of differentiation; diferenciační skupina
CD3e	povrchový glykoprotein exprimovaný thymocyty a zralými T lymfocyty
CD4	povrchový glykoprotein exprimovaný většinou thymocytů, subpopulací zralých T lymfocytů (především pomocnými T lymfocyty) a dendritickými buňkami
CD8a	povrchový glykoprotein exprimovaný většinou thymocytů, subpopulací zralých T lymfocytů (hlavně cytotoxickými T lymfocyty) a dendritickými buňkami
CD11b	transmembránový glykoprotein exprimovaný granulocyty, makrofágy, myeloidními dendritickými buňkami, NK buňkami atd.
CD19	transmembránový glykoprotein exprimovaný všemi vývojovými stádii B lymfocytů kromě plazmatických buněk
CD45	transmembránový glykoprotein exprimovaný všemi buňkami hematopoetického původu s výjimkou zralých erytrocytů a krevních destiček
COX	cyklooxygenáza
COX-1	cyklooxygenáza 1 (konstitutivní izoforma COX)
COX-2	cyklooxygenáza 2 (inducibilní izoforma COX)
DEX	dexametazon
DNA	deoxyribonucleic acid; deoxyribonukleová kyselina
ECM	extracelulární matrix

F4/80 antigen	transmembránový protein exprimovaný většinou zralých makrofágů, peritoneálními eosinofily a subtypy dendritických buněk
FACS	fluorescence-activated cell sorting; třídění buněk aktivované fluorescencí
Fc	fragment crystallizable; krystalizovatelný fragment
FITC	fluorescein isothiocyanate
FSC	forward scatter; přímý rozptyl
IL	interleukin
INDO	indometacin
i.p.	intraperitoneálně
Ir-LBP	<i>Ixodes ricinus</i> leukotriene B ₄ -binding protein; lipokalin ve slinách klíštěte <i>Ixodes ricinus</i>
ISL 929/1373	proteiny ve slinách klíštěte <i>Ixodes scapularis</i>
KC	keratinocyte chemoattractant
kDa	kilodalton
LPS	lipopolysacharid
LTB ₄	leukotrien B ₄
Ly-6C	lymphocyte antigen 6 complex, locus C; protein exprimovaný na povrchu monocytů/makrofágů, endoteliálních buněk, granulocytů a některých lymfocytů
Ly-6G	lymphocyte antigen 6 complex, locus G; protein exprimovaný na povrchu granulocytů v periferní krvi
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1
MHC	major histocompatibility complex; hlavní histokompatibilní komplex
MHC II	MHC glykoproteiny II. třídy
MIP-2	macrophage inflammatory protein 2
NaCl	chlorid sodný
NK	natural killer; „přirozený zabíječ“
NO	oxid dusnatý
NOS	NO syntáza
eNOS	endoteliální NO syntáza (konstitutivní izoforma NOS)
iNOS	inducibilní NO syntáza (inducibilní izoforma NOS)
nNOS	neuronální NO syntáza (konstitutivní izoforma NOS)

NSAIDs	non-steroidal anti-inflammatory drugs; nesteroidní protizánětlivé léky
O ₂ ⁻	superoxidový aniont, superoxid
OspC	outer surface protein C; vnější povrchový protein C borelií
PBS	phosphate buffered saline; fyziologický roztok pufovaný fosfáty
PE	phycoerythrin
PE-Cy7	phycoerythrin-cyanine 7
PerCP-Cy5.5	peridinin-chlorophyll-protein complex-cyanine 5.5
PI	propidium iodide; propidium jodid
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RNA	ribonucleic acid; ribonukleová kyselina
ROS	reactive oxygen species; reaktivní formy kyslíku
Salp15	protein ve slinách klíštěte <i>Ixodes scapularis</i>
Salp16 Iper1/Iper2	proteiny ve slinách klíštěte <i>Ixodes persulcatus</i>
SAT	saliva-assisted transmission; slinami asistovaný přenos
SGE	salivary gland extract; extrakt ze slinných žláz
SialoL	sialostatin L
SialoL2	sialostatin L2
Siglec-F	sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin F; lektin exprimovaný hlavně na povrchu eosinofilů a alveolárních makrofágů
SSC	side scatter; boční rozptyl
TGM	thioglykolátové médium
TGM 1	alternativní thioglykolátové médium (thioglycollate broth) od firmy Sigma-Aldrich
TGM 2	Difco™ tekuté thioglykolátové médium od firmy BD
Th9 lymfocyty	T helper type 9 cells; pomocné T lymfocyty typu 9
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor; faktor nádorové nekrózy
TSLPI	tick salivary lectin pathway inhibitor, protein ve slinách klíštěte <i>Ixodes scapularis</i>

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Arango Duque G., Descoteaux A. 2014: Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front. Immunol.* 5: 491.

Arnould T., Thibaut-Vercruyssen R., Bouaziz N., Dieu M., Remacle J., Michiels C. 2001: PGF_{2α}, a prostanoid released by endothelial cells activated by hypoxia, is a chemoattractant candidate for neutrophil recruitment. *Am. J. Pathol.* 159: 345–357.

Assreuy J., Cunha F.Q., Epperlein M., Noronha-Dutra A., O'Donnell C.A., Liew F.Y., Moncada S. 1994: Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *Eur. J. Immunol.* 24: 672–676.

Avila P.E., Trovão J.E., Maués L.A., de Lima A.B., de Sena C.B., Bastos Gde N., do Nascimento J.L. 2016: Vascular changes and acute inflammation induced by agar in the air pouch model. *J. App. Pharm. Sci.* 6: 110–117.

Balsinde J., Winstead M.V., Dennis E.A. 2002: Phospholipase A₂ regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett.* 531: 2–6.

Bannister J.V., Bellavite P., Davoli A., Thornalley P.J., Rossi F. 1982: The generation of hydroxyl radicals following superoxide production by neutrophil NADPH oxidase. *FEBS Lett.* 150: 300–302.

Barnes P.J. 1998: Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin. Sci. (Lond.)*. 94: 557–572.

Beaufays J., Adam B., Menten-Dedoyart C., Fievez L., Grosjean A., Decrem Y., Prévôt P.P., Santini S., Basseur R., Brossard M., Vanhaeverbeek M., Bureau F., Heinen E., Lins L., Vanhamme L., Godfroid E. 2008: Ir-LBP, an *Ixodes ricinus* tick salivary LTB₄-binding lipocalin, interferes with host neutrophil function. *PLoS ONE* 3: e3987.

Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A., Freeman B.A. 1990: Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 1620–1624.

Black W.C. 4th, Piesman J. 1994: Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 10034–10038.

Bouman E.A.P., Zemek R., Dusbábek F., Socha R. 1999: Sexual behaviour of the sheep tick, *Ixodes ricinus* (L.) (Acari, Ixodidae). In: W.H. Robinson, F. Rettich and G.W. Rambo (Eds.), Proceedings of the 3rd International Conference on Urban Pests. Grafické závody Hronov, Czech Republic, pp. 255–260.

Bray M.A. 1983: The pharmacology and pathophysiology of leukotriene B₄. *Br. Med. Bull.* 39: 249–254.

