

**Přírodovědecká fakulta
Univerzita Karlova v Praze
Katedra parazitologie**



Specifita imunitní odpovědi hostitele na poštípání flebotomy

Bc. Jan Drahota

Diplomová práce

Praha, 2009

Školitel: RNDr. Iva Rohoušová, PhD

Prohlašuji, že tuto diplomovou práci jsem vypracoval samostatně s použitím citované literatury.

Jan Drahota

Poděkování

Chtěl bych poděkovat především své školitelce Ivě Rohoušové za soustavnou a trpělivou pomoc při plánování experimentů a řešení všech jejich zapeklitostí. Dále bych chtěl poděkovat kolegům z naší laboratoře, především Jitce Hostomské a Míše Vlkové za spolupráci při experimentech, rady a ochotnou pomoc se vším, co bylo potřeba. Také bych chtěl poděkovat Heleně Havelkové a dalším lidem z laboratoře dr. Lipoldové v ÚMG za jejich pomoc při proliferačních testech. A samozřejmě bych chtěl poděkovat své rodině a přátelům za neustávající nejen psychickou podporu.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	6
1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE	7
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	
2.1 Rozdělení cytokinů a protilátek	8
2.1.1 Rozdělení cytokinů	8
2.1.2 Protilátky	9
2.2 Antihemostatické aktivita slin flebotomů a komárů	10
2.3 Imunitní odpověď na sliny flebotomů	12
2.3.1 Vliv slin flebotomů na imunitní systém naivního hostitele	12
2.3.1.1 Komplement a migrace zánětlivých buněk	12
2.3.1.2 Inhibice proliferace T-lymfocytů, vliv na kostimulační molekuly a produkci NO	12
2.3.1.3 Ovlivnění produkce cytokinů	14
2.3.2 Vliv slin flebotomů na přenos leishmaniové infekce	16
2.3.3 Vliv slin flebotomů na imunitní systém hostitele infikovaného leishmaniemi	17
2.3.3.1 <i>Lutzomyia longipalpis</i>	17
2.3.3.2 <i>Phlebotomus papatasi</i>	18
2.3.4. Buněčná a cytokinová odpověď na imunizaci slinami flebotomů	19
2.3.4.1 Účinek imunizace všemi komponenty slin najednou	19
2.3.4.2 Účinek imunizace vakcínami z jednotlivých komponent slinných žláz	21
2.3.5 Protilátková odpověď na imunizaci slinami flebotomů	22
2.3.6 Vztah imunizace slinami flebotomů a protekce proti leishmanióze	25
2.3.6.1 Protektivní efekt a DTH navozená imunizací slinami	25
2.3.6.2 Protektivní efekt a DTH navozená imunizací komponenty slin	27
2.3.6.3 Význam protilátek proti slinám při přenosu leishmaniózy	27
2.4 Imunitní odpověď na sliny komárů	30
2.4.1 Vliv slin komárů na imunitní systém naivního hostitele	30
2.4.1.1 <i>Aedes aegypti</i>	30
2.4.1.2 rod <i>Culex</i>	31
2.4.1.3 rod <i>Anopheles</i>	32
2.4.2 Vliv slin komárů na přenos infekčních chorob	32

2.4.3	Imunitní odpověď hostitele na opakované sání komárů	33
2.4.3.1	Hypersenzitivní odpověď vyvolaná sáním	33
2.4.3.2	Protilátková odpověď na sání komárů	34
2.4.4	Vliv opakovaného sání komárů na přenos infekcí	36
3.	METODIKA	36
3.1	Flebotomové	38
3.2	Pitva slinných žláz flebotomů a příprava homogenátu těchto žláz	39
3.3	Imunizace myši sáním flebotomů a odběr orgánů a krve	40
3.3.1	Imunizace sáním <i>P. sergenti</i>	40
3.3.2	Imunizace sáním <i>P. duboscqi</i> a infekce <i>Le. major</i>	40
3.4	Lymfoproliferační test	41
3.5	Stanovení produkce NO makrofágy	42
3.6	Stanovení množství cytokinů	43
3.7	Stanovení množství protilátek	44
3.8	Elektroforéza (SDS-PAGE)	45
3.9	Barvení gelů stříbrem	47
3.10	Imunoblot	48
4.	VÝSLEDKY	48
4.1	Specifita imunitní odpovědi u myši imunizovaných <i>P. sergenti</i>	48
4.1.1	Imunizace myši sáním <i>P. sergenti</i>	48
4.1.2	Vliv imunizace sáním <i>P. sergenti</i> na proliferaci splenocytů	49
4.1.3	Vliv imunizace sáním <i>P. sergenti</i> na produkci protilátek	51
4.2	Specifita im.odpovědi u myši imunizovaných <i>P. duboscqi</i> a infikovaných <i>Le. major</i>	
4.2.1	Imunizace myši sáním <i>P. duboscqi</i>	53
4.2.2	Vliv imunizace sáním <i>P. duboscqi</i> na proliferaci splenocytů	53
4.2.3	Vliv imunizace sáním <i>P. duboscqi</i> na produkci NO makrofágy	54
4.2.4	Vliv imunizace sáním <i>P. duboscqi</i> na produkci cytokinů IFN- γ a IL-4	55
4.3	Specifita antigenů slinných žláz <i>P. sergenti</i> , <i>P. arabicus</i> a <i>P. papatasi</i>	56
4.3.1	Elektroforetické profily slinných žláz <i>P. sergenti</i> , <i>P. arabicus</i> a <i>P. papatasi</i>	56
4.3.2	Charakterizace antigenů ve slinách <i>P. sergenti</i> , <i>P. arabicus</i> a <i>P. papatasi</i> pomocí imunoblotu	58
5.	DISKUZE	63
6.	SHRNUTÍ	70
7.	POUŽITÁ LITERATURA	71

SEZNAM ZKRATEK

<i>Ae.</i>	<i>Aedes</i>
Ara	<i>P. arabicus</i>
BALB/c	myši imbrední kmen citlivý na leishmaniózu
bb	buňky
CBA	myši imbrední kmen rezistentní na leishmaniózu
ConA	konkanavalin A
<i>Cu.</i>	<i>Culex</i>
Dub	<i>P. duboscqi</i>
DTH	delayed type hypersensitivity
FCS	fetální telecí sérum
GM-CSF	granulocyte monocyte colony stimulating factor
HLA-DR	human leukocyte antigen
IFN	interferon
IL	interleukin
<i>L.</i>	<i>Lutzomyia</i>
<i>Le.</i>	<i>Leishmania</i>
LPS	lipopolysacharid
OVA	ovalbumin
<i>P.</i>	<i>Phlebotomus</i>
Pap	<i>P. papatasi</i>
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
Per	<i>P. perniciosus</i>
PGE	prostaglandin
Th lymfocyty	Thymus helper lymfocyty
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor nekrotizující faktor
SGE	lyzát slinných žláz
SGH	homogenát slinných žláz
SGL	extrakt slinných žláz
SE	střední chyba průměru
Ser	<i>P. sergenti</i>
SI	stimulační index

1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Flebotomové jsou krevsající dvoukřídlý hmyz, který přenáší jedno z 10 nejzávažnějších infekčních onemocnění na světě, registrovaných WHO – leishmaniózu. Toto onemocnění je způsobeno prvoky rodu *Leishmania* přenášených mezi savci spolu s krví nasátou flebotomy.

Přenos leishmanií je kromě jiných faktorů ovlivněn také slinami flebotomů, kterou jsou během sání vstříknuty do rány. Již delší dobu je známo, že sliny krevsajících členovců mají antihemostatické a vazodilatační účinky, které napomáhají sání na hostiteli (shrnutí v Ribeiro 1987). Ovšem až poměrně nedávno byla objevena schopnost slin zefektivnit přenos a rozvoj infekčních chorob, což dělá z těchto členovců mnohem víc než jen injekční stříkačky pro vpravení infekčních agens. Tento efekt slin krevsajících členovců se v anglicky psané literatuře označuje jako tzv. „enhancing effect“ nebo také „saliva activated transmission“. V souvislosti s ním byla objevena schopnost působit také na imunitní systém hostitele od složek přirozené imunity po imunitu získanou (shrnutí v Andrade *et al.* 2005).

V poslední době bylo prokázáno, že u opakovaně pobodaných hostitelů vyvolávají sliny flebotomů imunitní reakci, která znesnadňuje či dokonce znemožňuje přenos leishmaniózy a souvisí s navozením DTH a nasměrování imunity k Th1 odpovědi. Zároveň je ale stimulována produkce protilátek proti slinám, u kterých význam při přenosu leishmaniózy není jednoznačně objasněn (shrnutí v Oliveira *et al.* 2009).

Mnoho nejasností panuje také okolo konkrétních efektorových mechanismů navozujících protekci a vše komplikuje velké kombinací vektor-patogen. Proto jsem se v této diplomové práci zaměřil na porovnání vlivu slin více druhů flebotomů a vlivu imunizace slinami na různé složky imunitní odpovědi – proliferaci T-lymfocytů, produkci cytokinů a NO a také protilátek, a to jak u neinfikovaného hostitele - myši, tak u myši infikovaných *Le. major*. Dále pak byly blíže charakterizovány antigeny ve slinách vybraných druhů flebotomů.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Rozdělení cytokinů a protilátek

2.1.1 Rozdělení cytokinů

Cytokiny jsou tkáňové hormony a jejich funkcí je přenos informace mezi buňkami. Nejlépe prostudované jsou cytokiny účastníci se regulace imunitního systému. Jde o rozpustné proteiny, většinou glykosylované, o molekulové velikosti 10 – 25 kDa. Cytokiny se dělí do mnoha strukturních a funkčních tříd. Pro účely této práce se budeme držet následujícího rozdělení (shrnutí v Klein a Hořejší 1997):

prozánětlivé cytokiny	IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 a TNF
protizánětlivé cytokiny	IL-1Ra, IL-4, IL-10 a TGF- β
cytokiny Th2 odpovědi	IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13
cytokiny Th1 odpovědi	IL-2, IL-12, IFN- γ a GM-CSF
hematopoetiny	IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF a další
antivirové cytokiny	IFN- α , IFN- β a IFN- γ
chemokiny	např. IL-8

(IL = interleukin, TNF = tumor nekrotizující faktor, TGF = transformující růstový faktor, IFN = interferon, GM-CSF = faktor stimulující kolonie granulocytů a monocytů, IL-1Ra – antagonist receptoru pro IL-1)

Jednotlivé cytokiny jsou produkovány různými buňkami imunitního systému, pro naše účely bude dostatečná informace, že IL-1 produkují makrofágy a neutrofilů IL-2 Th1 lymfocyty, IL-3 je produkován také Th1 buňkami, IL-4 je produkován Th2 lymfocyty a bazofily, IL-5 Th2 lymfocyty a eosinofily (jde o růstový faktor eosinofilů), IL-6 Th2 lymfocyty, makrofágy a neutrofilů, IL-8 různé typy buněk, IL-10 Th2 lymfocyty, makrofágy a neutrofilů, IL-12 produkují makrofágy, IFN- γ Th1 lymfocyty a NK buňky, TNF- α monocytů, makrofágy a NK buňky a TGF- β T-lymfocyty, makrofágy a trombocyty (shrnutí v Klein a Hořejší 1997).

Cytokiny Th2 odpovědi IL-4, IL-10 inhibují Th1 odpověď. Cytokin Th1 odpovědi IFN- γ blokuje zase naopak Th2 odpověď.

2.1.2 Protilátky

Protilátky neboli imunoglobuliny se u savců dělí na 5 tříd – IgA, IgD, IgG, IgM a IgE (shrnuto v Klein a Hořejší 1997). Opakované sání krevsajícího hmyzu vyvolá produkci protilátek tříd IgM, IgG a IgE – viz kapitola 2.3.5 a 2.4.3.2.

Protilátky třídy IgM jsou první třídou, která je po kontaktu s antigenem produkována do krve a bývají málo specifické a tudíž účinné. Dobře však aktivují komplement.

Protilátky třídy IgG se v těle (v krvi i tělních sekretech) vyskytují nejčastěji. U lidí se dělí na čtyři podtřídy: IgG1, IgG2, IgG3 a IgG4, u myší jsou také čtyři, ale označují se ale IgG1, IgG2a, IgG2b a IgG3, jelikož IgG2a a 2b jsou si strukturně velice podobné. Různé podtřídy se různě silně vážou se na Fc receptor fagocytických buněk (IgG1, IgG3 > IgG4 >> IgG2) a jsou schopné různě intenzivně aktivovat komplement (IgG3 > IgG1 > IgG2 >> IgG4). Jejich další funkcí je neutralizace aktivních míst enzymů. Protilátky třídy IgG2 u myší IgG2a) jsou indikátorem Th1 odpovědi, protilátky třídy IgG1 Th2 odpovědi. Jsou přítomné při hypersenzitivitě II. (cytotoxicita závislá na protilátkách) a III. typu (ukládání imunokomplexů v orgánech)

Protilátky třídy IgE se silně vážou na receptory na povrchu žírných buněk a bazofilních granulocytů. Jsou důležité při hypersenzitivitě I. typu neboli alergii. Neaktivují komplement (shrnuto v Klein a Hořejší 1997).

2.2 Antihemostatické aktivita slin flebotomů a komárů

Slinné žlázy samic flebotomů obsahují spektrum biologicky aktivních molekul, z nichž nejvíce prostudovány jsou apyráza a maxadilan. Apyráza brání agregaci krevních destiček a její biochemický účinek spočívá v hydrolýze ATP a ADP na AMP a anorganický fosfát (Ribeiro *et al.* 1995). Přítomnost apyrázy byla zdokumentována ve slinách rodů *Lutzomyia* i *Phlebotomus* a kromě toho u mnoha jiných skupin krevsajících členovců (Ribeiro *et al.* 1995). Hydrolázovou aktivitu mohou mít proteiny ze tří různých enzymatických rodin: 5'-nukleotidázy, aktin/hsp70/sacharidové kinázy a apyráza, která je charakterizovaná vlastnostmi apyrázy *Cimex lectularius* – mezi ty patří i apyráza *P. papatasi* (Valenzuela *et al.* 2001b).

Na rozdíl od apyrázy je maxadilan přítomný pouze ve slinách *L. longipalpis*. Jedná se o peptid, který byl objeven jako tzv. EIF = erythema inducing factor, faktor působící zarudnutí kůže (Ribeiro *et al.* 1986). Jeho hlavní funkcí je totiž schopnost vazodilatace, která funguje na podobném principu jako u CGRP (calcitonin gene-related peptide – peptid, jehož gen je příbuzný hormonu štítné žlázy kalcitoninu). Obě látky vyvolávají v kůži dlouho přetrvávající vazodilataci a relaxaci již stažených cév, a to aniž by působili svědění či edém (Lerner & Shoemaker 1992). Mechanismus působení maxadilanu je založen na tom, že je agonistou receptoru typu I pro PACAP (pituitary adenylyl cyclase activating peptide – peptid aktivující hypofyzální adenylyl cyklázu), tedy kompetuje o vazebné místo pro PACAP (Moro & Lerner 1997).

Dlouhou dobu nebyla známá substance zodpovědná za vazodilatační účinek slin rodu *Phlebotomus*. Až Ribeiro *et al.* (1999) prokázali ve žlázách *P. papatasi* adenosin a jeho prekurzor 5'AMP. Obě látky jsou známy tím, že mají vazodilatační účinky (Collis 1989) a také brání agregaci krevních destiček (Dionisotti *et al.* 1992).

V cDNA knihovně *L. longipalpis* byly nalezeny další enzymy: 5'-nukleotidáza s fosfodiesterázovou aktivitou, hyaluronidáza, anti-clotting protein a α -amyláza (Charlab *et al.* 1999). 5'-nukleotidáza je enzym s apyrázovou aktivitou, hyaluronidáza štěpí hyaluronovou kyselinu, což je molekula o vysoké molekulové hmotnosti vyskytující se v extracelulární matrix u obratlovců. Svoji aktivitou by enzym mohl napomáhat zvětšení potravní léze a šíření antihemostatických složek slin a případného patogena do jejího okolí (Ribeiro *et al.* 2000). Dále byla ve slinách *L. longipalpis* prokázána přítomnost adenosin deaminázy, která degraduje adenosin na inozin, který je relativně neúčinný při inhibici

hemostatických procesů, ale působí imunosupresivně (Charlab *et al.* 2000). Ve slinách flebotomů byla popsána také přítomnost D7 proteinů (Valenzuela *et al.* 2002), které vážou biogenní aminy, a tím ovlivňuje aktivaci koagulační kaskády (Calvo *et al.* 2006).

Ve slinách komárů je také přítomná apyráza - 5'-nukleotidáza (Champagne *et al.* 1995). Ta je hlavním efektorovým enzymem proti degranulaci krevních destiček ve slinách *Ae. aegypti*, oproti tomu *An. stephensi*, *An. albimanus* a *Cu. quinquefasciatus* produkují apyrázy málo (Ribeiro 2000). V jejich slinách je namísto toho účinná slinná peroxidáza a antitrombin účinkující na krevní destičky (Waidhet-Kouadio *et al.* 1998, Valenzuela *et al.* 1999, Ribeiro 2000). Dalšími antihemostatickými molekulami je protein proti Xa složce koagulační kaskády ve slinách *Ae. aegypti* (Stark & James 1998), platelet-activating faktor, který hydrolyzuje fosfolipázu C potřebnou pro agregaci trombocytů ve slinách *Cu. quinquefasciatus* (Ribeiro JMC & Francischetti 2001) a adenosin deamináza a nukleozidáza ve slinách *Ae. aegypti* a *Cu. quinquefasciatus* (Ribeiro *et al.* 2001, Ribeiro & Valenzuela 2003). Nejhojnějšími proteiny ve slinách mnoha druhů komárů jsou proteiny z rodiny D7, která je hodně různorodá a předpokládá se, že jednotlivé proteiny mají odlišné funkce, o kterých toho však není mnoho známo (Valenzuela *et al.* 2002).

