

APPENDIX

V rámci **Experimentu č. 1** byla část vzorků zpracována ve spolupráci s kolegy z Masarykovy university v Brně. Cílem této přílohy je doplnit výsledky uvedené v této diplomové práci o další údaje a ukázat tak tento experiment v celé jeho šíři.

Design experimentu je detailně popsán v materiálu a metodice této diplomové práce. Myším byly odebrány vzorky tkání 5. týden po infekci. Jeden ušní boltce z každé myši byl převeden do zinkové fixáže (BD Pharmingen, kat. č. 552658) a odeslán ke zpracování do laboratoře doc. Bardůnek Valigurové (Masarykova universita, Brno). Vzorky zde byly odvodněny, zality do parafinu, nakrájeny a obarveny hematoxylinem-eosinem (obrázek č. 1) či inkubovány s protilátkami proti neutrofilům a klasicky aktivovaným M1 makrofágům (obrázek č.2), které byly vizualizovány fluorescenčně značenou protilátkou pomocí mikroskopu Olympus IX81 vybaveného konfokální jednotkou FluoView 500. Detailní popis zpracování vzorků pro mikroskopickou analýzu tkáně ušního boltce je uveden v diplomové práci Karolíny Polákové (Poláková 2022), ze které jsou převzaty i následující obrázky (včetně číslování obrázků).

Na obrázcích jsou řezy ušním boltcem myši v různém zvětšení. D7 je skupina myši infikovaná *Leishmania major* v odstupu 7 dnů od poslední imunizace sáním *Phlebotomus duboscqi* (prezentované snímky jsou z myši č. 12), myši ve skupině D2 byli infikované *L. major* v odstupu 2 dnů od poslední imunizace (na snímcích jsou vzorky z myši č. 1), jako pozitivní kontrola (POS) sloužily myši infikované bez předchozí imunizace (myš č. 7) a jako negativní kontrola (NEG) sloužily myši neimunizované a neinfikované (myš č. 14). V tabulce č. 1 je pak uvedena plocha leishmaniové léze v 5. týdnu po nákaze u mikroskopicky analyzovaného ušního boltce (levé ucho) a plocha leishmaniové léze spolu s náloží parazitů v kontralaterálním ušním boltci té samé myši (pravé ucho).

U myši ze skupiny D7 jsme detekovali zvýšené množství klasicky aktivovaných makrofágů a téměř žádné aktivované neutrofilů (obrázek č. 2). U myši ze skupin POS a D2 bylo zastoupení těchto buněčných populací opačné, bylo pozorováno vyšší zastoupení neutrofilů na úkor klasicky aktivovaných makrofágů.

V rámci spolupráce s kolegy z Masarykovy University v Brně jsme provedli také předběžnou mikroskopickou analýzu tkáně ušního boltce u opakovaně pobodaných myši v časech, které odpovídají době infekce, tedy 48 hodin po posledním sání a týden po posledním sání.

Pro tento pokus byly myši opakovaně vystaveny sání flebotomem druhu *Phlebotomus papatasi* (jedná se o druh blízké příbuzný druhu *P. duboscqi* a potvrzeného přenašeče *L. major*), a to jednou za 7-14 dní v rámci péče o tuto kolonii flebotomů na kat. parazitologie PŘF UK. Sání probíhalo dlouhodobě zhruba 1 rok. Myši byly uvedeny do celkové anestezie a po celou dobu bylo dbáno na komfort zvířat (dostatečná teplota v místnosti, vlhčení očí). Uspané myši byly umístěny do klece se samicemi flebotomů a ponechány 60 minut ve tmě v pokojové teplotě. Po každém sání zvířata opět nabyly vědomí a byla vrácena do označené chovné nádoby. Na konci pokusu byly myši uvedeny do hluboké celkové anestezie a usmrceny v intervalu 48 hodin (skupina D2, n = 2) nebo 1 týden (skupina D7, n = 2) po posledním sání. Odebrané ušní boltce byly převedeny do zinkové fixáže (BD Pharmingen, kat. č. 552658) a odeslány ke zpracování do laboratoře doc. Bardůnek Valigurové (Masarykova universita, Brno). Vzorky zde byly odvodněny, zality do parafinu, nakrájeny a obarveny giemsou, hematoxylinem-eosinem, inkubovány s protilátkami proti neutrofilům a klasicky aktivovaným M1 makrofágům, které byly vizualizovány fluorescenčně značenou protilátkou pomocí mikroskopu Olympus IX81 vybaveného konfokální jednotkou FluoView 500 (obrázek č.3). Detailní popis zpracování vzorků pro mikroskopickou analýzu tkáně ušního boltce je uveden v diplomové práci Karolíny Polákové (Poláková 2022), ze které jsou převzaty i následující obrázky (včetně číslování obrázků).

