

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Vliv klíštěcích slin na vývoj zánětu indukovaného  
boreliemi v kůži myši**

Diplomová práce

**Bc. Tereza Štajnerová**

Školitel: prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

Konzultant: Mgr. Hana Sehadová, Ph.D.

České Budějovice 2018

Štajnerová, T., 2018: Vliv klíštěcích slin na vývoj zánětu indukovaného boreliemi v kůži myši. [Effect of tick saliva on the development of borrelia-induced inflammation in mouse skin. Mgr. Thesis in Czech] – 55 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The aim of the thesis was to review the effects of tick saliva on borrelia-induced inflammatory response. We performed immunohistochemical analysis and histological staining with Mallory trichrome and hematoxylin-eosin of inflamed mouse skin after injection of *Borrelia afzelii* spirochetes combined with tick saliva.

Prohlášení:

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

V Českých Budějovicích dne 18.4. 2018

.....

Tereza Štajnerová

## Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému školiteli prof. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. a konzultantce Mgr. Haně Sehadové, Ph.D. za jejich obětavost a cenné rady, bez nichž by tato práce nevznikla. Velké poděkování patří také Bc. Evě Výletové a pracovníkům Střediska mikroskopie a histologie Entomologického ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky. V neposlední řadě děkuji také své rodině a všem svým blízkým za trpělivost a podporu po celou dobu studia.

1	Literární přehled .....	1
1.1	Zánět .....	1
1.1.1	Monocyty/makrofágy .....	5
1.1.2	Neutrofilny .....	7
1.2	Klíště .....	11
1.3	Klíštěcí sliny .....	12
1.3.1	Osmotická rovnováha a exkrece vody .....	12
1.3.2	Anti-hemostatické látky .....	13
1.3.3	Imunomodulační látky .....	13
1.3.4	Přenos patogenů .....	16
2	Cíle práce .....	19
3	Materiál a metody .....	20
3.1	Laboratorní zvířata .....	20
3.2	Boreliový kmen .....	20
3.3	Klíštěcí sliny .....	20
3.4	Příprava vzorků pro histologické zpracování .....	20
3.5	Histologické barvení Malloryho trichromem .....	21
3.6	Histologické barvení hematoxylem a eosinem .....	21
3.7	Aplikace protilátek .....	22
3.8	Indukce zánětu .....	22
3.9	Počítání buněk .....	23
4	Výsledky .....	24
4.1	Histologické barvení podle Malloryho a hematoxylinem-eosinem .....	24
4.2	Imunohistochemická analýza vlivu klíštěcích slin na infiltraci neutrofilů a makrofágů do místa zánětu .....	28
4.3	Statistické vyhodnocení počtu infiltrovaných efektorů do místa zánětu .....	32
5	Diskuze .....	34
6	Závěr .....	39
7	Seznam zkratk .....	40
8	Seznam použité literatury .....	42

# 1 Literární přehled

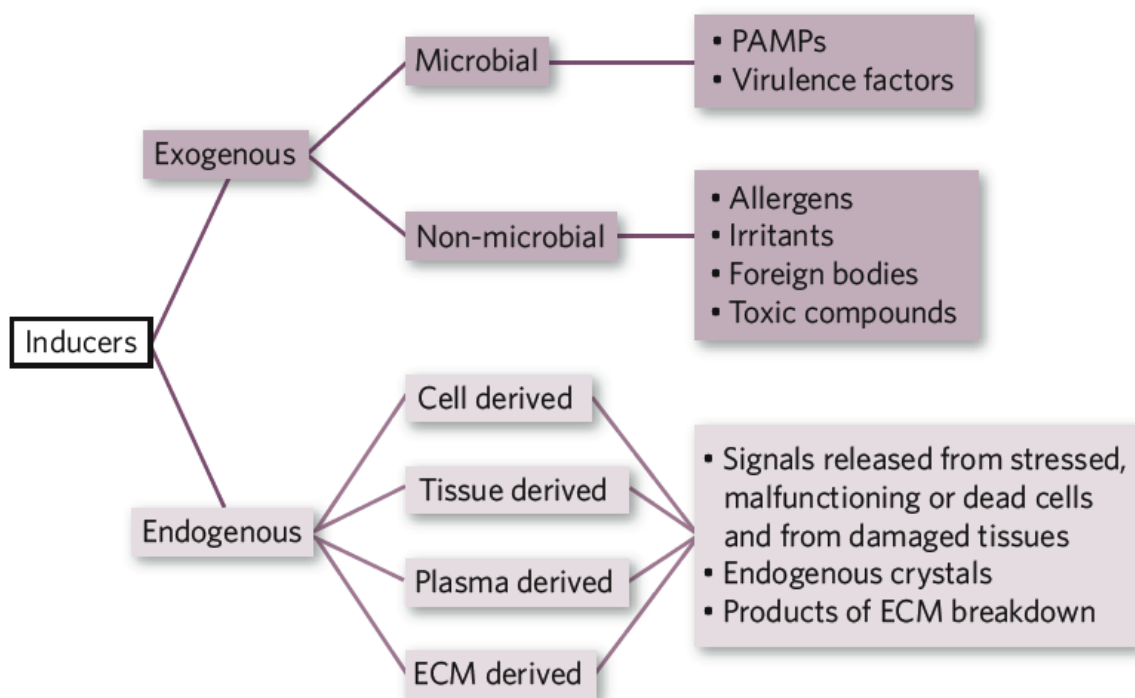
## 1.1 Zánět

Zánět je odpovědí organismu na poškození tkáně, které může být fyzikálního, chemického či mechanického původu, nebo může být vyvolán působením infekčních agens. Cílem zánětu je lokalizovat místo poškození, zabránit šíření infekce aktivací přirozené i adaptivní složky imunitního systému a znovunastolení homeostázy. Výsledkem úspěšného rozvoje fyziologického (akutního) zánětu je odstranění příčiny jeho vzniku a reparace poškozené tkáně.

První reakcí organismu v místě zánětu bývá vasodilatace, která zvýší prokrvení postiženého místa a tím zjednoduší migraci imunitních buněk do místa zánětu. Zvýšené prokrvení má také za následek lokální nárůst teploty (*calor*), zarudnutí (*rubor*) a otok (*tumor*). Důsledkem nahromadění kyselých metabolitů v místě zánětu pak dochází ke vzniku lokální acidózy, zvýšení osmotického a onkotického tlaku a následně zvýšené bolestivosti místa (*dolor*). Tyto čtyři základní znaky zánětu popsal již v prvním století našeho letopočtu Aulus Cornelius Celsus a o dvě století později byly doplněny Claudiem Galénem o pátý znak - poruchu funkce (*functio laesa*).

## Vznik zánětlivé reakce

Vývoj zánětu probíhá následujícím způsobem. Látky schopné vyvolat zánět (induktory) aktivují senzory, které spustí produkci mediátorů, jejichž pomocí jsou následně aktivovány efekторы. Induktory zánětu mohou být exo- nebo endogenního původu a dále se dělí na několik podskupin (viz obrázek 1).



**Obr. 1:** Induktory zánětu a jejich dělení. PAMP – pathogen associated molecular patterns; ECM – extracellular matrix (Medzhitov, 2008).

Mezi exogenní induktory zánětu můžeme řadit mikrobiální PAMPs (*patogen associated molecular patterns*) a virulentní faktory, které jsou taktéž mikrobiálního původu. Na rozdíl od PAMPs jsou virulentní faktory specifické pouze pro patogeny. Např. proteázy vylučované helminty jsou detekovány bazofily a tím spouštějí zánětlivou reakci. Stejný účinek mohou mít i některé proteázy, které se řadí mezi alergeny, což naznačuje určitou nespecifičnost bazofilních senzorů (Sokol et al., 2007). Je důležité zmínit, že exogenní mikrobiální induktory mohou pocházet i od symbiotických bakterií. Signální dráhy vedoucí k rozvoji zánětlivé reakce jsou v tomto případě blokovány rozličnými mechanismy (Turer et al., 2008).

Mezi nemikrobiální exogenní induktory zánětu se řadí alergeny, cizí, toxické a dráždivé látky (Majno and Joris, 2004).

Do endogenních induktorů, které mohou spustit zánětlivou reakci spadají signály vylučované z poškozených či stresovaných buněk. Jedná se většinou o látky, které se za normálních okolností nacházejí uvnitř buňky a ven se dostanou až poté, co buňka umře (u buňky, která umírá apoptózou k uvolnění těchto induktorů ven z buňky nedochází).

### **Průběh zánětlivé reakce**

Nejvíce prozkoumaným je zánět způsobený infekčním agens, obzvláště bakteriemi. Zánětlivá reakce je tímto podnětem spuštěna tak, že membránové receptory (nejčastěji) tkáňových makrofágů rozpoznají epitopy (PAMPs či virulentní faktory) na povrchu patogenu. To vede k produkci tzv. mediátorů - cytokinů, chemokinů, vazoaktivních látek či produktů proteolytické kaskády. Mediátory pak působí na efekторы a způsobují vazodilataci, proudění plazmy do místa zánětu a tím infiltraci zánětlivého ložiska efekторы z cirkulace (Medzhitov, 2010). Na místě zánětu jsou pak efekторы (neutrofilů i makrofágy) aktivovány a účastní se zánětlivé reakce jak eliminací patogenů, tak produkcí cytokinů, čímž aktivují další buňky imunitního systému. Neutrofilů pak mohou degranulovat či produkovat ROS (*reactive oxygen species*). Tyto prostředky ale nemohou být cílené pouze na patogen, a tak způsobují poškození i vlastní tkáni (Nathan, 2002).

Podle induktoru zánětlivé odpovědi se liší i výsledná zánětlivá reakce. Signál, který je spuštěn virovým patogenem zahrnuje produkci IFN- $\alpha$  (interferon  $\alpha$ ) a IFN- $\beta$  (interferon  $\beta$ ) nakaženými buňkami, zatímco napadení organismu parazitickými červy vede k produkci IL-4, IL-5 a IL-13 (*interleukin -4, -5 a -13*) žírnými buňkami a bazofily (Medzhitov, 2010).

Za ideálních okolností je pak patogen zlikvidován a dochází k ukončení zánětlivé reakce především za účasti neutrofilů a k reparaci poškozené tkáně makrofágy (viz níže). Pokud se nepovedlo patogen odstranit, mění se po nějaké době zánětlivý infiltrát a převažující procento neutrofilů je nahrazováno makrofágy a v případě infekce také T-lymfocyty.

### **Ukončení zánětu**

Velmi důležitou fází zánětu je jeho ukončení. Podílejí se na něm především buňky přirozené imunity. V případě neutrofilů dochází k jejich úmrtí a následnému odklizení za pomoci fagocytů. Stejně tak je zapotřebí odstranit i prozánětlivé cytokiny a finálně jsou na místo zánětu přiváděny protizánětlivé subtypy makrofágů anebo dochází k přeměně prozánětlivého fenotypu makrofágů na protizánětlivý (Tabas and Glass, 2013). Na těchto

dějích se podílejí např. IL-10, TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ) a lipidové faktory jako jsou protektiny, resolvin, maresiny a lipoxiny, které jsou všechny souhrnně nazývány specializované pro-resoluční mediátory (*specialized proresolving mediators* – SPMs) (Serhan, 2007). K ukončení zánětlivé odpovědi přispívá také komplement, který zvyšuje fagocytickou aktivitu efektorů a tím urychluje odklizení apoptotických buněk (Flierman and Daha, 2007; Ricklin et al., 2010).

### **Regenerace poškozené tkáně**

K následné regeneraci tkáně přispívají makrofágy, a to jejich oba subtypy, M1 i M2. Zatímco M2 fenotyp má protizánětlivé působení a slouží tak především k ukončení zánětlivé odpovědi, M1 fenotyp se podílí na odstraňování mrtvých buněk a dalších induktorů zánětu a produkcí IL-6, TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ) a IL-1 $\beta$  stimuluje myogenezi (Saclier et al., 2013). Obnovu tkáně urychluje také IL-4, který je na místě zánětu produkován eozinofily (Heredia et al., 2013). Pomocí regulace produkce růstových faktorů a indukce fagocytózy odumřelých buněk se na obnově tkáně podílí i komplement (Ricklin et al., 2010).

### **Patologie zánětlivé reakce**

Není-li strategie k odstranění patogenu úspěšná, akutní zánět přechází v chronický a na místě se mohou tvořit granulomy a terciální lymfoidní tkáně (Drayton et al., 2006). Kromě toho může být chronický zánět způsoben také autoimunními chorobami, přetrvávajícím poškozením tkáně, perzistujícími alergeny, nestravitelnými částicemi či endogenními krystaly natrium urátu (Majno and Joris, 2004).

Pokud je imunitní systém při reparaci poškozené tkáně přehnaně aktivovaný, může místo regenerace docházet k remodelaci tkáně neboli tkáňové fibróze. K tvorbě tkáňové fibrózy přispívá i komplementový systém (Ricklin et al., 2010). Stejně tak se patologické reakce účastní i většina ostatních buněk imunitního systému (shrnutí Kulkarni et al., 2016). Např. počet neutrofilů je používán jako prognostický marker při remodelaci kardiální tkáně (Stramer et al., 2007).

Poruchy v ukončení zánětlivé reakce přispívají k rozvoji chorob, jako jsou ateroskleróza, obezita, některé typy rakoviny, astma, neurodegenerativní onemocnění, mnohočetná skleróza či revmatoidní artritida. Některá tato onemocnění se jeví jako chronický zánět již od počátku (např. ateroskleróza či obezita), u některých onemocnění můžeme najít



akutní i chronický zánět současně (např. revmatoidní artritida, astma, Crohnova choroba atd.). U civilizačních onemocnění jako jsou obezita, diabetes druhého typu, neurodegenerativní onemocnění nebo rakovina se pak pacient ocitá v začarovaném kruhu, protože např. obezita může vést ke vzniku chronického zánětu, který má pak na svědomí diabetes druhého typu vytvořením rezistence k inzulinu (Hotamisligil, 2006). Podobné začarované kruhy se vyskytují například i u aterosklerózy či rakoviny a jsou tak zodpovědné za přetrvávající zánět.

V následujících kapitolách se budeme podrobněji věnovat roli makrofágů a neutrofilů ve vývoji zánětu.

### **1.1.1 Monocyty/makrofágy**

Makrofágy jsou jedním z nejdůležitějších efektorů přirozené imunity. O jejich důležitosti svědčí, že jsou přirozeně přítomné téměř ve všech tkáních a můžeme je najít u všech obratlovců i u celé řady bezobratlých živočichů (shrnutí Abnave et al., 2017).

Makrofágy mají svůj původ v progenitorových hemopoetických buňkách kostní dřeně, odkud jsou vyplavovány do cirkulace jako monocyty a po aktivaci chemokiny mohou prostupovat do tkání. Tento způsob vzniku makrofágů byl dlouhou dobu považován za jediný, ale Perdiguero a kol. (2015) prokázal, že některé populace tkáňových makrofágů pocházejí z buněk žloutkového váčku. Prekurzory těchto makrofágů vznikají ve tkáních již v prenatálním vývoji a jejich populace je obnovována nezávisle na makrofázích z cirkulace.

Tkáňové makrofágy tvoří celou řadu fenotypově odlišných populací, které podle jejich lokalizace rozlišujeme na Kupfferovy buňky (v játrech), mikroglie (v mozku), Langerhansovy buňky (v kůži) či alveolární makrofágy (v plicích). Jejich hlavní úlohou je likvidace vlastních odumřelých buněk a také představují první obrannou linii v případě proniknutí patogenu nebo vzniku poranění. V neposlední řadě se makrofágy významně podílí na vzniku, průběhu ale i ukončení zánětlivé reakce.

Ke změně monocyty na makrofág je zapotřebí působení růstových faktorů GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) a M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*). Diferencovaný makrofág může být působením dalších cytokinů aktivován. V závislosti na typu působících cytokinů pak vznikají dvě odlišné populace aktivovaných makrofágů.

Subpopulace M1 je také nazývána jako klasicky aktivované makrofágy, jelikož aktivace makrofágů pomocí  $\text{IFN}\gamma$  byla objevena jako první (Nathan et al., 1983). Takto aktivované efekторы stimulují vznik imunitní odpovědi typu 1. Mají větší schopnost prezentace antigenu, sekretují více prozánětlivých cytokinů (např.  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-12}$ ,  $\text{IL-18}$ ), ROS i RNS (*reactive nitrogen species*) a vykazují zvýšenou komplementem indukovanou schopnost fagocytózy (Martinez et al., 2009). Stimulují také T lymfocyty k produkci cytokinů Th1 skupiny (např.  $\text{IFN-}\gamma$ ), které aktivují další M1 makrofágy (Nathan, 1987).

Téměř deset let poté, co byla popsána M1 subpopulace makrofágů, pojmenoval Stein a kol. (1992) způsob alternativní aktivace makrofágů pomocí IL-4, čímž ustanovil druhou subpopulaci makrofágů - M2 (neboli alternativně aktivované makrofágy), která vyvolává imunitní odpověď typu 2, vykazuje sníženou produkci prozánětlivých cytokinů a hraje důležitou roli při hojení a obnově poškozené tkáně produkcí profibrotických faktorů jako je např. fibronectin. M2 makrofágy jsou také zodpovědné za produkci Th2 cytokinů (např.  $\text{TGF-}\beta$ , IL-4), které stimulují proliferaci B-lymfocytů a tvorbu protilátek (Jenkins and Allen, 2010). Tato subpopulace je více zodpovědná za fagocytózu mrtvých buněk (Yamazaki et al., 2008). Fagocytóza nekrotických buněk pak může vyvolat prozánětlivou odpověď (Roos et al., 2004), zatímco fagocytóza apoptotických buněk vyvolá zvýšenou produkci IL-10 makrofágy a sníženou produkci IL-12, čímž zaujmou M2 fenotyp s protizánětlivou odpovědí (Filaridy et al., 2010).

Celá problematika subpopulací aktivovaných makrofágů je ale zřejmě mnohem složitější. Mosser a Edwards (2008) ve své práci uvádí, že M1 a M2 nejsou ani tak dvě rozdílné subpopulace makrofágů, jako spíše dva krajní fenotypy, mezi nimiž existuje množství dalších subpopulací s vlastnostmi podobnými první či druhé skupině a tvořící tak plynulý přechod. Výsledná imunitní reakce je pak směsí M1/Th1 i M2/Th2 odpovědí (Murray and Wynn, 2011).