- Brossard M., Fivaz V. 1982:** *Ixodes ricinus* L.: mast cells, basophils and eosinophils in the sequence of cellular events in the skin of infested or re-infested rabbits. *Parasitology* 85: 583–592.
- Brown S.J., Knapp F.W. 1980:** *Amblyomma americanum*: sequential histological analysis of adult feeding sites on guinea pigs. *Exp. Parasitol.* 49: 303–318.
- Bystrom J., Evans I., Newson J., Stables M., Toor I., van Rooijen N., Crawford M., Colville-Nash P., Farrow S., Gilroy D.W. 2008:** Resolution-phase macrophages possess a unique inflammatory phenotype that is controlled by cAMP. *Blood* 112: 4117–4127.
- Cailhier J.F., Partolina M., Vuthoori S., Wu S., Ko K., Watson S., Savill J., Hughes J., Lang R.A. 2005:** Conditional macrophage ablation demonstrates that resident macrophages initiate acute peritoneal inflammation. *J. Immunol.* 174: 2336–2342.
- Call D.R., Nemzek J.A., Ebong S.J., Bolgos G.L., Newcomb D.E., Remick D.G. 2001:** Ratio of local to systemic chemokine concentrations regulates neutrophil recruitment. *Am. J. Pathol.* 158: 715–721.
- Cassado Ados A., D’Império Lima M.R., Bortoluci K.R. 2015:** Revisiting mouse peritoneal macrophages: heterogeneity, development, and function. *Front. Immunol.* 6: 225.
- Colbert J.D., Matthews S.P., Miller G., Watts C. 2009:** Diverse regulatory roles for lysosomal proteases in the immune response. *Eur. J. Immunol.* 39: 2955–2965.
- Conus S., Simon H.U. 2010:** Cathepsins and their involvement in immune responses. *Swiss Med. Wkly* 140: w13042.
- Cronstein B.N., Kimmel S.C., Levin R.I., Martiniuk F., Weissmann G. 1992:** A mechanism for the anti-inflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 9991–9995.
- Das A.M., Flower R.J., Hellewell P.G., Teixeira M.M., Perretti M. 1997:** A novel murine model of allergic inflammation to study the effect of dexamethasone on eosinophil recruitment. *Br. J. Pharmacol.* 121: 97–104.
- Davies L.C., Rosas M., Smith P.J., Fraser D.J., Jones S.A., Taylor P.R. 2011:** A quantifiable proliferative burst of tissue macrophages restores homeostatic macrophage populations after acute inflammation. *Eur. J. Immunol.* 41: 2155–2164.
- Davoine F., Lacy P. 2014:** Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity. *Front. Immunol.* 5: 570.
- de Menezes G.B., dos Reis W.G., Santos J.M., Duarte I.D., de Francischi J.N. 2005:** Inhibition of prostaglandin F_{2α} by selective cyclooxygenase 2 inhibitors accounts for reduced rat leukocyte migration. *Inflammation* 29: 163–169.

- Déruaz M., Bonvin P., Severin I.C., Johnson Z., Krohn S., Power C.A., Proudfoot A.E. 2013:** Evasin-4, a tick-derived chemokine-binding protein with broad selectivity can be modified for use in preclinical disease models. *FEBS J.* 280: 4876–4887.
- Dhawan L., Liu B., Blaxall B.C., Taubman M.B. 2007:** A novel role for the glucocorticoid receptor in the regulation of monocyte chemoattractant protein-1 mRNA stability. *J. Biol. Chem.* 282: 10146–10152.
- Díaz-González F., González-Alvaro I., Campanero M.R., Mollinedo F., del Pozo M.A., Muñoz C., Pivel J.P., Sánchez-Madrid F. 1995:** Prevention of *in vitro* neutrophil-endothelial attachment through shedding of L-selectin by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J. Clin. Invest.* 95: 1756–1765.
- Druilhe A., Cai Z., Hailé S., Chouaib S., Pretolani M. 1996:** Fas-mediated apoptosis in cultured human eosinophils. *Blood* 87: 2822–2830.
- Dubois R.N., Abramson S.B., Crofford L., Gupta R.A., Simon L.S., Van De Putte L.B., Lipsky P.E. 1998:** Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* 12: 1063–1073.
- Duncan G.S., Peers S.H., Carey F., Forder R., Flower R.J. 1993:** The local anti-inflammatory action of dexamethasone in the rat carrageenin oedema model is reversed by an antiserum to lipocortin 1. *Br. J. Pharmacol.* 108: 62–65.
- Errasfa M., Russo-Marie F. 1989:** A purified lipocortin shares the anti-inflammatory effect of glucocorticosteroids *in vivo* in mice. *Br. J. Pharmacol.* 97: 1051–1058.
- Estrada-Peña A. 2015:** Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. *Rev. Sci. Tech.* 34: 53–65.
- Féral C.C., Rose D.M., Han J., Fox N., Silverman G.J., Kaushansky K., Ginsberg M.H. 2006:** Blocking the $\alpha 4$ integrin α paxillin interaction selectively impairs mononuclear leukocyte recruitment to an inflammatory site. *J. Clin. Invest.* 116: 715–723.
- Fink P.J., Swan K., Turk G., Moore M.W., Carbone F.R. 1992:** Both intrathymic and peripheral selection modulate the differential expression of V beta 5 among CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 176: 1733–1738.
- Fonović M., Turk B. 2014:** Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation. *Biochim. Biophys. Acta* 1840: 2560–2570.
- Francischetti I.M., Sá-Nunes A., Mans B.J., Santos I.M., Ribeiro J.M. 2009:** The role of saliva in tick feeding. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* 14: 2051–2088.
- Franson R.C., Eisen D., Jesse R., Lanni C. 1980:** Inhibition of highly purified mammalian phospholipases A₂ by non-steroidal anti-inflammatory agents. Modulation by calcium ions. *Biochem. J.* 186: 633–636.
- Garjani A., Andalib S., Ziaee M., Maleki-Dizaji N. 2008:** Biphasic effects of atorvastatin on inflammation. *Pak. J. Pharm. Sci.* 21: 125–130.

- Gautier E.L., Ivanov S., Lesnik P., Randolph G.J. 2013:** Local apoptosis mediates clearance of macrophages from resolving inflammation in mice. *Blood* 122: 2714–2722.
- Getting S.J., Flower R.J., Perretti M. 1997:** Inhibition of neutrophil and monocyte recruitment by endogenous and exogenous lipocortin 1. *Br. J. Pharmacol.* 120: 1075–1082.
- Gewert K., Sundler R. 1995:** Dexamethasone down-regulates the 85 kDa phospholipase A2 in mouse macrophages and suppresses its activation. *Biochem. J.* 307: 499–504.
- Ghosn E.E., Cassado A.A., Govoni G.R., Fukuhara T., Yang Y., Monack D.M., Bortoluci K.R., Almeida S.R., Herzenberg L.A., Herzenberg L.A. 2010:** Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 2568–2573.
- Gill H.S. 1986:** Kinetics of mast cell, basophil and eosinophil populations at *Hyalomma anatolicum anatolicum* feeding sites on cattle and the acquisition of resistance. *Parasitology* 93: 305–315.
- Gill H.S., Walker A.R. 1985:** Differential cellular responses at *Hyalomma anatolicum anatolicum* feeding sites on susceptible and tick-resistant rabbits. *Parasitology* 91: 591–607.
- Grzonka Z., Jankowska E., Kasprzykowski F., Kasprzykowska R., Łankiewicz L., Wiczak W., Wiczerzak E., Ciarkowski J., Drabik P., Janowski R., Kozak M., Jaskólski M., Grubb A. 2001:** Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. *Acta Biochim. Pol.* 48: 1–20.
- Guo X., Booth C.J., Paley M.A., Wang X., DePonte K., Fikrig E., Narasimhan S., Montgomery R.R. 2009:** Inhibition of neutrophil function by two tick salivary proteins. *Infect. Immun.* 77: 2320–2329.
- Gupta A.K., Parasar D., Sagar A., Choudhary V., Chopra B.S., Garg R., Ashish, Khatri N. 2015:** Analgesic and anti-inflammatory properties of gelsolin in acetic acid induced writhing, tail immersion and carrageenan induced paw edema in mice. *PLoS ONE* 10: e0135558.
- Hajnická V., Kocáková P., Sláviková M., Slovák M., Gašperík J., Fuchsberger N., Nuttall P.A. 2001:** Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. *Parasite Immunol.* 23: 483–489.
- Hajnická V., Vančová I., Kocáková P., Slovák M., Gašperík J., Sláviková M., Hails R.S., Labuda M., Nuttall P.A. 2005:** Manipulation of host cytokine network by ticks: a potential gateway for pathogen transmission. *Parasitology* 130: 333–342.
- Handy R.L., Moore P.K. 1998:** A comparison of the effects of L-NAME, 7-NI and L-NIL on carrageenan-induced hindpaw oedema and NOS activity. *Br. J. Pharmacol.* 123: 1119–1126.
- Hannon R., Croxtall J.D., Getting S.J., Roviezzo F., Yona S., Paul-Clark M.J., Gavins F.N., Perretti M., Morris J.F., Buckingham J.C., Flower R.J. 2003:** Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1^{-/-} mouse. *FASEB J.* 17: 253–255.