2.3 Imunitní odpověď na sliny flebotomů

2.3.1 Vliv slin flebotomů na imunitní systém naivního hostitele

Sliny flebotomů mají široké spektrum imunomodulačních účinků od složek přirozené imunity jako je komplement, migrace leukocytů a také produkci NO v makrofázích, která už je na pomezí se získanou imunitou – do té se pak řadí proliferace T-lymfocytů, produkce cytokinů, prezentace antigenů a exprese kostimulačních molekul na povrchu antigen prezentujících buněk (shrnutí v Oliveira *et al.* 2009).

2.3.1.1 Komplement a migrace zánětlivých buněk

Vliv na komplement byl prokázán pro dva druhy – *L. longipalpis* a *L. migonei* (Cavalcante *et al.* 2003). Sliny *L. longipalpis* byly schopné inhibovat jak klasickou, tak alternativní cestu aktivace komplementu, sliny *L. migonei* pouze klasickou cestu. Jako inhibitor byl identifikován termostabilní protein o velikosti 10-30 kDa a protilátky proti slinám *L. longipalpis* byly schopné tento efekt slin částečně zrušit (Cavalcante *et al.* 2003).

Dále byl prokázán účinek slin flebotomů na migraci leukocytů. Co se týče efektu na chemotaxi, slinné žlázy *P. duboscqi* (Anjili *et al.* 1995), *P. papatasi* i *L. longipalpis* (Zer *et al.* 2001) byly chemotaktické pro myši monocyty/makrofágy. V případě *L. longipalpis* to však nebylo potvrzeno pro myši kmene C57BL/6 (Teixeira *et al.* 2005). Naproti tomu v pozdější studii Carregaro *et al.* (2008) byly slinné žlázy *P. papatasi* a *P. duboscqi* u ovalbuminem imunizovaných myši (Balb/c i C57BL/6) schopné zrušit migraci neutrofilů, makrofágů, B-lymfocytů a CD4+ i CD8+ T-lymfocytů, pouze u eozinofilů byla zvýšena migrace do peritoneální dutiny.

2.3.1.2 Inhibice proliferace T-lymfocytů, vliv na kostimulační molekuly a produkci NO

Homogenát slinných žláz druhu *L. longipalpis* inhibuje nescifickou proliferaci myších splenocytů stimulovaných jak *in vitro* pomocí mitogenu konkanavalinu A (Titus 1998, Rohoušová *et al.* 2005a), tak *in vivo* ovčími erytrocyty (Titus 1998).

Maxadilan je peptid, který se vyskytuje pouze ve slinách *L. longipalpis*. Kromě vazodilatačních má maxadilan i imunomodulační účinky. Maxadilan stejně jako celý homogenát slinných žláz inhiboval proliferaci splenocytů stimulovaných jak konkanavalinem A, tak i anti-TCR protilátkami (dojde tak k prokřížení TCR, v důsledku čehož se T-lymfocyty navzájem stimulují k proliferaci produkcí IL-2) (Qureshi *et al.* 1996).

Také homogenát slinných žláz rodu *Phlebotomus* má schopnost inhibovat proliferaci T-lymfocytů (Rohoušová *et al.* 2005a, Carregaro *et al.* 2008). Žlázy *P. papatasi* a *P. sergenti* inhibovaly proliferaci konkanavalinem A stimulovaných splenocytů stejně účinně jako žlázy *L. longipalpis*, a to při přidání kterékoli ze tří testovaných koncentrací žláz (Rohoušová *et al.* 2005a). Také u ovalbuminem imunizovaných myších byly žlázy *P. papatasi* a *P. duboscqi* schopné redukovat proliferaci splenocytů (Carregaro *et al.* 2008).

Qureshi *et al.* (1996) zkoumali schopnost maxadilanu ovlivnit aloantigenní prezentaci pomocí směsné lymfocytární reakce. Potvrdili přímý vliv maxadilanu na T-lymfocyty, ale i na antigen prezentující buňky. Snížení úrovně proliferace i v případě vymytí maxadilanu před vlastní reakcí mezi buňkami poukazuje na dlouhodobější působení maxadilanu. Byla provedena ještě jedna podobná metoda – smíšená reakce Langerhansových buněk (jde o kožní typ dendritických buněk) a lymfocytů, přičemž byl opět dosažen pokles úrovně proliferace T-lymfocytů. To by mohlo vysvětlovat, proč maxadilan sám o sobě v kůži působí pouze vznik erytému, ale nikoli edému a svědění (Ribeiro *et al.* 1986), k čemuž právě snížená úroveň aloantigenní prezentace mezi epiteliálními buňkami a T-lymfocyty přispívá. Qureshi *et al.* (1996) také prokázali, že imunomodulační účinky maxadilanu jsou stejně jako ty vazodilatační zprostředkovány přes signalizační dráhu se sekundárním poslem cAMP – uměle zvýšená hladina cAMP měla na myši makrofágy stejný účinek jako maxadilan.

Homogenát slinných žláz *L. longipalpis* měl také vliv na expresi povrchových kostimulačních molekul (Costa *et al.* 2004), které se podílejí na přenosu signálu mezi MHC molekulami a T-receptorem během mezibuněčného kontaktu antigen prezentující buňky s T-lymfocytem, a dále také na expresi MHC molekul II. třídy. Šlo konkrétně o CD80, CD86 (ligandy receptoru CD28 na T-lymfocytech) a HLA-DR (jeden z klasických MHC glykoproteinů II. třídy) u lidských monocytů, makrofágů a dendritických buněk. U monocytů a makrofágů došlo ke snížení exprese CD80, ale zároveň ke zvýšení exprese HLA-DR. U samotných monocytů došlo dále ke zvýšení exprese CD86. U dendritických buněk byly inhibovány všechny sledované kostimulační molekuly, ovšem pouze v případě,

že byly se slinami inkubovány již PBMC, ze kterých se vyvíjejí, pokud již byly diferencované, žádný efekt pozorován nebyl (Costa *et al.* 2004). Inhibiční efekt měl na expresi CD80 a CD86 u dendritických buněk také maxadilan (Wheat *et al.* 2008), sliny *P. papatasi* inhibovaly expresi CD86 a také MHC II molekul (Carregaro *et al.* 2008).

Studován byl také účinek slin flebotomů na efektorový mechanismus, kterým aktivované makrofágy zabíjejí pohlcené leishmanie, tedy produkce NO (Waitumbi a Warburg 1998, Katz *et al.* 2000). Sliny *P. papatasi* byly schopné snížit expresi genu pro iNOS (inducibilní NO syntáza) a tím i produkci NO v myších makrofázích (Waitumbi a Warburg 1998, Katz *et al.* 2000). Tento efekt však nebyl pozorován v případě použití slin *L. longipalpis* (Katz *et al.* 2000). Děje se tak zřejmě přes inhibici protein fosfatázy 1 a protein fosfatázy 2a, které přenášejí v buňce příslušný signál do jádra (Waitumbi a Warburg 1998) a tímto inhibitorem by mohl být adenosin, který jako jedna ze složek slin *P. papatasi* také snižuje expresi genu pro iNOS v aktivovaných makrofázích (Katz *et al.* 2000).

2.3.1.3 Ovlivnění produkce cytokinů

Dalším z imunomodulačních účinků slin *L. longipalpis* je vliv na produkci cytokinů (Costa *et al.* 2004, Rohoušová *et al.* 2005a). Cytokiny TNF- α , IL-12p40, IL-10, IL-8 a IL-6 byly studovány na lidských monocitech, makrofázích a dendritických buňkách inkubovaných s homogenátem slinných žláz *L. longipalpis* v přítomnosti bakteriálního LPS, přičemž změna v produkci byla pozorována pouze u monocytů (Costa *et al.* 2004). Cytokiny IFN- γ , IL-2 a IL-4 byly studovány *in vitro* na myších slezinných buňkách stimulovaných mitogenem konkanavalinem A (Rohoušová *et al.* 2005a). Během prvních 48 hodin inkubace imunitních buněk v přítomnosti slinných žláz *L. longipalpis* byl prokázán vliv na produkci všech sledovaných cytokinů. Na cytokiny Th1 odpovědi (IFN- γ a IL-2) měly sliny *L. longipalpis* převážně tlumivý vliv (Rohoušová *et al.* 2005a). Produkce IL-12p40 byla oproti tomu zvýšena, nejde však o funkční IL-12, jen o jeho podjednotku, která sama o sobě může mít spíše opačný efekt než IL-12 (Klein a Hořejší 1999). Produkce prozánětlivých cytokinů IL-6 a IL-8 byla zvýšena, oproti tomu produkci TNF- α sliny naopak inhibovaly (Costa *et al.* 2004). Z cytokinů Th2 odpovědi byly studovány IL-10 (Costa *et al.* 2004) a IL-4 (Rohoušová *et al.* 2005a), jejichž produkce byla vlivem slin snížena.

Vliv na produkci cytokinů byl studován také u samotného maxadilanu, tentokrát ovšem jen na cytokinech produkovaných mononukleárními fagocyty – monocyty a makrofágy (Bozza *et al.* 1998, Soares *et al.* 1998, Rogers a Titus 2003) a dendritickými buňkami (Wheat *et al.* 2008).

Maxadilan měl stimulační účinky na produkci cytokinů IL-6 (Bozza *et al.* 1998, Soares *et al.* 1998, Rogers a Titus 2003) a IL-10 (Bozza *et al.* 1998) a prozánětlivého prostaglandinu PGE₂ (Soares *et al.* 1998). Rogers a Titus (2003) dále prokázali, že vazodilatační aktivita maxadilanu je esenciální pro jeho působení na produkci IL-6, neboť v případě, kdy byl aplikován mutovaný rekombinantní maxadilan bez této aktivity, k inhibici produkce IL-6 nedošlo. V případě IL-10 byla stimulace slinami *L. longipalpis* natolik účinná, že zabránila endotoxinovému šoku, který LPS působí. Mechanismus, který šok potlačil, je závislý právě na přítomnosti IL-10, neboť myši, které měly inaktivovaný gen kódující IL-10, nebyly vůči šoku rezistentní (Bozza *et al.* 1998).

Maxadilan inhibuje také produkci prozánětlivého TNF- α , a to *in vitro* u lidských LPS-stimulovaných PBMC a monocytů (Rogers a Titus 2003) a u myších LPS-stimulovaných makrofágů (Soares *et al.* 1998), ale také *in vivo* u myší, jimž bylo LPS podáno intravenózně (Bozza *et al.* 1998). Co se mechanismu inhibice produkce TNF- α týče, může jít o přímý vliv maxadilanu na produkci TNF- α nebo o stimulaci produkce IL-10, prostaglandinu PGE₂ a/nebo IL-6, které samy o sobě působí inhibici tohoto cytokinu (Soares *et al.* 1998). V dalších experimentech proto byly použity anti-IL-10 a anti-IL-6 protilátky a indomethacin, který potlačuje produkci PGE₂. Bylo tak potvrzeno, že vliv maxadilanu na produkci TNF- α je závislý na PGE₂ (Soares *et al.* 1998).

Na rozdíl od homogenátu celých žláz maxadilan inhiboval produkci IL-12p40, a to u lidských LPS-stimulovaných PBMC. K inhibici celého IL-12 (IL-12p70) nedošlo (Rogers a Titus 2003).

V případě dendritických buněk maxadilan podobně jako u monocytů a makrofágů stimuloval produkci cytokinů IL-6 a IL-10 a redukoval produkci cytokinů IL-12p40, TNF- α a IFN- γ , pokud byly dendritické buňky stimulovány pomocí LPS (Wheat *et al.* 2008). Pokud byly stimulovány alogenními CD4⁺ T-lymfocyty, byl trend opět podobný – produkce IL-6 a IL-13 se zvýšila, zato produkce IFN- γ a TNF- α poklesla (Wheat *et al.* 2008).

Vliv slin na cytokinovou odpověď flebotomů rodu *Phlebotomus* byl měřen u myších splenocytů stimulovaných *in vitro* mitogenem konkanavalinem A (Rohoušová *et al.* 2005a) a lidských monocytů stimulovaných LPS (Rogers a Titus 2003). U obou

testovaných druhů flebotomů - *P. papatasi* a *P. sergenti* - došlo k inhibici produkce Th1 i Th2 cytokinů produkovaných T-lymfocyty: IFN- γ , IL-2 a IL-4 (Rohoušová *et al.* 2005a). Je však třeba dodat, že produkce IL-2 byla inhibována pouze při 24 hodinové inkubaci, při 48 hodinové nedošlo ani u jednoho z druhů flebotomů k signifikantnímu útlumu a při 72 hodinové inkubaci došlo dokonce k vzestupu produkce. V případě IL-4 došlo k inhibici při 24 a 48 hodinové inkubaci, v případě IFN- γ ve všech třech uvedených časech. Dalším měřeným cytokinem byl IL-6, jehož hladina byla zvýšena u lidských monocytů inkubovaných s homogenátem slinných žláz *P. papatasi* (Rogers a Titus 2003).

2.3.2 Vliv slin flebotomů na přenos leishmaniové infekce

Leishmanie jsou v obratlovcích intracelulárními parazity makrofágů, které je ovšem jsou schopné zabít pomocí NO poté co jsou aktivovány IFN- γ produkovaného Th1 lymfocyty (shrnutí v Andrade *et al.* 2005). Průkopníky v odhalování významu slin flebotomů na přenos leishmanií jsou Titus a Ribeiro (1988), kteří jako první prokázali, že sliny *L. longipalpis* zesilují infekci parazitem *Le. major*, a to jak v případě zvětšení velikosti kožních lézí – byly měřeny na myších kmenech rezistentních i vnímavých k leishmanióze (CBA a BALB/c), tak v množství parazitů, které obsahovaly. Zajímavým zjištěním bylo, že efekt na infekci byl nejvýraznější v případě podání malých množství parazitů (100 nebo 10 promastigotů). Titus a Ribeiro (1988) ve svých pokusech zároveň potvrdili, že sliny jiných skupin krevsajících členovců nemají vliv na průběh leishmaniové infekce, konkrétně šlo o sliny komára *Aedes aegypti*, ploštice *Rhodnius prolixus* a klíštěte *Ixodes dammini*. Homogenát slinných žláz *L. longipalpis* zhoršuje nejenom průběh infekce *Le. major* (Titus a Ribeiro 1988, Theodos *et al.* 1991, Theodos a Titus 1993, Warburg *et al.* 1994), ale též infekci *Le. mexicana amazonensis* (Theodos *et al.* 1991, Samuelson *et al.* 1991, Laurenti *et al.* 2009), *Le. braziliensis* (Samuelson *et al.* 1991, Lima a Titus 1996, Donnelly *et al.* 1998, Bezerra a Teixeira 2001) i *Le. chagasi* (Warburg *et al.* 1994).

Vliv maxadilanu – důležité vazodilatační komponenty slin *L. longipalpis* – na velikost lézí u myši a počet parazitů druhu *Le. major* v nich byl seznán stejně silným jako v případě celého extraktu slinných žláz (Morris *et al.* 2001). Dále bylo prokázáno, že vazodilatační aktivita maxadilanu zřejmě souvisí s typem leishmaniózy – viscerální nebo kožní. Srovnáním účinků slin tří populací *L. longipalpis* došli Warburg *et al.* (1994) k závěru, že leishmanie přenášené flebotomy s nízkou vazodilatační aktivitou infikují

převážně kožní makrofágy a způsobují tak kožní lézi. Pokud je ovšem stejný parazit injikován se slinami obsahujícími větší množství maxadilanu, místo sání může infiltrovat více cirkulujících monocytů, kteří zprostředkují časnou visceralizaci infekce (Warburg *et al.* 1994).

Byl potvrzen i proinfekční vliv slin druhu *P. papatasi*, a to jak na velikost kožních lézí způsobených *Le. major* u myší, tak na množství parazitů v lézích (Theodos *et al.* 1991, Belkaid *et al.* 1998). Mbow *et al.* (1998) dále zjistili, že sliny *P. papatasi* mají na velikost lézí a množství parazitů v nich stejný efekt jako sliny *L. longipalpis*. Na rozdíl od experimentu s *Le. infantum* (Zer *et al.* 2001) sliny *P. papatasi* neovlivnily množství *Le. major* pohlcených makrofágy, zato snížily schopnost IFN- γ aktivovat makrofágy a tím zabránily zabíjení leishmanií (Hall a Titus 1995).

2.3.3 Vliv slin flebotomů na imunitní systém hostitele infikovaného leishmaniemi

2.3.3.1 *Lutzomyia longipalpis*

Sliny *L. longipalpis* měly vliv na hladinu cytokinů produkovaných T-lymfocyty v myších infikovaných *Le. braziliensis* (Lima a Titus 1996), *Le. amazonensis* (Norsworthy *et al.* 2004) a *Le. major* (Theodos a Titus 1993, Monteiro *et al.* 2007). V případě *Le. braziliensis* šlo o zvýšení hladiny IL-4 - buňky lymfatických uzlin z okolí léze sekretovaly v přítomnosti slin 2-3krát více tohoto cytokinu. Jeho vliv na infekci byl natolik silný, že anti-IL-4 protilátky efekt slin plně zrušily. Na sekreci jiných cytokinů (IL-2, IL-10, IFN- γ a TNF- α) však neměly sliny žádný vliv (Lima a Titus 1996). Také v případě infekce *Le. amazonensis* produkovaly buňky lymfatických uzlin preinkubované se slinami více IL-4, avšak průběh infekce byl ovlivněn spíše vysokými hladinami IL-10 (Norsworthy *et al.* 2004). V případě dalších cytokinů (IL-2, IL-6, TNF- α a IFN- γ) již ke změně produkce nedošlo. Sliny *L. longipalpis* byly při infekci *Le. major* myší Balb/c a C57BL/6 schopné navodit vyšší produkci IL-10 než IFN- γ (Monteiro *et al.* 2007).

Byla též pozorována snížená produkce NO u makrofágů, které byly před infekcí *Le. amazonensis* vystaveny SGE *L. longipalpis* (Norsworthy *et al.* 2004). Při *in vitro* pokusu s *Le. infantum* a slinami *L. longipalpis* a *P. papatasi* byl dále pozorován zvýšený podíl infikovaných makrofágů a množství parazitů v nich (Zer *et al.* 2001). Theodos a Titus

(1993) dokázali, že homogenát slinných žláz druhu *L. longipalpis* inhibuje u myších makrofágů schopnost prezentace antigenů *Le. major* T-lymfocytům, a to i v případě, kdy makrofágy byly s homogenátem slinných žláz preinkubovány a před kontaktem s T-lymfocyty byl homogenát odmyt (Theodos a Titus 1993).