Roli makrofágů ve vývoji zánětu můžeme rozdělit do čtyř fází:

1. Poté, co patogen vnikne do organismu, makrofágy jej rozpoznají. K tomuto účelu jim slouží celá řada receptorů tzv. PRR (*patogen recognition receptors*), jejichž prostřednictvím rozpoznává PAMPs nebo molekuly vznikající poškozením vlastních buněk - DAMPs (*damage-associated molecular patterns*). Mezi PRR se řadí například TLR (*Toll-like receptors*), NLR (*NOD-like receptors*), RLR (*RIG-I-like receptors*)

- a C-lektinové receptory (Takeuchi and Akira, 2010). Tímto procesem je spuštěna prozánětlivá odpověď.
2. V dalším kroku se zvyšuje počet makrofágů v místě zánětu, a to dvěma způsoby. Pomocí CCL2 (*C-C motif chemokine ligand*) chemoatraktantů jsou do místa zánětu přiváděny další makrofágy z cirkulace (Shi and Pamer, 2011) a působením IL-4 se zvyšuje proliferace na místě infekce (Jenkins et al., 2011).
  3. Makrofágy na místě zánětu jsou poté diferencovány na M1 či M2 subpopulaci, která může produkovat ROS, NO a řadu zánětlivých cytokinů.
  4. Po eliminaci infekce zaujímají makrofágy protizánětlivý fenotyp a účastní se ukončení zánětu a následného zhojení poškození (Soehnlein and Lindbom, 2010). M1 subpopulace je schopná se změnit na M2 fenotyp a zabránit přílišnému poškození tkáně pomocí produkce *macrophage-derived arginase 1*, která snižuje produkci IL-12 a ovlivňuje činnost T-reg (*regulatory T-lymfocyte*) (Herbert et al., 2010). Na výsledném zhojení tkáně se makrofágy podílí produkcí profibrotických faktorů.

Činnost makrofágů během zánětu ovlivňuje také neutrofilů. Pro migraci neutrofilů jsou důležité zejména CXCL-1 (*C-X-C motif chemokine ligand*), CXCL-2, IL-1 $\alpha$  a MIP2 (*macrophage inflammatory protein-2*) (Barry et al., 2013; Beck-Schimmer et al., 2005; De Filippo et al., 2008). Tato buněčná signalizace má za následek příliv neutrofilů do místa zánětu a eliminaci patogenů neutrofilů. Jelikož neutrofilů mají po opuštění krevního řečiště velmi krátkou životnost, produkují makrofágy v místě zánětu růstové faktory jako jsou GM-CSF, G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*) a TNF $\alpha$ , aby jejich životnost prodloužily (Takano et al., 2009).

Makrofágy také podporují angiogenezi produkcí cytokinů a růstových faktorů jako je VEGF-A (*vascular endothelial growth factor*) nebo FGF-2 (*fibroblast growth factor*), u kterých bylo prokázáno synergické působení (Xue and Greisler, 2002).

### 1.1.2 Neutrofilů

Patří mezi hlavní složku přirozené imunity a tvoří největší část recirkulujících leukocytů (McCracken and Allen, 2014). Účastní se především časné imunitní odpovědi, hrají důležitou roli ve vývoji zánětu, ale také při některých chronických chorobách. Jsou schopné zbavit se patogenu pomocí degranulace, ale mohou jej i fagocytovat a kromě toho jsou producentem

důležitých cytokinů (Scapini et al., 2000). Dalším způsobem, jak mohou neutrofilové zlikvidovat patogen, jsou NETs (*neutrophil extracellular traps*), což jsou sítě vláken tvořených především z neutrofilové DNA. Dále jsou původcem ROS. Činností membránové NADPH (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*) oxidázy produkují superoxidový anion ( $O_2^-$ ), který způsobuje oxidativní vzplanutí (Nunes et al., 2013). Hrají také důležitou roli v tzv. přirozené imunitní paměti, za kterou jsou, na rozdíl od klasické adaptivní imunologické paměti, zodpovědné epigenetické změny, nikoliv trvalé změny v genetické informaci jako jsou mutace či rekombinace (Logie and Stunnenberg, 2016).

Neutrofilové, stejně jako ostatní krevní buňky, vznikají v kostní dřeni. Odtud jsou vyplavovány do cirkulace, kde ale zůstávají jen krátce (zhruba po dobu jednoho dne) a následně umírají apoptózou. Tuto krátkou životnost mohou ovlivnit zánětlivé cytokiny a prodloužit ji o několik dní (Mantovani et al., 2011). Pokud dostanou neutrofilové signály z místa zánětu, mohou prostupovat z cirkulace do tkání. První signály jsou většinou DAMPs od poškozených nebo nekrotických buněk (Pittman and Kubes, 2013). Tyto DAMP molekuly, mezi něž můžeme řadit  $IL-1\alpha$ , ATP, histony, DNA a další, působí také jako chemoatraktanty, nebo mohou aktivovat okolní tkáň a stimulovat je k produkci dalších cytokinů (Chen and Nuñez, 2010). Další chemoatraktanty jsou produkovány např. tkáňovými makrofágy po jejich aktivaci (viz výše).

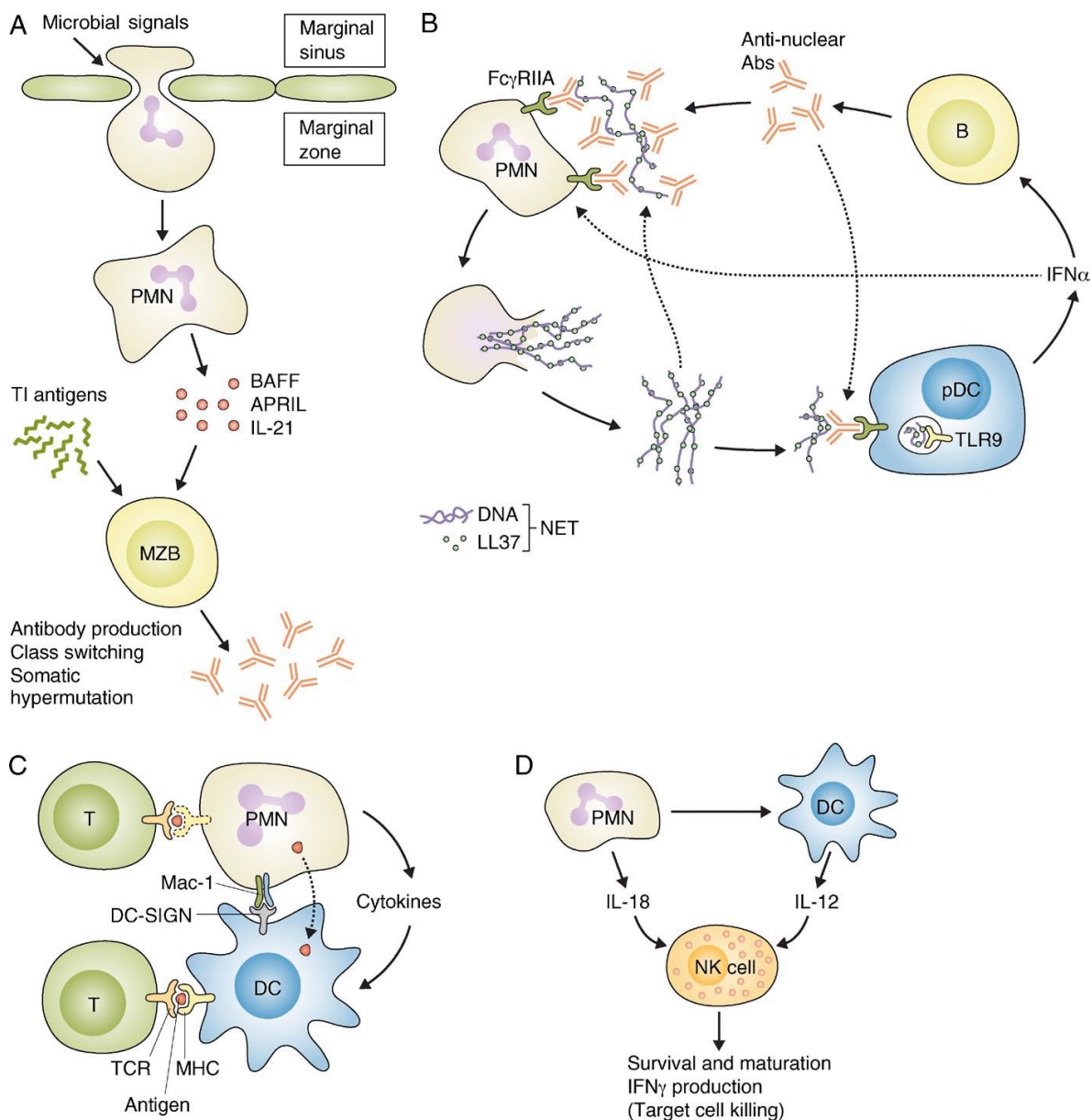
Jakmile neutrofilní granulocyty doputují do zánětlivého ložiska, účastní se likvidace patogenu a produkují chemoatraktanty, jejichž působení má za následek zvýšenou migraci monocytů/makrofágů do místa zánětu - např. CAP37/azurocidin a cathepsin G (Chertov et al., 1997). Další migraci makrofágů do místa zánětu ovlivňují chemokiny CCL2, CCL3, CCL19, CCL20 či granulární proteiny, které zároveň zvyšují schopnost makrofágů fagocytovat a produkovat cytokiny (Soehnlein et al., 2009). Neutrofilové jsou schopny pomocí produkovaného CAP37/azurocidinu vyvolat změnu v cytoskeletu endoteliálních buněk a tím zvýšit permeabilitu endotelu pro monocyty (Gautam et al., 2001). A v neposlední řadě zvyšují expresi adhezních molekul ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*) a *E-selectinu* (Lee et al., 2003).

Neutrofil, který fagocytoval patogen, může putovat do lymfatických uzlin. K tomuto pohybu je zapotřebí, aby buňka exprimovala chemokinové receptory CXCR4 (*C-X-C motif chemokine receptor*) a CCR7 (Beauvillain et al., 2010). V lymfatických uzlinách pak

neutrofilů pronikají do všech vrstev, aby byly v kontaktu s co největším počtem aktivovaných imunitních buněk (Liao and Von der Weid, 2015).

Poté, co neutrofilů splní svou úlohu v místě zánětu, jsou fagocytovány makrofágy či dendritickými buňkami, nebo umírají prostřednictvím apoptózy, autofágie či NETózy (proces, kdy z mrtvé buňky vznikají NETs) (Iba et al., 2013).

Všechna působení neutrofilních granulocytů také značně ovlivňují ostatní imunitní buňky. Například degranulace neutrofilů slouží především pro eliminaci patogenů, ale působením látek z granul jsou neutrofilů schopné ovlivnit, jestli okolní makrofágy zaujmou M1 nebo M2 fenotyp a tím, jestli jejich imunitní odpověď bude pro- nebo protizánětlivá (Hamilton et al., 2014). Nejvíce prozkoumaný cytokin produkovaný neutrofilů – IL-8 ovlivňuje chemotaxi, degranulaci a oxidativní vzplanutí samotných neutrofilů, ale také působí chemotakticky na bazofily a T-lymfocyty (Baggiolini, 1998). Interakce s dalšími imunitními buňkami jsou znázorněny na obrázku 2.



**Obr. 2: Interakce neutrofilů s dalšími imunitními buňkami.** **A** – Neutrofilý (PMN) se akumuluji v marginální zóně sleziny, kde spolu s působením na T-buňkách nezávislých antigenů (TI) podporují tvorbu protilátek a zrání B-lymfocytů marginální zóny (MZB). **B** – Účast neutrofilů v tzv. začarovaném kruhu autoimunního onemocnění, kde uvolňováním NETs indukují produkci IFN- $\alpha$  pomocí pDC, což stimuluje B-lymfocyty (B) k produkci protilátek. **C** – PMN přímo prezentují antigen T-lymfocytům (T) a aktivují DC prezentací antigenu. **D** – Neutrofilý spolu s DC aktivují NK buňky. (Mócsai, 2013).

Aktivovaný neutrofil na místě zánětu může vytvářet množství subpopulací s různými funkcemi. Tyto subpopulace nebyly všechny ještě řádně prozkoumány, ale Tsuda a kol. (2004) ve své práci popisuje, že po infekci na antibiotika rezistentním kmenem *Staphylococcus aureus* tvořily myší neutrofilý dvě subpopulace PMN-1 a PMN-2, které se lišily v produkci

cytokinů, schopnosti aktivovat makrofágy, expresi TLR i některých povrchových molekul. Subpopulace PMN-1 produkuje IL-12, aktivuje makrofágy klasicky a exprimuje TLR2, TLR4, TLR5 či TLR8, zatímco subpopulace PMN-2 produkuje IL-10, makrofágy aktivuje alternativně a exprimuje TLR2, TLR4, TLR7 a TLR9 (Tsuda et al., 2004).

Neutrofilů hrají důležitou roli i v ukončení zánětlivé reakce. Pomocí produkce lipoxinu A4 během závěrečné fáze zánětlivé reakce zastavují migraci dalších neutrofilů do místa zánětu; k ukončení chemotaxe a migrace do místa zánětu slouží také resolvinů jako je např. resolvin E1, resolvin E2 či resolvin D1 a resolvin D2 (Serhan et al., 2008). Dalším úkolem neutrofilů je blokování a degradace zánětlivých cytokinů (Ariel et al., 2006). Nakonec neutrofilů na svém povrchu exprimují tzv. *eat-me signály*, které mají za následek fagocytózu neutrofilů makrofágy, jejich vývoj v M2 fenotyp a spuštění protizánětlivé reakce (Bystrom et al., 2008).

Ačkoliv je neutrofil většinou považován za imunitní buňku, která má (i vzhledem ke své krátké životnosti) za úkol pouze doputovat do místa zánětu, odstranit patogen a poté je fagocytována makrofágem, poslední dobou je čím dál více zřejmé, že neutrofilů mohou tvořit velké množství subpopulací s různorodými funkcemi – od produkce cytokinů přes imunologickou paměť až po působení v řadě zánětlivých onemocnění (shrnutí Rosales, 2018).

## 1.2 Klíště

Klíště je téměř celosvětově rozšířený hematofágní ektoparazit. Parazituje na savcích, ptácích, plazích i obojživelnících a představuje tak významného přenašeče širokého spektra patogenů. V současné době jsou klíšťata řazena do taxonomické podtřídy roztočů (*Acari*), řádu klíšťatovci (*Ixodida*) a do něj spadajících tří čeledí: *Ixodidae*, *Argasidae* a *Nuttallielidae*.

Do čeledi *Ixodidae* spadá 702 druhů rozdělených do 14 rodů. Kvůli jejich typickému znaku - tvrdému hřbetnímu štítu (scutum) - jsou nazývána jako tzv. „tvrdá klíšťata“ (Horak, 2003). Do čeledi *Argasidae* patří 193 druhů, ale jejich rozdělení do rodů je zatím nejednoznačné (Horak et al., 2003). Klíšťata z čeledi *Argasidae* nemají tvrdý hřbetní štítek a jsou proto nazývána „měkká klíšťata“. Kromě tohoto znaku se „tvrdá“ a „měkká“ klíšťata liší také způsobem života. Zatímco „měkká“ klíšťata sají v každém vývojovém stádiu několikrát a pouze krátce (po dobu několika hodin), „tvrdá“ klíšťata sají většinou v každém vývojovém stádiu pouze jednou, ale po dobu několika dnů až týdnů (Sonenshine and Roe,

2014). Poslední čeleď řádu Ixodida nese název *Nuttallielidae* a patří do ní jediný zástupce *Nuttalliela namaqua*, který saje převážně na plazech, vykazuje znaky obou výše zmíněných skupin a je považován za jejich předchůdce (Mans et al., 2011b).

Pro efektivní přísátí klíště nejdříve naruší tkáň hostitele, do rány zanoří hypostom a následně se u klíšťat rodu čeledi *Ixodidae* kolem hypostomu tvoří tzv. cement, který usnadňuje pevné přichycení klíštěte v ráně. Zástupci čeledi *Argasidae* cement netvoří a spoléhají na hluboký průnik hypostomu do tkáně. (Sonenshine and Roe, 2014). V ráně kolem hypostomu se tvoří tzv. *feeding pool* z nahromaděné krve.

Přestože krev-sajících parazitů je velké množství, klíště mezi nimi představuje unikátní skupinu, jelikož na rozdíl od ostatních hematofágů zůstává přísáto i několik dní až týdnů (zástupci skupiny „tvrdých klíšťat“). Takto dlouhý kontakt s hostitelem vystavuje klíště obranným imunitním mechanismům hostitele, se kterými se musí vyrovnat. Za tímto účelem je klíště schopné produkovat celou řadu látek jako jsou lipidy, peptidy i velké proteiny, které dopravuje do těla hostitele po celou dobu přísátí ve formě slin (Anderson and Valenzuela, 2008).

### **1.3 Klíštěcí sliny**

Klíštěcí sliny se tvoří ve slinných žlázách, které jsou umístěny anterolaterálně v ústní oblasti. Z lalůčků (alveolů) slinných žláz jsou sliny odváděny pomocí slinných vývodů do salivaria umístěného mezi chelicerami a hypostomem.

Alveoly slinných žláz můžeme rozdělit na agranulární (typ I) a granulární (typ II, III a IV). Typ I je spojován s osmoregulací, zbylé typy jsou zodpovědné za sekreci proteinů se širokou škálou funkcí a transport vody (Sauer et al., 1995).

#### **1.3.1 Osmotická rovnováha a exkrece vody**

Dlouhou dobu byla považována za hlavní funkci klíštěcích slin osmoregulace. Dospělá samice zvětší během sání svůj objem až stokrát, což má za následek i značnou změnu iontové rovnováhy (Sauer et al. 1995). S tím se klíště vyrovnává za pomoci slin, jejichž prostřednictvím vylučuje zpět do těla hostitele přebytečnou vodu i ionty (Kaufman et al., 1980). Pokud klíště není přísáto na svém hostiteli, slinné žlázy produkují hyperosmotickou tekutinu, která pomáhá vstřebávat vzdušnou vlhkost a umožňuje klíštěti překonat dlouhá období bez přístupu k vodě. (Sonenshine and Roe, 2013).