- Hartung K., Schlick E., Stevenson H.C., Chirigos M.A. 1983:** Prostaglandin E synthesis and release by murine macrophages and human monocytes after *in vitro* treatment with biological response modifiers. *J. Immunopharmacol.* 5: 129–146.
- Hassimotto N.M., Moreira V., do Nascimento N.G., Souto P.C., Teixeira C., Lajolo F.M. 2013:** Inhibition of carrageenan-induced acute inflammation in mice by oral administration of anthocyanin mixture from wild mulberry and cyanidin-3-glucoside. *Biomed Res. Int.* 2013: 146716.
- Heinze D.M., Carmical J.R., Aronson J.F., Thangamani S. 2012:** Early immunologic events at the tick-host interface. *PLoS ONE* 7: e47301.
- Henderson R.B., Hobbs J.A., Mathies M., Hogg N. 2003:** Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration. *Blood* 102: 328–335.
- Henderson R.B., Lim L.H.K., Tessier P.A., Gavins F.N.E., Mathies M., Perretti M., Hogg N. 2001:** The use of lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice to determine the role of LFA-1, Mac-1, and $\alpha 4$ integrin in the inflammatory response of neutrophils. *J. Exp. Med.* 194: 219–226.
- Henriques M.G., Silva P.M., Martins M.A., Flores C.A., Cunha F.Q., Assreuy-Filho J., Cordeiro R.S. 1987:** Mouse paw edema. A new model for inflammation? *Braz. J. Med. Biol. Res.* 20: 243–249.
- Herrmann C., Gern L. 2015:** Search for blood or water is influenced by *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. *Parasit. Vectors* 8: 6.
- Hidano A., Konnai S., Yamada S., Githaka N., Isezaki M., Higuchi H., Nagahata H., Ito T., Takano A., Ando S., Kawabata H., Murata S., Ohahsi K. 2014:** Suppressive effects of neutrophil by Salp16-like salivary gland proteins from *Ixodes persulcatus* Schulze tick. *Insect Mol. Biol.* 23: 466–474.
- Hirai H., Tanaka K., Takano S., Ichimasa M., Nakamura M., Nagata K. 2002:** Cutting edge: agonistic effect of indomethacin on a prostaglandin D₂ receptor, CRTH2. *J. Immunol.* 168: 981–985.
- Horká H., Staudt V., Klein M., Taube C., Reuter S., Dehzad N., Andersen J.F., 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. *J. Immunol.* 188: 2669–2676.
- Chen G., Severo M.S., Sohail M., Sakhon O.S., Wikel S.K., Kotsyfakis M., Pedra J.H. 2012:** *Ixodes scapularis* saliva mitigates inflammatory cytokine secretion during *Anaplasma phagocytophilum* stimulation of immune cells. *Parasit. Vectors* 5: 229.
- Chmelař J., Kotál J., Kopecký J., Pedra J.H., Kotsyfakis M. 2016:** All for one and one for all on the tick-host battlefield. *Trends Parasitol.* 32: 368–377.

- Isoe Y., Kato T., Arita M. 2012:** Emerging roles of eosinophils and eosinophil-derived lipid mediators in the resolution of inflammation. *Front. Immunol.* 3: 270.
- Italiani P., Boraschi D. 2014:** From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Front. Immunol.* 5: 514.
- Jones L.D., Davies C.R., Steele G.M., Nuttall P.A. 1987:** A novel mode of arbovirus transmission involving a nonviremic host. *Science* 237: 775–777.
- Jones L.D., Hodgson E., Nuttall P.A. 1989:** Enhancement of virus transmission by tick salivary glands. *J. Gen. Virol.* 70: 1895–1898.
- Jonjić N., Peri G., Bernasconi S., Sciacca F.L., Colotta F., Pelicci P., Lanfrancone L., Mantovani A. 1992:** Expression of adhesion molecules and chemotactic cytokines in cultured human mesothelial cells. *J. Exp. Med.* 176: 1165–1174.
- Kaplan L., Weiss J., Elsbach P. 1978:** Low concentrations of indomethacin inhibit phospholipase A₂ of rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 2955–2958.
- Kazimírová M. 2008:** Pharmacologically active compounds in tick salivary glands. In: S.E. Makarov and R.N. Dimitrijević (Eds.), *Advances in Arachnology and Developmental Biology*. Institute of Zoology, Belgrade, pp. 281–296.
- Kazimírová M., Štibrániová I. 2013:** Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3: 43.
- Klein M., Brühl T.J., Staudt V., Reuter S., Grebe N., Gerlitzki B., Hoffmann M., Bohn T., Ulges A., Stergiou N., de Graaf J., Löwer M., Taube C., Becker M., Hain T., Dietzen S., Stassen M., Huber M., Lohoff M., Campos Chagas A., Andersen J., Kotál J., Langhansová H., Kopecký J., Schild H., Kotsyfakis M., Schmitt E., Bopp T. 2015:** Tick salivary sialostatin L represses the initiation of immune responses by targeting IRF4-dependent transcription in murine mast cells. *J. Immunol.* 195: 621–631.
- Klompen H., Dobson S.J., Barker S.C. 2002:** A new subfamily, Bothriocrotoninae n. subfam., for the genus *Bothriocroton* Keirans, King & Sharrad, 1994 status amend. (Ixodida: Ixodidae), and the synonymy of *Aponomma* Neumann, 1899 with *Amblyomma* Koch, 1844. *Syst. Parasitol.* 53: 101–107.
- Kopecký J., Kuthejlová M. 1998:** Suppressive effect of *Ixodes ricinus* salivary gland extract on mechanisms of natural immunity *in vitro*. *Parasite Immunol.* 20: 169–174.
- Kotsyfakis M., Anderson J.M., Andersen J.F., Calvo E., Francischetti I.M., Mather T.N., Valenzuela J.G., Ribeiro J.M. 2008:** Cutting edge: Immunity against a “silent” salivary antigen of the Lyme vector *Ixodes scapularis* impairs its ability to feed. *J. Immunol.* 181: 5209–5212.
- Kotsyfakis M., Horká H., Salát J., Andersen J.F. 2010:** The crystal structures of two salivary cystatins from the tick *Ixodes scapularis* and the effect of these inhibitors on the

establishment of *Borrelia burgdorferi* infection in a murine model. *Mol. Microbiol.* 77: 456–470.

Kotsyfakis M., Karim S., Andersen J.F., Mather T.N., Ribeiro J.M. 2007: Selective cysteine protease inhibition contributes to blood-feeding success of the tick *Ixodes scapularis*. *J. Biol. Chem.* 282: 29256–29263.