Co se buněčné odpovědi dále týče, lyzát slinných žláz *L. longipalpis* výrazně modifikuje zastoupení buněk během zánětlivé odpovědi při infekci *Le. braziliensis* (Donnelly *et al.* 1998) a *Le. major* (Monteiro *et al.* 2007). V první fázi infekce *Le. braziliensis* se v kožních lézích pokusných i kontrolních myší objevují infiltráty neutrofilů, eozinofilů a histiocytů. Účinek lyzátu se později projevil četnou a neorganizovanou akumulací intenzívně parazitovaných epiteloidních makrofágů, trvalou přítomností neutrofilů a eozinofilů v lézi a minimální fibroplázií (Donnelly *et al.* 1998). Infekce *Le. major* spojená s podáním SGS *L. longipalpis* do peritoneální dutiny myší BALB/c a C57BL/6 také vedla k zánětlivé reakci sestávající z neutrofilů, eozinofilů a CD4+ T-lymfocytů (Monteiro *et al.* 2007).

Vliv maxadilanu byl prokázán u leukocytů stimulovaných *in vitro* promastigoty druhu *Le. major*. Maxadilan inhiboval produkci IFN- γ a IL-12p40 a stimuloval produkci IL-6 u lidských PBMC (Rogers a Titus 2003).

2.3.3.2 *Phlebotomus papatasi*

Homogenát slinných žláz *P. papatasi* má rovněž vliv na průběh leishmaniové infekce. Jeho vliv na cytokinovou odpověď hostitele byl sledován na modelu *P. papatasi* – *Le. major* (Theodos *et al.* 1991, Hall a Titus 1995, Belkaid *et al.* 1998, Mbow *et al.* 1998, Rogers a Titus 2003), což je na rozdíl od *L. longipalpis* přirozená kombinace vektor-parazit.

Z cytokinů Th1 odpovědi byla snížena exprese IFN- γ a IL-12 mRNA v mízních uzlinách infikovaných myší (Mbow *et al.* 1998). Ke snížení produkce IFN- γ došlo také u lidských PBMC stimulovaných promastigoty (Rogers a Titus 2003). Při měření vlivu sání flebotomy, a nikoli aplikace homogenátu slinných žláz, došlo k stimulaci IL-2 a dokonce mírnému zvýšení produkce IFN- γ (Kamhawi *et al.* 2000). Poslední z testovaných Th1 cytokinů, jehož produkci homogenát slinných žláz ovlivnil, a to tak, že zvýšil, byl GM-CSF (Belkaid *et al.* 1998). Lyzát slinných žláz stimuloval také produkci prozánětlivého IL-6 u monocytů stimulovaných promastigoty *Le. major* (Rogers a Titus 2003) a při sání

infikovaných flebotomů došlo ke zvýšení produkce IL-3, cytokinu s funkcí růstového faktoru (Kamhawi *et al.* 2000).

Sliny *P. papatasi* mají vliv i na produkci Th2 cytokinů. U myší infikovaných *Le. major* došlo v přítomnosti slin k stimulaci produkce IL-4 (Belkaid *et al.* 1998, Mbow *et al.* 1998). Jedná se zřejmě o klíčový cytokin efektu slinných žláz na leishmaniózu; u IL-4 deficitních myší neměl lyzát slinných žláz žádný vliv na průběh leishmaniózy (Belkaid *et al.* 1998). Kamhawi *et al.* (2000) však prokázali, že při sání infikovaných *P. papatasi* nedochází u hostitele k vyvolání časné IL-4 odpovědi. Rozdíl imunitní odpovědi infikovaného hostitele na přirozenou dávku slin a "umělou" dávku lyzátu slin autoři vysvětlují tím, že látka zodpovědná za zvýšenou produkci IL-4 je zřejmě přítomna v lyzátu žláz, ale ne ve slinách. Z dalších Th2 cytokinů došlo ke zvýšení produkce IL-5 (Belkaid *et al.* 1998), nebyla však pozorována změna v produkci IL-10 a TGF- β (Mbow *et al.* 1998).

Sliny *P. papatasi*, jak je uvedeno výše, způsobily snížení schopnosti infikovaných makrofágů zabít amastigoty *Le. major* tím, že snížily citlivost makrofágů k IFN- γ . Tato inhibice korelovala s redukcí produkce NO (Hall a Titus 1995).

2.3.4. Buněčná a cytokinová odpověď na imunizaci slinami flebotomů

2.3.4.1 Účinek imunizace všemi komponenty slin najednou

Imunizace slinami flebotomů ovlivňuje míru infiltrace zánětlivých buněk v místě vpichu slin. Tato zánětlivá odpověď vyvolaná opakovaným sáním je známý jev, který je klinicky označován jako tzv. harara (podle Belkaid *et al.* 2000), který se vyskytuje u flebotomů rodu *Phlebotomus*, u rodu *Lutzomyia* bylo původně prokázáno, že po poštípání dochází pouze k erytému, nikoli k edému (Ribeiro *et al.* 1986), nověji však byly prokázány i některé projevy edému (Vinhas *et al.* 2007).

Ve většině zjištěných případů se jednalo o navození DTH neboli oddáleného typu hypersenzitivity, která je založena především na infiltraci mononukleárních fagocytů aktivovaných Th1 lymfocyty po jejich opakované stimulaci (Belkaid *et al.* 2000, Silva *et al.* 2005, Teixeira *et al.* 2005, de Moura *et al.* 2007, Vinhas *et al.* 2007). V práci Belkaid *et al.* (2000) byla tato odpověď navozena již po aplikaci dvakrát 0,2 páru slinných žláz *P. papatasi* do uší myší kmene C57BL/6 s dvoutýdenním odstupem mezi dávkami a následné stimulaci homogenátem slinných žláz (SGH) či sáním - v obou případech na opačném

uchu, než na kterém byla myš imunizována. Druhou variantou imunizace byly dvě sání *P. papatasi* (5-10 samic) na uších myši C57BL/6 se stejným časovým schématem. V obou případech byl dosažen signifikantní vzestup populace mononukleárních fagocytů, CD4 pozitivních T-lymfocytů, ale také eozinofilů, což značí, že imunitní odpověď nebyla čistě typu Th1, ale částečně i Th2. Zároveň bylo prokázáno pomocí anti-CD4 protilátek, že bez CD4⁺ T-lymfocytů ke zvýšené infiltraci zánětlivých buněk nedošlo. Jedním z cílů práce bylo ověřit hypotézu, zda-li DTH odpověď může flebotomům pomoci při sání, když se na první pohled zdá, že je pouze nepříjemným vedlejším účinkem sání. Bylo prokázáno, že v uších imunizovaných myši krev proudila rychleji a flebotomové se byli také schopni nasát rychleji než u neimunizovaných myši. Tento fakt tým Belkaid *et al.* (2000) potvrdil také na lidských dobrovolnících.

Při experimentu s opakovaným sáním *L. longipalpis* na myších kmene Balb/c ovšem také došlo k zánětlivé odpovědi (Silva *et al.* 2005). Naměřeny byly zvýšené populace neutrofilů, makrofágů a v menší míře také eozinofilů. Nejedná se tedy opět o klasickou DTH, i když ve 2. odběru vzrostl počet makrofágů a klesl počet neutrofilů. V jiné práci byl pozorován jev přesně opačný (Teixeira *et al.* 2005). U neimunizovaných myši Balb/c (Balb/c inklinují spíše k Th2 odpovědi) došlo k buněčné odpovědi na SGH podané do podkoží zad ve vzduchové bublině (tzv. air pouch model) - pozorován byl zvýšený přísun makrofágů a eozinofilů a naopak poštipání samicemi *L. longipalpis* inhibovalo přísun makrofágů. Stejný efekt mělo na naivní myši sérum s IgG specifickými proti SGH. Na myších Balb/c byl udělán podobný experiment týmem de Moura *et al.* (2007) s výsledkem zcela opačným – tj. imunizace u myši vyvolala po kontaktu s SGS zánětlivou odpověď signifikantně větší než u myši neimunizovaných. Nejednalo se ovšem o SGS druhu *L. longipalpis*, ale druhu *L. intermedia*, což bude nejspíš příčinou rozporného výsledku, neboť imunizace touto lutzomyií má jiné účinky i v jiných měřených parametrech včetně vlivu na infekci *Le. braziliensis* (viz kapitola 2.3.). Dvacet čtyři hodin po posledním vpichu SGS bylo pozorováno výrazně zvýšené zastoupení polymorfonukleárních leukocytů a méně výrazné zvýšení počtu mononukleárních leukocytů. Po 48 hodinách bylo zastoupení obou typů buněk ještě výraznější. U myši, které byly místo SGS imunizovány PBS puřem, byl přísun leukocytů signifikantně nižší. Kromě buněk byly u imunizovaných myši detekovány také zvýšené hladiny cytokinů IFN- γ a IL-4, hladina IL-10 nedoznala změny. To vše platilo jak pro Th, tak pro Tc lymfocyty (de Moura *et al.* 2007).

U naivních psů nebyla po první imunizaci sáním *L. longipalpis* pozorována žádná kožní reakce ani přísun zánětlivých buněk (Collin *et al.* 2009). Již po třetím sání byl ovšem pozorován erytém, vyrážka a zduření a nárůst počtu lymfocytů, makrofágů a eozinofilů. Co se cytokinů týče, byla pozorována jak zvýšená produkce Th1 cytokinů (IFN- γ a IL-12), tak cytokinů Th2 odpovědi (IL-4, TGF- β).

Jak je to tedy s DTH vyvolanou sáním *L. longipalpis* u lidí? Odpovědět na tuto otázku se snažili Vinhas *et al.* (2007). Experimentálním modelem se jim stala skupina šesti dobrovolníků, kteří byli vystaveni sání *L. longipalpis*. Měřena jim byla kožní reakce na sání, a to její velikost, zarudnutí, mikropapily (vyrážka) a noduly (pupínky) – měření probíhalo vždy 2 a 24 hodin po sání. Reakce na poštípání byla sice individuální, bylo však prokázáno, že sání nezpůsobuje pouze erytém, ale i mírné zduření. Po prvním sání se třem dobrovolníkům utvořil nejdříve erytém a po 24 hodinách vznikla mírná vyrážka, u zbývajících tří byla raná fáze méně výrazná, po 24 hodinách však došlo ke vzniku malých pupínků. Po dalších sáních byl průběh u všech dobrovolníků totožný. Kromě kožní reakce byla dále stanovena *in vitro* změna počtu aktivovaných Th a Tc lymfocytů získaných z mononukleárních leukocytů z periferní krve v odpovědi na SGS – u obou typů buněk došlo u imunizovaných dobrovolníků ke zmnožení oproti nestimulovaným jedincům. Pro zjištění typu Th odpovědi byla měřena také produkce IFN- γ a IL-10 u mononukleárních leukocytů z periferní krve v odpovědi na SGS – i zde došlo v obou případech k vzestupu, a to i během dalšího měření po roční pauze, kdy byly dobrovolníci znovu vystaveni sání (tzv. booster efekt). Změny od neimunizovaných jedinců nebylo ovšem doznáno v případě TNF- α .

2.3.4.2 Účinek imunizace vakcínami z jednotlivých komponent slinných žláz

Posledním tématem, kterým se vědci v souvislosti s buněčnou imunitní odpovědí na imunizaci slinami flebotomů v poslední době zabývali, byla identifikace konkrétních proteinů navozujících tuto odpověď (Valenzuela *et al.* 2001a, Oliveira *et al.* 2006, Gomes *et al.* 2008, Collin *et al.* 2009). Prvním identifikovaným proteinem byl PpSP15 ze žláz *P. papatasi*, který u myši kmene C57BL/6 vyvolával silnou DTH odpověď srovnatelnou s celým SGH (Valenzuela *et al.* 2001a). Buněčný infiltrát obsahoval zvýšené množství makrofágů, ale také neutrofilů a eozinofilů, a to 24 hodin po vystavení sání 10 flebotomů coby stimulu. Imunizace probíhala intradermálně do ucha 5 μ g DNA plazmidu dvakrát s dvoutýdenním intervalem. Velmi podrobnou práci, mající za cíl identifikování proteinů

indukujících DTH, publikoval tým Oliveira *et al.* v roce 2006. Dvanáct z celkového počtu 24 plazmidů získaných z cDNA knihovny slinných žláz *P. ariasi* (vektora *Le. infantum*) byly schopné u outbredních myší Swiss Webster vyvolat kožní zduření. Stimulem byla SGH a DTH byla stanovována 48 hodin po jeho aplikaci. Z těchto 12 plazmidů byly však pouze tři schopné vyvolat odpověď, která by byla signifikantní: ParSP25 (neznámá funkce), ParSP01 (apyráza) a ParSP03 (homolog SL1 proteinu ze slinných žláz *L. longipalpis*), z nichž nejsilnější reakci vyvolával ParSP25. Zajímavostí však je, že tyto proteiny indukující DTH vyvolávaly v některých případech Th1 odpověď (ParSP03) a v jiných Th2 odpověď (ParSP25), což bylo určeno na základě poměru IgG1 (Th2 profil) a IgG2a (Th1 profil) protilátek.

Nejnovejším příspěvkem na dané téma je práce týmu Gomes *et al.* (2008). Vědci imunizovali křečky *Mesocricetus auratus* DNA plazmidy se zaklonovanými sekvencemi proteinů ze slinných žláz *L. longipalpis*, pak na nich nechali sáť samice *L. longipalpis*, aby za 48 hodin poté mohli odebrat vzorky pro měření buněčné odpovědi. Tři z testovaných plazmidů (LJM17 – tzv. Yellow protein, LJM11 – 5' nukleotidáza a LJM19 – neznámá funkce) vyvolaly DTH odpověď se signifikantním ztluštěním ucha oproti kontrole. LJM19 byl jediným plazmidem, který indukoval silnou DTH odpověď a přitom nestimuloval produkci protilátek. DTH odpověď byla charakterizovaná infiltrací mononukleárních buněk a lymfocytů a také malým množstvím neutrofilů (Gomes *et al.* 2008). Podobně byly identifikovány 4 proteiny vyvolávající DTH u psů (Collin *et al.* 2009). Dva z nich - LJM143 a LJM17 (ani u jednoho z nich nebyla uvedena bližší identifikace) byly zkoumány podrobněji - DTH u nich sestávala jen z lymfocytů a makrofágů. U PBMC z těchto psů LJM143 stimuloval produkci IFN- γ , IL-12, IL-4 a také TGF- β podobně jako celé SGH, LJM17 pouze Th1 cytokiny IFN- γ a IL-12 (Collin *et al.* 2009).

2.3.5 Protilátková odpověď na imunizaci slinami flebotomů

Protilátková odpověď na opakované sání či podání homogenátu slinných žláz flebotomů byla zaznamenána jak u laboratorních zvířat (Volf a Rohoušová 2001, Rohoušová *et al.* 2005b, Silva *et al.* 2005, Thiakaki *et al.* 2005, Oliveira *et al.* 2006, de Moura *et al.* 2007, Gomes *et al.* 2008, Hostomská *et al.* 2008), tak u lidí – dobrovolníků (Vinhas *et al.* 2007) i obyvatel endemických oblastí leishmaniózy (Barral *et al.* 2000, Gomes *et al.* 2002, Rohoušová *et al.* 2005b, de Moura *et al.* 2007), přičemž všechny tyto

práce se zabývají především protilátkami třídy IgG. Jednalo se o imunizace jak druhy rodu *Phlebotomus*, tak *Lutzomyia* – viz tabulka 2.1.

Kromě celých slinných žláz byla produkci IgG protilátek schopná vyvolat i imunizace některými cDNA plazmidy z knihovny slinných žláz *L. longipalpis* u křečků druhu *Mesocricetus auratus* (Gomes *et al.* 2008). Byly to plazmidy označené jako LJM11 (43,2 kDa, Yellow protein), LJM17 (45,2 kDa, Yellow protein) a LJM11 (60,6 kDa, 5'-nukleotidáza). Slabou protilátkovou odpověď byl schopen navodit též maxadilan (6,9 kDa), LJM04 (13,8 kDa, neznámá funkce) a LJM111 (43 kDa, Yellow protein). Pro srovnání antigeny, které byly rozeznány pomocí imunoblotu sér z myši Balb/c imunizovaných sáním *L. longipalpis*: 15, 44, 45 kDa (Silva *et al.* 2005). Potvrzení, že preexpozice k maxadilanu také vyvolává produkci protilátek bylo potvrzeno ještě v další nezávislé práci (Morris *et al.* 2001).

Některé práce pak popisují zastoupení konkrétních podtříd IgG protilátek proti slinám flebotomů (Gomes *et al.* 2002, Silva *et al.* 2005, Oliveira *et al.* 2006, de Moura *et al.* 2007, Vinhas *et al.* 2007, Hostomská *et al.* 2008, Collin *et al.* 2009). U myši Balb/c imunizovaných sáním *L. longipalpis* byly nejvíce zastoupeny protilátky podtřídy IgG1, které jsou důsledkem polarizace k Th2 imunitní odpovědi, zatímco IgG2a a IgG2b byly sotva detekovatelné (Silva *et al.* 2005). Při imunizaci příbuzným druhem *L. intermedia* byly opět zaznamenány signifikantně zvýšené titry protilátek IgG1, nikoli však IgG2a ani IgG2b (de Moura *et al.* 2007). To potvrzuje protilátková odpověď na experimentální poštipání lidí *L. longipalpis* – byly měřeny IgG1, IgG2 a IgG4 protilátky (Vinhas *et al.* 2007). Signifikantní zvýšení bylo pozorováno u IgG1 (hladina protilátek vzrůstala s následnými expozicemi) a opožděně také – po opětovném sání za rok od začátku imunizace, u IgG4. U lidí z endemické oblasti viscerální leishmaniózy působené *Le. chagasi* v Brazílii byl v případě, že se u nich projevila DTH proti antigenu *Le. chagasi*, pozorován vzestup IgG1 protilátek, zatímco u lidí, u kterých byly naměřeny protilátky proti *Le. chagasi*, byl naměřen vzestup IgG4 protilátek (Gomes *et al.* 2002). Vzestup celkových anti-*L. longipalpis* IgG přitom byl pozorován pouze v první skupině, ve druhé byl naopak pozorován pokles. Další experiment byl proveden na psech, na kterých sály samice *L. longipalpis*. Pozorovány byly zvýšené hladiny IgG1, ale také IgG2 protilátek a odrážely počty nasátých samic flebotomů (Hostomská *et al.* 2008). V novější práci Collin *et al.* (2009) zkoumající psy poštipané *L. longipalpis* byl potvrzen nárůst pouze u IgG2 protilátek, množství nasátých flebotomů bylo ovšem o řád nižší a počet imunizací byl také nižší.