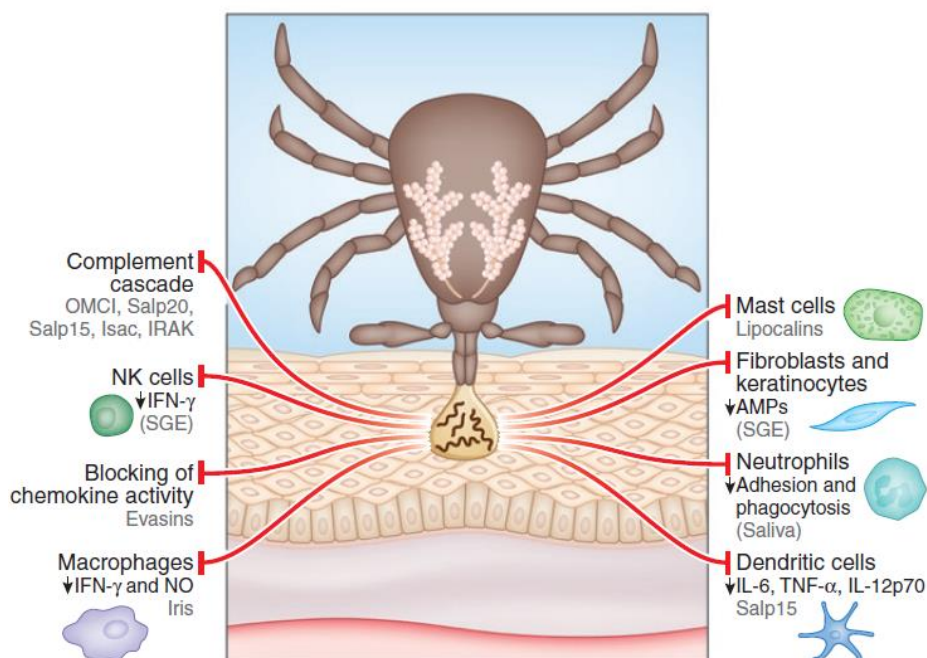


### 1.3.2 Anti-hemostatické látky

Narušení tkáně hostitele má za následek spuštění hemostatických procesů – vasokonstrikce, hemokoagulace a agregace krevních destiček. Tyto mechanismy zabraňují nadbytečným ztrátám krve při poranění, ale pro krev-sající parazity představují překážku, se kterou se musí vyrovnat. V klíštěcích slinách jsou za tímto účelem přítomny molekuly inhibující koagulační kaskádu, zabraňující agregaci krevních destiček a způsobující vasodilataci. Jako příklad takové látky bychom mohli uvést prostaglandiny, které mají jak antiagregační, tak vasodilatační účinek (Sauer et al., 2000). Podrobný souhrn látek ovlivňujících hemostázu poskytuje mnoho prací např. Kazimírová a Štibrániová, 2013; Chmelař a kol., 2012; Mans, 2011a; Valenzuela, 2004.

### 1.3.3 Imunomodulační látky

Již začátkem 80. let 20. století bylo odhaleno, že proteiny produkované v klíštěcích slinách jsou schopné vázat histamin a tím omezit vývoj zánětlivé odpovědi v místě přístátí klíštěte (Paine et al., 1983). Od té doby bylo objeveno a popsáno široké spektrum dalších látek ovlivňujících vývoj zánětu. Na obrázku 3 je schematicky znázorněno působení klíštěcích slin na různé složky imunitního systému.



*Obr. 3: Působení složek klíštěcích slin na imunitní systém hostitele (Hovius, 2009).*

### **Působení klíštěcích slin na komplement**

Komplement je skupina sérových proteinů, které představují důležitou složku přirozené imunity. Jeho dílčí molekuly mají vliv na vývoj zánětu, opsonizaci, i výslednou lýzu patogenu. Nunn a kol. (2005) ve své práci popisuje, že protein přítomný v SGE (*salivary gland extract*) z klíštěte *Ornithodoros moubata* zabraňuje aktivaci komplementu klasickou i alternativní cestou ovlivňováním aktivace C5 konvertázy. U *Ixodes scapularis* byly odhaleny dva proteiny inhibující C3 konvertázu alternativní cesty komplementu – ISAC (*Ixodes scapularis anticomplement protein*) a Salp 20 (Tyson et al., 2007; Hourcade, 2016). Salp20 váže properdin, který je zodpovědný za stabilitu C3 konvertázy. Jejich obdoby IRAC I (*Ixodes ricinus anticomplement protein*), IRAC II a IXAC-B1-5 (*Ixodes family anticomplement protein*) existují i u klíštěte *Ixodes ricinus* (Lawrie et al., 1999).

Významnou součástí zánětlivé reakce je migrace buněk do místa zánětu. Tyto buňky (neutrofily, makrofágy, dendritické buňky, NK-buňky, ale i T- a B- lymfocyty) pak produkují cytokiny, čímž na místo infekce přivádějí další efekторы a spouštějí tak kaskádovitou reakci. Klíště je pomocí látek obsažených ve slinách schopno tuto odpověď značně modulovat. Vliv klíštěcích slin (respektive SGE) byl prokázán v *in vitro* pokusech na složky adaptivní i přirozené imunity, tedy na makrofágy, granulocyty, NK buňky a T- i B-lymfocyty a podrobně popsán ve velkém množství prací (např. Mjeri et al., 2002; Schoeler et al., 2000). Níže se opět budeme věnovat podrobněji působení klíštěcích slin na makrofágy a neutrofily.

### **Působení klíštěcích slin na makrofágy**

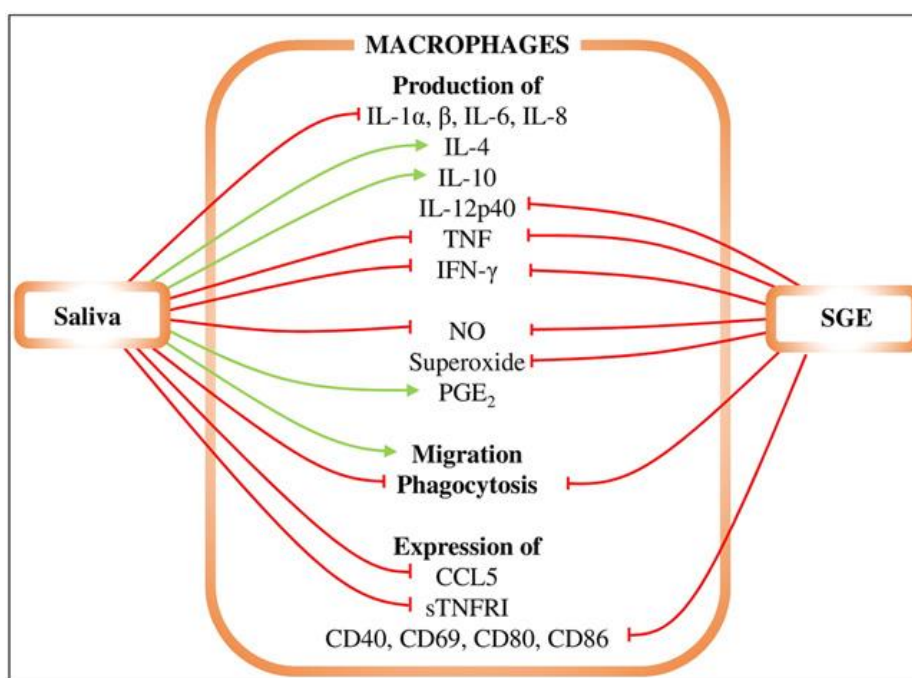
Kramer a kol. (2011) prokázal, že sliny z klíštěte *Dermacentor variabilis* stimulují makrofágovou linii IC-21 k produkci Th-2 cytokinů IL-4 a IL-10, ovlivňují jejich migraci a dále snižují schopnost fagocytózy.

Sliny z klíštěte *Ixodes ricinus* zvyšují produkci makrofágového zánětlivého proteinu MIP2 (*macrophage inflammatory protein 2*) a MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), který v závěrečné fázi sání klíštěte může stimulovat uvolnění histaminu a tím zvýšit prokrvení místa přisátí klíštěte (Langhansová et al., 2015).

V práci Kýčkové a Kopeckého (2006) bylo prokázáno snížení produkce prozánětlivého cytokinu TNF $\alpha$  a také snížená schopnost fagocytózy spirochét *Borrelia afzelii* myšími makrofágy po působení slin i SGE z klíštěte *Ixodes ricinus*. V té samé práci autoři uvádí, že zatímco působení SGE zvýšilo produkci NO myšími makrofágy, sliny měly opačný efekt.

Po působení PGE<sub>2</sub> (*prostaglandin E2*) ze slin klíštěte *Dermacentor variabilis* na makrofágovou linii IC-21 bylo prokázáno potlačení produkce prozánětlivých cytokinů a také migrace fibroblastů do místa zánětu, čímž dochází ke zhoršenému zhojení tkáně (Poole, 2013).

SGE z klíštěte *Rhipicephalus microplus* ovlivňuje expresi kostimulačních molekul (CD40, CD80, CD86) na buňkách myší makrofágové linie RAW 264.7 po stimulaci LPS (lipopolysacharid) (Brake et al., 2010). Po zopakování téhož pokusu na makrofázích skotu aktivovaných LPS došli Brake a kol. (2012) k podobným výsledkům – SGE moduloval expresi CD80, CD69 i CD86 a zároveň snižoval produkci IL-12 a tím i TNF $\alpha$  a IFN $\gamma$ , což koreluje s potlačením imunitní odpovědi typu Th1. Obrázek 4 schematicky znázorňuje působení slin a SGE na činnost makrofágů.



**Obr. 4:** Vliv klíštěcích slin a SGE na makrofágy. Červené linie označují inhibici, zelené pozitivní vliv (Kotál et al., 2015).

#### Působení klíštěcích slin na neutrofilny

O působení klíštěcích slin na neutrofilní granulocyty toho zatím není známo tolik jako o interakci klíštěcích slin s makrofágy. Nicméně již v r. 1990 Ribeiro a kol. ve své práci popisuje, že působením slin klíštěte *Ixodes dammini* docházelo ke snížené degranulaci

a infiltraci neutrofilů do místa sání klíštěte a zároveň byla snížena schopnost neutrofilů fagocytovat spirochéty *Borrelia burgdorferi*.

Migraci granulocytů do místa zánětu snižuje Evasin-1 (Déruaz et al., 2008).

Proteiny ze slin klíštěte *Ixodes scapularis* ovlivňují migraci PMN (polymorfonukleárních leukocytů) do místa sání klíštěte a jejich působení má za následek větší přežívání spirochét *Borrelia burgdorferi* v místě zánětu (Guo et al., 2009). Sliny ze stejného klíštěte také inhibují produkci  $\beta$ 2-integrinu, čímž snižují adhezi PMN k povrchu a tím i schopnost vázat spirochéty *Borrelia burgdorferi* (Montgomery et al., 2004).

Na migraci neutrofilů do místa zánětu působí pomocí Evasinu-3 také sliny i SGE z klíšťat *Rhipicephalus sanguineus*, *Ambylomma variegatum* a *Dermacentor reticulatus* tak, že regulují produkci chemoatraktantů CXCL-8 (IL-8) a CXCL-1 (Vančová et al., 2010). Kromě toho sliny z klíšťat *Dermacentor reticulatus*, *Rhipicephalus appendiculatus* i *Ambylomma variegatum* zabraňují vazbě IL-8 na jeho receptor a tím omezují i aktivaci neutrofilů (Kocáková et al., 2003).

Sliny z klíštěte *Ixodes ricinus* statisticky významně snižují produkci reaktivních forem kyslíku, překvapivě ale nebyl potvrzen vliv slin na tvorbu NETs (Menten-Dedoyart et al., 2012).

#### 1.3.4 Přenos patogenů

Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách, přestože přisátí klíštěte vyvolá v hostiteli okamžitou zánětlivou odpověď, klíště je schopno vylučovat do slin velké množství látek, jimiž tuto odpověď moduluje ve svůj prospěch. Okamžiku oslabené imunity hostitele využívá několik patogenů, které jsou přenášeny spolu s klíštěčímí slinami. Tento jev je nazýván SAT (*saliva - activated / assisted transmission*) a umožňuje patogenům snadnější infekci hostitele (Nuttall and Labuda, 2004). SAT byl poprvé objeven u přenosu Thogoto viru (Jones et al., 1989) a od té doby byl potvrzen i u viru klíšťové encefalitidy (Labuda et al., 1993), bakterie *Borrelia burgdorferi* (Zeidner et al., 2002) a několika dalších patogenů včetně těch, které jsou přenášeny jinými vektory.

Nejvíce prozkoumaným proteinem účastnícím se SAT je Salp15. Tento protein je za normálních okolností produkován klíštětem *Ixodes scapularis* za účelem inhibice CD4+ T-lymfocytů (Anguita et al., 2002). Spirochéty *Borrelia burgdorferi* jsou schopny se

na Salp15 vázat prostřednictvím proteinu OspC (*outer surface protein*) přítomného na povrchu buňky a tím si zajistit ochranu před imunitním systémem hostitele (Ramamoorthi et al., 2005). Salp15 kromě toho inhibuje aktivaci dendritických buněk (Hovius et al., 2007a). Dále bylo prokázáno působení Salp15 na zánětlivou odpověď keratinocytů, produkci chemokinů (IL-8, MCP-1) a antimikrobiálních peptidů (Marchal et al., 2010). U klíštěte *Ixodes ricinus* byl objeven homolog Salp15 nazvaný Salp15-Iric-1, jehož účinky na přenos *Borrelia burgdorferi* jsou shodné jako u Salp15 a je schopen se vázat na OspC *Borrelia afzelii* i *B. garnii*, ale tyto dva druhy spirochét nejsou Salp15-Iric-1 chráněny proti protilátkové imunitě (Hovius et al., 2008b).

Dai a kol. (2009) ve své práci zkoumal účinek imunizace klíšťat pomocí Salp15. Výsledkem byl snížený přenos patogenu *Borrelia burgdorferi* na hostitele i přesto, že kvalita a délka sání klíštěte ovlivněna nebyla. Tento objev nastiňuje směr, kterým by se mohl vydat další výzkum v oblasti očkování proti klíšťatým přenášeným vektorům.

Klíště *Ixodes ricinus* vylučuje ve svých slinách mimo jiné i inhibitory cysteinových proteáz sialostatin L a sialostatin L2. Sialostatin L má imunosupresivní a protizánětlivý účinek na hostitelský organismus, pravděpodobně díky inhibici katepsinu S. Sialostatin L2 také ovlivňuje aktivitu intracelulárních i extracelulárních katepsinů a tím úspěšnost sání klíštěte (Kotsyfakis et al., 2007). Kromě toho bylo u sialostatinu L2 prokázáno působení na přenos spirochety *Borrelia burgdorferi* do těla hostitele. Při injikaci spirochét do těla myši současně se sialostatinem L2 bylo po 4 dnech pozorováno až šestinásobné zvýšení počtu spirochét oproti kontrole (Kotsyfakis et al., 2010). Na rozdíl od Salp 15 se ale sialostatin L2 neváže přímo na spirochety a nemá vliv ani na jejich proliferaci *in vitro*, takže jeho působení bude nejspíš založeno na jiném principu (Kotsyfakis et al., 2010).

Protein Salp25D patřící mezi peroxiredoxiny napomáhá přenosu spirochét *Borrelia* z hostitele do trávicího traktu klíštěte (Narasimhan et al., 2007a). Ve stejné práci autoři prokázali schopnost Salp25D eliminovat kyslíkové radikály produkované neutrofily a tím zvyšovat přežití spirochét v hostitelském organismu a jejich následný přenos do těla vektora. Po blokaci Salp25D byl přenos spirochét z nakažené myši na klíště dramaticky snížen, ale přenos spirochét z klíštěte do těla hostitele ovlivněn nebyl (Narasimhan et al., 2007a).

Další látkou ze slin klíštěte *Ixodes scapularis* ovlivňující přenos patogenu do těla hostitele je tHRF (*tick histamine release factor*). Jeho produkce je výrazně zvýšena u klíšťat

infikovaných *Borrelia burgdorferi* a ovlivňuje kvalitu sání klíštěte a přenos patogenu do těla hostitele (Dai et al., 2010). Autoři v práci také navrhuji, že blokování tHRF by mohlo být úspěšnou vakcínou proti klíšťaty přenášeným patogenům.

Ve slinách klíštěte *Ixodes scapularis* byl nalezen protein TSLPI (*tick salivary lectin pathway inhibitor*), který ovlivňuje lektinovou cestu aktivace komplementu, čímž snižuje chemotaxi a fagocytózu neutrofilů, což má za následek zvýšené přežívání *Borrelia burgdorferi* v hostiteli i v trávicím traktu klíštěte (Schuijt et al., 2011a).

Zatím provedené výzkumy naznačují, že průběh SAT a obsah zúčastněných látek se odlišuje u různých druhů patogenů i vektorů a zřejmě závisí i na druhu hostitele (Nuttall and Labuda, 2004). Podobně se mění zastoupení imunomodulačních látek ve slinách v průběhu sání (Tirloni et al., 2014).

## 2 Cíle práce

- Příprava histologických řezů myší kůže a seznámení se s její strukturou.
- Histologické barvení řezů myší kůže Malloryho trichromem a hematoxylinem-eosinem.
- Imunohistochemická detekce neutrofilů a makrofágů.
- Indukce zánětu intradermální injekcí borelií a analýza složení zánětlivého infiltrátu.
- Studium vlivu klíštěcích slin na vývoj zánětu, zejména na množství neutrofilů a makrofágů v zánětlivé tkáni.

### **3 Materiál a metody**

#### **3.1 Laboratorní zvířata**

Použitý myší kmen C57BL/6N, samice ve stáří cca 6 týdnů, od Charles River Laboratories. Jedinci byli chováni ve sterilních boxech za neomezeného přístupu ke sterilní pitné vodě a krmivu ve formě suchých pelet. V místnosti byla zajištěna konstantní teplota 22 °C, relativní vlhkost 65 % a fotoperioda 12/12 hodin.

#### **3.2 Boreliový kmen**

Spirochéty *Borrelia afzelii* uchovávané v glycerolu při -72 °C. Po oživení byly spirochéty kultivovány v BSK-H mediu (Sigma Aldrich, USA) s přidavkem 1 % antibiotik (100 µl amphotericinu + 8 ml fosfomycinu + 1,9 ml rifampicin; vše Sigma Aldrich, USA) v termostatu při 34 °C.

#### **3.3 Klíštěcí sliny**

Sliny byly získány z dospělých samic klíštěte *Ixodes ricinus*. Klíšťata byla nachytána ve volné přírodě metodou tzv. vlnkování a poté sála na morčeti po dobu 6 dní. Nasátí jedinci byli očištěni a připevněni oboustrannou lepicí páskou na podložní sklíčko a na hypostom a jednu z palp jim byla nasazena skleněná kapilára, která byla zafixována pomocí plastelíny. Na hřbetní část byly každému klíštěti kápnuty 2 µl 5 % roztoku pilokarpinu (Sigma Aldrich, USA) v 95 % etanolu a poté byla klíšťata ponechána ve vlhké komůrce v termoboxu při 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub> po dobu 1,5-2 hodiny. Vyprodukované sliny byly sesbírány z kapilár, sterilizovány filtrací přes filtr (0,22 µm; Merc Millipore) a uloženy při teplotě -70 °C.