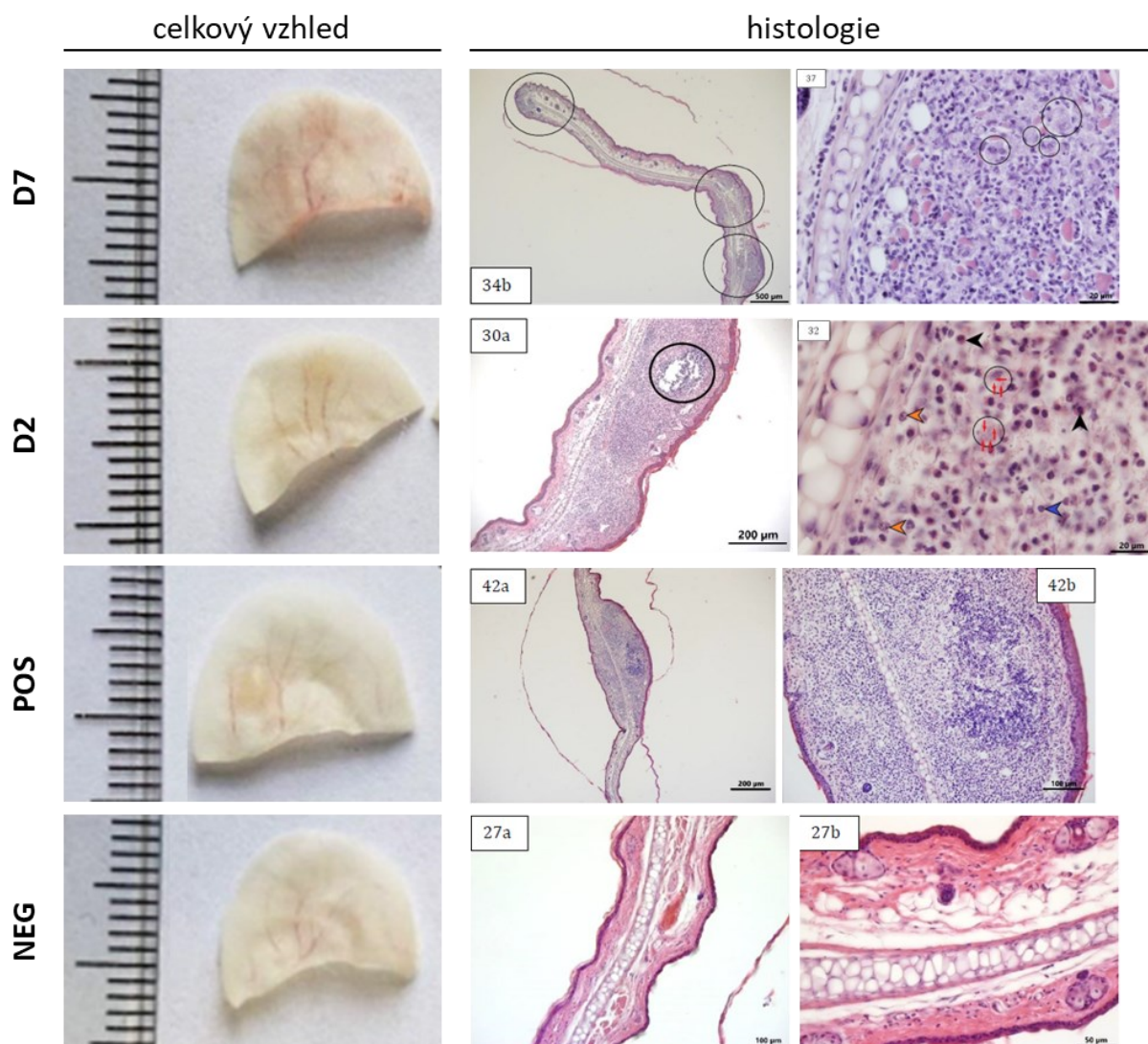
U myši ze skupiny D2 jsme pozorovali zvýšené množství imunitních buněk v tkáni, větší množství aktivovaných neutrofilů a téměř žádné M1 makrofágy. U myši odebraných ve větším časovém odstupu od posledního sání (skupina D7) bylo v tkáni přítomno menší množství imunitních buněk, téměř žádné aktivované neutrofilů, ale zato jsme pozorovali vyšší zastoupení M1 makrofágů.