Protilátky třídy IgE byly měřeny u psů (Hostomská *et al.* 2008) a lidí (Gomes *et al.* 2002, Vinhas *et al.* 2007). U psů byla zvýšená hladina anti-*L. longipalpis* IgE naměřena jen výjimečně a nijak nekorelovala s intenzitou poštípání (Hostomská *et al.* 2008). Co se lidí týče, IgE protilátky proti *L. longipalpis* byly pozorovány u dětí z endemické oblasti *Le. chagasi* v Brazílii, u kterých se projevila DTH proti antigenu *Le. chagasi* (Gomes *et al.* 2002) a dále u některých experimentálně poštípaných dobrovolníků (Vinhas *et al.* 2007). Hladina IgE byla vyšší u těch dobrovolníků, kteří na poštípání odpovídali časnou hypersenzitivní reakcí, na rozdíl od IgG protilátek, jejichž výskyt koreloval s DTH proti slinám *L. longipalpis* (Vinhas *et al.* 2007).

Co se konkrétních proteinů ze slinných žláz týče, již v minulé kapitole (2.3.4.1) byly vyjmenovány ty ze slinných žláz *P. ariasi*, které vyvolávaly DTH odpověď a zároveň stimulovaly produkci jedné z podtříd IgG protilátek – buď IgG1 (šlo o cDNA plazmid ParSP25) nebo IgG2a (ParSP03) u outbredních myší Swiss Webster (Oliveira *et al.* 2006). Dalšími cDNA plazmidy, které stimulovaly produkci IgG2a byly ParSP07 (protein příbuzný D7 ze žláz *P. papatasi* o velikosti 30kDa), ParSP10 (protein podobný endonukleáze ze žláz *L. longipalpis*) a ParSP23 (neznámý protein). IgG1 jiným plazmidem stimulovány nebyly. Důležité je však zmínit, že celkové IgG byly signifikantně zvýšeny oproti imunizaci prázdným plazmidem pouze v případě ParSP23 a ParSP25 (Oliveira *et al.* 2006). U psů vyvolávaly DNA plazmidy LJL143 a LJM17 ze žláz *L. longipalpis* produkci protilátek podtřídy IgG2 výrazně vyšší než produkci IgG1 (Collin *et al.* 2009). Podobně při imunizaci sáním či homogenátem slin *L. longipalpis* rozličná zvířecí a lidská séra (IgG protilátky) rozeznávala odlišné antigeny: myší séra antigeny o velikosti 15, 44, 45 kDa (Silva *et al.* 2005), psí 25, 34, 37-39, 45, 55 a 66 kDa antigeny (Hostomská *et al.* 2008) a lidská séra antigeny o velikosti 17, 35, 43, 44 a 45 kDa (Gomes *et al.* 2002, Vinhas *et al.* 2007), popřípadě 6, 12, 36, a 96 kDa (Barral *et al.* 2000).

Jelikož jednotlivé druhy flebotomů, a dokonce i geograficky vzdálené kolonie jednoho druhu, mají odlišnou skladbu účinných látek ve slinách, což bylo demonstrováno například na druzích *P. papatasi*, *P. duboscqi*, *L. longipalpis* (Volf *et al.* 2000), bylo potřeba zjistit, jak jsou protilátky proti slinám jednoho druhu flebotoma schopné rozeznávat antigeny ve slinách jiných druhů flebotomů. V práci Volf a Rohoušová (2001) byly porovnávány antigeny slinných žláz druhů *P. papatasi*, *P. perniciosus* a *P. halepensis*. Imunobloty prokázaly 4-9 hlavních antigenů u každého druhu flebotoma, se kterými reagovala séra zvířat poštípaných tím samým druhem flebotoma. Zkřížené reakce nebyly prokázány mezi *P. papatasi* a zbylými dvěma druhy, ale mezi *P. perniciosus* a *P.*

halepensis bylo několik společných antigenů, jak ve žlázách *P. perniciosus* rozpoznávaných anti-*P. halepensis* protilátkami, tak ve žlázách *P. halepensis* rozpoznávaných sérem ze zvířat poštípaných *P. perniciosus* (Volf a Rohoušová 2001). Mezi druhy *P. papatasi*, *P. sergenti* a *L. longipalpis* byl nalezen pomocí myších sér pouze jediný společný antigen, a to protein ve žlázách *P. papatasi* o velikosti mezi 24-29 kDa rozeznávaný sérem myši imunizovaných *P. sergenti* (Rohoušová *et al.* 2005b). V rámci rodu *Lutzomyia* byla séra myši imunizovaných *L. intermedia* schopná rozeznat v SGS *L. longipalpis* jediný pruh o velikosti 45 kDa, který odpovídá proteinu příbuznému Yellow proteinům (de Moura *et al.* 2007). Obyvatelé turecké Sanliurfy mají v krvi často IgG protilátky proti dvěma endemickým druhům flebotomů – *P. papatasi* a *P. sergenti*, tyto protilátky však nereagovaly s SGH *L. longipalpis* (Rohoušová *et al.* 2005b). Zajímavé též bylo, že přestože lidská a myší séra reagovala s podobnými hlavními antigeny *P. sergenti* a *P. papatasi*, tak ve žlázách *P. papatasi* myší séra rozeznávala silněji antigen o velikosti 42 kDa, zatímco lidská séra hlavně antigen o velikosti 30 kDa.

2.3.6 Vztah imunizace slinami flebotomů a protekce proti leishmanióze

2.3.6.1 Protektivní efekt a DTH navozená imunizací slinami

Imunizace slinami flebotomů navozuje u hostitele buněčnou i protilátkovou odpověď (Oliveira *et al.* 2009). Otázkou tedy zůstává, zda-li je tato imunogenost slin schopná zvrátit průběh leishmaniové infekce a která ze složek imunitní odpovědi je za to zodpovědná.

Jako první byla schopnost preexpozice ke slinám flebotomů ovlivnit infekci leishmaniami prokázána na experimentálním modelu *P. papatasi* – *Le. major* – myši kmenů Balb/c a C57BL/6 (Belkaid *et al.* 1998). U myši imunizovaných SGS došlo k protektivnímu efektu SGS na infekci – na velikost lézí i počet parazitů v nich obsažených. Co se týče produkce cytokinů v epidermis infikovaného ucha, u imunizovaných myši došlo oproti kontrole k inhibici produkce Th2 cytokinu IL-4, u Balb/c navíc ještě ke snížení IL-5 a GM-CSF. Ve spádové lymfatické uzlině byl také pozorován úbytek IL-4, nižší byla ale u Balb/c myši i produkce IFN- γ . Ne zcela jednoznačné nasměrování k Th1 odpovědi potvrzuje i DTH vyvolaná imunizací. Ta byla závislá na

CD4⁺ lymfocytech a složená jak z mononukleárních fagocytů, tak z eozinofilů u obou kmenů myši a u Balb/c byl navíc pozorován i přísun neutrofilů (Belkaid *et al.* 1998).

Také imunizace sáním neinfikovaných flebotomů vedla k ochraně před důsledky leishmaniové infekce (Kamhawi *et al.* 2000). Na laboratorním modelu *P. papatasi* – *Le. major* – myši kmenů Balb/c a C57BL/6 byl pozorován ochranný efekt imunizace na velikost léze i počet parazitů. V dalších měřených parametrech ovšem byly zjištěny jisté odlišnosti: cytokiny, jejichž produkce byla měřena u epiteliálních buněk, se u imunizovaných myši lišily od naivních ve zvýšené produkci IFN- γ a IL-12. Protekce byla spojena se silnou buněčnou odpovědí, ve které byly zastoupeny nejen makrofágy, eozinofily a neutrofilů, ale také dendritické buňky a lymfocyty.

Protektivní efekt imunizace slinami flebotomů byl potvrzen i na modelu *L. longipalpis* – *Le. amazonensis* – Balb/c (Thiakaki *et al.* 2005). V tomto případě však bylo v epidermis infikovaného ucha méně mononukleárních fagocytů a neutrofilů než u kontrolních myši. Vyjimku tvořily F4/80⁺ buňky značené protilátkou proti MHC antigenu II. třídy (jedná se buď o dendritické buňky a/nebo o aktivované makrofágy), u nichž byl stav přesně opačný – zvýšení počtu po imunizaci SGH *L. longipalpis* (Thiakaki *et al.* 2005).

Protektivní efekt imunizace slinami ovšem nebyl prokázán na všech případech – např. na modelu: *L. intermedia* - *Le. braziliensis* - Balb/c (de Moura *et al.* 2007). Imunizace SGS *L. intermedia* u myši Balb/c vyvolala po kontaktu s SGS zánětlivou odpověď signifikantně větší než u myši neimunizovaných, pokud však byly zároveň infikovány *Le. braziliensis*, léze sice měly pomalejší vývoj, ale byly větší a obsahovaly více parazitů než u nemunizovaných myši. Důsledkem imunizace bylo zvýšené množství IFN- γ a IL-4, jejich poměr byl však velmi nízký v neprospěch IFN- γ .

V případě slin *L. longipalpis* se zdá být protektivní účinek imunizace slinami druhově specifický (Thiakaki *et al.* 2005). Jedině při imunizaci SGH *L. longipalpis* došlo k projevu ochranného efektu vůči infekci *Le. amazonensis* + SGH *L. longipalpis*. Pokud byly myši imunizovány SGH *P. papatasi* nebo *P. sergenti*, pak byla velikost lézí i počet parazitů srovnatelný s neimunizovanou kontrolou.

Výsledky pokusů na myším modelu ukazují na možnost využití slin flebotomů ve vakcíně proti leishmanioze. Studie na lidských dobrovolnících tuto možnost potvrzuje (Vinhas *et al.* 2007). Dobrovolníci byli imunizováni sáním neinfikovaných flebotomů; rok po posledním sání jim byla odebrána krev a makrofágy a lymfocyty z ní byly inkubovány s *Le. chagasi* a SGS. Byla prokázána signifikantní redukce počtu amastigotů

v makrofázích, pokud byly inkubovány s lymfocyty z imunizovaných jedinců a s SGS (Vinhas *et al.* 2007).

2.3.6.2 Protektivní efekt a DTH navozená imunizací komponenty slin

Dalším logickým krokem bylo nalezení těch proteinů ze slinných žláz, které jsou za protektivní účinek zodpovědné a mohly by být využity při vývoji vakcíny proti leishmanióze. Stalo se tak u dvou druhů flebotomů – *P. papatasi*, vektora kožní leishmaniózy působené *Le. major* (Oliveira *et al.* 2008) a *L. longipalpis* vektora viscerální leishmaniózy působené *Le. infantum* (Gomes *et al.* 2008, Collin *et al.* 2009). V případě *P. papatasi* byly objeveny dva proteiny vyvolávající DTH s protichůdným účinkem na infekci *Le. major*: myši imunizované cDNA proteinu PpSP15 (protein podobný SL1 proteinu ze žláz *L. longipalpis*) prokazovaly dlouhotrvající protekci, zatímco myši imunizované cDNA proteinu PpSP44 (protein podobný Yellow proteinu ze žláz *L. longipalpis*) měly horší průběh infekce než myši neimunizované. Každá z vakcín dále odlišně stimulovala produkci cytokinů IFN- γ a IL-4: PpSP15 signifikantně stimuloval produkci IFN- γ v CD4⁺ T-lymfocytech v dermis ucha myší infikovaných *Le. major*, zatímco PpSP44 byl schopen pouze stimulovat produkci srovnatelnou s kontrolou imunizovanou prázdným plazmidem. Podobně tomu bylo u podjednotky cytokinu IL-12 (IL-12R β 2). V případě IL-4 PpSP15 stimuloval produkci srovnatelnou s kontrolou, zato PpSP44 jeho produkci signifikantně zvýšil. Ani jeden s testovaných plazmidů neměl vliv na produkci cytokinů TNF- α a IL-5 (Oliveira *et al.* 2008).

V dalším případě byly křečci imunizováni DNA plazmidy z knihovny slinných žláz *L. longipalpis* (Gomes *et al.* 2008). Přestože celé žlázy neměly vliv na infekci *Le. infantum*, byl popsán protein LJM19 (neznámý protein), který vyvolává DTH odpověď a zároveň nevyvolává protilátkovou odpověď a křečci jím (v podobě plazmidu) imunizovaní měli po infekci menší počet parazitů v játrech a ve slezině. U křečků imunizovaných LJM19 byl zároveň pozorován vyšší poměr IFN- γ /TGF- β než u kontroly a také zvýšená exprese iNOS (Gomes *et al.* 2008). Makrofágy z psů imunizovaných LJM143 a LJM17 byly schopny efektivně zabít amastigoty *Le. chagasi* (Collin *et al.* 2009)

2.3.6.3 Význam protilátek proti slinám při přenosu leishmaniózy

Zdá se tedy, že DTH je zodpovědná za protekci proti leishmanióze, ale je otázka, jakou roli přitom hrají protilátky, které jsou projevem jak Th1, tak Th2 odpovědi.

U dětí z endemické oblasti *Le. chagasi* koreloval výskyt protilátek proti slinám přenašeče s pozitivní DTH proti antigenu z *Le. chagasi* (Barral *et al.* 2000, Gomes *et al.* 2002). Z toho tedy vyplývá, že protilátky proti slinám by mohly být relativním ukazatelem úspěšně prodělané leishmaniózy, proti které získal pacient imunitu. V endemické oblasti kožní leishmaniozy se však zjistilo, že zvýšené hladiny protilátek proti přenašeči (*P. sergenti*) mají pacienti s probíhající infekcí (Rohoušová *et al.* 2005b). Autoři z toho vyvozují, že protilátky proti vektorovi by mohly proto sloužit spíše pro monitorování poštípání flebotomy a s tím spojeného rizika přenosu leishmanií v dané endemické oblasti. Korelaci infekce-poštípání potvrzuje i studie de Moura *et al.* (2007) z endemické oblasti *Le. braziliensis*. I zde měli nemocní pacienti vyšší hladiny protilátek proti slinám přenašeče (*L. intermedia*) než zdraví jedinci, kteří ovšem navíc měli pozitivní kožní (DTH) test na leishmaniový antigen – měli tedy imunitu proti leishmanióze. Z toho tedy jasně vyplývá, že i v tomto případě jsou protilátky proti slinám *L. intermedia* ukazatelem míry poštípání flebotomy a s tím spojeného rizika přenosu infekce *Le. braziliensis*. Nutno také připomenout, že v případě laboratorního modelu, imunizace slinami *L. intermedia* neměla protektivní efekt na vývoj infekce (de Moura *et al.* 2007).

Tabulka 2.1 Schéma metodiky imunizací slinami flebotomů a infekcí leishmaniemi

	i m u n i z a c e	obrat love	
		čládek – děti	
		myši	
		čládek	
		čládek	
		čládek	

2.4 Imunitní odpověď na sliny komárů

2.4.1 Vliv slin komárů na imunitní systém naivního hostitele

Další významnou skupinou krevsajícího hmyzu, v jejichž slinách byla popsána imunomodulační aktivita, jsou zástupci čeledi *Culicidae*. Kromě jiného ovlivňují i produkci cytokinů, a to jak Th1, tak Th2 odpovědi (Bissonnette *et al.* 1993, Cross *et al.* 1994, Zeidner *et al.* 1999, Wanassen *et al.* 2004, Wasserman *et al.* 2004) a také proliferaci leukocytů (Cross *et al.* 1994, Wanassen *et al.* 2004, Wasserman *et al.* 2004). Opět byl studován vliv na leukocyty stimulované mitogeny, antigeny nebo parazity, které komáři přenášejí – viz podkapitola 2.4.2. Nejprostudovanějším druhem je *Ae. aegypti* (shrnutí v Andrade *et al.* 2005), mezi další patří *Cu. pipiens* (Zeidner *et al.* 1999), *Cu. quinquefasciatus* (Wanassen *et al.* 2004) a *An. stephensi* (Owhashi *et al.* 2001, Demeure *et al.* 2005, Owhashi *et al.* 2008).

2.4.1.1 *Aedes aegypti*

Na rozdíl od slin flebotomů sliny *Ae. aegypti* nemají účinek na komplement (Cavalcante *et al.* 2003). Sliny *Ae. aegypti* mají ovšem inhibiční vliv na proliferaci naivních slezinných T-lymfocytů stimulovaných ovalbuminem, a to u myši kmene OVA-TCR DO11 - jejich T-lymfocyty reagují na stimulaci ovalbuminem, což je hlavní protein vyskytující se ve vaječném bílku, jenž se používá jako mitogen T-lymfocytů (Wasserman *et al.* 2004). Dále pak došlo též k inhibici proliferace myších splenocytů BALB/c předem stimulovaných OVA, a to jak v případě IL-2, tak i IL-4 vyvolané proliferace. Silnější inhibiční vliv byl ovšem pozorován v případě IL-2 stimulované proliferace (Cross *et al.* 1994). Wanassen *et al.* (2004) se pokusili zjistit, zda je tento vliv (konkrétně šlo o OVA imunizované splenocyty myši) způsoben cytotoxickou aktivitou slin, či zda jde pouze o potlačení buněčného dělení - byl potvrzen vliv na oba tyto parametry.