Obsah proteinů ve slinách byl změřen pomocí Bradfordovy metody stanovení koncentrace proteinů (Bradford, 1976).

#### **3.4 Příprava vzorků pro histologické zpracování**

Z testovaných myší i z myší, u nichž byl indukován zánět (viz níže) byla po usmrcení myši odebrána kůže a okamžitě vložena do fixačního roztoku. V pilotních experimentech bylo vyzkoušeno několik postupů s různými fixážemi a různou dobou fixace. Používali jsme BHS (roztok Bouin-Hollande bez kyseliny octové, ale s 10 % přidavkem chloridu rtuťnatého), 4 % PFA (paraformaldehyd) a 10 % NBF (50 ml 37 % formaldehydu, 450 ml destilované



vody, 3,25 g hydrogen fosforečnanu sodného ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 2 g dihydrogen fosforečnanu sodného ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )).

U BHS byly vzorky fixovány přes noc při 4 °C, u 4 % PFA a 10 % NBF po dobu 2,5 hod při laboratorní teplotě nebo přes noc při 4 °C. Po odstranění fixačního roztoku několikanásobným promytím v 70 % etanolu pro BHS a fosfátovým pufrům (PBS) pro PFA a NBF fixace, byla tkáň odvodněna vzestupnou etanolovou řadou (70 %, 95 %, 100 %), omyta v chloroformu a zalita do paraplastu. Na mikrotomu byly zhotoveny paraplastové řezy o tloušťce 7  $\mu\text{m}$ . Zhotovené preparáty byly odparafinovány a rehydratovány sestupnou alkoholovou řadou. Na řezy fixované v BHS byl dále použit Lugolův roztok následovaný 7,5 % roztokem thiosíranu sodného, kvůli odstranění případných zbytků těžkých kovů ve tkáni. Dále byly všechny vzorky omyty destilovanou vodou a fosfátovým pufrům s přísadkou 0,3 % Tween 20 (PBS-Tw). Takto připravené preparáty byly buď použity pro histologické barvení nebo pro imunohistochemickou detekci antigenů specifických pro neutrofile a makrofágy.

### **3.5 Histologické barvení Malloryho trichromem**

Barvení Malloryho trichromem bylo provedeno pomocí kitu Trichrome Stain (Masson) Kit (Sigma Aldrich, USA). Řezy byly barveny 3 min v kyselém fuchsinu, 5 min v kyselině fosfomolybdenové a 1 min v modrém anilinu. Mezi jednotlivými barvami byla sklíčka řádně vymyta v destilované vodě (3 x 1 min). Dále byly preparáty odvodněny alkoholovou řadou a xylenem, zality do zálévacího média DPX Mountant (Sigma Aldrich, USA). Obrazová dokumentace byla zhotovena na mikroskopu Axioplan 2 (Zeiss) vybaveném CCD kamerou DP73 (Olympus).

### **3.6 Histologické barvení hematoxylem a eosinem**

Sklíčka byla barvena po dobu 10 min v hematoxylinu, poté promyta 3 x 1 min v destilované vodě a následně barvena 3 min eosinem, odvodněna alkoholovou řadou a zalita do DPX Mountant media. Obrazová dokumentace byla zhotovena na mikroskopu Axioplan 2 (Zeiss) vybaveném CCD kamerou DP73 (Olympus).

### 3.7 Aplikace protilátek

Vzorky kůže byly fixovány, zality do parafinu, nakrájeny a odvodněny stejným postupem, jako bylo popsáno v kapitole 3.5. Pro blokování nespecifických vazeb byly řezy inkubovány s 5 % roztokem kozího séra v PBS-Tw po dobu 30 min při laboratorní teplotě. Následná inkubace s primární protilátkou ředěnou v blokovacím roztoku (5 % kozího séra v PBS-Tw) probíhala přes noc ve 4 °C. K detekci neutrofilů byla použita protilátka Anti-Mouse Ly-6G (Gr-1) Alexa Fluor 700 v ředění 1:100 (Thermo Fisher Scientific, USA). Makrofágy byly detekovány pomocí F4/80 Monoclonal Antibody (BM8) v ředění 1:50 (Thermo Fisher Scientific, USA). Následně byla sklíčka několikrát řádně propláchnuta v PBS-Tw a inkubována se sekundární protilátkou Goat anti-Rat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647 (Life Technologies) ředěnou 1:500 v blokovacím roztoku přes noc při 4 °C. Vzorky byly následně promyty v PBS-Tw, odvodněny alkoholovou řadou a xylenem a zality do DPX Mountant média. Analýza a dokumentace pozitivního signálu byla provedena na konfokálním mikroskopu Olympus FluoView™ FV1000.

### 3.8 Indukce zánětu

Pět myších samic kmene C57Bl starých 6 týdnů bylo rozděleno do tří skupin:

- První skupinu tvořily dvě myši, kterým bylo intradermálně injikováno 200  $\mu$ l BSK-H media obsahujícího  $10^7$  spirochét *Borrelia afzelii*.
- Ve druhé skupině byly také dvě myši, intradermálně byla každé podána injekce 100  $\mu$ l BSK-H media s  $10^7$  spirochét *Borrelia afzelii* a 100  $\mu$ l klišťecích slin s obsahem proteinu 400  $\mu$ g/ml.
- Ve třetí kontrolní skupině byla jen jedna myš, které bylo intradermálně injikováno pouze 200  $\mu$ l BSK-H media.

Po čtyřech hodinách byly zlomením vazy zabity dvě myši – jedna z každé infikované skupiny. Okamžitě byly odebrány a fixovány vzorky kůže. Tyto vzorky byly zpracovány na identifikaci neutrofilů.

Zbylé dvě infikované myši a kontrolní myš byly zabity po 72 hod. Vzorky kůže byly takéž okamžitě odebrány a fixovány. Tyto vzorky byly zpracovány pro identifikaci makrofágů v místě zánětu.

### 3.9 Počítání buněk

Počet neutrofilů a makrofágů, které infiltrovaly místo zánětu byl zjištěn manuálním počítáním imunopozitivních buněk v programu ImageJ. Kombinací různého složení injikátu a detekcí dvou druhů imunitních buněk jsme dostali šest skupin:

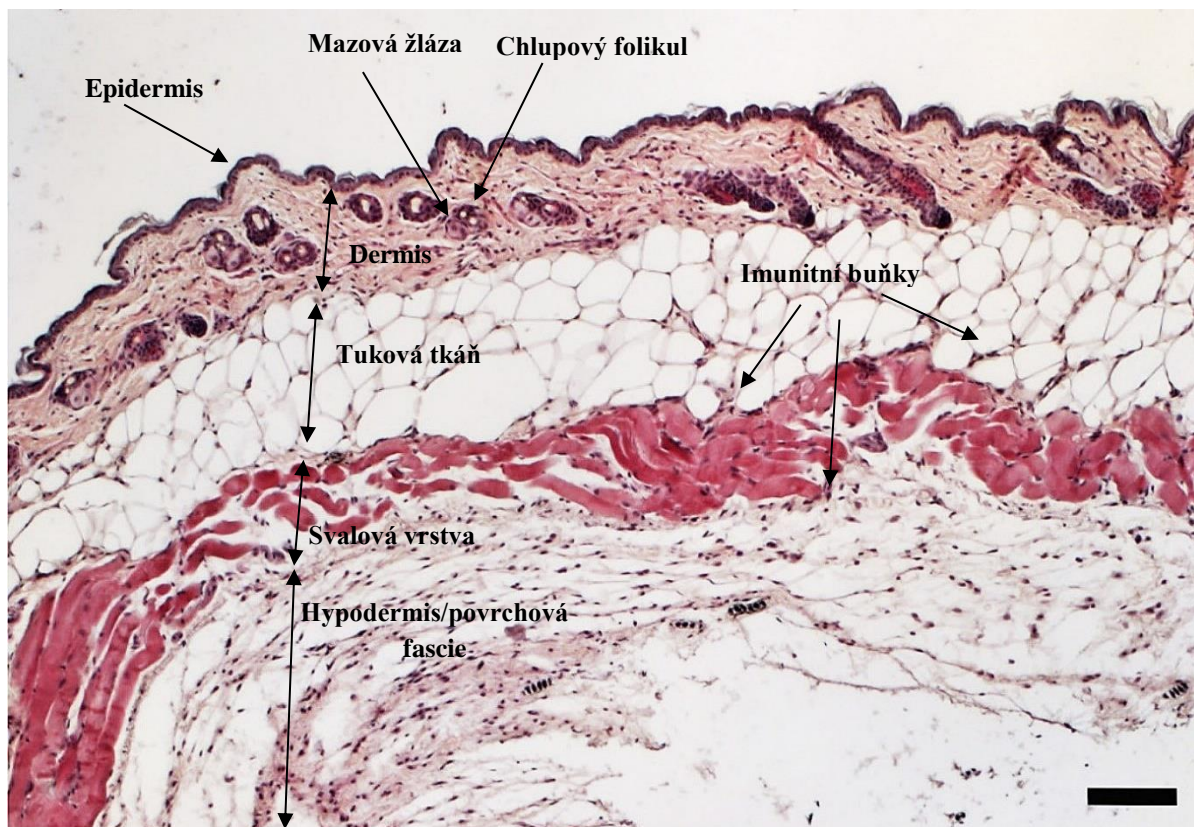
- Injikovány borelie + detekovány neutrofilly
- Injikovány borelie a sliny + detekovány neutrofilly
- Kontrolní skupina – injikováno medium + detekovány neutrofilly
- Injikovány borelie + detekovány makrofágy
- Injikovány borelie a sliny + detekovány makrofágy
- Kontrolní skupina – injikováno medium + detekovány makrofágy

Pozitivní signál byl kvantifikován tak, že z jednotlivých typů zhotovených preparátů byla náhodně vybrána tři sklíčka, z každého sklíčka tři řezy a na každém řezu byly vybrány 3 čtverce z nejspodnější oblasti hypodermis (pod svalovou vrstvou) o velikosti 200 x 200 pixelů. Celkem bylo v každé skupině spočítáno 27 čtverců. U kontrolních preparátů nebyl pozitivní signál kvantifikován, ale byl hodnocen pouze vizuálně. Výsledné počty byly statisticky vyhodnoceny Studentovým dvouvýběrovým t-testem v programu MS Excel.

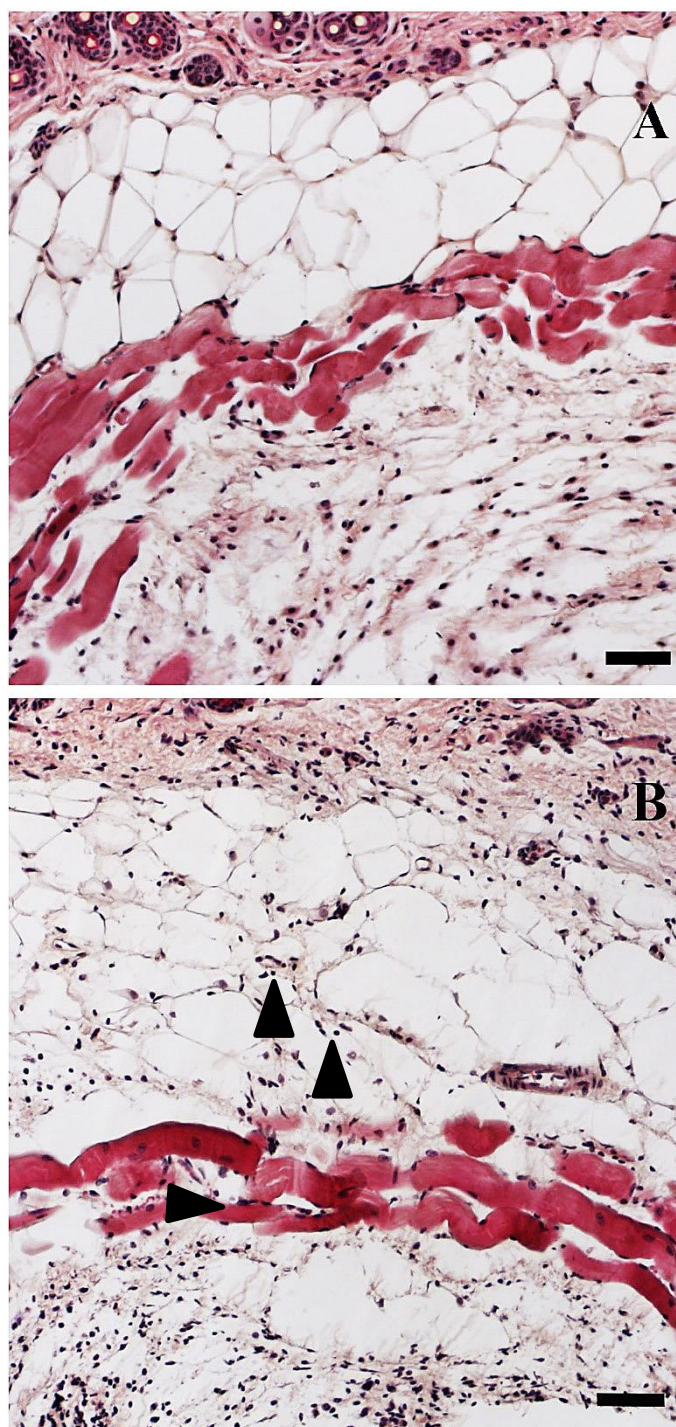
## 4 Výsledky

### 4.1 Histologické barvení podle Malloryho a hematoxylinem-eosinem

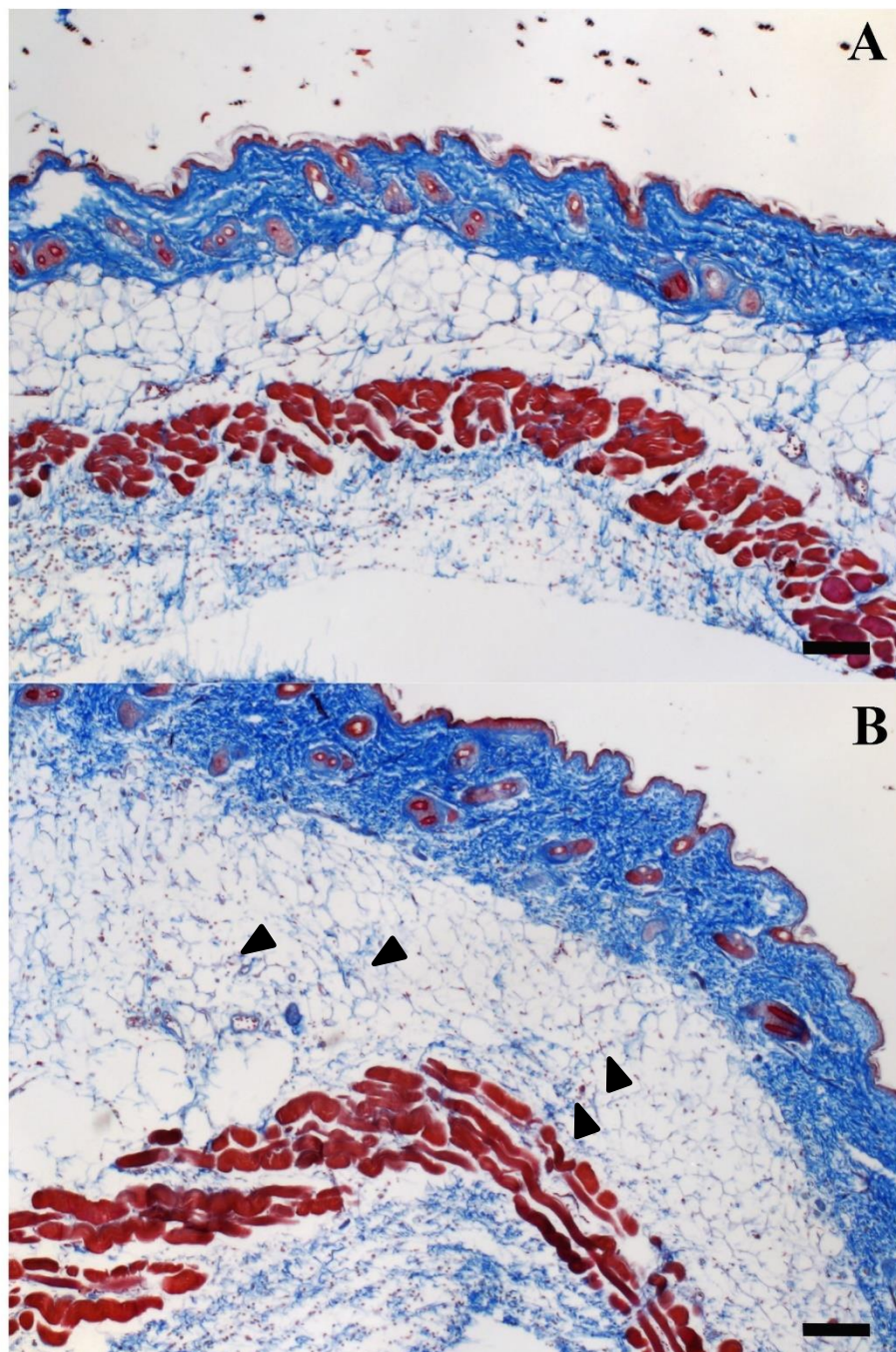
Cílem tohoto pokusu bylo bližší seznámení se s histologií myší kůže a následná vizuální analýza vývoje zánětu v kůži. Paraplastové řezy kůže o tloušťce 7  $\mu\text{m}$  byly barveny dvěma klasickými histologickými metodami - Malloryho trichromem a hematoxylinem-eosinem a prohlíženy pomocí světelného mikroskopu. Na zhotovených histologických preparátech barvených jak hematoxylinem-eosinem, tak Malloryho trichromem, bylo možné jasně rozlišit následující struktury: epidermis, dermis, vrstvu tukových buněk, svalovou vrstvu, hypodermis neboli povrchovou fascii, chlupové folikuly, mazové žlázy a imunitní buňky (obr. 5, 7). Byl také sledován vliv klíštěcích slin na počet infiltrovaných imunitních buněk do místa zánětu tak, že byl porovnán počet imunitních buněk v tukových vrstvách, svalových vrstvách a hypodermis u vzorků z myší do kterých byly injikovány samotné borellie nebo borelie spolu s klíštěcími slinami (obr. 6, 7). Ve vzorku bez klíštěcích slin pozorujeme zvýšení počtu imunitních buněk zejména v tukové a svalové vrstvě.