POUŽITÁ LITERATURA

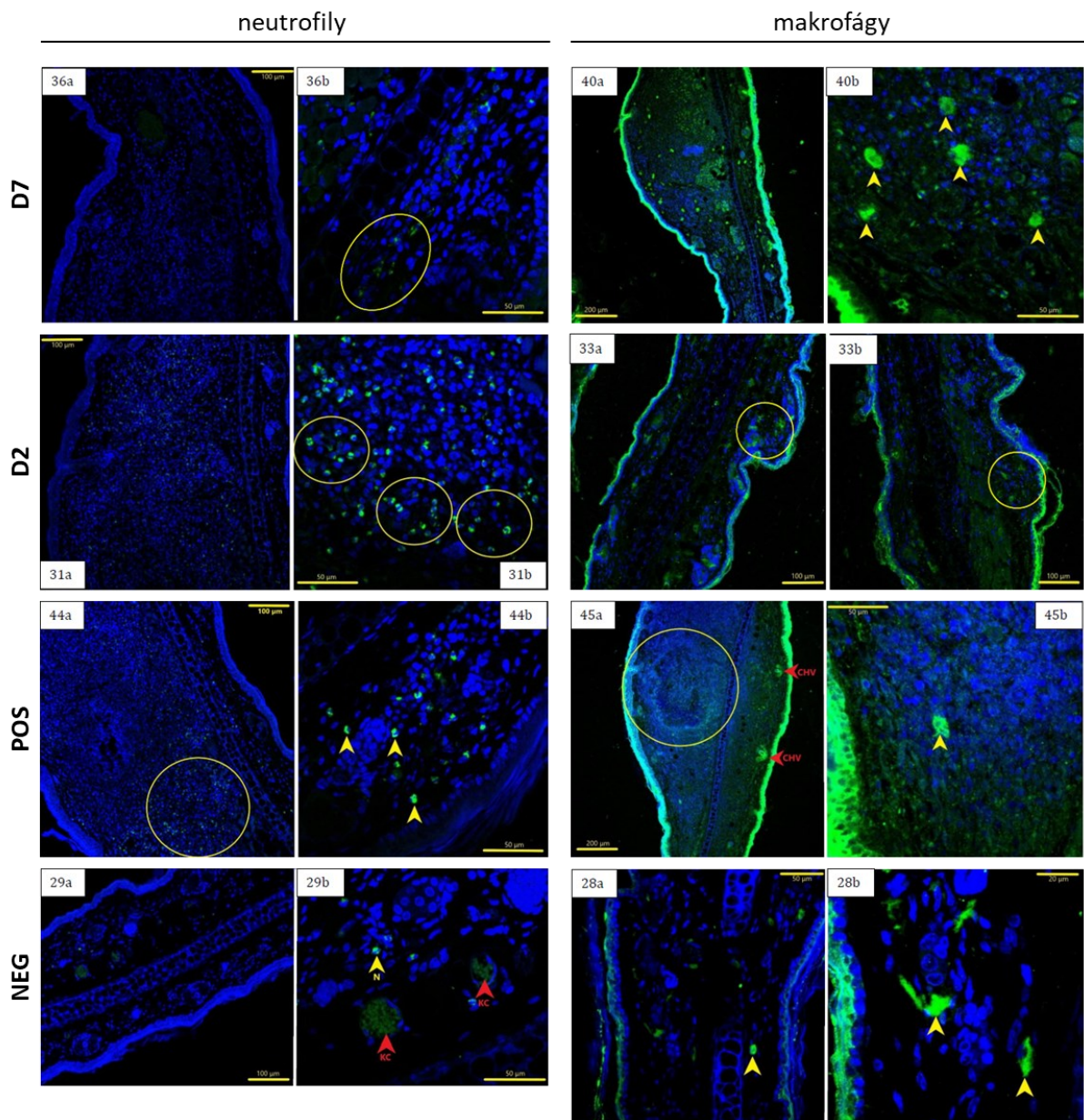
Bc. Karolína Poláková (2022): Vliv časné imunitní odpovědi u myši opakovaně pobodaných flebotomy na průběh kožní leishmaniózy. Diplomová práce. Ústav botaniky a zoologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita. 96 stran. Vedoucí práce: doc. RNDr. Andrea Bardůnek Valigurová, Ph.D.