Z cytokinů Th1 odpovědi byl ve všech měřených případech prokázán tlumivý efekt slin na produkci IFN- γ (Cross *et al.* 1994, Wanassen *et al.* 2004, Zeidner *et al.* 1999, Wasserman *et al.* 2004) a GM-CSF (Wasserman *et al.* 2004). Jednotlivé práce se však liší v případě vlivu slin komárů na produkci IL-2. U myších splenocytů po stimulaci mitogenem byla produkce tohoto cytokinu snížena (Cross *et al.* 1994, Wasserman *et al.*

2004), u poštípaných myší však žádný vliv na produkci IL-2 prokázán nebyl (Zeidner *et al.* 1999). Jako řešení tohoto rozporu Zeidner *et al.* (1999) navrhuje to, že mohlo jít o vliv vyšší koncentrace použitého homogenátu slinných žláz. Další možností je, že homogenát slinných žláz má jiné složení než sliny. IL-12, jehož produkce byla zjišťována jako jediná u dendritických buněk, byl také inhibován (Wasserman *et al.* 2004).

Sliny *Ae. aegypti* mají vliv i na produkci Th2 cytokinů. Publikované studie se však rozcházejí v tom, zda jsou IL-4, IL-5 a IL-10 cytokiny inhibovány či stimulovány. Imunomodulace produkce Th2 cytokinů byla závislá na zvoleném přístupu; homogenát slinných žláz produkci inhiboval – IL-10 (Wanasen *et al.* 2004) a IL-4 a IL-5 (Wasserman *et al.* 2004), popřípadě byla změna v produkci (IL-4 a IL-5) nesignifikantní (Cross *et al.* 1994). Sání naopak stimulovalo cytokiny IL-4 a IL-10 (Zeidner *et al.* 1999).

Stejně jako hladina všech ostatních cytokinů měřených při pokusech Wasserman *et al.* (2004), i hladina prozánětlivého TNF- α produkovaného splenocyty byla snížena. Také v pokusech Bissonnette *et al.* (1993) mastocyty produkovaly v přítomnosti slin menší množství TNF- α , přičemž byl vyloučen vliv kontaminace LPS, CGRP (calcitonin gene related peptid), NGF (nerve growth factor), EGF (epidermal growth factor) a TGF- β .

Zeidner *et al.* (1999) zkoumali vliv konkrétních dvou složek slin *Ae. aegypti* - sialokininu I a II (jde o tachykiny s vazodilatační aktivitou vyskytující se ve slinách *Ae. aegypti*) na cytokiny IFN- γ , IL-4 a IL-10. V případě sialokininu I byl efekt identický s vlivem sání komárů na tyto cytokiny, tj. inhiboval IFN- γ a stimuloval IL-4 a IL-10, v případě sialokininu II byl již slabší, přesto dokázal inhibovat produkci IFN- γ a stimuloval IL-4. Ve slinách *Ae. aegypti* byl nedávno identifikován protein SAAG-4 o hmotnosti 20 kDa s neznámou funkcí, byl však schopný snížit produkci IFN- γ a zvýšit produkci IL-4 (Boppana *et al.* 2009).

2.4.1.2 rod *Culex*

Dalším druhem, u kterého byla popsána imunomodulační aktivita slin je *Cu. quinquefasciatus*. Wanasen *et al.* (2004) zkoumali imunomodulační vlastnosti slin tohoto druhu a srovnávali je se slinami *Ae. aegypti*. V žádném ze sledovaných parametrů - zabývali se vlivem homogenátu slinných žláz na produkci IFN- γ a IL-10, který byl pozorován na myších (C3H/HeJ) splenocytech stimulovaných konkanavalinem A, však imunomodulačního efektu dosaženo nebylo. Dalším zkoumaným druhem byl *Cu. pipiens*, jehož sání mělo na myší imunitní odpověď – konkrétně na cytokiny IFN- γ , IL-4 a IL-10 -

stejný vliv jako sání *Ae. aegypti*, s nímž jej autoři Zeidner *et al.* (1999) srovnávali: produkce IFN- γ byla snížena 7-10 dní po sání a hladina IL-4 a IL-10 naopak zvýšena, tentokrát po 4-7 dnech po sání.

2.4.1.3 rod *Anopheles*

Poštipání myši komárem *An. stephensi* vyvolalo degranulaci žírných buněk a to dále vedlo k vyhlazení tkáňového moku a přílivu neutrofilů. K těmto změnám nedošlo u W/W^v myši, které nemají žádné žírné buňky. Aktivace žírných buněk měla dále za následek hyperplázii lymfatické uzliny (Demeure *et al.* 2005). Ve slinách *An. stephensi* byl dále nalezen NCF – faktor chemotaktický pro neutrofilů o molekulové hmotnosti 200 kDa (Owhashi *et al.* 2001) a dále protein ECF o velikosti 66 kDa z chitinázové rodiny, který byl hlavním chemotaktickým faktorem pro eozinofily (Owhashi *et al.* 2008).

2.4.2 Vliv slin komárů na přenos infekčních chorob

Mezi choroby přenášené komáry, na jejichž infekci měly sliny komárů vliv, patří *Cache-Valley* virus přenášený druhy *Ae. triseriatus*, *Ae. aegypti* a *Cu. pipiens* (Edwards *et al.* 1998), virus *Sindbis* působící horečku *sindbis* přenášený *Ae. aegypti* (Schneider *et al.* 2004), virus *West Nile* působící nervové onemocnění přenášený též *Ae. aegypti* (Schneider *et al.* 2006), flaviviry přenášené *Cu. pipiens* (Zeidner *et al.* 1999), virus *Dengue* působící stejnojmennou horečku přenášený *Ae. aegypti* (Ader *et al.* 2004), prvok *Plasmodium gallinaceum* působící ptačí malárii přenášený *Ae. fluviatilis* (Rocha *et al.* 2004) a filárie *Brugia pahangi* přenášená *Ae. aegypti* (Gillan a Devaney 2004).

Cache-Valley virus je bunyavirus, který způsobuje neplodnost a vrozené malformace (znetvoření) u přežvýkavců Severní Ameriky (Edwards 1994). Tímto virem se zabýval Edwards *et al.* (1998) a prokázali, že u myši, které byly poštipány druhy *Ae. triseriatus*, *Ae. aegypti* a *Cu. pipiens*, a do místa, kde došlo k poštipání byly následně vstříknuty virové částice, došlo k projevu infekce. Ten však v případě infekce virem bez pokousání komáry či dokonce inokulace extraktu z thoraxu komárů (který obsahuje i slinné žlázy) spolu s virovými částicemi pozorován nebyl (Edwards *et al.* 1998).

Vliv homogenátu slinných žláz *Ae. aegypti* na infekci virem *Sindbis* (jde o alfavirus) byla prokázána ve studii Schneider *et al.* (2004). Virové částice byly injikovány do myši, a

to buďto spolu s homogenátem slinných žláz nebo samotné. V případě přidání homogenátu došlo ke snížené produkci antivirových cytokinů IFN- γ a IFN- β , zatímco produkce cytokinů IL-4 a IL-10 byla zvýšena oproti aplikaci samotných virových částic.

Dalším virózou přenášenou *Ae. aegypti* je onemocnění způsobené virem *West Nile* (citace). Myši infikované intradermálně, na kterých poté sáli komáři, prodělali závažnější onemocnění s vyšší virémií a urychlenou neuroinvasí viru než myši infikované bez následného sání komárů (Schneider *et al.* 2006).

Flaviviry a vlivem slin druhu *Cu. pipiens* na jejich infekci se zabýval Zeidner *et al.* (1999). Nejednalo se přímo o infekční pokusy, ale rozdíly v imunitní odpovědi na sliny komárů byly pozorovány u myší, které byly na infekci flaviviry různou měrou rezistentní. Na myších C3H/HeJ (jde o kmen citlivý na nákazu flaviviry) T-lymfocytech byl prokázán útlum produkce IFN- γ a stimulace produkce IL-4 a IL-10. Za to v případě rezistentních myší (C3H/RV) byla hladina IFN- γ a IL-2 naopak zvýšena a IL-4 snížena. Pouze hladina IL-10 byla zvýšena u obou kmenů myší, nezávisle na jejich vnímavosti k flavivirové infekci (Zeidner *et al.* 1999).

Virus *Dengue* je flavivirus, který je přenášen komárem *Ae. aegypti* a způsobuje horečku dengue (viz učebnice Volf *et al.* 2007). Pouze v tomto případě nemají sliny přenašeče stimulační účinek na rozvoj infekce při *in vitro* pokusu s dendritickými buňkami, naopak způsobují její potlačení (Ader *et al.* 2004). Mechanismus tohoto jevu je zřejmě založen na ochraně dendritických buněk a na zvýšené produkci prozánětlivých cytokinů IL-12 a TNF- α .

Kromě virů jsou komáři také přenašeči prvoků rodu *Plasmodium* působících malárii. Na příkladu ptačího druhu *Plasmodium gallinaceum* byl demonstrován efekt slin *Ae. fluviatilis* (Rocha *et al.* 2004). Kuřata byla podkožně infikována sporozoity a homogenátem slinných žláz a došlo k posílení infekce – zvýšil se počet parazitů.

L3 larvami filárie *Brugia pahangi* a změnou hladiny produkce cytokinů Th2 odpovědi – IL-4, IL-5 a IL-10 se zabývali Gillan a Devaney (2004). Zkoumali vliv L3 larev filárie spolu se slinami *Ae. aegypti* na myší splenocyty a zjistili, že byla snížena produkce těchto cytokinů.

2.4.3 Imunitní odpověď hostitele na opakované sání komárů

2.4.3.1 Hypersenzitivní odpověď vyvolaná sáním

Sliny komárů jsou schopné vyvolávat kožní reakce u obratlovců, na kterých sají. Kromě drobných svědivých otoků může docházet k alergickým reakcím (opožděná hypersenzitivita I. typu), buňkami působené opožděné reakci III. typu a systémové odpovědi organismu – vyrážce, otoku až anafylaktickému šoku (Wikel 1982). Z imunologického hlediska je možné popsat 5 fází vývoje reakce obratlovce při opakovaném kontaktu s antigeny slin (Cabrera *et al.* 1997). Při prvním kontaktu se většinou neprojeví žádná makroskopická reakce. Ve druhé fázi, při opakovaném kontaktu se slinami komárů, dochází k navození opožděné hypersenzitivní reakce III. typu, jejíž příčinou jsou imunokomplexy tvořené protilátkami třídy IgG a komplementem a která se klinicky projevuje jako svědivý otok po 24 hodinách od poštípání. Ve třetí fázi se k opožděné reakci přidává také časná, otoky se objevují již 10-15 minut po poštípání a další projevy se pak přidávají po 12 hodinách. Ve čtvrté fázi se časná reakce objevuje po pár minutách a vyhasíná po pár hodinách. V páté fázi dochází k desenzitizaci a tím k bezpříznakovosti (Cabrera *et al.* 1997).

Co se týče DTH (jde o opožděnou reakci IV. typu závislou na T-lymfocytech a mononukleárních fagocytech), ta byla na rozdíl od opožděné reakci III. typu částečně potlačena (Depinay *et al.* 2006). DTH vyvolaná OVA antigenem u C57BL/6 myši byla redukována sáním *An. stephensi*. Byl přitom snížen počet leukocytů ve spádové mízni uzlině a dále byl pozorován pokles IFN- γ a vzestup IL-10 (Chen *et al.* 1998). V případě imunizace myši Balb/c sáním *Ae. aegypti* byla zvýšena průměrná proliferace lymfocytů, ale byla zvýšená produkce IL-4 a snížená produkce IFN- γ . Zvýšená proliferace T-lymfocytů byla pozorována i u lidí poštípaných *Ae. vexans* a korelovala s časnou hypersenzitivní reakcí (Peng *et al.* 1996).

2.4.3.2 Protilátková odpověď na sání komárů

Protilátky třídy IgM proti slinám komárů *An. gambiae* byly zvýšeny u francouzských vojáků v tropické Africe - incidence činila 17% sledovaných osob (Pradines *et al.* 2007). Protilátky třídy IgG byly pozorovány opět u francouzských vojáků, a to proti slinám *An. gambiae* i *Ae. aegypti* – 41% resp. 15% incidence (Pradines *et al.* 2007), u dětí v kanadském Winnipegu, a to proti slinám *Ae. vexans* (Peng *et al.* 2004) a u pacientů s akutní malárií v Thajsku proti slinám *An. dirus* (Waitayakul *et al.* 2006).

Co se jednotlivých podtříd IgG protilátek týče, byl pozorován vzestup podtřídy IgG1 (Brummer-Korvenkontio *et al.* 1994, Paluoso *et al.* 1997, Chen *et al.* 1998) a IgG4 (Brummer-Korvenkontio *et al.* 1994, Brummer-Korvenkontio *et al.* 1997, Paluoso *et al.* 1997, Reunala *et al.* 1994), nikoli však IgG2a (Chen *et al.* 1998). Jednotlivé podtřídy protilátek byly pozorovány u myši (Brummer-Korvenkontio *et al.* 1997, Chen *et al.* 1998) i lidí (Brummer-Korvenkontio *et al.* 1994, Paluoso *et al.* 1997, Reunala *et al.* 1994) a různých druhů komárů - *Ae. communis* (Brummer-Korvenkontio *et al.* 1994, Reunala *et al.* 1994, Brummer-Korvenkontio *et al.* 1997, Paluoso *et al.* 1997), *Ae. aegypti* (Reunala *et al.* 1994, Brummer-Korvenkontio *et al.* 1997, Chen *et al.* 1998) a *An. stephensi* (Brummer-Korvenkontio *et al.* 1997).

Zvýšené hladiny protilátek třídy IgE byly prokázány ve všech pracích zmíněných v souvislosti podtříd IgG (Brummer-Korvenkontio *et al.* 1994, Brummer-Korvenkontio *et al.* 1997, Paluoso *et al.* 1997, Chen *et al.* 1998, Peng *et al.* 2004). IgE stejně jako IgG korelovaly u lidských dobrovolníků poštípaných *Ae. vexans* s výskytem časně hypersenzitivní reakce (Peng *et al.* 1996) a dále byla prokázána nepřímá korelace mezi věkem lidí a množstvím protilátek IgG i IgE proti *Ae. vexans* (Peng *et al.* 2004). Výskyt podtříd IgG1, IgG4 i třídy IgE přitom vykazoval vyšší hladiny protilátek po komáří sezóně (Paluoso *et al.* 1997).

Protilátky reagovaly s různými antigeny slinných žláz (Brummer-Korvenkontio *et al.* 1994, Reunala *et al.* 1994, Brummer-Korvenkontio *et al.* 1997, Chen *et al.* 1998, Waitayakul *et al.* 2006, Pradines *et al.* 2007). Protilátky tříd IgM a IgM z lidských sér reagovaly s 10 antigeny žláz *An. dirus* o hmotnostech 20,4 - 55 kDa (Waitayakul *et al.* 2006). Podobně IgG protilátky v sérech vojáků rozeznávaly 15 antigenů ve žlázách *An. gambiae* a 10 ve žlázách *Ae. aegypti*, a to v rozpětí 13 až více než 300 kDa – většina z nich se dá přiřadit známým proteinovým rodinám ve slinách komárů jako je například apyrázová nebo nukleatidázová rodina (Pradines *et al.* 2007). Hlavními antigeny rozpoznávanými IgG4 a IgE protilátkami lidí ve slinách *Ae. communis* byly proteiny o hmotnosti 22, 30 a 36 kD, ve slinách *Ae. aegypti* proteiny o hmotnosti 31, 36, 46 a 64-66kD a dále ve slinách *An. stephensi* 46 kD protein (Brummer-Korvenkontio *et al.* 1997).

Protilátky podtříd IgG1 a IgG4 i třídy IgE z lidských sér reagovaly se stejným antigenem o hmotnosti 36 kDa ze žláz *Ae. communis* (Brummer-Korvenkontio *et al.* 1994, Reunala *et al.* 1994) a také *Ae. aegypti* (Reunala *et al.* 1994). Pět z osmi antigenů *Ae. aegypti*, které byly rozpoznány IgE protilátkami myši, byly detekovány také lidskými IgE protilátkami (Chen *et al.* 1998).

2.4.4 Vliv opakovaného sání komárů na přenos infekcí

Co se týče protektivního efektu imunizace slinami komárů na infekci přenášenými patogeny, byl prokázán účinek imunizace homogenátem slinných žláz a sáním *Ae. fluviatilis* na infekci *Plasmodium gallinaceum* u kuřat (Rocha *et al.* 2004) a sáním *An. stephensi* na infekci *Plasmodium yoelli* u myší (Donovan *et al.* 2007). Částečná protekce (nižší počty parazitů a nižší úmrtnost kuřat) vůči infekci *Plasmodium gallinaceum* byla navozena opakovaným sáním i aplikací SGH a nekorelovala s protilátkami proti sporozoitům *Plasmodium gallinaceum* (Rocha *et al.* 2004).

Nižší parazitémie *Plasmodium yoelli* u myší (Balb/c) byla dosažena sáním komárů *An. stephensi* a byla spojena se zvýšením produkce iNOS a Th1 cytokinů IL-12 a IFN- γ (Donovan *et al.* 2007). V případě virových infekcí byl prokázán ochranný efekt slin na infekci virem *Dengue* při preexpozice buněk slinami *Ae. aegypti* (Ader *et al.* 2004). Naopak enhancing efekt čili zhoršení infekce po imunizaci slinami byl patrný při infekci viru *West Nile* přenášeného *Ae. aegypti* (Schneider *et al.* 2007). Účinek imunizace se projevil vyšší mortalitou myší Balb/c po infekci, intenzivnější replikací viru v časném stádiu nemoci, zvýšené expresi IL-10 a zvýšeném přísunu buněk citlivých na virus – dendritických buněk, monocytů a makrofágů (Schneider *et al.* 2007).