**Obr. 5:** Řez myší kůží, ve které byl indukován zánět pomocí subkutánní injekce  $10^7$  spirochét *Borrelia afzelii* v  $100\ \mu\text{l}$  BSK-H media spolu se  $100\ \mu\text{l}$  slin z kličtěte *Ixodes ricinus* (obsah proteinu ve slinách  $400\ \mu\text{g/ml}$ ), kůže byla odebrána 72 hodin po indukci zánětu, barveno hematoxylinem a eosinem. Na obrázku lze vidět epidermis, dermis, svalovou vrstvu, hypodermis / povrchovou fascii, imunitní buňky, chlupový folikul, mazovou žlázu – vyznačeno šipkami. Měřítko= $100\ \mu\text{m}$ .



**Obr. 6:** Sledování vlivu klíštěcích slin na počet infiltrovaných imunitních buněk do místa zánětu na řezech myši kůže barvených hematoxylinem a eosinem, kůže odebrána 4 hodiny po indukci zánětu. (A) Zánět indukován subkutánní injekcí spirochét *Borrelia afzelii* ( $10^7$  borelií ve 100  $\mu$ l BSK-H media), spolu se 100  $\mu$ l slin z klíštěte *Ixodes ricinus* (s obsahem proteinu 400  $\mu$ g/ml). Mezi svalovými buňkami a v tukové vrstvě se nachází pouze malé množství imunitních buněk. (B) Zánět vyvolaný boreliemi bez působení klíštěcích slin. Imunitní buňky jsou patrné ve svalové i tukové vrstvě (označeno šipkami). Měřítko = 50  $\mu$ m.



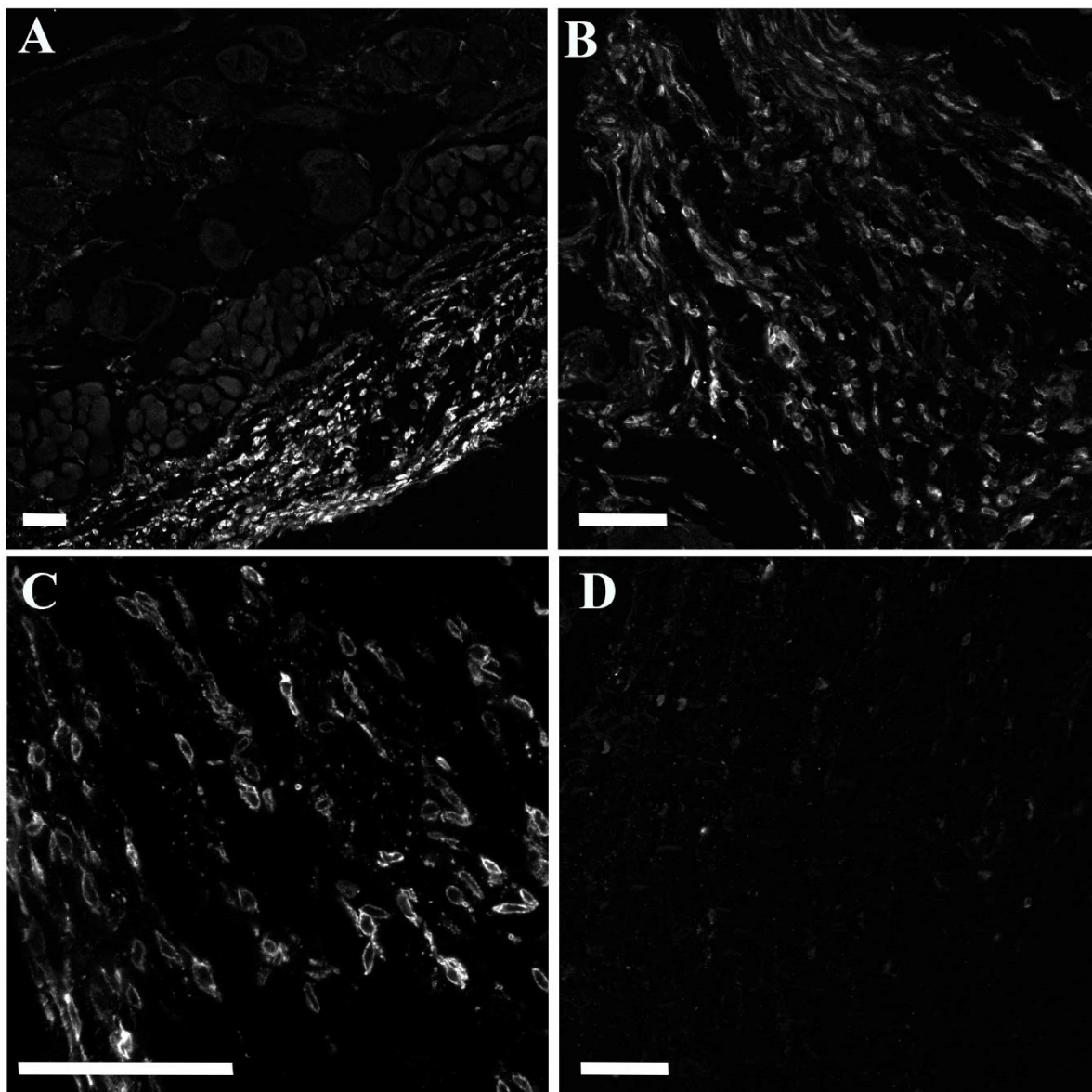
**Obr. 7:** Porovnání působení klíštěcích slin na vývoj zánětlivého infiltrátu na řezech myší kůže barvených Malloryho trichromem, kůže odebrána 4 hodiny po indukci zánětu. (A) zánětlivý infiltrát vyvolaný subkutánní injekcí spirochét *Borrelia afzelii* ( $10^7$  spirochét ve 100  $\mu$ l BSK-H media) spolu s působením 100  $\mu$ l slin klíštěte *Ixodes ricinus* (s obsahem proteinu 400  $\mu$ g/ml). (B) zánětlivý infiltrát vyvolaný subkutánní injekcí borelií bez působení klíštěcích slin. Šipky označují imunitní buňky infiltrované do tukové vrstvy kůže. Měřítko = 100  $\mu$ m

## **4.2 Imunohistochemická analýza vlivu klíštěcích slin na infiltraci neutrofilů a makrofágů do místa zánětu**

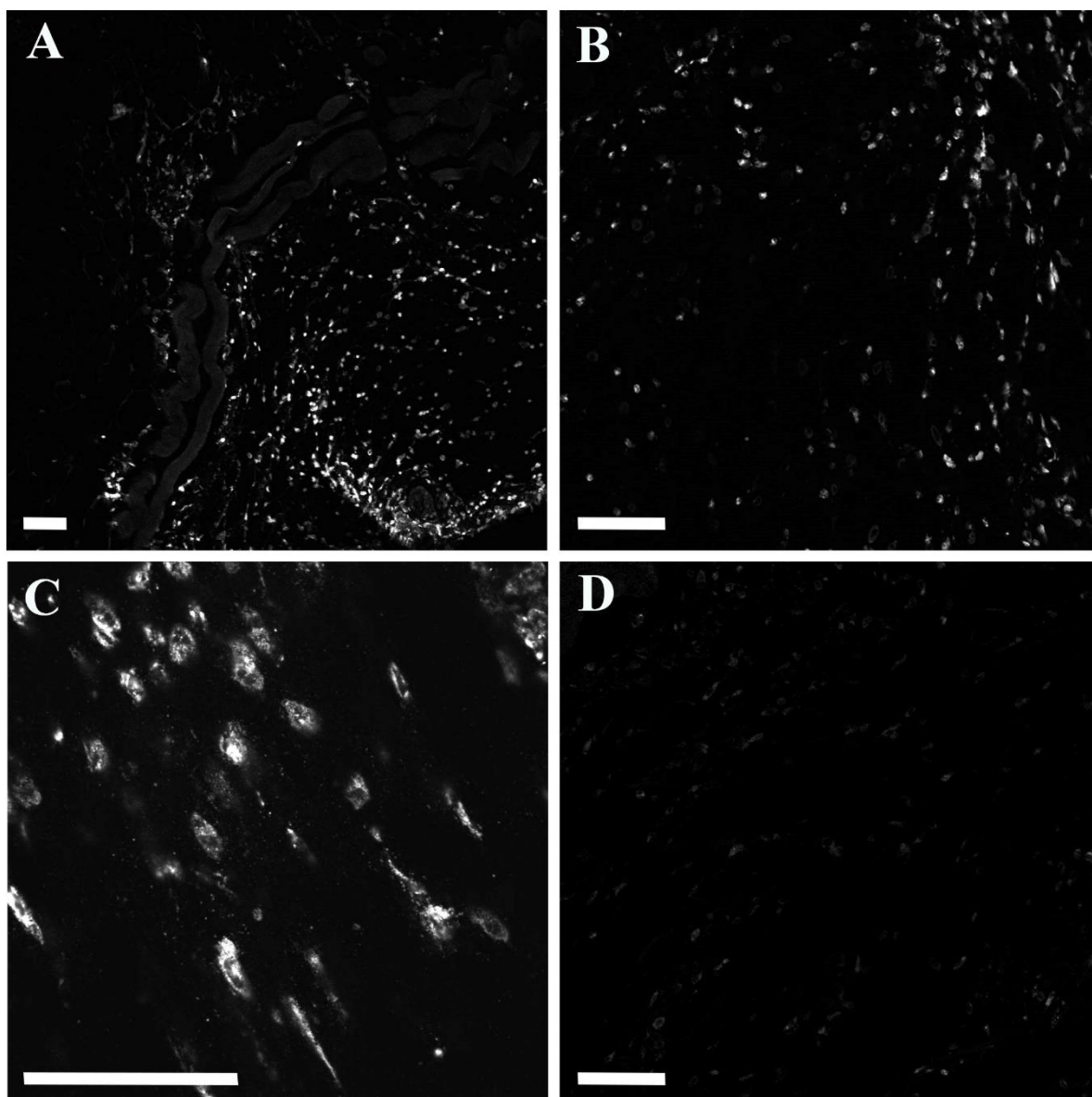
Efaktorové buňky neutofilů a makrofágů byly detekovány pomocí specifických protilátek nasměrovaných proti Ly6G (*Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D*) v neutrofilech a proti antigenu F4/80 v makrofázích. Protilátka detekující makrofágy značila buňky především v nejspodnější vrstvě hypodermis tj. ve fascii pod svalovou vrstvou (obr. 8), pravděpodobně z toho důvodu, že borelie byly injikovány subkutánně, a proto probíhal nejvýraznější zánět právě ve spodních vrstvách kůže. Neutrofile byly pomocí specifické protilátky lokalizovány také v hypodermis, ale v menší míře byly detekovány i ve svalové vrstvě kůže myši infikované boreliemi (obr. 9). Jako kontrolní vzorek byla použita tkáň z myši, které bylo injikováno pouze BSK-H medium a tudíž se nepředpokládá zvýšený počet imunitních buněk.

Množství pozitivně značených imunitních buněk bylo studováno ve vzorcích ovlivněných boreliemi a boreliemi spolu s klíštěcími slinami. Ve vzorcích, kam spolu s boreliemi byly vneseny i klíštěcí sliny dochází k signifikantnímu poklesu obou typů infiltrovaných imunitních buněk (obr. 10). Přestože rozdíl mezi oběma testovanými skupinami byl výrazný, byla provedena statistická analýza počtu imunoreaktivních buněk.

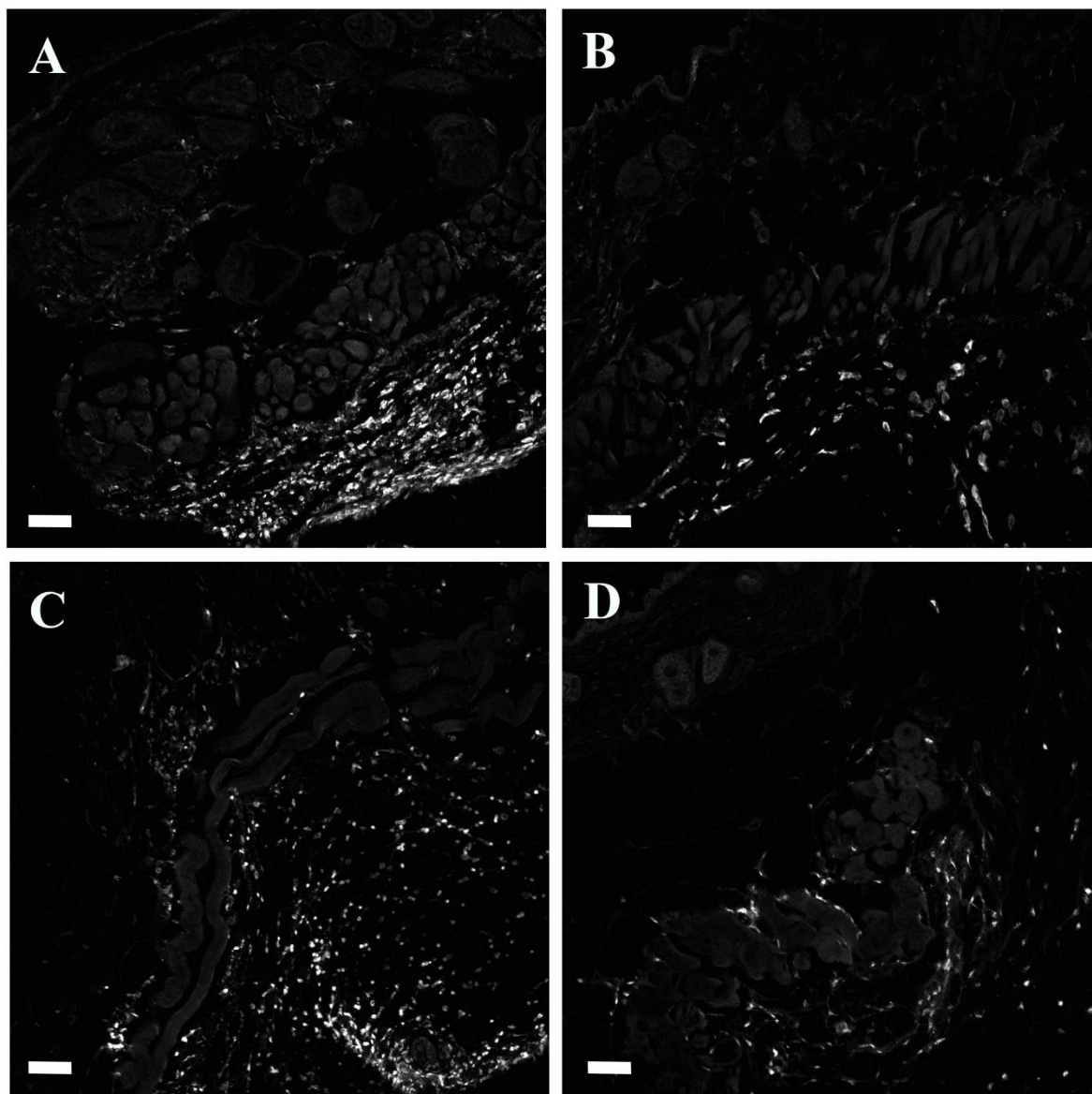




**Obr. 8:** *Imunolokalizace makrofágů v kůži z myši, které byl vyvolán zánět subkutánní injekcí spirochét *Borrelia afzelii* ( $10^7$  spirochét v 200  $\mu$ l BSK-H media), tkáň byla odebrána 72 hodin po indukci zánětu. (A-C) Pohled na hypodermis při různém zvětšení. (D) Kontrolní vzorek z myši, které bylo injikováno pouze 200  $\mu$ l BSK-H media. Měřítko = 50  $\mu$ m.*



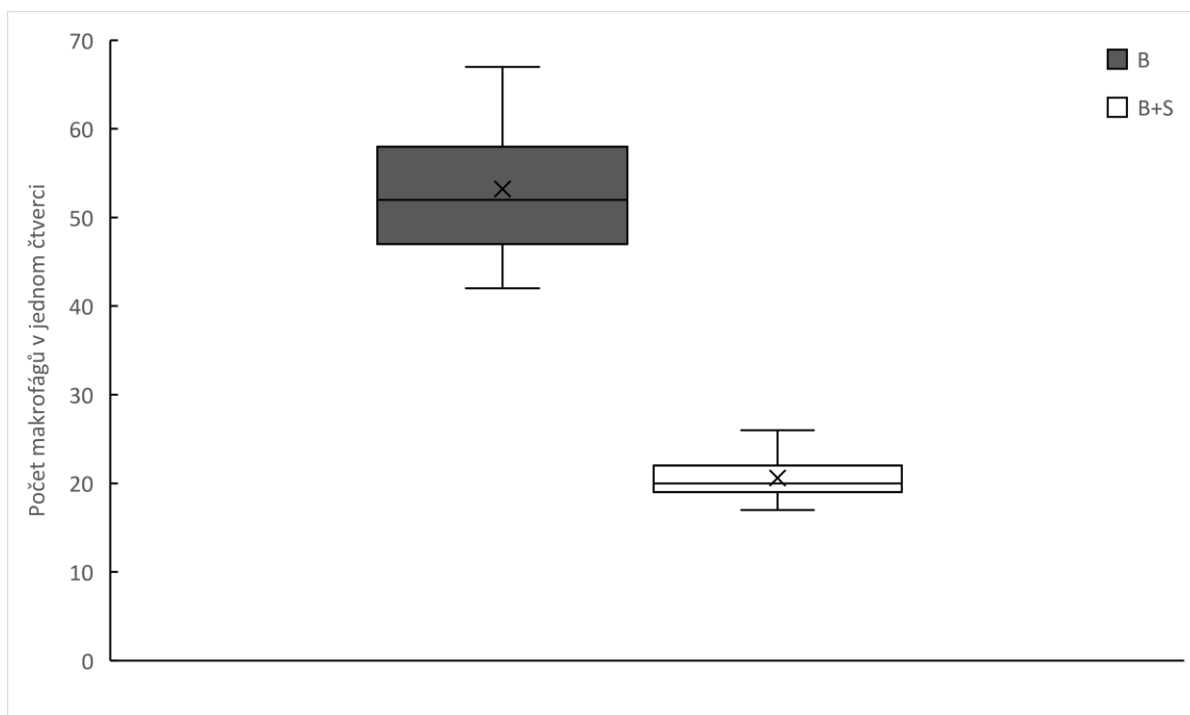
**Obr. 9:** *Imunolokalizace neutrofilů v kůži myši, které bylo subkutánně injikováno  $10^7$  spirochét Borrelia afzelii v 200  $\mu$ l BSK-H media, tkáň byla odebrána 4 hodiny po indukci zánětu. (A-C) Pohled na hypodermis při různém zvětšení. (D) Kontrolní vzorek myši, které bylo injikováno pouze 200  $\mu$ l media. Měřítko = 50  $\mu$ m.*