Kotsyfakis M., Sá-Nunes A., Francischetti I.M., Mather T.N., Andersen J.F., Ribeiro J.M. 2006: Anti-inflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. *J. Biol. Chem.* 281: 26298–26307.

Kouro T., Takatsu K. 2009: IL-5- and eosinophil-mediated inflammation: from discovery to therapy. *Int. Immunol.* 21: 1303–1309.

Krause P.J., Grant-Kels J.M., Tahan S.R., Dardick K.R., Alarcon-Chaidez F., Bouchard K., Visini C., Deriso C., Foppa I.M., Wikel S. 2009: Dermatologic changes induced by repeated *Ixodes scapularis* bites and implications for prevention of tick-borne infection. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 9: 603–610.

Kruger P., Saffarzadeh M., Weber A.N., Rieber N., Radsak M., von Bernuth H., Benarafa C., Roos D., Skokowa J., Hartl D. 2015: Neutrophils: between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog.* 11: e1004651.

Kubíčková M. 2016: Optimalizace *in vitro* metod studia adheze leukocytů. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, 44 pp.

Kunkel S.L., Kaercher K., Plewa M., Fantone J.C., Ward P.A. 1982: Production of cyclooxygenase products and superoxide anion by macrophages in response to chemotactic factors. *Prostaglandins* 24: 789–799.

Kunz D., Walker G., Eberhardt W., Pfeilschifter J. 1996: Molecular mechanisms of dexamethasone inhibition of nitric oxide synthase expression in interleukin 1 beta-stimulated mesangial cells: evidence for the involvement of transcriptional and posttranscriptional regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 255–259.

Kuthejlová M., Kopecký J., Štěpánová G., Macela A. 2001: Tick salivary gland extract inhibits killing of *Borrelia afzelii* spirochetes by mouse macrophages. *Infect. Immun.* 69: 575–578.

Kýčková K., Kopecký J. 2006: Effect of tick saliva on mechanisms of innate immune response against *Borrelia afzelii*. *J. Med. Entomol.* 43: 1208–1214.

Leboulle G., Crippa M., Decrem Y., Mejri N., Brossard M., Bollen A., Godfroid E. 2002: Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks. *J. Biol. Chem.* 277: 10083–10089.

Lemos H.P., Grespan R., Vieira S.M., Cunha T.M., Verri W.A. Jr., Fernandes K.S., Souto F.O., McInnes I.B., Ferreira S.H., Liew F.Y., Cunha F.Q. 2009: Prostaglandin

mediates IL-23/IL-17-induced neutrophil migration in inflammation by inhibiting IL-12 and INF- γ production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 5954–5959.

Leung-Tack J., Tavera C., Martinez J., Colle A. 1990: Neutrophil chemotactic activity is modulated by human cystatin C, an inhibitor of cysteine proteases. *Inflammation* 14: 247–258.

Liao J.C., Tsai J.C., Peng W.H., Chiu Y.J., Sung P.J., Tsuzoki M., Kuo Y.H. 2013: Anti-inflammatory activity of *N*-(3-florophenyl)ethylcaffeamide in mice. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 15199–15211.

Lim L.H., Solito E., Russo-Marie F., Flower R.J., Perretti M. 1998: Promoting detachment of neutrophils adherent to murine postcapillary venules to control inflammation: effect of lipocortin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 14535–14539.

Longui C.A. 2007: Glucocorticoid therapy: minimizing side effects. *J. Pediatr. (Rio J.)* 83 (5 Suppl.): S163–S177.

Magister S., Kos J. 2013: Cystatins in immune system. *J. Cancer* 4: 45–56.

Macháčková M., Oborník M., Kopecký J. 2006: Effect of salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks on the proliferation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto *in vivo*. *Folia Parasitol.* 53: 153–158.

Mans B.J., de Klerk D., Pienaar R., Latif A.A. 2011: *Nuttalliella namaqua*: a living fossil and closest relative to the ancestral tick lineage: implications for the evolution of blood-feeding in ticks. *PLoS ONE* 6: e23675.

Maridonneau-Parini I., Errasfa M., Russo-Marie F. 1989: Inhibition of O₂-generation by dexamethasone is mimicked by lipocortin 1 in alveolar macrophages. *J. Clin. Invest.* 83: 1936–1940.

Matuschka F.R., Fischer P., Musgrave K., Richter D., Spielman A. 1991: Hosts on which nymphal *Ixodes ricinus* most abundantly feed. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44: 100–107.

Maxwell S.S., Stoklasek T.A., Dash Y., Macaluso K.R., Wikel S.K. 2005: Tick modulation of the *in-vitro* expression of adhesion molecules by skin-derived endothelial cells. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 99: 661–672.

Meacock S.C., Kitchen E.A. 1976: Some effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on leucocyte migration. *Agents Actions* 6: 320–325.

Medlock J.M., Hansford K.M., Bormane A., Derdáková M., Estrada-Peña A., George J.C., Golovljova I., Jaenson T.G., Jensen J.K., Jensen P.M., Kazimírová M., Oteo J.A., Papa A., Pfister K., Plantard O., Randolph S.E., Rizzoli A., Santos-Silva M.M., Sprong H., Vial L., Hendrickx G., Zeller H., Van Bortel W. 2013: Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasit. Vectors* 6: 1.

Menezes G.B., Rezende R.M., Pereira-Silva P.E., Klein A., Cara D.C., Francischi J.N. 2008: Differential involvement of cyclooxygenase isoforms in neutrophil migration *in vivo* and *in vitro*. *Eur. J. Pharmacol.* 598: 118–122.

- Menten-Dedoyart C., Faccinetto C., Golovchenko M., Dupiereux I., Van Lerberghe P.B., Dubois S., Desmet C., Elmoualij B., Baron F., Rudenko N., Oury C., Heinen E., Couvreur B. 2012:** Neutrophil extracellular traps entrap and kill *Borrelia burgdorferi* sensu stricto spirochetes and are not affected by *Ixodes ricinus* tick saliva. *J. Immunol.* 189: 5393–5401.
- Misharin A.V., Saber R., Perlman H. 2012:** Eosinophil contamination of thioglycollate-elicited peritoneal macrophage cultures skews the functional readouts of *in vitro* assays. *J. Leukoc. Biol.* 92: 325–331.
- Mitchell J.A., Akarasereenont P., Thiemermann C., Flower R.J., Vane J.R. 1993:** Selectivity of non-steroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 11693–11697.
- Montgomery R.R., Lusitani D., de Boisfleury Chevance A., Malawista S.E. 2004:** Tick saliva reduces adherence and area of human neutrophils. *Infect. Immun.* 72: 2989–2994.
- Nakano T., Ohara O., Teraoka H., Arita H. 1990:** Glucocorticoids suppress group II phospholipase A₂ production by blocking mRNA synthesis and post-transcriptional expression. *J. Biol. Chem.* 265: 12745–12748.
- Nantel F., Denis D., Gordon R., Northey A., Cirino M., Metters K.M., Chan C.C. 1999:** Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 128: 853–859.
- Nava S., Guglielmono A.A., Mangold A.J. 2009:** An overview of systematics and evolution of ticks. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* 14: 2857–2877.
- Nečas J., Bartošíková L. 2013:** Carrageenan: a review. *Vet. Med.* 58: 187–205.
- Newton R., Seybold J., Kuitert L.M., Bergmann M., Barnes P.J. 1998:** Repression of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E₂ release by dexamethasone occurs by transcriptional and post-transcriptional mechanisms involving loss of polyadenylated mRNA. *J. Biol. Chem.* 273: 32312–32321.
- Nielsen H., Bennedsen J. 1983:** Effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs on human monocyte chemotaxis *in vitro*. *Immunopharmacology* 5: 259–265.
- Nicholson W.L., Sonenshine D.E., Lane R.S., Uilenberg G. 2009:** Ticks (Ixodida). In: G.R. Mullen and L.A. Durden (Eds.), *Medical and Veterinary Entomology*. Elsevier, pp. 483–532.
- Nithiuthai S., Allen J.R. 1985:** Langerhans cells present tick antigens to lymph node cells from tick-sensitized guinea-pigs. *Immunology* 55: 157–163.
- Nonato F.R., Santana D.G., de Melo F.M., dos Santos G.G., Brustolim D., Camargo E.A., de Sousa D.P., Soares M.B., Villarreal C.F. 2012:** Anti-inflammatory properties of rose oxide. *Int. Immunopharmacol.* 14: 779–784.
- Nuttall P.A., Labuda M. 2008:** Saliva-assisted transmission of tick-borne pathogens. In: A.S. Bowman and P.A. Nuttall (Eds.), *Ticks: Biology, Disease and Control*. Cambridge University Press, United Kingdom, pp. 205–219.