Tabulka 2.2 Schéma metodiky imunizací slinami komárů a infekcí viry a Plasmodii

imunizace – p. inokulací ×dávka; interval	obratlovec	komár	infekce	autoři
	dobrovolníci – Finové	<i>Ae. communis</i>		Brummer-Korvenkontio <i>et al.</i> (1994)
	myši	<i>Ae. communis</i> , <i>Ae. aegypti</i> a <i>An. stephensi</i>		Brummer-Korvenkontio <i>et al.</i> (1997)
4×16 komárů; 2t	myši Balb/c	<i>Ae. aegypti</i>		Chen <i>et al.</i> (1998)
2×imunizace OVA; 1t – při 1. vpichu zároveň sání okolo 17 komárů	myši C57BL/6	<i>An. stephensi</i>		Depinay <i>et al.</i> (2006)
6×15-20 komárů; 2t	myši Balb/c	<i>An. stephensi</i>	infikovaní komáři - <i>Plasmodium yoelli</i>	Donovan <i>et al.</i> 2007
	lidé - Finové	<i>Ae. communis</i>		Paluoso <i>et al.</i> (1997)
1×	lidé - dobrovolníci	<i>Ae. vexans</i>		Peng <i>et al.</i> (1996)
	děti v kanadském Winnipegu	<i>Ae. vexans</i>		Peng <i>et al.</i> (2004)
	francouzští vojáci v Africe	<i>An. gambiae</i> a <i>Ae. aegypti</i>		Pradines <i>et al.</i> (2007)
	děti z různých zemí	<i>Ae. communis</i> a <i>Ae. aegypti</i>		Reunala <i>et al.</i> (1994)
4-7×10 komárů (či ekvivalent SGH); 1t	kuřata <i>Gallus gallus</i>	<i>Ae. fluviatilis</i>	infikovaní komáři - <i>Plasmodium gallinaceum</i>	Rocha <i>et al.</i> (2004)
4×15-20 komárů; 1t	myši Balb/c	<i>Ae. aegypti</i>	infikovaný komár - virus <i>West Nile</i>	Schneider <i>et al.</i> (2007)
	pacienti s akutní malárií v Thajsku	<i>An. dirus</i>		Waitayakul <i>et al.</i> (2006)

3. METODIKA

3.1 Flebotomové

Kolonie flebotomů jsou chovány ve dvou oddělených místnostech, ve kterých panuje teplota 25-27 °C, světelné podmínky 14/10 LD (light/dark – tj. počet hodin světla ku tmě) a vzdušná vlhkost okolo 60%. Zároveň jsou ale chovné sítě izolovány igelitem, díky čemuž je v klecích udržována téměř 100% vlhkost (zdrojem vlhkosti je navlhčená vata). Chovné nylonové sítě jsou napnuty na kovových konstrukcích, jejichž rozměry jsou asi 40x40x40 cm.

Dospělci sají 50% vodný roztok cukru. Samice sají krev jednou týdně na uspaných myších. Nasáté samice jsou následující den odděleny do malé sítě (asi 20x20x20 cm). Po strávení krve, tj. 5.-7. den po sání, jsou umístěny do kelímků s navlhčenou sádrou. Samice se pak vykladou během následujících 2-5 dnů.

Vajíčka a následně pak i larvy, kukly a líhnoucí se dospělci zůstávají umístěni v kelímcích. Ty se uskladňují v plastových dozách, jejichž dno je pokryto sterilizovaným pískem navlhčeným destilovanou vodou. Larvy druhého a vyššího instaru jsou krmeny na jemno mletou směsí králíčího trusu a pelet (v poměru 1:1) fermentovanou 3-4 týdny za 100% vlhkosti a teploty 25 °C v izolovaných boxech z plexiskla. Po fermentaci je směs vysušena a namleta a její stopové množství pak také slouží při zakládání nové směsi jako zdroj plísně pro novou fermentaci. Larvy prvního instaru jsou krmeny toutéž směsí s tím rozdílem, že je filtrována přes 1 vrstvu monofilu. Vylíhlí dospělci jsou třikrát týdně vypouštěni do chovných sítí.

Celkový životní cyklus flebotomů chovaných v laboratorních podmínkách trvá 5-8 týdnů. Přehled kolonií, které byly zařazeny do pokusů uvádí tabulka.

Tabulka 3.1: Použité kolonie flebotomů

Druh	Podrod	Země původu a rok založení kolonie	Použitá zkratka
<i>Phlebotomus arabicus</i>	<i>Adlerius</i>	Izrael 2001	Ara
<i>Phlebotomus papatasi</i>	<i>Phlebotomus</i>	Turecko 2005	Pap
<i>Phlebotomus sergenti</i>	<i>Paraphlebotomus</i>	Izrael 1999	Ser
<i>Phlebotomus duboscqi</i>	<i>Phlebotomus</i>	Senegal 1988	Dub

Roztoky:

Anesteze: Zásobní roztok uchovávan ve 4°C: 2 ml 2% xylazinu (Rometar; Spofa), 4 ml 10% ketaminu (Narketan; Vétoquinol), 14 ml sterilního fyziologického roztoku (150 mM NaCl); dávkování (intraperitoneálně): 7-7,5 µl/g váhy myši

3.2 Pitva slinných žláz flebotomů a příprava homogenátu těchto žláz

Slinné žlázy flebotomů byly získány ze samic flebotomů starších čtyř dnů, což je věk, při kterém je dosažen úplný proteinový profil žláz (Volf *et al.* 2000). Pomůcky použité při pitvání byly pitvátko (minucie vsazené do dřevěných špejlí), binokulární lupa a trisový pufr. Při vlastní pitvě byla nejprve samice znehybněna chladem, dekapitována pitvátkem se zahnutým koncem a druhým pitvátkem pak byl oddělen pár slinných žláz vyčnívající z oddělené hlavy. Takto získané slinné žlázy byly umístěny do mikrozkuřavky s trisovým pufrům – koncentrace vzorku byla 1 žláza/1 µl pufru. Mikrozkuřavky pak byly zamrazeny a uchovávány při teplotě -20 °C.

Slinné žlázy byly před použitím zhomogenizovány třikrát opakovaným zmražením a rozmražením v tekutém dusíku. V případě lymfoproliferačního testu a stanovení produkce NO byly navíc ještě ředěny v RPMI médiu a sterilizovány po objemech 20 µl žláz do 460 µl 10% RPMI centrifugací (Minispin, Eppendorf; 5 min, 7100 g) přes filtr o velikosti pórů 0,22 µm (GV Durapore, Millipore, kat. č. UFC306VOS). Ten samý postup homogenizace a sterilizace byl použit i pro čistý Tris, který sloužil v pokusech jako kontrola.

Roztoky:

RPMI médium:

RPMI 1640 Hepes modification (Sigma-Aldrich, kat. č. R5886)

50 µM 2-merkaptoethanol (Serva, kat. č. 28625)

2 mM glutamin (L-glu-L-ala; Sigma-Aldrich, kat. č. 058K2358)

antibiotika: 100 U/ml penicilinu (penicilin 65, Biotika, a.s.)

50 µg/ml gentamycinu (Ker)

10% fetálního telecího séra (fetal calf serum – FCS; Sigma-Aldrich, kat. č. 10270-106)

Tris pufr: 20 mM Tris (Sigma-Aldrich), 0,15 M NaCl (Lachema), pH 7,8

3.3 Imunizace myší sáním flebotomů a odběr orgánů a krve

3.3.1 Imunizace sáním *P. sergenti*

K pokusům byly použity samice inbrední linie myší BALB/c ve věku 8 týdnů. Myši dodala firma AnLab. Během imunizace sáním byly myši ustájeny ve zvěřinci na katedře parazitologie PřF UK, kde byly také usmrceny. Myši byly sáté jednou týdně po dobu 5 týdnů individuálně v oddělených sítích, kde byly vystaveny 70 samicím flebotomů. Samice flebotomů byly staré minimálně 5 dní a sály většinou za tmy. Kontrolní myši byly buďto také uspávány nebo byly ponechány bez manipulace.

Týden po posledním sání byly myši vykrveny, a to v hluboké narkóze z podpažních cév. Získaný objem krve se pohyboval v rozmezí 0,5-1,5 ml/myš. Krev se nechala minimálně 1 hodinu koagulovat při pokojové teplotě (při delší prodlevě byla uchovávána při 4°C), poté byla zcentrifugována (Minispin; Eppendorf; 5 min, 2415 g) a získané sérum bylo zamrazeno v -20 °C.

Po odebrání krve byly myši usmrceny stržením vazů a byly jim odebrány sleziny. Sleziny byly odebrány semisterilně (úkon byl prováděn v rukavicích a myš byla v místě preparace omyta 70% etanolem) a byly vzápětí převedeny do 0,5-1 ml 10% RPMI média.

3.3.2 Imunizace sáním *P. duboscqi* a infekce *Le. major*

Během tohoto pokusu bylo 24 samic myší Balb/c (AnLab) starých 12 týdnů rovnoměrně rozděleno do tří skupin: 1. skupina byla imunizována sáním po dobu 15 týdnů, 2. skupina po dobu 2 týdny – jednalo se o poslední dva týdny imunizace 1. skupiny. Imunizace probíhala stejným způsobem jako v případě 3.3.1 s tím rozdílem, že každá myš byla vystavena pouze okolo 30 flebotomům. Poslední skupina imunizována nebyla.

Infekce byly provedeny u všech skupin v jeden den, a to týden po dokončení imunizací. Jako infekční agens byl použit kmen *Le. major* LV561 (plný název: MHOM/IL/67/LRC-L137 Jericho II). Leishmanie byly nejprve promyty sterilním fyziologickým roztokem (150 mM NaCl), resuspendovány v cca 1,5 ml sterilního fyziologického roztoku, spočteny a následně naředěny sterilním fyziologickým roztokem na $2,2 \times 10^6$ buněk/ml. Jako infekční dávka bylo použito 10^4 buněk a 0,5 žlázy *P. duboscqi* (šlo o

homogenát žláz) intradermálně à 5 µl/ucho. Skupiny byly poté překódovány nezávislou osobou, aby bylo dosaženo objektivního odečtu velikostí lézí.

Následujících 6 týdnů byl myším 1x týdně měřen průměr lézí na uších. Sedmý týden byla myším odebrána krev z podpažních cév a po usmrcení také dále zpracováváný materiál – uši a spádové lymfatické uzliny, játra, slezina a peritoneální tekutina.

3.4 Lymfoproliferační test

Sleziny byly vzápětí po odběru převezeny na ledu z fakulty do Laboratoře molekulární a buněčné imunologie Ústavu molekulární genetiky AV ČR v Krči. Za účelem homogenizace byly sleziny nejprve najemno nastříhány nůžkami. Získané buněčné suspenze byly scezeny přes dvojitou vrstvu monofylu do zkumavky a centrifugovány (Eppendorf - Centrifuge 5810 R, 4°C, 8 min, 960 g). Sedimenty byly resuspendovány ve 4 ml 10% RPMI média. Počet lymfocytů v suspenzi byl stanoven pomocí přístroje pro počítání buněk (Z2 Coulter Particle Count and Size Analyzator, Beckman coulter) – vzorek obsahoval 20 ml izotonického roztoku (Coulter Isoton II Diluent), 100 µl buněčné suspenze a 5 kapek hemolyzačního roztoku Ekoglobin (Hemax).

Buňky (10^5 /jamka) byly inkubovány v 96-jamkových polystyrenových destičkách pro tkáňové kultury (Nunc). Buňky byly stimulovány k proliferaci T-mitogenem konkanavalinem A (Sigma-Aldrich; 0,5 µg/ml 10% RPMI) a inkubovány s lyzátem slinných žláz (příprava viz kapitola 3.2) v 10% RPMI (0,25 žlázy/jamka). Celkový objem v jedné jamce byl 200 µl. U nestimulovaných buněk byl místo roztoku mitogenu výsledný objem doplněn 10% RPMI médiem; jako kontrola pro odečtení čistého vlivu žláz na lymfocyty byl místo homogenátu žláz použit čistý Tris (viz kapitola 3.2). Každá z kombinací byla provedena ve třech paralelách.

Kultury byly inkubovány při teplotě 37°C v atmosféře obohacené 5% CO₂ po dobu 72 hodin. Proliferace buněk byla stanovena na základě přidání 30 kBq/jamka ³H-thymidinu (30 µl zásobního roztoku) 6 hodin před koncem inkubace. Po inkubaci byly buňky přesáty na proužky filtračního papíru (glass microfibre filters GF/B; Whatman). Filtrační papíry byly pak sušeny přes noc při pokojové teplotě. Každý terčík filtračního papíru s buňkami byl umístěn do zvláštní skleněné ampule naplněné scintilačním roztokem. Naměřené hodnoty CPM (counts per minute) představují míru inkorporace ³H-thymidinu do nově syntetizované DNA dělicích se buněk.

Vyhodnocení pokusů bylo provedeno pomocí tzv. stimulačního indexu (SI). Ten byl vypočítán podle vzorce: $SI = \frac{CPM \text{ vzorku s homogenátem}}{\bar{CPM} \text{ vzorků s Trisem}}$, čili jako podíl hodnoty CPM z kultury s přidaným homogenátem žláz a průměru hodnot CPM trisové kontroly příslušné myši. Z paralel těchto SI se pak spočetly aritmetické průměry a střední chyby průměru (SE). Pro statistické posouzení rozdílů byl použit neparametrický dvouvýběrový a párový test (Wilcoxon Signed-Rank Test for Difference in Medians a Wilcoxon Rank-Sum Test for Difference in Medians, resp., program NCSS 6.0.21).

Roztoky:

10% RPMI médium (vše od firmy Sigma-Aldrich):

RPMI 1640 médium (kat. č. R8758)

25 mM HEPES; pH = 7,4

50 μ M 2-merkapt ethanol

antibiotika: 63,7 μ g/ml penicilin; 100 μ g/ml streptomycin

10% fetálního telecího séra (FCS)

Zásobní roztok izotopu

40 ml média RPMI 1640

1 ml ^3H -thymidinu [40 MBq/1 ml] (TH6-16-3H/Thymidin, Lacomel)

Scintilační roztok

0,4% PPO (2,5 – difenyloxazol; Fluka)

0,01% POPOP (1,4-di[2-(5-fenyloxazolyl)]-benzen; Staart Enterprises)

toluen (Penta)

3.5 Stanovení produkce NO makrofágy

Makrofágy byly získány z myši výplachem peritoneální (břišní) dutiny, který byl proveden za sterilních podmínek. Myš byla nejprve usmrcena stržením vazů, pak jí byla obnažena pravá polovina peritonea (pobřišnice), do kterého (skrz tukové těleso u kořene ocasu) bylo injikováno 8 ml vychlazeného RPMI média s 10% FCS neboli kompletního RPMI (viz kapitola 3.2). Po promasírování peritonea byla tekutina odebrána, zcentrifugována (Jouan BR4i; 8 min, 270 g) a pelet byl resuspendován ve 3 ml kompletního RPMI.

Získané makrofágy byly spočítány pomocí Bürkerovy počítací komůrky a naředěny na koncentraci 10^6 buněk/ml kompletního RPMI. Rozředěné buňky byly nakapány na 96-

jamkovou destičku pro tkáňové kultury (Falcon 3072, Microtest III Tissue Culture Plate) v objemu 100 μ l na jamku. Následující 2 hodiny bylo makrofágům umožněno přisednout na povrch jamek, a to při 37°C a v 5% CO₂ atmosféře. Po tomto čase bylo jejich přisednutí zkontrolováno mikroskopicky na inverzním mikroskopu a byl odebrán supernatant. Buňky byly inkubovány v 10% RPMI v přítomnosti LPS (Sigma-Aldrich kat. č. L4516; 0,5 μ g/ml) a IFN- γ (AD Serotec kat. č. PMP43A; 25 U/ml) a homogenizovaných žláz flebotomů (1/4 žlázy/jamka) v celkovém objemu 200 μ l. Buňky pak byly opět překontrolovány pod inverzním mikroskopem. Kultivace probíhala v 37°C a 5% CO₂ po dobu 72 hodin, na jejímž konci byly odebrány supernatanty.

Posledním krokem bylo vlastní stanovení NO pomocí Griessova činidla (reaguje s již zoxidovaným NO₂⁻). Jako standard bylo použito NaNO₂ ředěné do kompletního RPMI. Vzorky (supernatanty odebrané z kultur makrofágů) a standardy byly nakapané po 50 μ l/jamku do 96 jamkové destičky (Costar 9018, EIA/RIA). Vlastní reakce proběhla po přidání 25 μ l činidla A (1% sulfanilamid v 3% H₃PO₄; Sigma-Aldrich) a posléze 25 μ l činidla B (0,15% N-1-naftyletylendiaminu dihydrochloridu v 3% H₃PO₄; Sigma-Aldrich), přičemž všechny roztoky byly ředěny do deionizované vody. Optická denzita byla měřena na fluorometru (Tecan infinite M200) při 550 nm.

Pro statistické posouzení rozdílů byl použit neparametrický dvouvýběrový a párový test (Wilcoxon Signed-Rank Test for Difference in Medians a Wilcoxon Rank-Sum Test for Difference in Medians, resp., program NCSS 6.0.21).

3.6 Stanovení množství cytokinů

Množství cytokinů (IL-4, IFN- γ) bylo měřeno ze sér myší imunizovaných *P. sergenti* (viz kapitola 3.3.2).

Ke stanovení množství cytokinů byl použit tzv. sandwich ELISA test, tj. vrstvy: primární protilátka-cytokin-značená sekundární protilátka. Primární protilátky, standardy a konjugát sekundární protilátky s navázaným biotinem byly dodány od firmy eBioscience a avidin-peroxidáza od firmy Sigma-Aldrich. Primárních protilátky byly ředěny v PBS, a to v koncentraci 2 μ g/ml, a nanášeny na povrch 96-jamkových ELISA destiček (Costar 9018, EIA/RIA) byly v objemech 50 μ l/jamka. Inkubace probíhaly přes noc při teplotě 4°C. Po třech promytích promývacím roztokem následovalo zablokování nespecifických vazebných míst v jamkách 6% koňským sérem ředěným v promývacím roztoku (100 μ l/jamka). Inkubace

probíhala po dobu 2 hodin za pokojové teploty. Po třech promytích promývacím roztokem byla do jamek nanášena po 100 μ l séra z pokusných myší ředěná 3% koňským sérem v poměru 1:9. Inkubace probíhala přes noc při teplotě 4°C. Po čtyřech promytích promývacím roztokem byl přidán konjugát sekundární protilátky s navázaným biotinem ředěný do 3% koňského séra v koncentraci 2 μ g/ml a v objemech 50 μ l/jamka. Inkubace probíhala po dobu 1 hodiny za pokojové teploty. Po šesti promytích promývacím roztokem pak byl přidán roztok avidin-peroxidáza ředěný v koncentraci 2,5 μ g/ml 3% koňského séra, opět v objemech 50 μ l/jamka. Následovala inkubace půl hodiny při pokojové teplotě a 7-9 násobné promytí. Posledním krokem bylo vyvolání „barevné“ reakce. Ta proběhla za tmy po nanášení substrátového roztoku spolu s OPD a peroxidem vodíku do jamek po 100 μ l. Reakce byla zastavena 10% roztokem kyseliny sírové a na závěr byla změřena absorbance při 492 nm na fluorometru Tecan Infinite M200.