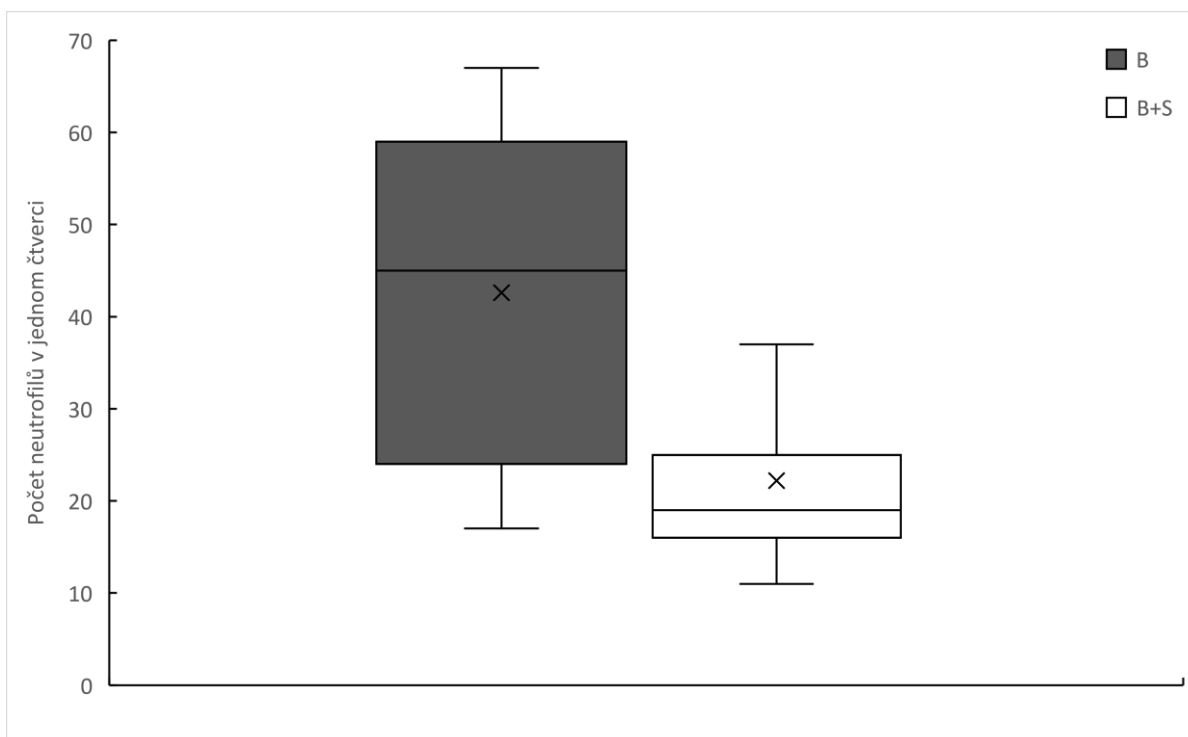
**Obr. 10:** *Vliv klišťecích slin na množství imunitních buněk v místě zánětu. (A) Immunodetekce makrofágů ve vzorcích injikovaných boreliemi ( $10^7$  spirochét *Borrelia afzelii* v 200  $\mu$ l BSK-H media). (B) Immunodetekce makrofágů ve vzorcích injikovaných boreliemi ( $10^7$  spirochét *Borrelia afzelii* ve 100  $\mu$ l BSK-H media) a 100  $\mu$ l slin z klišťete *Ixodes ricinus* s obsahem proteinu 400  $\mu$ g/ml. (C) Immunodetekce neutrofilů ve vzorcích injikovaných boreliemi ( $10^7$  spirochét *Borrelia afzelii* v 200  $\mu$ l BSK-H media). (D) Immunodetekce neutrofilů ve vzorcích injikovaných boreliemi ( $10^7$  spirochét *Borrelia afzelii* ve 100  $\mu$ l BSK-H media) a klišťecími slinami (100  $\mu$ l slin klišťete *Ixodes ricinus* s obsahem proteinu 400  $\mu$ g/ml). U snímků (A) a (B) byla tkáň odebrána 72 hodin po indukci zánětu, u snímků (C) a (D) byla odebrána tkáň 4 hodiny po indukci zánětu. Měřítko = 50  $\mu$ m.*

### 4.3 Statistické vyhodnocení počtu infiltrovaných efektorů do místa zánětu

Snímky zánětlivého infiltrátu byly vyhodnoceny počítáním buněk a statistickým zpracováním získaných údajů. Z grafu na obrázku 11 a 12 je patrné, že za přítomnosti klíštěcích slin docházelo k poklesu počtu infiltrovaných makrofágů o 61 % ( $P < 0,001$ ) a neutrofilů o 48 % ( $P < 0,001$ ).



**Obr. 11:** Porovnání počtu makrofágů v místě zánětu vyvolaném injekcí borelií ( $10^7$  spirochét *Borrelia afzelii* ve  $100 \mu\text{l}$  BSK-H media) za přítomnosti  $100 \mu\text{l}$  slin klíštěte *Ixodes ricinus* s obsahem proteinu  $400 \mu\text{g/ml}$  (B+S); a v místě zánětu vyvolaném boreliemi ( $10^7$  spirochét *Borrelia afzelii* v  $200 \mu\text{l}$  BSK-H media) bez působení klíštěcích slin (B) ( $P < 0,001$ ).



**Obr. 12:** Působení klišťecích slin (100  $\mu$ l slin klišťete *Ixodes ricinus* s obsahem proteinu 400  $\mu$ g/ml) na počet neutrofilů v místě zánětu vyvolaném subkutánní injekcí  $10^7$  spirochét *Borrelia afzelii* ve 100  $\mu$ l BSK-H media (B+S); oproti počtu efektorů v myší kůži za přítomnosti pouze borelií (B). ( $P < 0,001$ ).

## 5 Diskuze

Cílem literárního přehledu této diplomové práce bylo seznámit se s mechanismy zánětlivé reakce a s vlivem klíštěcích slin na tyto procesy. Z dostupné literatury je zřejmé, že (podobně jako u protinádorové imunity) mohou efektorové buňky zastupovat jak prozánětlivou, tak protizánětlivou roli, tyto fenotypy v závislosti na signálech z okolí měnit a vzájemně spolu interagovat a ovlivňovat se.

Role neutrofilů ve vývoji zánětu je nezastupitelná především v časných fázích zánětlivé reakce. Přestože disponují širokou škálou způsobů, jakými přispívají k eliminaci patogenu a rozvoji zánětlivé reakce, jsou tyto mechanismy často nespecifické a mohou způsobovat poškození vlastní tkáně, což může ústít až ve vývoj chronického zánětlivého onemocnění. Např. u obezity dochází k uvolňování DAMPs z umírajících buněk, což neustále aktivuje neutrofile a vzniklý chronický zánět pak má za následek zvýšenou adhezi neutrofilů k cévnímu endotelu a vaskulární dysfunkce (Van Oostrom et al., 2004). Na druhou stranu, z pokusů, kdy byly neutrofile u těchto chronických zánětlivých onemocnění pomocí protilátky odstraněny z místa zánětu, je patrné, že hrají nezastupitelnou roli i v ukončení zánětu a reparaci poškozené tkáně, jelikož výsledkem byla zvýšená patologie onemocnění (Kühl et al., 2007). Kromě funkcí, které byly zmíněny v úvodu této práce, přispívají neutrofile po ukončení zánětlivé reakce také k revaskularizaci poškozené tkáně produkcí MMP9 (*matrix metalloproteinase 9*) (Christoffersson et al., 2012).

Podobně jako neutrofile mají i makrofágy ve vývoji zánětu dvojaké působení. Mohou zaujímat prozánětlivý i protizánětlivý fenotyp a následně produkovanými cytokiny ovlivňovat ostatní imunitní buňky. Odlišná imunitní odpověď makrofágů může být spuštěna vazbou různých ligandů na FPR (*formyl peptide receptor*), neboť výsledkem reakce je infiltrace místa zánětu prozánětlivým nebo protizánětlivým fenotypem efektorů (Ye et al., 2009). M2 subpopulace makrofágů hraje důležitou roli ve vývoji chronických onemocnění, fibrózy i infekcí helminty (Akira et al., 2013). Nezastupitelný význam mají makrofágy také v ukončení zánětlivé reakce, kde především odstraňují zbytky poškozených buněk, mrtvé efekторы i již nepotřebné cytokiny.

V zájmu klíštěte jakožto hematofágního parazita je tlumit zánětlivé projevy organismu a naopak podporovat protizánětlivé. Z tohoto důvodu působí klíštěcí sliny antihemostaticky, vasoaktivně, inhibují komplement a fagocytózu a inaktivují anafylatoxiny (Brossard

and Wikel, 2004). Kromě působení na neutrofilny a makrofágy mají klíštěcí sliny nemalý vliv i na lymfocyty. Vlivem působení klíštěcích slin v místě zánětu dochází ke snížení produkce prozánětlivých cytokinů Th1 subpopulace T-lymfocytů a zvyšuje se produkce cytokinů Th2 subpopulace, které mají protizánětlivý účinek (Schoeler et al., 1999; Mejri et al., 2001). Za účasti prostaglandinů přítomných ve slinách je omezená i produkce IL-2 a IFN $\gamma$ . *In vitro* bylo potvrzeno snížení proliferace T-lymfocytů po vystavení buněčné kultury působení SGE (Kovář et al., 2001). Protein Salp15 moduluje působení CD4+ T-lymfocytů, ale také ovlivňuje sekreci cytokinů dendritickými buňkami (Garg et al., 2006; Hovius et al., 2008a). Působením SGE z různých druhů klíšťat byla ovlivněna i proliferace B-lymfocytů (Rolínková et al., 2003). U psů byla prokazatelně snižená produkce protilátek B-lymfocyty působením SGE z klíštěte *Rhipicephalus sanguineus* (Matsumoto et al., 2003).

Role klíštěcích slin ale zřejmě nebude pouze protizánětlivá, jak by se očekávalo. Scholl a kol. (2016) ve své práci zmiňuje, že samotné klíštěcí sliny bez přítomnosti patogenu mohou vyvolat produkci prozánětlivých látek fibroblasty. Autoři tento jev vysvětlují tak, že prozánětlivé účinky mají sliny pravděpodobně hlavně v časné fázi sání klíštěte a s postupujícím časem přisátí se jejich imunomodulační účinek mění na protizánětlivý, což potvrzují i výsledky v jejich práci.

Obsah klíštěcích slin se zřejmě nemění jen s dobou sání klíštěte, ale zdá se, že složení klíštěcích slin se může lišit i v rámci rodu *Ixodes*. Klíčové je v tomto případě, zda klíště při sání tvoří cement či ne. Tvrdá klíšťata, tvořící při sání cement, vyvolávají u hostitele menší zánětlivou reakci než tvrdá klíšťata, která cement netvoří (Mihara, 2017).

Imunomodulační účinky klíštěcích slin ovlivňují také přenos klíšťaty přenášených patogenů. S postupujícím zájmem o tuto problematiku je ale čím dál zřejmější, že přenosu patogenů nenapomáhají pouze protizánětlivé složky klíštěcích slin, ale také látky ovlivňující expresi určitých genů vektora. Např. interakce spirochéty *Borrelia burgdorferi* s klíštětem *Ixodes ricinus* zvyšuje expresi klíštěcích genů pro TROSPA (*tick receptor for OspA*) a Salp 15, který významně napomáhá přežití patogenu v hostiteli (Hovius et al., 2007b). Bylo také prokázáno, že borelie po přenosu do hostitelské tkáně neopouštějí místo sání klíštěte až po dobu několika dní (Shih et al., 1992), což potvrzuje, že podmínky vytvořené působením klíštěcích slin napomáhají přežívání a přenosu bakterie.

Významnost klíštěcích slin pro přenos spirochěty *Borrelia burgdorferi* se rozhodli analyzovat Narasimhan a kol. (2007b). Z jejich práce vyplývá, že pro přenos infekce z klíštěte na hostitele jsou stěžejní proteiny produkované ve slinách během prvních 24 hodin sání klíštěte, jelikož imunizace králíků těmito proteiny způsobila výrazně snížený přenos bakterie na hostitele a zkrácenou dobu sání klíštěte. V práci Chong-Cerrillo a kol. (2001) bylo zjištěno, že oproti naivním králíkům se u imunizovaných jedinců spirochěty *Borrelia burgdorferi* objevovaly v signifikantně menším množství, po 36 hodinách nebyly detekovány vůbec a imunitní odpověď nezahrnovala infiltraci lymfocytů, což naznačuje, že imunitní odpověď imunizovaných králíků je protilátkami zprostředkovaná a účastní se jí především neutrofily a makrofágy. Tyto objevy by mohly do budoucna usnadnit vývoj vakcíny proti lymské borelióze.

Vzhledem k významné incidenci lymské boreliózy v Evropě, ale i jinde ve světě, by bylo zapotřebí objevit vhodné látky, které by se daly použít při vakcinaci proti této nemoci. Zatím nejslibněji se jevila vakcína proti OspA, která velmi dobře fungovala u myši, u lidí byla zavedena na trh, ale zjistilo se, že titr protilátek, který po očkování přetrval není dostatečný a bylo by nutné očkovací dávky příliš často opakovat, proto byla po čtyřech letech stažena z prodeje (Steele et al., 1998). Mezi přístupy, které by v budoucnu mohly vést k vývoji úspěšné vakcíny můžeme řadit např. imunizaci směsí boreliových OMPs (*outer membrane proteins*), imunizaci klíštěcími proteiny, které by vyvolaly imunitní reakci v místě sání klíštěte a způsobily ukončení sání klíštěte nebo imunizaci klíštěcími proteiny v kombinaci s boreliovými antigeny (shrnutí Schuijt et al., 2011b; Embers and Narasimhan, 2013). Z toho důvodu je důležité co nejvíce prozkoumat a porozumět procesům, které probíhají ve tkáni při sání klíštěte.

Cílem praktické části této práce byla analýza zánětlivého infiltrátu po indukci zánětu spirochétami *Borrelia afzelii* a následné zkoumání vlivu slin z klíštěte *Ixodes ricinus* na počet infiltrovaných neutrofilů a makrofágů. Aby bylo možné detekovat změny v počtu infiltrovaných buněk, byl k indukci zánětu použit vysoký počet spirochét *Borrelia afzelii*. Do každé myši bylo vpraveno  $10^7$  bakterií ve 200  $\mu$ l BSK-H media, stejně jako v práci Severinové a kol. (2005). Podle vzoru této práce byly do myši kůže vpraveny i klíštěcí sliny – tedy 100  $\mu$ l klíštěcích slin o obsahu proteinu 400  $\mu$ g/ml.

Přestože, jsou klíštěcí sliny známé svým silným imunosupresivním účinkem, nedochází v místě sání klíštěte k úplnému potlačení zánětlivé odpovědi, ale pouze k regulaci její míry.



Na pokusu, ve kterém sála klíšťata *Ixodes scapularis* na králících, to dokazuje Scholl a kol. (2016). V našich pokusech jsme potvrdili, že toto schéma platí i u vzorků kůže, kde je zánět vyvolán injekčně a klíštěcí sliny následně vpraveny také injekčně. U zánětlivé tkáně, na kterou působily klíštěcí sliny byl patrný silný signál imunitních buněk detekovaných imunohistochemicky, zatímco kontrolní vzorky, kam bylo vpraveno pouze medium, vykazovaly signál minimální nebo žádný.

Protizánětlivé působení klíštěcích slin je známé již dlouhou dobu. Ve svých pracích jej zkoumají např. Severinová a kol. (2005), v jejíž práci SGE z klíštěte *Ixodes ricinus* prokazatelně snižoval počet infiltrovaných leukocytů a  $\gamma\delta$ T-lymfocytů v epidermis v časných fázích infekce bakterií *Borrelia afzelii*. Také byl snížen celkový počet efektorů v přilehlých lymfatických uzlinách a v pozdějších fázích zánětu došlo i ke změně složení zánětlivého infiltrátu. Další práce potvrzuje, že sliny klíštěte *Ixodes scapularis* (publikováno jako *Ixodes dammini*) způsobují sníženou schopnost fagocytózy borelií neutrofily (Ribeiro et al., 1990). SGE z klíštěte *Ixodes ricinus* redukuje produkci ROS a RNS makrofágy (Kuthejlová et al., 2001). Působení klíštěcích slin při sání klíštěte na produkci CRAMP (*mouse cathelicidin related antimicrobial peptide*) a TNF- $\alpha$  prokázalo její výrazné snížení oproti situaci, kdy byly myším ijikovány jen borelie (Kern et al., 2011). Důležitou roli ve vývoji zánětlivé odpovědi hrají keratinocyty a fibroblasty, které představují první obrannou linii po průniku klíštěcího hypostomu do kůže. Vlivu klíštěcích slin na keratinocyty se věnuje např. práce Marchal a kol. (2009). Chemoatranktanty vylučované keratinocyty mají vliv na infiltraci neutrofilů, makrofágů i T-lymfocytů do místa zánětu (Pasparakis et al., 2014). Účinkem klíštěcích slin mohou lyzovat fibroblasty, což pomáhá klíštěti k tvorbě tzv. „*feeding pit*“ (Schramm et al., 2012). V *in vitro* pokusu byl potvrzen vliv klíštěcích slin na expresi adhezních molekul E-selektin, P-selektin, ICAM-1 a VCAM-1 buňkami endotelové linie (Maxwell et al., 2005).

Protizánětlivé účinky klíštěcích slin jsme prokázali i v našich pokusech, ve kterých došlo ke snížení počtu infiltrovaných makrofágů do místa zánětu o 61 % u vzorků, kde docházelo k působení klíštěcích slin v porovnání se vzorky, kde byl pouze indukován zánět. V případě neutrofilů byl počet buněk snížen o 48 %. V *in vitro* pokusu Vachier a kol. (2015) došlo působením klíštěcích slin ke snížení počtu infiltrovaných buněk myeloidní linie o 50 %, což koreluje s našimi výsledky. Výrazný vzestup PMN 1 den po infikaci králíků spirochétami *Borrelia burgdorferi* zmiňuje Chong-Cerrillo a kol. (2001) a uvádí, že vzestup počtu makrofágů nastal kolem třetího dne po infikaci, což odpovídá uspořádání našeho pokusu.