Ochieng J., Chaudhuri G. 2010: Cystatin superfamily. *J. Health Care Poor Underserved* 21 (1 Suppl): 51–70.

Okabe Y., Medzhitov R. 2014: Tissue-specific signals control reversible program of localization and functional polarization of macrophages. *Cell* 157: 832–844.

Okayama H., Fushimi T., Shimura S., Sasaki H., Shirato K. 1994: Glucocorticoids suppressed production and gene expression of interleukin-5 by peripheral blood mononuclear cells in atopic patients and normal subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 93: 1006–1012.

Okoli C.O., Akah P.A., Nwafor S.V., Anisiobi A.I., Ibegbunam I.N., Erojikwe O. 2007: Anti-inflammatory activity of hexane leaf extract of *Aspilia africana* C.D. Adams. *J. Ethnopharmacol.* 109: 219–225.

Olabissi O.A., Moussa O., Moustapha O., Edgard Z.F., Eléonore K., Marius L., Pierre G.I. 2011: Acute toxicity and anti-inflammatory activity of aqueous ethanol extract of root bark of *Ximenia americana* L. (Olacaceae). *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 5: 806–811.

Oliveira A.S., Xavier-Filho J., Sales M.P. 2003: Cysteine proteinases and cystatins. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 46: 91–104.

Ong C.K., Lirk P., Tan C.H., Seymour R.A. 2007: An evidence-based update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Clin. Med. Res.* 5: 19–34.

Otto H.H., Schirmeister T. 1997: Cysteine proteases and their inhibitors. *Chem. Rev.* 97: 133–172.

Overzier E., Pfister K., Herb I., Mahling M., Böck G. Jr., Silaghi C. 2013: Detection of tick-borne pathogens in roe deer (*Capreolus capreolus*), in questing ticks (*Ixodes ricinus*), and in ticks infesting roe deer in southern Germany. *Ticks Tick Borne Dis.* 4: 320–328.

Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. 2007: Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.* 87: 315–424.

Pechová J., Štěpánová G., Kovář L., Kopecký J. 2002: Tick salivary gland extract-activated transmission of *Borrelia afzelii* spirochaetes. *Folia Parasitol.* 49: 153–159.

Pereira D.A., Koelzer J., Dalmarco J.B., Pizzolatti M.G., Fröde T.S. 2009: Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Lotus pedunculatus*. *Int. J. Green Pharm.* 3: 105–111.

Perišić Nanut M., Sabotič J., Jewett A., Kos J. 2014: Cysteine cathepsins as regulators of the cytotoxicity of NK and T cells. *Front. Immunol.* 5: 616.

Perretti M., Flower R.J. 1996: Measurement of lipocortin 1 levels in murine peripheral blood leukocytes by flow cytometry: modulation by glucocorticoids and inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 118: 605–610.

Peterková K., Vančová I., Hajnická V., Slovák M., Šimo L., Nuttall P.A. 2008: Immunomodulatory arsenal of nymphal ticks. *Med. Vet. Entomol.* 22: 167–171.

- Pham C.T. 2006:** Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 541–550.
- Pinchuk L.M., Filipov N.M. 2008:** Differential effects of age on circulating and splenic leukocyte populations in C57BL/6 and BALB/c male mice. *Immun. Ageing* 5: 1.
- Posadas I., Bucci M., Roviezzo F., Rossi A., Parente L., Sautebin L., Cirino G. 2004:** Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br. J. Pharmacol.* 142: 331–338.
- Radomski M.W., Palmer R.M., Moncada S. 1990:** Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 10043–10047.
- Ramamoorthi N., Narasimhan S., Pal U., Bao F., Yang X.F., Fish D., Anguita J., Norgard M.V., Kantor F.S., Anderson J.F., Koski R.A., Fikrig E. 2005:** The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature* 436: 573–577.
- Ray A., Dittel B.N. 2010:** Isolation of mouse peritoneal cavity cells. *J. Vis. Exp.* 35: 1488.
- Reis E.F., Castro S.B., Alves C.C., Oliveira E.E., Corrêa T.A., Almeida M.V., Ferreira A.P. 2013:** Lipophilic amino alcohols reduces carrageenan-induced paw edema and anti-OVA DTH in BALB/c mice. *Int. Immunopharmacol.* 17: 727–732.
- Ricciotti E., FitzGerald G.A. 2011:** Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31: 986–1000.
- Rolfe F.G., Hughes J.M., Armour C.L., Sewell W.A. 1992:** Inhibition of interleukin-5 gene expression by dexamethasone. *Immunology* 77: 494–499.
- Ryan G.B., Majno G. 1977:** Acute inflammation. A review. *Am. J. Pathol.* 86: 183–276.
- Salvemini D., Misko T.P., Masferrer J.L., Seibert K., Currie M.G., Needleman P. 1993:** Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 7240–7244.
- Salvemini D., Wang Z.Q., Wyatt P.S., Bourdon D.M., Marino M.H., Manning P.T., Currie M.G. 1996:** Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 118: 829–838.
- Sá-Nunes A., Bafica A., Antonelli L.R., Choi E.Y., Francischetti I.M., Andersen J.F., Shi G.P., Chavakis T., Ribeiro J.M., Kotsyfakis M. 2009:** The immunomodulatory action of sialostatin L on dendritic cells reveals its potential to interfere with autoimmunity. *J. Immunol.* 182: 7422–7429.
- Scannell M., Flanagan M.B., deStefani A., Wynne K.J., Cagney G., Godson C., Maderna P. 2007:** Annexin-1 and peptide derivatives are released by apoptotic cells and stimulate phagocytosis of apoptotic neutrophils by macrophages. *J. Immunol.* 178: 4595–4605.
- Scapini P., Lapinet-Vera J.A., Gasperini S., Calzetti F., Bazzoni F., Cassatella M.A. 2000:** The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol. Rev.* 177: 195–203.