Roztoky:

PBS: 150 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄, 3 mM KCl; pH 7,2

Promývací roztok: PBS + 0,05% Tween 20 (Serva), pH 7,2-7,5

Substrátový roztok:

McIlweein fosfát-citrát, pH 5,5:

9 ml 0,11 M fosfát (Na₂HPO₄.12H₂O) + 1 ml 0,5 M kyseliny citronové (bezvodé)

těsně před použitím přidat 5 mg OPD (o-fenylendiamin) a 10 μ l 30% H₂O₂

Katalogová čísla: Primární protilátky – IFN- γ : 14-7311-85, IL-4: 14-7041-85

Standard – IFN- γ : 39-8311-65 , IL-4: 88-7044-ST

Konjugát – IFN- γ : 13-7312-85, IL-4: 13-7042-85

3.7 Stanovení množství protilátek

Ke stanovení množství protilátek byl použit nepřímý ELISA test, tj. vrstvy: antigen-detekovaná protilátka-značená sekundární protilátka.

Jako antigen byl použit homogenát slin flebotomů (viz kapitola 3.2), který byl ředěn v poměru: 1/5 žlázy/100 μ l navazovacího roztoku. Destička byla inkubována přes noc při teplotě 4°C. Po dvou promytích promývacím roztokem následovalo zablokování nespecifických vazebných míst v jamkách 6% koňským sérem ředěným v promývacím roztoku - opět 100 μ l/jamka. Inkubace probíhala po dobu 45 minut za teploty 37°C. Po třech

promytých promývacím roztokem byla do jamek nanese séra z pokusných myší ředěná 3% koňským sérem v poměru 1:200. Séra pocházela z myší imunizovaných *P. sergenti* (viz kapitola 3.3.1). Jako pozitivní kontroly byly použity séra z myší imunizovaných *P. arabicus*, *P. papatasi* a *P. sergenti*. Ve všech případech šlo o dlouhodobé sání jednou týdně 1 hodinu vysokým počtem flebotomů (80-100) na samcích myší Balb/c různého stáří. Negativní kontrolou bylo sérum z neimunizovaného samce Balb/c. Inkubace probíhala 90 min za teploty 37°C. Po čtyřech promytých promývacím roztokem byl přidán konjugát sekundární protilátky s navázanou křenovou peroxidázou (goat anti-mouse IgG-HRP; Sigma-Aldrich A-3673) ředěný do promývacího roztoku v poměru 1:1000. Přidávaný objem byl opět 100 µl/jamka. Inkubace probíhala po dobu 45 minut za teploty 37°C. Před vyvoláním byla destička promyta 6 krát promývacím roztokem a následně byl přidán substrátový roztok s OPD a peroxidem vodíku, opět v objemu 100 µl/jamka. Barevná reakce probíhala za tmy po dobu asi 6 minut při pokojové teplotě a zastavena byla 10% H₂SO₄ (100 µl/jamka). Intenzita zbarvení (absorbance) byla měřena při 492 nm na fluorometru Tecan Infinite M200.

Roztoky:

Navazovací roztok: 20 mM Na₂CO₃-NaHCO₃, pH 9,0-9,5

PBS: 150 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄, 3 mM KCl; pH 7,2

Promývací roztok: PBS + 0,05% Tween 20 (Serva), pH 7,2-7,5

Substrátový roztok:

McIlwein fosfát-citrát, pH 5,5:

9 ml 0,11 M fosfát (Na₂HPO₄.12H₂O) + 1 ml 0,5 M kyseliny citronové (bezvodé)

těsně před použitím přidat 5 mg OPD (o-fenylendiamin) a 10 µl 30% H₂O₂

3.8 Elektroforéza (SDS-PAGE)

Elektroforeticky jsme rozdělávaly proteiny obsažené ve slinných žlázách flebotomů. Dělo se tak za přítomnosti SDS a redukujících či neredukujících podmínek. Gely k tomu použité měly tloušťku 0,75 mm, dělicí gel obsahoval 12,5% polyakrylamidu, startovací 4%. V případě vzorků, které měly být později obarveny stříbřením, byl použit 10-jamkový hřeben, v případě vzorků určených pro přebílení 5-jamkový hřeben.

Slinné žlázy (viz. kapitola 3.2) byly před nanesením na gel 3 minuty povařeny se vzorkovým pufrům (1:2 vzorek:pufr) ve vodní lázni. Na gel byl nanášen objem 9 µl/jamka (tj.

6 žláz), pokud šlo o gel určený pro stříbření, nebo 45 μ l/jamka (30 žláz), pokud šlo o gel určený pro přebílení. Standard pocházel od firmy Invitrogen. Dělení proteinů probíhalo vertikálně na aparatuře Mini-Protean 3 (BioRad) za limitního napětí 200 V. Jak je uvedeno výše, gely byly barveny stříbrem (viz kapitola 3.10), případně byly proteiny z gelů elektroforeticky přeneseny (přebíleny) na nitrocelulóзовou membránu (viz kapitola 3.11).

Roztoky:

Vzorkový pufr:

60 mM Tris-HCl (pH 6,8), 25% glycerol, 2% SDS, dH₂O

redukující pufr navíc: 14,4 mM 2-merkaptoethanol

Roztok A: 38,7% akrylamid; 1,3% bis-akrylamid; dH₂O

Roztok B: 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8); 0,4% SDS; dH₂O

Roztok C: 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8); 0,4% SDS; dH₂O

SDS pufr: 25 mM Tris; 192 mM glycin; 0,1% SDS; dH₂O

Separáčnı gel (12,5%):

2,5 ml roztoku A

2 ml roztoku B

3,5 ml dH₂O

5 μ l TEMED (tetrakis-hydroxypropyl-ethylendiamin)

50 μ l 10 % APS (persıran amonnı)

Startovacı gel (4%):

0,4 ml roztoku A

1 ml roztoku C

2,6 ml dH₂O

5 μ l TEMED (tetrakis-hydroxypropyl-ethylendiamin)

40 μ l 10 % APS (persıran amonnı)

3.9 Barvení gelů stříbrem

Elektroforeticky rozdělené proteiny byly sřibřeny podle protokolu Ausubel (1992). Po dobu všech inkubací byly gely uchovávány v plastových nádobách a promývány na třepačce, inkubace probíhaly za laboratorní teploty. Prvním krokem byla fixace proteinů v gelech fixačním roztokem, a to po dobu 10 minut nebo přes noc. Dalších 5 minut byly gely promývány destilovanou vodou (2x pokud byly fixovány přes noc). 1 minutu pak trvala inkubace s 0,02% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, po ní následovalo krátké promytí v destilované vodě (20 s) a vzápětí 10 minutová inkubace s 0,1% AgNO_3 . To bylo opět odmyto destilovanou vodou a byl přidán vyvíjecí roztok – nejdříve v něm gely byly opláchnuty, při druhém přidání v něm byly inkubovány do objevení pruhů jednotlivých proteinů. Reakce byla zastavena přidáním kyseliny citronové (výsledná koncentrace byla 0,115 M). Po 10 minutové inkubaci byly gely dalších 10 minut promývány destilovanou vodou. Na závěr byly naskenovány v průhledných euroobalech.

Roztoky:

Fixační roztok: 100 ml 40% methanol; 50 μl 37% formaldehyd

Vyvíjecí roztok: 100 ml 3% Na_2CO_3 ; 200 μl 0,2% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; těsně před použitím: 50 μl 37% formaldehyd

3.10 Imunoblot

Po elektroforetickém rozdělení proteinů ze slinných žláz flebotomů na polyakrylamidových gelech (viz kapitola 3.8) byly proteiny přeneseny na nitrocelulózovou membránu podle protokolu iBLOT od firmy Invitrogen, od které také pocházely všechny komponenty při blotování používané. Úspěšnost přenosu byla ověřena reverzibilním obarvením membrány červení Ponceau S (5-10 minut). Barva byla odmyta roztokem Tris-Tween (dále T-Tw). Membrána pak byla rozřezána na pruhy (jedné jamce odpovídalo 5-6 pruhů) a standard byl barven amidočerní (přebytečná barva byla odmyta odbarvovacím roztokem, který byl před usušením membrány ještě odmyt roztokem T-Tw).

Rozřezaná membrána byla přenesena do plastového stojanu s podélnými zářezy (jamkami), ve kterých byl každý z pruhů membrány inkubován s dále popsány roztoky –

vždy v objemu 600 µl/jamka. Volná vazebná místa na membránách byla nejprve zablokována 5% roztokem sušeného nízkotučného mléka (Blotting trade Blocker Non-Fat Dry Milk; Bio-Rad) ředěným v T-Tw. Inkubace probíhala po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě nebo přes noc při 4°C. Poté byla membrána promyta 3x5 minut v T-Tw. Testovaná a kontrolní séra (viz kapitola 3.3.1 a 3.7) byla ředěná v T-Tw v poměrech 1:200 a inkubována s membránami po dobu 1 hodiny. Po inkubaci byly membrány opět promyty v T-Tw (3x5 minut) a 1 hodinu inkubovány se sekundární protilátkou s navázanou křenovou peroxidázou (goat anti-mouse IgG-HRP; Sigma-Aldrich A-3673) ředěnou 1:1000 v T-Tw. Po dalším promytí (2x5 minut v T-Tw, 1x5 minut v Tris) byla vyvolána barevná reakce, a to inkubací se substrátovým roztokem, a zastavena destilovanou vodou. Membrány byly osušeny a naskenovány.

Roztoky:

Ponceau S: 0,2 % Ponceau S (Sigma-Aldrich); 3% kyselina octová; dH₂O

odbarvovací roztok pro Ponceau S: dH₂O

Tris-Tween: 20 mM Tris; 0,15 M NaCl; 0,05% Tween 20 (Serva)

Amidočern: 0,1% amidočern (10B-Merck); 25% isopropanol; 10% kyselina octová; dH₂O

odbarvovací roztok pro amidočern: 25% isopropanol; 10% kyselina octová

Substrátový roztok: 20 ml Tris; 0,01 g DAB (3,3',4,4'-tetraaminobifenyl; Sigma-Aldrich, kat. č. D5637-5G);

6 µl 30% H₂O₂ – přidat těsně před použitím

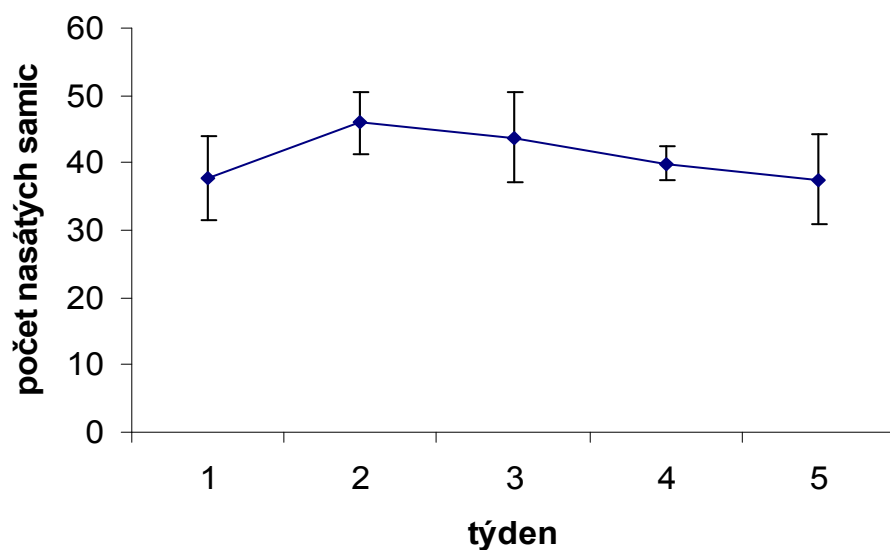
4. VÝSLEDKY

4.1 Specifita imunitní odpovědi u myši imunizovaných *P. sergenti*

4.1.1 Imunizace myši sáním *P. sergenti*

Myši byly imunizovány následujícími počty samic *P. sergenti* - graf 4.1 udává průměrné počty nasátých samic pro jednotlivé týdny 5 týdnů dlouhé imunizace. Celkový průměr činil 41 nasátých flebotomů se střední chybou průměru 2,43.

Graf 4.1 Počty samic flebotomů nasátých během imunizace myši *P. sergenti*
Chybové úsečky označují průměr \pm střední chyba průměru



4.1.2 Vliv imunizace sáním *P. sergenti* na proliferaci splenocytů

Pomocí lymfoproliferačního testu byly testovány jak sleziny z myši imunizovaných sáním *P. sergenti*, tak z myši neimunizovaných. Splenocyty byly inkubovány v přítomnosti SGH 3 různých druhů flebotomů: *P. arabicus*, *P. papatasi*, *P. sergenti*. Stimulovány byly mitogenem konkanavalinem A. Proliferační odpověď buněk nestimulovaných mitogenem uvádí graf 4.2A, odpověď stimulovaných buněk graf 4.2B.

U buněk nestimulovaných mitogenem došlo v případě neimunizovaných myši k inhibici proliferace vlivem SGH každého z použitých druhů flebotomů, a to na 5% hladině signifikance, v případech homogenátu ze žláz *P. arabicus* a *P. papatasi* dokonce na 1% hladině signifikance. Zároveň byly rozdíly mezi proliferacemi po inkubacích s homogenáty jednotlivých druhů flebotomů nesignifikantní. V případě nestimulovaných buněk z imunizovaných myši došlo vlivem SGH *P. arabicus* a *P. papatasi* také k inhibici proliferace na 1% hladině signifikance, vlivem SGH *P. sergenti* však nedošlo k žádné signifikantní změně oproti kontrole. Navzájem se pak lišily jak proliferace buněčných kultur s SGH *P. arabicus* a *P. sergenti*, tak *P. papatasi* a *P. sergenti*, v prvním případě se tak stalo na 1% hladině signifikance, ve druhém na 5% hladině. Co se týče rozdílů proliferací mezi nestimulovanými buňkami z naivních myši a z imunizovaných myši inkubovaných se stejným SGH, došlo k signifikantnímu rozdílu pouze v případě inkubace s SGH z *P. sergenti*, a to na 5% hladině významnosti. Vyšší hodnoty proliferace bylo v tomto případě dosaženo u imunizovaných myši.

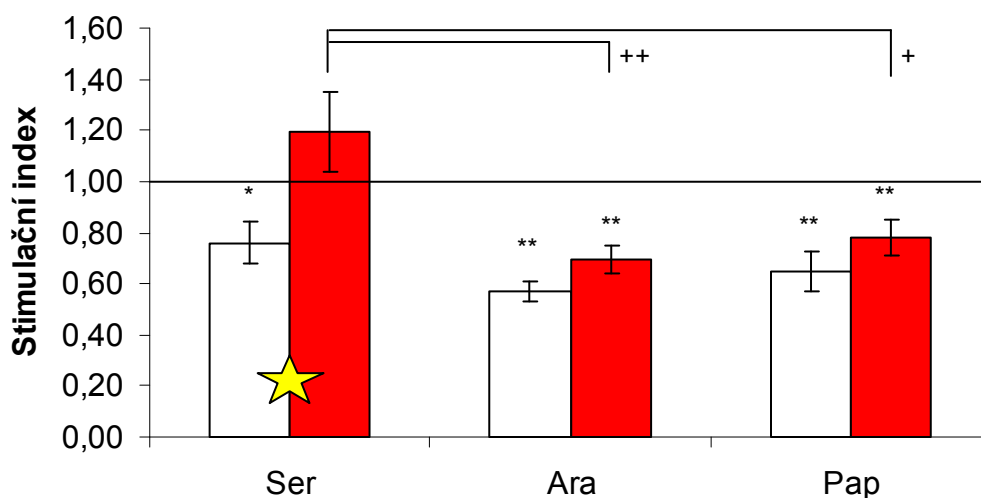
U buněk stimulovaných mitogenem byla v případě neimunizovaných myši také ve všech kombinacích prokázána inhibice proliferace splenocytů vlivem SGH, a to na 1% hladině signifikance. Rozdíly mezi proliferacemi po inkubacích s homogenáty jednotlivých druhů flebotomů byly též nesignifikantní. Na rozdíl od nestimulovaných buněk však u imunizovaných myši nedošlo k inhibici proliferace nejen v případě inkubace buněk s SGH *P. sergenti*, ale také v případě inkubace s SGH *P. papatasi*. Bylo přitom dosaženo signifikantního rozdílu pouze mezi proliferacemi kultur s SGH *P. arabicus* a *P. sergenti*, a to na 5% hladině významnosti. Rozdíly proliferací mezi buňkami z naivních a imunizovaných myši v rámci jedné varianty SGH byly tentokrát dosaženy jak v případě SGH *P. papatasi*, tak *P. sergenti*.