Snížená infiltrace efektorů do místa zánětu může být způsobena např. inhibicí chemoatraktantů, které jsou zodpovědné za migraci efektorů z cirkulace do zánětlivé oblasti. Klíštěcí sliny inhibují alarminy, které slouží jako chemoatraktanty antigen-prezentujících buněk a spouští prozánětlivou odpověď (Marchal et al., 2010). IL-6 patří mezi hlavní chemoatraktanty, kterými jsou na místo zánětu naváděny monocyty (Scheller et al., 2011). Jeho produkce je významně snižována klíštěcími slinami u žírných buněk (Bernard et al., 2017) i makrofágů (Scholl et al., 2016). Snížená migrace efektorů do místa zánětu je přičítána také evasinům, které jsou přítomné v klíštěcích slinách a rovněž inhibují chemotaxi efektorů do místa zánětu (Déruaz et al., 2008). Chemotaxe neutrofilů je ovlivňována i proteinem vázajícím leukotrien B4 (*leukotriene B4-binding protein*) (Beaufays et al., 2008).

Imunomodulační účinek nemají pouze klíštěcí sliny, ale také borelie. Infekce spirochétami *Borrelia burgdorferi* snižuje expresi MHC II molekul (Silberer et al., 2000). Tím snižuje aktivaci antigen-prezentujících buněk a následnou produkci cytokinů, které se mimo jiné podílí i na infiltraci místa zánětu imunitními buňkami.

Migrace imunitních buněk byla ovlivněna i v našich pokusech, kde byly vzorky barveny hematoxylinem-eosinem nebo Malloryho trichromem. Z výsledků je patrné, že pokud na zánětlivé místo nepůsobily klíštěcí sliny, docházelo k migraci buněk do vyšších vrstev kůže – do svalové vrstvy a do tukové vrstvy. Tento jev byl u vzorků, na které působily klíštěcí sliny pozorovatelný jen v malé míře. Vysvětlením by mohl být fakt, že bez působení klíštěcích slin probíhala v hypodermis slinější zánětlivá reakce a efektorové buňky vykazovaly více aktivity a z toho důvodu migrovaly i do vyšších vrstev kůže.

V práci se nám podařilo potvrdit protizánětlivý účinek klíštěcích slin v souvislosti s počtem infiltrovaných makrofágů a neutrofilů do místa zánětu vyvolaného subkutánní injekcí borelií. Do budoucna by bylo určitě vhodné pokusy s tímto uspořádáním zopakovat, potvrdit naše výsledky a analyzovat také vývoj zánětu z hlediska lymfocytů a ostatních imunitních buněk.

## 6 Závěr

- Na histologických řezech barvených hematoxylinem a eosinem, popř. Malloryho trichromem, je patrné, že imunitní buňky více infiltrovaly vyšší vrstvy kůže, pokud nebylo místo zánětu vystavené působení klíštěcích slin.
- Přítomnost klíštěcích slin v místě zánětu vyvolaném boreliemi způsobuje statisticky významný pokles počtu infiltrovaných neutrofilů i makrofágů, čímž byl potvrzen jejich protizánětlivý efekt.

## 7 Seznam zkratek

- ATP – adenosin trifosfát
- BHS – *Bouin-Hollande solution*, roztok Bouin-Hollande
- CAP37 – *cationic antimicrobial protein 37, azurocidin, heparine-binding protein*
- CCL – *C-C motif chemokine ligand*
- CCR – *C-C motif chemokine receptor*
- CD – *cluster of differentiation*, diferenciační znak
- CRAMP - *mouse cathelicidin related antimicrobial peptide*
- CXCL – *C-X-C motif chemokine ligand*
- CXCR – *C-X-C motif chemokine receptor*
- DAMPs – *damage associated molecular patterns*, s poškozením asociované molekulové vzory, alarminy
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- DC – *dendritic cells*, dendritické buňky
- ECM – *extracellular matrix*, extracelulární matrix
- FGF – *fibroblast growth factor*, fibroblastový růstový faktor
- G-CSF – *granulocyte colony-stimulating factor*, faktor stimulující granulocytární kolonie
- GM-CSF – *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, faktor stimulující granulocytární a makrofágové kolonie
- ICAM – *intercellular adhesion molecule*
- IFN - interferon
- IL - interleukin
- IRAC – *Ixodes ricinus anticomplement protein*
- IXAC – *Ixodes family anticomplement protein*
- Ly6G - *Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D*
- M-CSF – *macrophage colony stimulating factor*, faktor stimulující makrofágové kolonie
- MCP – *monocyte chemoattractant protein*
- MIP – *macrophage inflammatory protein*, makrofágový zánětlivý protein
- MZB – *marginal zone B-lymphocyte*, B-lymfocyty marginální zóny
- NADPH – *nicotineamide adenine dinucleotide phosphate*

- NBF – *neutral buffered formalin*
- NETs – *neutrophil extracellular traps*
- NK – *natural killer cells*, přirození zabíječi, NK-buňky
- NLR – *Nod-like receptors*, Nod-like receptory
- NO – oxid dusnatý
- OMPs – *outer membrane proteins*
- PAMPs – *pathogen associated molecular patterns*, s patogeny asociované molekulové vzory
- PBS – *phosphate buffered saline*, fosfátový pufr
- PBS-Tw – fosfátový pufr s přidavkem 0,3 % Tween 20 (polysorbát 20)
- PGE2 – prostaglandin E2
- PFA - paraformaldehyd
- PMN – *polymorphonuclear cells*, polymorfonukleární lymfocyty
- PRRs – *pattern recognition receptors*, receptory rozpoznávající patogenové vzory
- RLR – RIG-I-like receptory
- RNS – *reactive nitrogen species*, reaktivní formy dusíku
- ROS – *reactive oxygen species*, reaktivní formy kyslíku
- SAT – *saliva activated / assisted transmission*, slinami aktivovaný přenos
- SGE – *salivary gland extract*, extrakt z klíštěčích slinných žláz
- SPMs - *specialized proresolving mediators*
- TGF – *transforming growth factor*, transformující růstový faktor
- tHRF - *tick histamine release factor*
- TI – na T-lymfocytech nezávislé antigeny
- TLR – Toll-like receptor
- TNF – *tumor necrosis factor*, faktor nádorové nekrózy
- TROSPA – *tick receptor for OspA*
- TSLPI - *tick salivary lectin pathway inhibitor*
- VCAM – *vascular cell adhesion molecule*, vaskulární adhezní molekula
- VEGF – *vascular endothelial growth factor*, faktor podporující růst vaskulárního endotelu

## 8 Seznam použité literatury

- **Abnave, P., Muracciole, X., Ghigo, E.** (2017). Macrophages in invertebrates: From insects and crustaceans to marine bivalves. In: Kloc, M. (eds) *Macrophages. Results and Problems in Cell Differentiation*, vol 62. Springer, Cham, 62, 147-158.
- **Akira, S., Misawa, T., Satoh, T., Saitoh, T.** (2013). Macrophages control innate inflammation. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 15, 10-18.
- **Anderson, J. M., Valenzuela, J. G.** (2008). Tick saliva: From pharmacology and biochemistry to transcriptome analysis and functional genomics. *Ticks: Biology, Disease and Control*, 92-107.
- **Anguita, J., Ramamoorthi, N., Hovius, J. W., Das, S., Thomas, V., Persinski, R., Conze, D., Askenase, P. W., Rincón, M., Kantor, F. S., Fikrig, E.** (2002). Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4 T cell activation. *Immunity*, 16, 849-859.
- **Ariel, A., Fredman, G., Sun, Y., Kantarci, A., Dyke, T. E., Luster, A. D., Serhan, C. N.** (2006). Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression. *Nature Immunology*, 7, 1209-1216.
- **Baggiolini, M.** (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, 392, 565-568.
- **Barry, K. C., Fontana, M. F., Portman, J. L., Dugan, A. S., Vance, R. E.** (2013). IL-1 signaling initiates the inflammatory response to virulent *Legionella pneumophila* *in vivo*. *The Journal of Immunology*, 190, 6329-6339.
- **Beaufays, J., Adam, B., Menten-Dedoyart, C., Fievez, L., Grosjean, A., Decrem, Y., Prévôt, P. P., Santini, S., Brasseur, 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.
- **Beauvillain, C., Cunin, P., Doni, A., Scotet, M., Jaillon, S., Loiry, M., et al.** (2010). CCR7 is involved in the migration of neutrophils to lymph nodes. *Blood*, 117, 1196-1204.
- **Beck-Schimmer, B., Schwendener, R., Pasch, T., Reyes, L., Booy, C., Schimmer, R. C.** (2005). Alveolar macrophages regulate neutrophil recruitment in endotoxin-induced lung injury. *Respiratory Research*, 6, 61.

- **Bernard, Q., Wang, Z., Nardo, A. D., Boulanger, N.** (2017). Interaction of primary mast cells with *Borrelia burgdorferi* (*sensu stricto*): Role in transmission and dissemination in C57BL/6 mice. *Parasites & Vectors*, *10*, 313.
- **Bradford, M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248-254.
- **Brake, D. K., Wikel, S. K., Tidwell, J. P., León, A. A.** (2010). *Rhipicephalus microplus* salivary gland molecules induce differential CD86 expression in murine macrophages. *Parasites & Vectors*, *3*, 103.
- **Brake, D. K., León, A. A.** (2012). Immunoregulation of bovine macrophages by factors in the salivary glands of *Rhipicephalus microplus*. *Parasites & Vectors*, *5*, 38.
- **Bystrom, J., Evans, I., Newson, J., Stables, M., Toor, I., van Rooijen, N., Crawford, M., Colville-Nash, P., Farrow, S. and Gilroy, D.** (2008). Resolution-phase macrophages possess a unique inflammatory phenotype that is controlled by cAMP. *Blood*, *112*, 4117-4127.
- **Chen, G. and Nuñez, G.** (2010). Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Reviews Immunology*, *10*, 826-837.
- **Chmelař, J., Calvo, E., Pedra, J., Francischetti, I. and Kotsyfakis, M.** (2012). Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *Journal of Proteomics*, *75*, 3842-3854.
- **Chertov, O., Ueda, H., Xu, L. L., Tani, K., Murphy, W. J., Wang, J. M., Howard, O. M., Sayers, T. J., Oppenheim, J. J.** (1997). Identification of human neutrophil-derived cathepsin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils. *The Journal of Experimental Medicine*, *186*, 739-747.
- **Chong-Cerrillo, C., Shang, E. S., Blanco, D. R., Lovett, M. A., Miller, J. N.** (2001). Immunohistochemical analysis of Lyme disease in the skin of naive and infection-immune rabbits following challenge. *Infection and Immunity*, *69*, 4094-4102.
- **Christofferson, G., Vagesjo, E., Vandooren, J., Liden, M., Massena, S., Reinert, R. B., Brissova, M., Powers, A. C., Opdenakker, G., Phillipson, M.** (2012). VEGF-A recruits a proangiogenic MMP-9-delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue. *Blood*, *120*, 4653-4662.

- **Dai, J., Wang, P., Adusumilli, S., Booth, C. J., Narasimhan, S., Anguita, J., Fikrig, E.** (2009). Antibodies against a tick protein, Salp15, protect mice from the Lyme disease agent. *Cell Host & Microbe*, 6, 482-492.
- **Dai, J., Narasimhan, S., Zhang, L., Liu, L., Wang, P., Fikrig, E.** (2010). Tick histamine release factor is critical for *Ixodes scapularis* engorgement and transmission of the Lyme disease agent. *PLoS Pathogens*, 6, e1001205.
- **De Filippo, K., Henderson, R. B., Laschinger, M., Hogg, N.** (2008). Neutrophil chemokines KC and macrophage-inflammatory protein-2 are newly synthesized by tissue macrophages using distinct TLR signaling pathways. *The Journal of Immunology*, 180, 4308-4315.
- **Déruaz, M., Frauenschuh, A., Alessandri, A., Dias, J., Coelho, F., Russo, R., Ferreira, B., Graham, G., Shaw, J., Wells, T., Teixeira, M., Power, C., Proudfoot, A.** (2008). Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. *The Journal of Experimental Medicine*, 205, 2019-2031.
- **Drayton, D. L., Liao, S., Mounzer, R. H., Ruddle, N. H.** (2006). Lymphoid organ development: From ontogeny to neogenesis. *Nature Immunology*, 7, 344-353.
- **Embers, M. E., Narasimhan, S.** (2013). Vaccination against Lyme disease: Past, present, and future. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 6.
- **Filardy, A. A., Pires, D. R., Nunes, M. P., Takiya, C. M., Freire-De-Lima, C. G., Ribeiro-Gomes, F. L., Dosreis, G. A.** (2010). Proinflammatory clearance of apoptotic neutrophils induces an IL-12(low)IL-10(high) regulatory phenotype in macrophages. *The Journal of Immunology*, 185, 2044-2050.
- **Flierman, R., Daha, M. R.** (2007). The clearance of apoptotic cells by complement. *Immunobiology*, 212, 363-370.
- **Garg, R., Juncadella, I. J., Ramamoorthi, N., A., Ananthanarayanan, S. K., Thomas, V., Rincón, M., Krueger, J. K., Fikrig, E., Yengo, C. M., Anguita, J.** (2006). Cutting edge: CD4 is the receptor for the tick saliva immunosuppressor, Salp15. *The Journal of Immunology*, 177, 6579-6583.
- **Gautam, N., Olofsson, A. M., Herwald, H., Iversen, L. F., Lundgren-Åkerlund, E., Hedqvist, P., Arfors, K. E., Flodgaard, H., Lindbom, L.** (2001). Heparin-binding protein (HBP/CAP37): A missing link in neutrophil-evoked alteration of vascular permeability. *Nature Medicine*, 7, 1123-1127.



- **Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., Ley, K.** (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, 327, 656-661.
- **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. *Infection and Immunity*, 77, 2320-2329.
- **Hamilton, T. A., Zhao, C., Pavicic, P. G., Datta, S.** (2014). Myeloid colony-stimulating factors as regulators of macrophage polarization. *Frontiers in Immunology*, 5, 554.
- **Herbert, D., Orekov, T., Roloson, A., Ilies, M., Perkins, C., O' Brien, W., Cederbaum, S., Christianson, D., Zimmermann, N., Rothenberg, M., Finkelman, F.** (2010). Arginase I suppresses IL-12/IL-23p40-driven intestinal inflammation during acute schistosomiasis. *The Journal of Immunology*, 184, 6438-6446.
- **Heredia, J., Mukundan, L., Chen, F., Mueller, A., Deo, R., Locksley, R., Rando, T., Chawla, A.** (2013). Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. *Cell*, 153, 376-388.
- **Horak, I. G., Camicas, J., Keirans, J. E.** (2003). The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): A world list of valid tick names. *Ticks and Tick-Borne Pathogens*, 28, 27-54.
- **Hotamisligil, G. S.** (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444, 860-867.
- **Hourcade, D. E., Akk, A. M., Mitchell, L. M., Zhou, H., Hauhart, R., Pham, C. T.** (2016). Anti-complement activity of the *Ixodes scapularis* salivary protein Salp20. *Molecular Immunology*, 69, 62-69.
- **Hovius, J. W., Ramamoorthi, N., Van't Veer, C., de Groot, K. A., Nijhof, A. M., Jongejan, F., van Dam, A. P., Fikrig, E.** (2007a) Identification of Salp15 homologues in *Ixodes ricinus* ticks. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 7, 296-303.
- **Hovius, J. W.; Van Dam, A. P.; Fikrig, E.** (2007b). Tick–host–pathogen interactions in Lyme borreliosis. *Trends in Parasitology*, 23, 434-438.
- **Hovius, J. W., Marein A. W. P. De Jong, Dunnen, J. D., Litjens, M., Fikrig, E., Poll, T. V., Gringhuis, S. I., Geijtenbeek, T. B.** (2008a). Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization. *PLoS Pathogens*, 4, e31.

- **Hovius, J. W., Schuijt, T. J., De Groot, K. A., Roelofs, J. J. T. H., Oei, G. A., Marquart, J. A., De Beer, R., Van't Veer, C., Van der Poll, T., Ramamoorthi, N., Fikrig, E., Van Dam, A. P.** (2008b). Preferential protection of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* by a Salp 15 homologue in *Ixodes ricinus* saliva. *Journal of Infectious Diseases*, 198, 1189-1197.
- **Hovius, J. W.** (2009). Spitting image: tick saliva assists the causative agent of Lyme disease in evading host skin's innate immune response. *Journal of Investigative Dermatology*, 129: 2337-2339.
- **Iba, T., Hashiguchi, N., Nagaoka, I., Tabe, Y., Murai, M.** (2013). Neutrophil cell death in response to infection and its relation to coagulation. *Journal of Intensive Care*, 1, 13.
- **Jenkins, S. J., Allen, J. E.** (2010) Similarity and diversity in macrophage activation by nematodes, trematodes, and cestodes. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 1-14.
- **Jenkins, S., Ruckerl, D., Cook, P., Jones, L., Finkelman, F., van Rooijen, N., MacDonald, A. and Allen, J.** (2011). Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science*, 332, 1284-1288.
- **Jones, L. D., Hodgson, E., Nuttall, P. A.** (1989). Enhancement of virus transmission by tick salivary glands. *Journal of General Virology*, 70, 1895-1898.
- **Kaufman, W. R., Aeschlimann, A. A., Diehl, P. A.** (1980). Regulation of body volume by salivation in a tick challenged with fluid loads. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 238, R102-R112.
- **Kazimírová, M., Štibrániová, I.** (2013). Tick salivary compounds: Their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 43.
- **Kern, A., Collin, E., Barthel, C., Michel, C., Jaulhac, B., Boulanger, N.** (2011). Tick saliva represses innate immunity and cutaneous inflammation in a murine model of Lyme disease. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11, 1343-1350.
- **Kocakova, P., Slavikova, M., Hajnicka, V., Slovak, M., Gasperik, J., Vancova, I., Fuchsberger, N., Nuttall, P. A.** (2003). Effect of fast protein liquid chromatography fractionated salivary gland extracts from different ixodid tick species on interleukin-8 binding to its cell receptors. *Folia Parasitologica*, 50, 79-84.