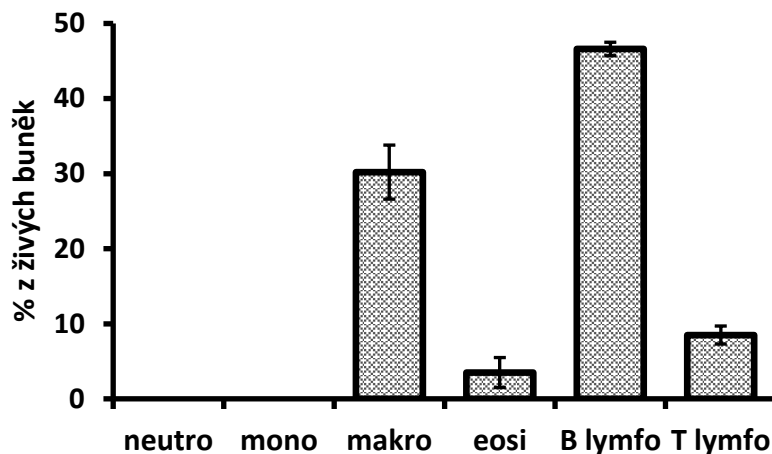
- Schäcke H., Schottelius A., Döcke W.D., Strehlke P., Jaroch S., Schmees N., Rehwinkel H., Hennekes H., Asadullah K. 2004:** Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 227–232.
- Schmidt M., Pauels H.G., Lügering N., Lügering A., Domschke W., Kucharzik T. 1999:** Glucocorticoids induce apoptosis in human monocytes: potential role of IL-1 β . *J. Immunol.* 163: 3484–3490.
- Schramm R., Liu Q., Thorlacius H. 2000:** Expression and function of MIP-2 are reduced by dexamethasone treatment *in vivo*. *Br. J. Pharmacol.* 131: 328–334.
- Schuijt T.J., Coumou J., Narasimhan S., Dai J., DePonte K., Wouters D., Brouwer M., Oei A., Roelofs J.J., van Dam A.P., van der Poll T., van't Veer C., Hovius J.W., Fikrig E. 2011:** A tick mannose-binding lectin inhibitor interferes with the vertebrate complement cascade to enhance transmission of the Lyme disease agent. *Cell Host Microbe* 10: 136–146.
- Schwab J.M., Chiang N., Arita M., Serhan C.N. 2007:** Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* 447: 869–874.
- Schwarz A., Valdés J.J., Kotsyfakis M. 2012:** The role of cystatins in tick physiology and blood feeding. *Ticks Tick Borne Dis.* 3: 117–127.
- Siuda K., Nowak M. 2006:** Zagrożenie atakami kleszczy na szlakach turystycznych w województwie małopolskim. *Konspekt* 26: 42–48.
- Slavin J., Unemori E., Hunt T.K., Amento E. 1995:** Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) mRNA is down-regulated in human dermal fibroblasts by dexamethasone: differential regulation by TGF- β . *Growth Factors* 12: 151–157.
- Stables M.J., Shah S., Camon E.B., Lovering R.C., Newson J., Bystrom J., Farrow S., Gilroy D.W. 2011:** Transcriptomic analysis of murine resolution-phase macrophages. *Blood* 118: e192–208.
- Stubbs V.E., Schratl P., Hartnell A., Williams T.J., Peskar B.A., Heinemann A., Sabroe I. 2002:** Indomethacin causes prostaglandin D₂-like and eotaxin-like selective responses in eosinophils and basophils. *J. Biol. Chem.* 277: 26012–26020.
- Sudlow A.W., Carey F., Forder R., Rothwell N.J. 1996:** The role of lipocortin 1 in dexamethasone-induced suppression of PGE₂ and TNF- α release from human peripheral blood mononuclear cells. *Br. J. Pharmacol.* 117: 1449–1456.
- Sugimoto M.A., Vago J.P., Teixeira M.M., Sousa L.P. 2016:** Annexin A1 and the resolution of inflammation: modulation of neutrophil recruitment, apoptosis, and clearance. *J. Immunol. Res.* 2016: 8239258.
- Sugishita E., Amagaya S., Ogihara Y. 1981:** Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. *J. Pharmacobiodyn.* 4: 565–575.

- Tager A.M., Dufour J.H., Goodarzi K., Bercury S.D., von Andrian U.H., Luster A.D. 2000:** BLTR mediates leukotriene B₄-induced chemotaxis and adhesion and plays a dominant role in eosinophil accumulation in a murine model of peritonitis. *J. Exp. Med.* 192: 439–446.
- Tailor A., Tomlinson A., Salas A., Panés J., Granger D.N., Flower R.J., Perretti M. 1999:** Dexamethasone inhibition of leucocyte adhesion to rat mesenteric postcapillary venules: role of intercellular adhesion molecule 1 and KC. *Gut* 45: 705–712.
- Teixeira M.M., Das A.M., Miotla J.M., Perretti M. Hellewell P.G. 1998:** The role of lipocortin-1 in the inhibitory action of dexamethasone on eosinophil trafficking in cutaneous inflammatory reactions in the mouse. *Br. J. Pharmacol.* 123: 538–544.
- Turk V., Stoka V., Vasiljeva O., Renko M., Sun T., Turk B., Turk D. 2012:** Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim. Biophys. Acta* 1824: 68–88.
- Urioste S., Hall L.R., Telford S.R. 3rd, Titus R.G. 1994:** Saliva of the Lyme disease vector, *Ixodes dammini*, blocks cell activation by a nonprostaglandin E₂-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* 180: 1077–1085.
- Ushio H., Hirota S., Jippo T., Higuchi S., Kawamoto K., Kitamura Y., Matsuda H. 1995:** Mechanisms of eosinophilia in mice infested with larval *Haemaphysalis longicornis* ticks. *Immunology* 84: 469–475.
- Vančová I., Slovák M., Hajnická V., Labuda M., Šimo L., Peterková K., Hails R.S., Nuttall P.A. 2007:** Differential anti-chemokine activity of *Amblyomma variegatum* adult ticks during blood-feeding. *Parasite Immunol.* 29: 169–177.
- Verma S., Dixit R., Pandey K.C. 2016:** Cysteine proteases: modes of activation and future prospects as pharmacological targets. *Front. Pharmacol.* 7: 107.
- Walker A.R., Fletcher J.D. 1986:** Histological study of the attachment sites of adult *Rhipicephalus appendiculatus* on rabbits and cattle. *Int. J. Parasitol.* 16: 399–413.
- Walther A., Riehemann K., Gerke V. 2000:** A novel ligand of the formyl peptide receptor: annexin I regulates neutrophil extravasation by interacting with the FPR. *Mol. Cell* 5: 831–840.
- Wan H., Coppens J.M., van Helden-Meeuwsen C.G., Leenen P.J., van Rooijen N., Khan N.A., Kiekens R.C., Benner R., Versnel M.A. 2009:** Chorionic gonadotropin alleviates thioglycollate-induced peritonitis by affecting macrophage function. *J. Leukoc. Biol.* 86: 361–370.
- Weiss S.J., King G.W., LoBuglio A.F. 1978:** Superoxide generation by human monocytes and macrophages. *Am. J. Hematol.* 4: 1–8.
- Williams T.J. 1977:** Chemical mediators of vascular responses in inflammation: a two mediator hypothesis. *Br. J. Pharmacol.* 61: 447P–448P.