Tabulka č. 1: Parametry leishmaniové infekce měřené v 5. týdnu infekce, v době odběru vzorů tkání. Upraveno dle Poláková 2022.

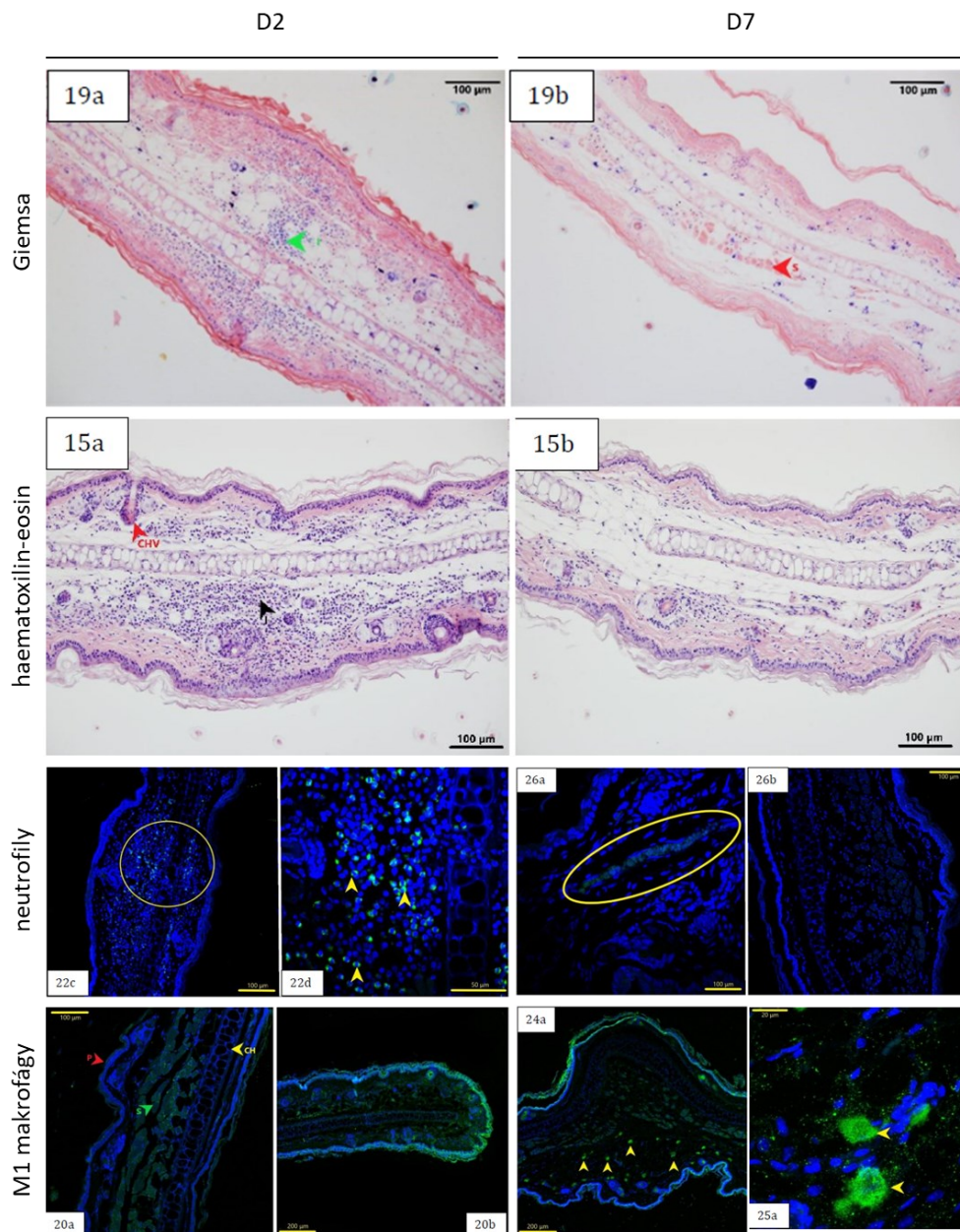
skupina		D7	D2	POS	NEG
č. vzorku		12	1	7	14
levé ucho	plocha léze (mm ²)	113,04	10,17	25,28	0,00
pravé ucho	plocha léze (mm ²)	78,50	12,01	16,49	0,00
	množství leishmanií (qPCR)	591	456	74 400	0