- **Kotál, J., Langhansová, H., Lieskovská, J., Andersen, J. F., Francischetti, I. M., Chavakis, T., Kopecký, J., Pedra, J. H. F., Chmelař, J.** (2015). Modulation of host immunity by tick saliva. *Journal of Proteomics*, 128, 58-68.
- **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*. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 29256-29263.
- **Kotsyfakis, M., Horka, H., Salat, 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. *Molecular Microbiology*, 77, 456-470.
- **Kovář, L., Kopecký, J., Říhová, B.** (2001). Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* tick polarizes the cytokine profile toward Th2 and suppresses proliferation of T lymphocytes in human PBMC culture. *The Journal of Parasitology*, 87, 1342-1348.
- **Kramer, C. D., Poole, N. M., Coons, L. B., Cole, J. A.** (2011). Tick saliva regulates migration, phagocytosis, and gene expression in the macrophage-like cell line, IC-21. *Experimental Parasitology*, 127, 665-671.
- **Kulkarni, O., Lichtnekert, J., Anders, H. and Mulay, S.** (2016). The immune system in tissue environments regaining homeostasis after injury: Is “inflammation” always inflammation?. *Mediators of Inflammation*, 2016, 1-9.
- **Kuthejlová, M., Kopecký, J., Štěpánová, G., Macela, A.** (2001). Tick salivary gland extract inhibits killing of *Borrelia afzelii* spirochetes by mouse macrophages. *Infection and Immunity*, 69, 575-578.
- **Kühl, A. A., Kakirman, H., Janotta, M., Dreher, S., Cremer, P., Pawlowski, N. N., Loddenkemper, C., Heimesaat, M. M., Grollich, K., Zeitz, M., Farkas, S., Hoffmann, J. C.** (2007). Aggravation of different types of experimental colitis by depletion or adhesion blockade of neutrophils. *Gastroenterology*, 133, 1882-1892.
- **Kýčková, K., Kopecký, J.** (2006). Effect of tick saliva on mechanisms of innate immune response against *Borrelia afzelii*. *Journal of Medical Entomology*, 43, 1208-1214.
- **Labuda, M., Jones, L. D., Williams, T., Danielova, V., Nuttall, P. A.** (1993). Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between cofeeding ticks. *Journal of Medical Entomology*, 30, 295-299.

- **Langhansová, H., Bopp, T., Schmitt, E., Kopecký, J.** (2015). Tick saliva increases production of three chemokines including monocyte chemoattractant protein-1, a histamine-releasing cytokine. *Parasite Immunology*, 37, 92-96.
- **Lawrie, C. H., Randolph, S. E., Nuttall, P. A.** (1999). Ixodes ticks: Serum species sensitivity of anticomplement activity. *Experimental Parasitology*, 93, 207-214.
- **Lee, T. D., Gonzalez, M. L., Kumar, P., Grammas, P., Pereira, H.** (2003). CAP37, a neutrophil-derived inflammatory mediator, augments leukocyte adhesion to endothelial monolayers. *Microvascular Research*, 66, 38-48.
- **Liao, S., Weid, P. V.** (2015). Lymphatic system: An active pathway for immune protection. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 38, 83-89.
- **Logie, C., Stunnenberg, H. G.** (2016). Epigenetic memory: A macrophage perspective. *Seminars in Immunology*, 28, 359-367.
- **Majno, G., Joris, I.** (2004). *Cells, Tissues, and Disease: Principles of general pathology*. New York: Oxford University Press.
- **Mans, B. J.** (2011a). Evolution of vertebrate hemostatic and inflammatory control mechanisms in blood-feeding arthropods. *Journal of Innate Immunity*, 3, 41-51.
- **Mans, B. J., Klerk, D. D., Pienaar, R., Latif, A. A.** (2011b). *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.
- **Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C., Jaillon, S.** (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 11, 519-531.
- **Marchal, C. M., Luft, B. J., Yang, X., Sibilia, J., Jaulhac, B., Boulanger, N. M.** (2009). Defensin is suppressed by tick salivary gland extract during the *in vitro* interaction of resident skin cells with *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Investigative Dermatology*, 129, 2515-2517.
- **Marchal, C., Schramm, F., Kern, A., Luft, B. J., Yang, X., Schuijt, T., Hovius, J. W., Jaulhac, B., Boulanger, N.** (2010). Antialarmin effect of tick saliva during the transmission of Lyme disease. *Infection and Immunity*, 79, 774-785.
- **Martinez, F. O., Helming, L., Gordon, S.** (2009). Alternative activation of macrophages: An immunologic functional perspective. *Annual Review of Immunology*, 27, 451-483.

- **Matsumoto, K., Inokuma, H., Okuda, M., Onishi, T.** (2003). Effects of salivary gland extract from *Rhipicephalus sanguineus* on IgG subclass production and cytokine mRNA expression in mononuclear cells of canine peripheral blood. *Journal of Veterinary Medical Science*, 65, 137-140.
- **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. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 99, 661-672.
- **Mccracken, J. M., Allen, L. H.** (2014). Regulation of human neutrophil apoptosis and lifespan in health and disease. *Journal of Cell Death*, 7, 15-23.
- **Medzhitov, R.** (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454, 428-435.
- **Medzhitov, R.** (2010). Inflammation 2010: New adventures of an old flame. *Cell*, 140, 771-776.
- **Mejri, N., Franscini, N., Rutti, B., Brossard, M.** (2001). Th2 polarization of the immune response of BALB/c mice to *Ixodes ricinus* instars, importance of several antigens in activation of specific Th2 subpopulations. *Parasite Immunology*, 23, 61-69.
- **Mejri, N., Rutti, B., Brossard, M.** (2002). Immunosuppressive effects of *Ixodes ricinus* tick saliva or salivary gland extracts on innate and acquired immune response of BALB/c mice. *Parasitology Research*, 88, 192-197.
- **Menten-Dedoyart, C., Faccineto, C., Golovchenko, M., Dupiereux, I., Lerberghe, P. V., 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. *The Journal of Immunology*, 189, 5393-5401.
- **Mihara, M.** (2017). A histopathologic study of the human skin in the early stage after a tick bite: A special reference to cutaneous tissue reaction to the cement substance of tick saliva. *Yonago Acta Medica*, 60, 186-199.
- **Mócsai, A.** (2013). Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *Journal of Experimental Medicine*, 210, 1283-1299.
- **Montgomery, R., Lusitani, D., de Boisfleury Chevance, A. and Malawista, S.** (2004). Tick saliva reduces adherence and area of human neutrophils. *Infection and Immunity*, 72, 2989-2994.

- **Mosser, D. M., Edwards, J. P.** (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, 8, 958-969.
- **Murray, P. J., Wynn, T. A.** (2011). Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *Journal of Leukocyte Biology*, 89, 557-563.
- **Narasimhan, S., Sukumaran, B., Bozdogan, U., Thomas, V., Liang, X., Deponte, K., Marcantonio, N., Koski, R. A., Anderson, J. F., Kantor, F., Fikrig, E.** (2007a). A tick antioxidant facilitates the Lyme disease agents successful migration from the mammalian host to the arthropod vector. *Cell Host & Microbe*, 2, 7-18.
- **Narasimhan, S., Deponte, K., Marcantonio, N., Liang, X., Royce, T. E., Nelson, K. F., Booth, C. J., Koski, B., Anderson, J. F., Kantor, F., Fikrig, E.** (2007b). Immunity against *Ixodes scapularis* salivary proteins expressed within 24 hours of attachment thwarts tick feeding and impairs *Borrelia* transmission. *PLoS ONE*, 2, e451.
- **Nathan, C. F.** (1983). Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *Journal of Experimental Medicine*, 158, 670-689.
- **Nathan, C. F.** (1987). Secretory products of macrophages. *The Journal of Clinical Investigation*, 79, 319-326.
- **Nathan, C. F.** (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, 420, 846-852.
- **Netea, M., Joosten, L., Latz, E., Mills, K., Natoli, G., Stunnenberg, H., O'Neill, L. Xavier, R.** (2016). Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*, 352, aaf1098.
- **Nunes, P., Demarex, N., Dinauer, M. C.** (2013). Regulation of the NADPH oxidase and associated ion fluxes during phagocytosis. *Traffic*, 14, 1118-1132.
- **Nunn, M. A., Sharma, A., Paesen, G. C., Adamson, S., Lissina, O., Willis, A. C., Nuttall, P. A.** (2005). Complement inhibitor of C5 activation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *The Journal of Immunology*, 174, 2084-2091.
- **Nuttall, P. A., Labuda, M.** (2004). Tick–host interactions: Saliva-activated transmission. *Parasitology*, 129, S177-S189.
- **Paine, S. H., Kemp, D. H., Allen, J. R.** (1983). In vitro feeding of *Dermacentor andersoni* (Stiles): Effects of histamine and other mediators. *Parasitology*, 86, 419-428.

- **Pasparakis, M., Haase, I., Nestle, F. O.** (2014). Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 14, 289-301.
- **Perdiguero, E. G., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M. F., Geissmann, F., Rodewald, H. R.** (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature*, 518, 547-551.
- **Pittman, K., Kubes, P.** (2013). Damage-associated molecular patterns control neutrophil recruitment. *Journal of Innate Immunity*, 5, 315-323.
- **Pober, J. S., Sessa, W. C.** (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 7, 803-815.
- **Poole, N. M., Mamidanna, G., Smith, R. A., Coons, L. B., Cole, J. A.** (2013). Prostaglandin E2 in tick saliva regulates macrophage cell migration and cytokine profile. *Parasites & Vectors*, 6, 261.
- **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.
- **Ribeiro, J., Weis, J. J., Telford, S. R.** (1990). Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. *Experimental Parasitology*, 70, 382-388.
- **Rolníková, T., Kazimírová, M., Buc, M.** (2003). Modulation of human lymphocyte proliferation by salivary gland extracts of ixodid ticks (Acari: Ixodidae): Effect of feeding stage and sex. *Folia Parasitologica*, 50, 305-312.
- **Roos, A., Xu, W., Castellano, G., Nauta, A., Garred, P., Daha, M., Kooten, C. V.** (2004). Mini-review: A pivotal role for innate immunity in the clearance of apoptotic cells. *European Journal of Immunology*, 34, 921-929.
- **Rosales, C.** (2018). Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types? *Frontiers in Physiology*, 9, 113.
- **Saclier, M., Yacoub-Youssef, H., Mackey, A. L., Arnold, L., Ardjoune, H., Magnan, M., Sailhan, F., Chelly, J., Pavlath, G. K., Mounier, R., Kjaer, M., Chazaud, B.** (2013). Differentially activated macrophages orchestrate myogenic precursor cell fate during human skeletal muscle regeneration. *Stem Cells*, 31, 384-396.

- **Sauer, J. R.** (1995). Tick salivary gland physiology. *Annual Review of Entomology*, 40, 245-267.
- **Sauer, J., Essenberg, R., Bowman, A.** (2000). Salivary glands in ixodid ticks: Control and mechanism of secretion. *Journal of Insect Physiology*, 46, 1069-1078.
- **Scapini, P., Lapinet-Vera, J. A., Gasperini, S., Calzetti, F., Bazzoni, F., Cassatella, M. A.** (2000). The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunological Reviews*, 177, 195-203.
- **Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., Rose-John, S.** (2011) The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 2011, 1813, 878-888.
- **Schoeler, G. B., Manweiler, S. A., Wikel, S. K.** (1999). *Ixodes scapularis*: Effects of repeated infestations with pathogen-free nymphs on macrophage and T-lymphocyte cytokine responses of BALB/c and C3H/HeN mice. *Experimental Parasitology*, 92, 239-248.
- **Schoeler, G. B., Bergman, D. K., Manweiler, S. A., Wikel, S. K.** (2000). Influence of soluble proteins from the salivary glands of ixodid ticks on the *in-vitro* proliferative responses of lymphocytes from BALB/c and C3H/HeN mice. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 94, 507-518.
- **Scholl, D. C., Embers, M. E., Caskey, J. R., Kaushal, D., Mather, T. N., Buck, W. R., Morici, L. A., Philipp, M. T.** (2016). Immunomodulatory effects of tick saliva on dermal cells exposed to *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. *Parasites & Vectors*, 9, 394.
- **Schramm, F., Kern, A., Barthel, C., Nadaud, S., Meyer, N., Jaulhac, B., Boulanger, N.** (2012). Microarray analyses of inflammation response of human dermal fibroblasts to different strains of *Borrelia burgdorferi sensu stricto*. *PLoS ONE*, 7, e40046.
- **Schuijt, T., Coumou, J., Narasimhan, S., Dai, J., DePonte, K., Wouters, D., Brouwer, M., Oei, A., Roelofs, J., van Dam, A., van der Poll, T., van't Veer, C., Hovius, J., Fikrig, E.** (2011a). 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.
- **Schuijt, T., Hovius, J., Poll, T. V., Dam, A. V., Fikrig, E.** (2011b). Lyme borreliosis vaccination: The facts, the challenge, the future. *Trends in Parasitology*, 27, 40-47.



- **Serhan, C. N.** (2007). Resolution phase of inflammation: Novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annual Review of Immunology*, 25, 101-137.
- **Serhan, C. N., Chiang, N., Dyke, T. E.** (2008). Resolving inflammation: Dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nature Reviews Immunology*, 8, 349-361.
- **Severinová J., Salát, J., Kročová, Z., Řezničková, J., Demová, H., Horká, H., Kopecký, J.** (2005). Co-inoculation of *Borrelia afzelii* with tick salivary gland extract influences distribution of immunocompetent cells in the skin and lymph nodes of mice. *Folia Microbiologica*, 50, 457-463.
- **Shi, C., Pamer, E. G.** (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 11, 762-774.
- **Shih, C., Pollack, R. J., Telford, S. R., Spielman, A.** (1992). Delayed dissemination of Lyme disease spirochetes from the site of deposition in the skin of mice. *Journal of Infectious Diseases*, 166, 827-831.
- **Silberer, M., Koszik, F., Stingl, G., Aberer, E.** (2000). Downregulation of class II molecules on epidermal Langerhans cells in Lyme borreliosis. *British Journal of Dermatology*, 143, 786-794.
- **Soehnlein, O., Weber, C., Lindbom, L.** (2009). Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. *Trends in Immunology*, 30, 538-546.
- **Soehnlein, O., Lindbom, L.** (2010). Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 10, 427-439.
- **Sonenshine, D. E., Roe, R. M.** (2014). *Biology of ticks*. Oxford: Oxford University Press.
- **Sokol, C., Barton, G., Farr, A., Medzhitov, R.** (2007). A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nature Immunology*, 9, 310-318.
- **Steere, A. C., Sikand, V. K., Meurice, F., Parenti, D.L., Fikrig, E., Schoen, R. T., Nowakowski, J., Schmid, C. H., Laukamp, S., Buscarino, C., Krause, D.S.** (1998). Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface lipoprotein A with adjuvant. *New England Journal of Medicine*, 1998, 339, 209-215.
- **Stein, M.** (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: A marker of alternative immunologic macrophage activation. *Journal of Experimental Medicine*, 176, 287-292.

- **Stramer, B. M., Mori, R., Martin, P.** (2007). The inflammation–fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *Journal of Investigative Dermatology*, *127*, 1009-1017.
- **Tabas, I., Glass, C. K.** (2013). Anti-inflammatory therapy in chronic disease: Challenges and opportunities. *Science*, *339*, 166-172.
- **Takano, T., Azuma, N., Satoh, M., Toda, A., Hashida, Y., Satoh, R., Hohdatsu, T.** (2009). Neutrophil survival factors (TNF-alpha, GM-CSF, and G-CSF) produced by macrophages in cats infected with feline infectious peritonitis virus contribute to the pathogenesis of granulomatous lesions. *Archives of Virology*, *154*, 775-781.
- **Takeuchi, O., Akira, S.** (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, *140*, 805-820.
- **Tirloni, L., Reck, J., Terra, R. M., Martins, J. R., Mulenga, A., Sherman, N. E., Fox, J.W., Yates, J. R. 3rd, Termignoni, C., Pinto, A. F., Vaz Ida, S. Jr.** (2014). Proteomic analysis of cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* saliva: A comparison between partially and fully engorged females. *PLoS ONE*, *9*, e94831.
- **Tsuda, Y., Takahashi, H., Kobayashi, M., Hanafusa, T., Herndon, D. Suzuki, F.** (2004). Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Immunity*, *21*, 215-226.
- **Turer, E. E., Tavares, R. M., Mortier, E., Hitotsumatsu, O., Advincula, R., Lee, B., Shifrin, N., Malynn, B. A., Ma, A.** (2008). Homeostatic MyD88-dependent signals cause lethal inflammation in the absence of A20. *The Journal of Experimental Medicine*, *205*, 451-464.
- **Tyson, K., Elkins, C., Patterson, H., Fikrig, E., Silva, A. D.** (2007). Biochemical and functional characterization of Salp20, an *Ixodes scapularis* tick salivary protein that inhibits the complement pathway. *Insect Molecular Biology*, *16*, 469-479.
- **Vachery, N., Puech, C., Cavelier, P., Rodrigues, V., Aprelon, R., Lefrançois, T., Martinez D, Epardaud M.** (2015). An in vitro model to assess the immunosuppressive effect of tick saliva on the mobilization of inflammatory monocyte-derived cells. *Veterinary Research*, *46*, 117.
- **Valenzuela, J. G.** (2004). Exploring tick saliva: From biochemistry to ‘sialomes’ and functional genomics. *Parasitology*, *129*, S83-S94.

- **Van Oostrom, A. J., Van Wijk, J. P., Sijmonsma, T. P., Rabelink, T. J., Castro, C. M.** (2004) Increased expression of activation markers on monocytes and neutrophils in type 2 diabetes. *Netherlands Journal of Medicine*, 62, 320-325.
- **Vančová, I., Hajnická, V., Slovák, M., Kocáková, P., Paesen, G. C., Nuttall, P. A.** (2010). Evasin-3-like anti-chemokine activity in salivary gland extracts of ixodid ticks during blood-feeding: A new target for tick control. *Parasite Immunology*, 32, 460-463.
- **Xue, L., Greisler, H. P.** (2002). Angiogenic effect of fibroblast growth factor-1 and vascular endothelial growth factor and their synergism in a novel in vitro quantitative fibrin-based 3-dimensional angiogenesis system. *Surgery*, 132, 259-267.
- **Yamazaki, T., Nagata, K., Kobayashi, Y.** (2008). Cytokine production by M-CSF- and GM-CSF-induced mouse bone marrow-derived macrophages upon coculturing with late apoptotic cells. *Cellular Immunology*, 251, 124-130.
- **Ye, R. D., Boulay, F., Wang, J. M., Dahlgren, C., Gerard, C., Parmentier, M., Serhan, C. N., Murphy, P. M.** (2009). International union of basic and clinical pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) Family. *Pharmacological Reviews*, 61, 119-161.
- **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. *The Journal of Parasitology*, 88, 1276-1278.