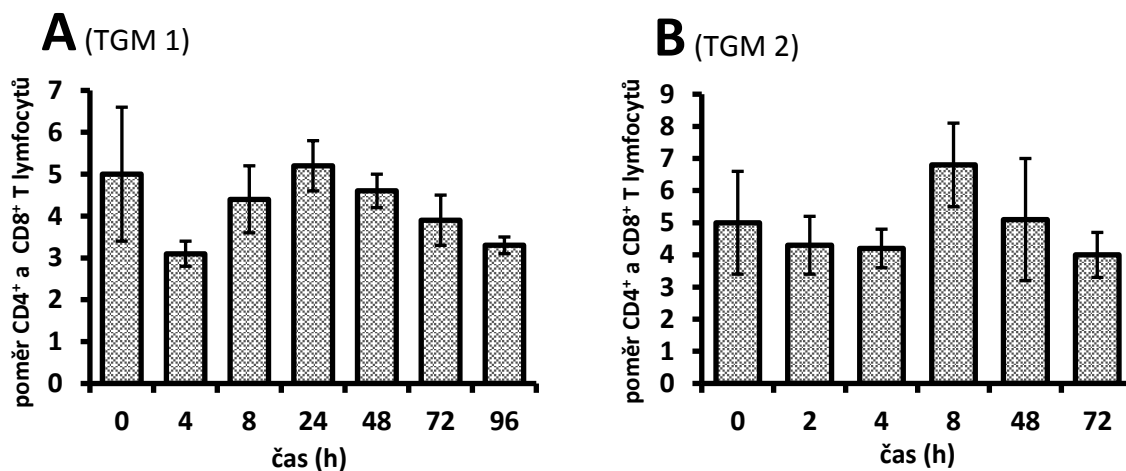
- Willoughby D.A., DiRosa M. 1972:** Studies on the mode of action of non-steroid anti-inflammatory drugs. *Ann. Rheum. Dis.* 31: 540.
- Wise L.E., Cannavacciuolo R., Cravatt B.F., Martin B.F., Lichtman A.H. 2008:** Evaluation of fatty acid amides in the carrageenan-induced paw edema model. *Neuropharmacology* 54: 181–188.
- Xie J., Zhang J., Wu H., Tang X., Liu J., Cheng G., Li P. 2016:** The influences of age on T lymphocyte subsets in C57BL/6 mice. *Saudi J. Biol. Sci.* DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.09.002>.
- Yamada T., Tani Y., Nakanishi H., Taguchi R., Arita M., Arai H. 2011:** Eosinophils promote resolution of acute peritonitis by producing proresolving mediators in mice. *FASEB J.* 25: 561–568.
- Zeidner N.S., Schneider B.S., Nuncio M.S., Gern L., Piesman J. 2002:** Coinoculation of *Borrelia* spp. with tick salivary gland lysate enhances spirochete load in mice and is tick species-specific. *J. Parasitol.* 88: 1276–1278.
- Zuany-Amorim C., Leduc D., Vargaftig B.B., Pretolani M. 1993:** Characterization and pharmacological modulation of antigen-induced peritonitis in actively sensitized mice. *Br. J. Pharmacol.* 110: 917–924.

9. PŘÍLOHY

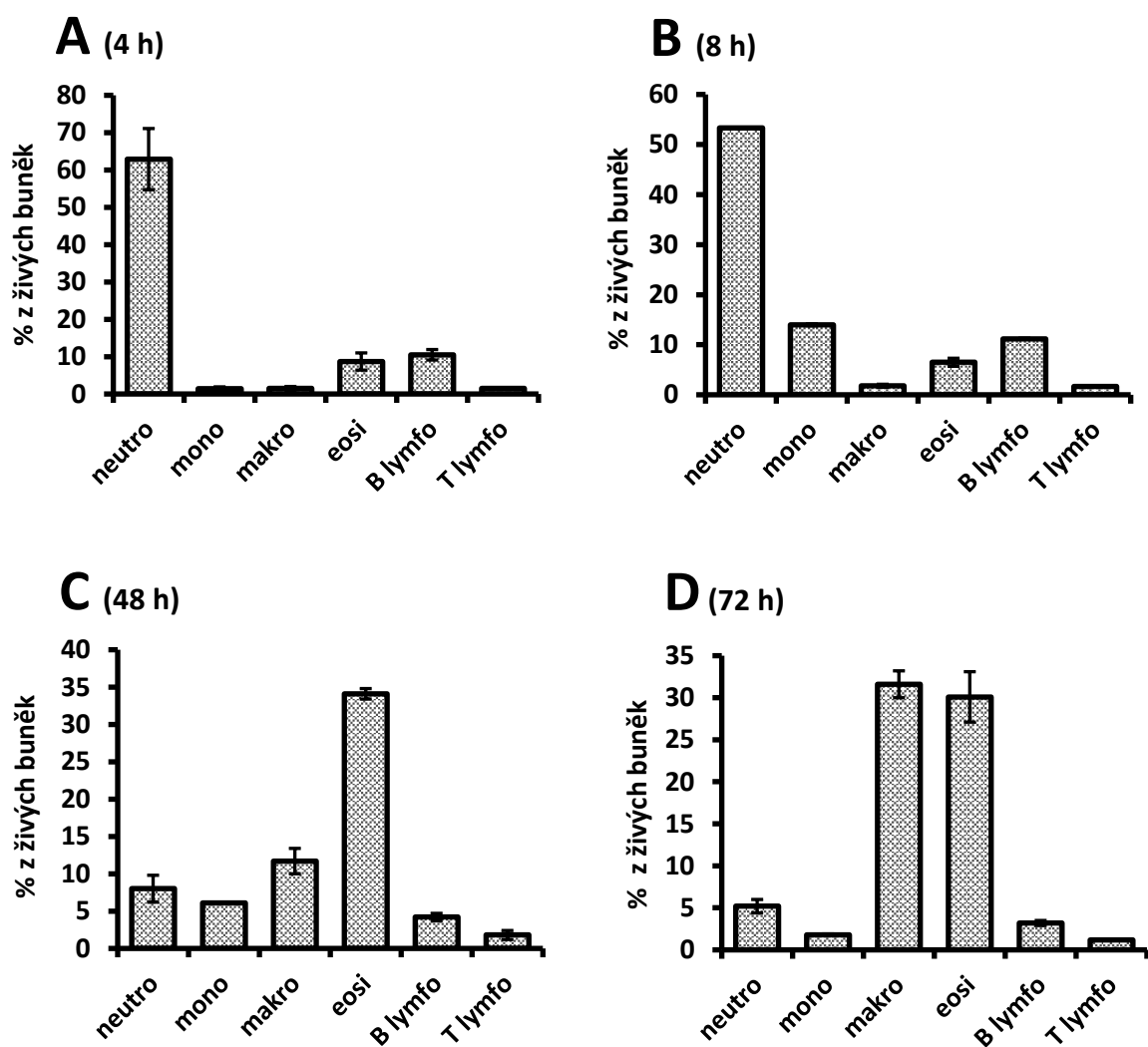
9.1. PŘÍLOHA 1



Obr. 22: Zastoupení jednotlivých buněčných populací v peritoneálních dutinách myši, jimž nebylo injikováno TGM. Jedná se o procentuální podíl neutrofilů, monocytů, makrofágů, eosinofilů, B lymfocytů a T lymfocytů ze živých buněk získaných peritoneální laváží. Užity byly 3 myši.