Obrázek č. 1: Celkový vzhled ušního boltce. Histologické preparáty barvené hematoxylinem-eosinem. 37 a 32 - makrofágy (některé jsou zakroužkované) s amastigoty leishmanií (červené šipky), 30a – nekrotizovaný buněčný materiál v centru léze (zakroužkováno). Upraveno dle Poláková 2022.



Obrázek č. 2: Imunohistochemické značení neutrofilů a klasicky aktivovaných makrofágů. Neutrofilů byly značeny primární polyklonální protilátkou proti myeloperoxidáze (Invitrogen, kat. č. PA5-16672) a klasicky aktivované makrofágy primární polyklonální protilátkou proti inducibilní NO syntáze (Invitrogen, kat. č. PA3-030A). Sekundární protilátka byla v obou případech konjugovaná s FITC (Sigma-Aldrich, kat. č. F 0382, zelená). Buněčná jádra byla podbarvena Hoechst 33342 (modrá). **Neutrofilů** (myeloperoxidáza): 36b, 31b a 44a – shluky aktivovaných neutrofilů (některé jsou zakroužkované), 44b - žluté šipky označují aktivované neutrofilů, 29b - detail oblasti s aktivovanými neutrofilů (jeden z nich je označen žlutou šipkou), červené šipky označují cévy s erytrocyty (autofluorescence). **Klasicky aktivované makrofágy** (iNOS): 40b, 45b, 28a a 28b - žluté šipky označují klasicky aktivované makrofágy, 33a a 33b - oblasti s menší lézí vykazující místo slabší fluorescenční signál (příklad zakroužkován), 45a - celkový pohled na lézi s nekrotickou tkání (zakroužkováno), červenými šipkami jsou označeny chlupové váčky (CHV). Upraveno dle Poláková 2022.



Obrázek č. 3: Mikroskopická analýza ušního boltce opakovaně pobodaných myši odebraného 2. a 7. den po posledním sání *P. papatasi*. Histologické preparáty byly barvené giemsou (19a, 19b) a hematoxylinem-eosinem (15a a 15b). Zelená šipka (19a) – shluky zánětlivého infiltrátu prostupujícího chrupavkou, S – svaly, CHV – chlupový váček, černá šipka (15a) - shluky zánětlivého infiltrátu. U imunohistochemických preparátů byly neutrofilly značeny primární polyklonální protilátkou proti myeloperoxidáze (Invitrogen, kat. č. PA5-16672) a M1 makrofágy primární polyklonální protilátkou proti inducibilní NO syntáze (Invitrogen, kat. č. PA3-030A). Sekundární protilátka byla v obou případech konjugovaná s FITC (Sigma-Aldrich, kat. č. F 0382, zelená). Buněčná jádra byla podbarvena Hoechst 33342 (modrá). **Neutrofilly** (myeloperoxidáza): 22c - shluk aktivovaných neutrofilů v domnělém místě vpichu flebotoma (zakroužkovaná oblast), 22d - detail infiltrátu s aktivovanými neutrofilly (některé jsou označené šipkami) v místě sítě flebotoma, 26a (fixace ve 4% PFA) - značená oblast představuje krevní cévu. **M1 makrofágy** (iNOS): 20a (fixace ve 4% PFA) - S = svalová vlákna, CH = elastická chrupavka, P = pokožka, 24a - buněčný infiltrát s aktivovanými makrofágy (některé jsou označené žlutými šipkami), 25a - detail aktivovaných makrofágů (označené žlutými šipkami). Upraveno dle Poláková 2022.