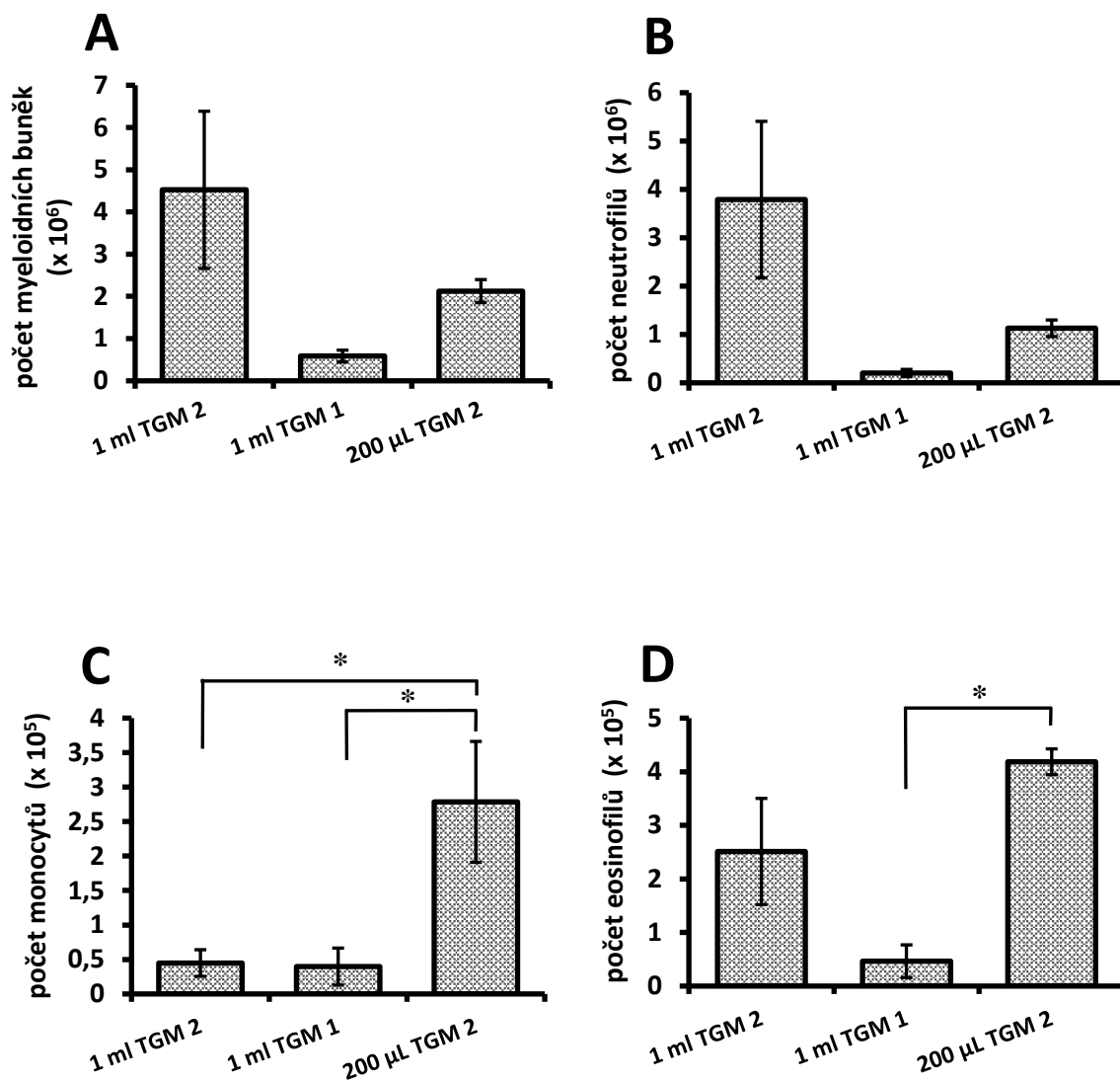


Obr. 23: Poměr počtu CD4⁺ T lymfocytů ku počtu CD8⁺ T lymfocytů v jednotlivých časových intervalech po injikaci TGM 1 nebo TGM 2: **A** – poměr počtu CD4⁺ T lymfocytů ku počtu CD8⁺ T lymfocytů 4, 8, 24, 48, 72 a 96 h po podání TGM 1; **B** – poměr počtu CD4⁺ T lymfocytů ku počtu CD8⁺ T lymfocytů 2, 4, 8, 48 a 72 h po injikaci TGM 2; **0 h** – poměr počtů CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů získaných z peritoneálních dutin bez zánětu. Jednotlivé skupiny byly tvořené 2–6 myši.

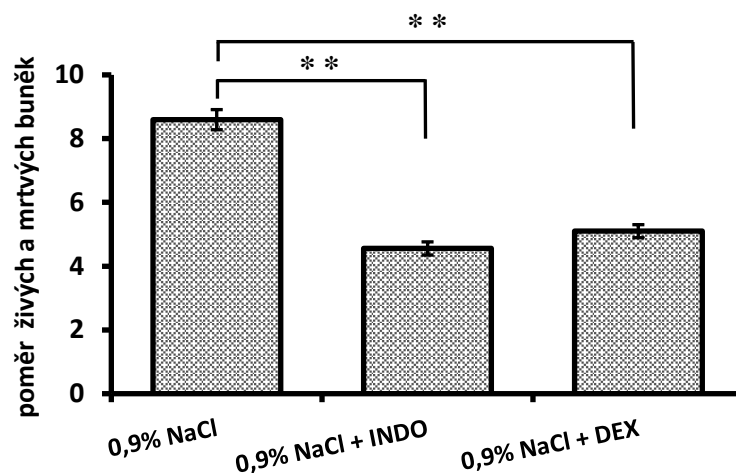


Obr. 24: Procentuální podíl neutrofilů, monocytů, makrofágů, eosinofilů, B lymfocytů a T lymfocytů ze živých buněk získaných peritoneální laváží 4 h (A), 8 h (B), 48 h (C) a 72 h (D) po intraperitoneální injekci TGM 2. Počet myši použitých v jednotlivých časových intervalech: 4 h – 3 myši, 8 h – 2 myši, 48 h – 2 myši, 72 h – 6 myši.

9.2. PŘÍLOHA 2

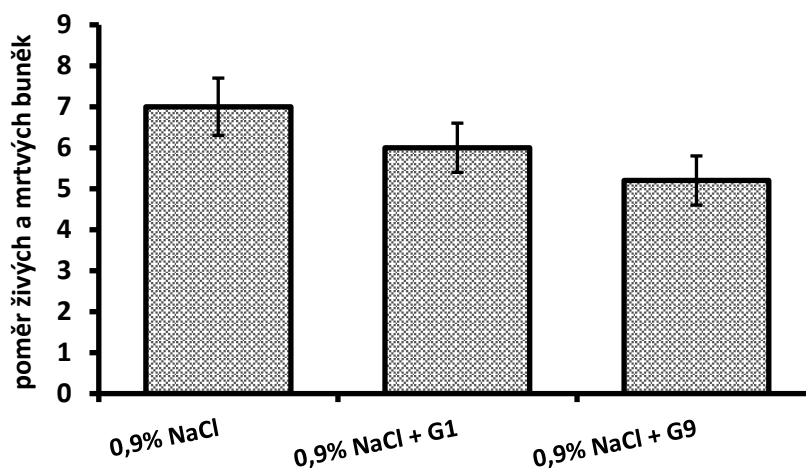


Obr. 25: Počet buněk myeloidní linie (A), neutrofilů (B), monocytů (C) a eosinofilů (D) získaných peritoneální laváží 4 h po intraperitoneální injekci 1 ml TGM 2, 1 ml TGM 1 nebo 200 µL TGM 2. Počet myši užitých v jednotlivých skupinách: 1 ml TGM 2 – 3 myši, 1 ml TGM 1 – 3 myši, 200 µL TGM 2 – 2 myši.



Obr. 26: Poměr procentuálního podílu živých buněk ze singletů ku procentuálnímu podílu mrtvých buněk ze singletů získaných peritoneální laváží 4 h po injekci 200 μ l TGM 2: **0,9% NaCl** – skupina 2 myši, jimž bylo podáno TGM 2 bez INDO a DEX; **0,9% NaCl + INDO** – skupina 3 myši, jimž byl spolu s TGM 2 dvakrát podán indometacin (5 mg/kg); **0,9% NaCl + DEX** – skupina 3 myši, jimž byl spolu s TGM 2 dvakrát podán dexametazon (5 mg/kg).

9.3. PŘÍLOHA 3



Obr. 27: Poměr procentuálního podílu živých buněk ze singletů ku procentuálnímu podílu mrtvých buněk ze singletů získaných peritoneální laváží 4 h po injekci 200 μ l TGM 2: **0,9% NaCl**: skupina 9 myši, jimž bylo podáno TGM 2 bez cystatinů; **0,9% NaCl + G1** – skupina 9 myši, jimž byl spolu s TGM 2 dvakrát podán cystatin G1 (2 mg/kg); **0,9% NaCl + G9** – skupina 8 myši, jimž byl spolu s TGM 2 dvakrát podán cystatin G9 (2 mg/kg).