Graf 4.2 Vliv imunizace sáním *P. sergenti* na proliferaci lymfocytů

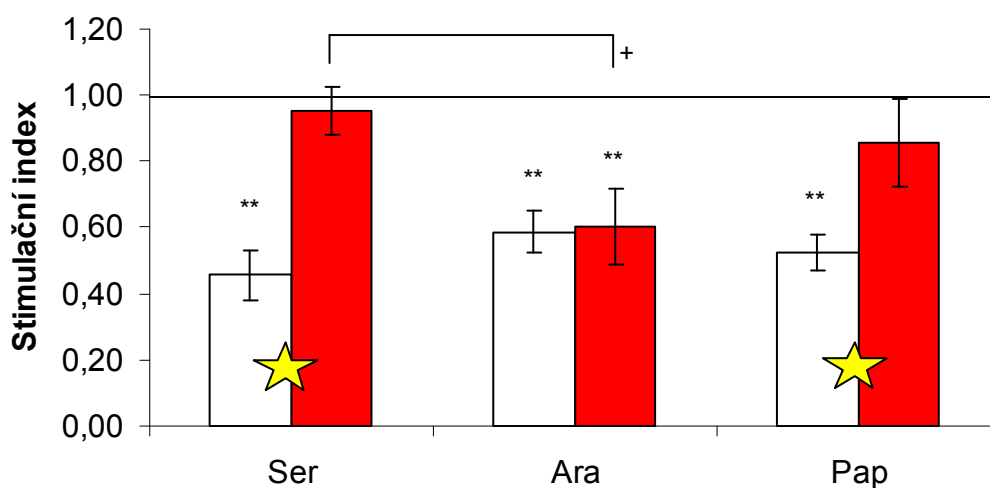
Splenocyty z naivních myší (□) a imunizovaných myší sáním *P. sergenti* (■) byly inkubovány s SGH *P. arabicus* (Ara), *P. papatasi* (Pap) a *P. sergenti* (Ser). Splenocyty byly stimulované ConA (0,5 µg/ml), homogenát slinných žláz byl přidán v koncentraci 0,25 žlázy/jamku. Míra proliferace je vyjádřena průměrnou hodnotou stimulačního indexu (SI), chybové úsečky označují průměr SI ± střední chyba průměru. Vodorovná úsečka představuje průměrnou hodnotu SI kontrol bez SGH.

★ označuje signifikantní rozdíl mezi proliferacemi buněk pocházejících z myší z různých skupin inkubovaných se stejným SGH ($p < 0,05$). * označuje signifikantní rozdíl mezi kontrolou a buňkami inkubovaným s SGH (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). + představuje signifikantní rozdíl mezi kulturami z té samé skupiny myší, ale inkubované s odlišnými SGH (+ $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$)

A: Nestimulované splenocyty



B: Lymfocyty stimulované ConA



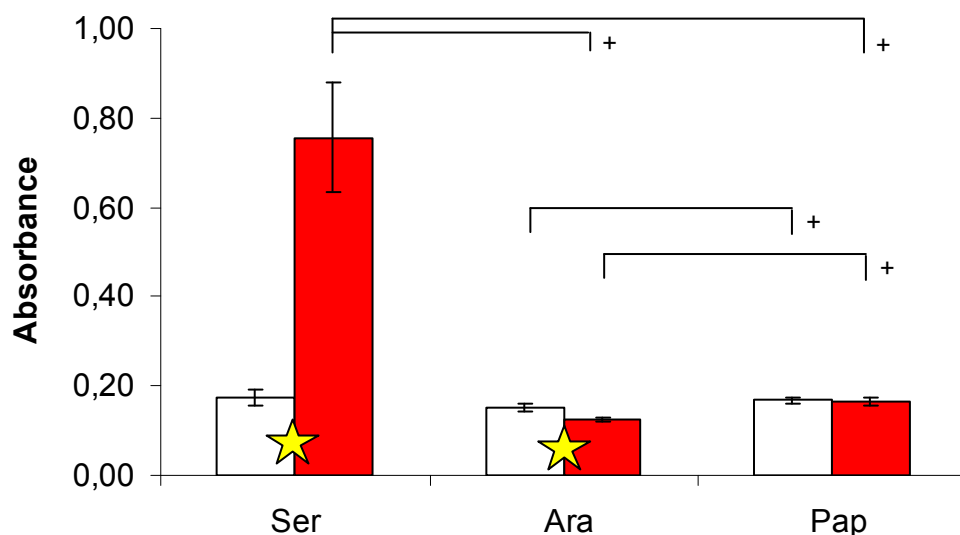
4.1.3 Vliv imunizace sáním *P. sergenti* na produkci protilátek

Protilátky třídy IgG proti SGH *P. sergenti*, *P. arabicus* a *P. papatasi* z krve naivních a imunizovaných myší byly detekovány pomocí ELISA testu (grafu 4.3).

Signifikantních rozdílů mezi hladinami protilátek v sérech z myší imunizovaných a neimunizovaných bylo dosaženo v případě SGH *P. sergenti* a *P. arabicus*. V obou případech byla překonána 1% hladina významnosti. V rámci imunizovaných myší byl prokázán signifikantní rozdíl mezi protilátkami proti *P. sergenti* a protilátkami proti oběma zbylým antigenům. Statisticky prokazatelný byl ovšem i rozdíl mezi protilátkami proti SGH *P. arabicus* a *P. papatasi* a u myší neimunizovaných byl prokázán rozdíl mezi protilátkami proti SGH *P. arabicus* a *P. papatasi*.

Graf 4.3 Vliv imunizace sáním *P. sergenti* na produkci protilátek specifických proti homogenátu slinných žláz *P. arabicus*, *P. papatasi* a *P. sergenti*

Séra z naivních myší (□) a imunizovaných myší sáním *P. sergenti* (■) byly inkubovány s SGH *P. sergenti* (Ser), *P. arabicus* (Ara) a *P. papatasi* (Pap). Průměrné hladiny protilátek jsou vyjádřeny pomocí absorbancí. Chybové úsečky označují průměr ± střední chyba průměru. ★ označuje signifikantní rozdíl mezi hladinami protilátek proti danému antigenu v sérech z myší imunizovaných a neimunizovaných ($p < 0,01$). + představuje signifikantní rozdíl mezi protilátkami v rámci imunizovaných nebo naivních myší inkubovaných s odlišnými SGH ($p < 0,05$)



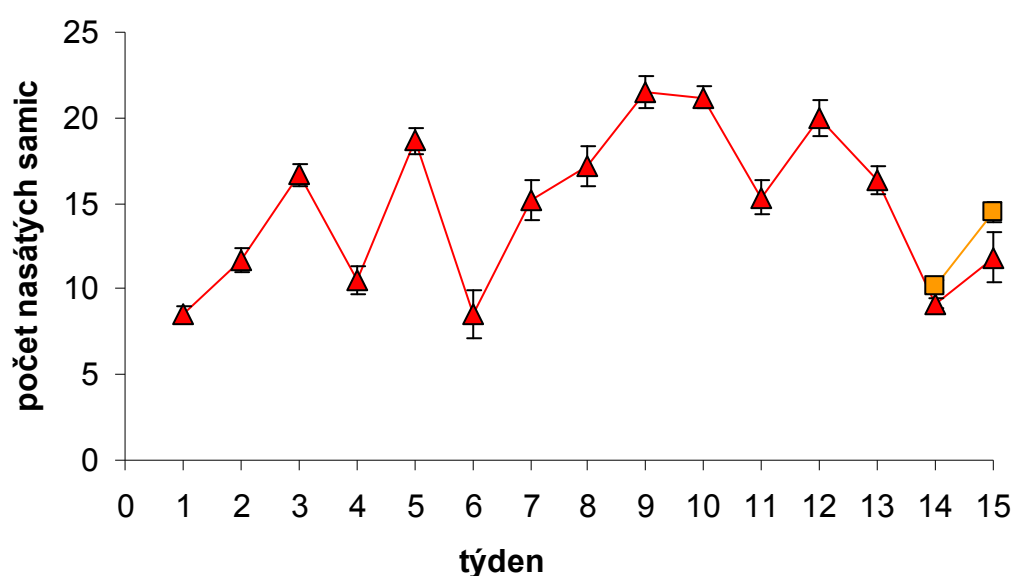
4.2 Specifita imunitní odpovědi u myši imunizovaných *P. duboscqi* a infikovaných *Le. major*

4.2.1 Imunizace myši sáním *P. duboscqi*

Myši imunizované sáním *P. duboscqi* byly rozdělené do tří skupin – jedna byla imunizována po dobu patnácti týdnů, druhá po dobu dvou týdnů a třetí sloužila jako kontrolní – myši nebyly imunizované. Průměrné počty nasátých samic během jednotlivých týdnů u obou dvou skupin udává graf 4.4 Celkový průměr pro patnácti týdenní imunizaci činil 15 nasátých flebotomů se střední chybou průměru 0,56 a pro dvoutýdenní imunizaci 12 nasátých flebotomů se střední chybou průměru 0,72.

Graf 4.4 Počty samic flebotomů nasátých během imunizace myši *P. duboscqi*

Chybové úsečky označují průměr \pm střední chyba průměru. Trojúhelníky představují průměry počtů samic pro 15 týdenní imunizaci, čtverce počty pro 2 týdenní imunizaci.



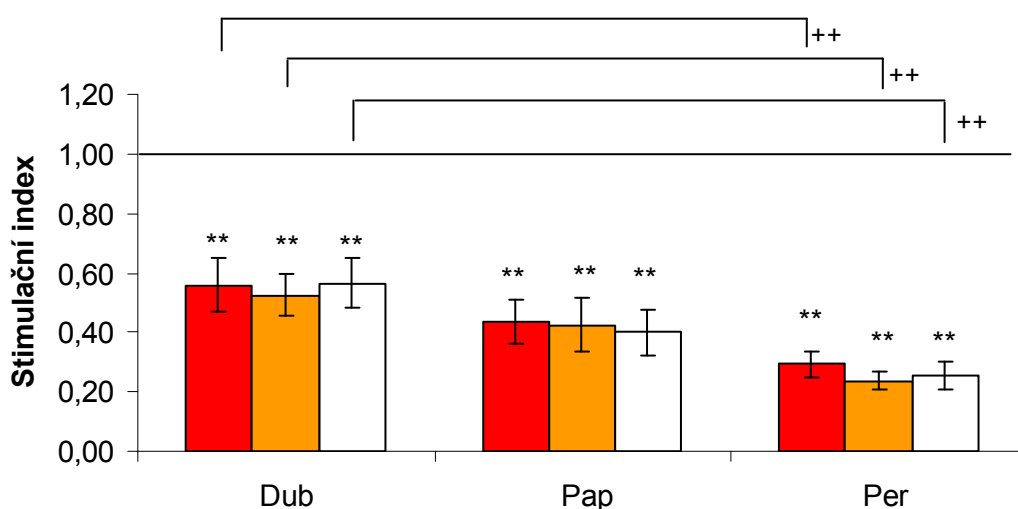
4.2.2 Vliv imunizace sáním *P. duboscqi* na proliferaci splenocytů

Testovány byly sleziny z myši imunizovaných sáním *P. duboscqi* po dobu patnácti a dvou týdnů a také sleziny neimunizovaných myši. Splenocyty byly inkubovány v přítomnosti 3 různých SGH: *P. duboscqi*, *P. papatasi* a *P. perniciosus*. Hodnoty stimulačních indexů vyjadřuje graf 4.5

Jak u obou imunizovaných skupin, tak u skupiny naivních myši došlo k inhibici proliferací splenocytů, a to nezávisle na přidaném druhu SGH. Bylo při tom dosaženo jednoprocentní hladiny významnosti. Pokud šlo o rozdíly mezi inkubacemi s SGH jednotlivých druhů flebotomů, bylo dosaženo signifikantního rozdílu na 1% hladině významnosti mezi SGH *P. duboscqi* a *P. perniciosus* u všech tří testovaných skupin myši. Nebyly pozorované žádné rozdíly mezi skupinami v rámci inkubací s tou samou variantou SGH.

Graf 4.5 Vliv imunizace sáním *P. duboscqi* na proliferaci lymfocytů

Splenocyty z myši imunizovaných po dobu 15 týdnů (■) a po dobu 2 týdnů (■) sáním *P. duboscqi* a z myši neimunizovaných (□) byly inkubovány s SGH *P. duboscqi* (Dub), *P. papatasi* (Pap) a *P. perniciosus* (Per). Míra proliferace je vyjádřena průměrnou hodnotou stimulačního indexu (SI), chybové úsečky označují průměr SI ± střední chyba průměru. Vodorovná úsečka představuje průměrnou SI kontrol bez SGH. * označuje signifikantní rozdíl mezi kontrolou a vzorkem inkubovaným s SGH (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). + představuje signifikantní rozdíl mezi kulturami z té samé skupiny myši, ale inkubované s odlišnými SGH (+ $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$)



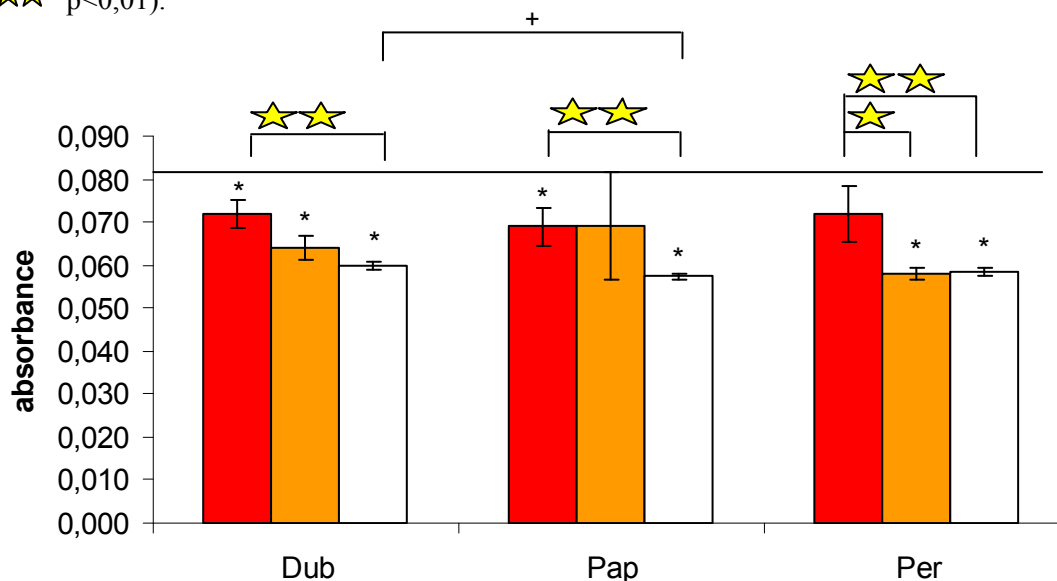
4.2.3 Vliv imunizace sáním *P. duboscqi* na produkci NO makrofágy

Na produkci NO byly testovány ty samé skupiny myši jako na proliferaci splenocytů – tj. obě dvě skupiny imunizovaných a skupina neimunizovaných. Stejně byly také druhy flebotomů, z nichž byly použity SGH pro inkubaci s makrofágy. Šlo o druhy *P. duboscqi*, *P. papatasi* a *P. perniciosus*. Graf 4.6 vyjadřuje výsledné hodnoty naměřených absorbancí.

K inhibici produkce NO vlivem SGH došlo ve většině případů, a to na 5% hladině významnosti. K inhibici nedošlo pouze u kultury buněk z myši imunizovaných 15 týdnů, které byly inkubovány s SGH *P. perniciosus* a kultury buněk z myši imunizovaných 2 týdny, které byly inkubovány s SGH *P. papatasi*. Buňky z naivních myši produkovaly signifikantně méně NO při inkubaci s SGH *P. papatasi* než *P. duboscqi*. U SGH všech tří druhů flebotomů byl na 1% hladině významnosti prokázán pokles produkce NO mezi buňkami z myši imunizovaných 15 týdnů a buňkami z myši naivních. U SGH *P. perniciosus* byl navíc prokázán pokles mezi buňkami z myši imunizovaných 15 týdnů a oběma zbývajících skupinami, a to na 5% hladině významnosti v obou případech.

Graf 4.6 Vliv imunizace sáním *P. duboscqi* na produkci NO makrofágy

Makrofágy z myši imunizovaných po dobu 15 týdnů (■) a po dobu 2 týdny (■) sáním *P. duboscqi*, z myši neimunizovaných (□), byly inkubovány s SGH *P. duboscqi* (Dub), *P. papatasi* (Pap) a *P. perniciosus* (Per) nebo bez SGH (kontrola). Míra produkce NO je vyjádřena průměrnou hodnotou absorbance, chybové úsečky označují průměr absorbance \pm střední chyba průměru. Vodorovná úsečka představuje průměrnou absorbanci kontrol bez SGH (0,081). * označuje signifikantní rozdíl mezi kontrolou a vzorkem inkubovaným s SGH ($p < 0,05$). + označuje signifikantní rozdíl mezi inkubacemi s různými SGH v rámci inkubací z jedné skupiny myši. ★ označuje signifikantní rozdíl mezi různými skupinami myši v rámci stejného SGH (★ $p < 0,05$; ★★ $p < 0,01$).

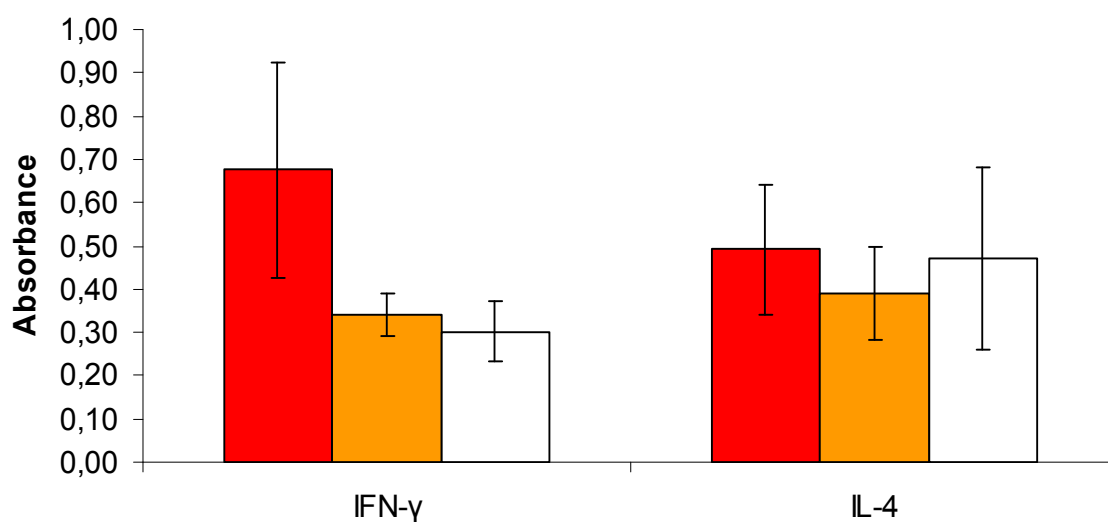


4.2.4 Vliv imunizace sáním *P. duboscqi* na produkci cytokinů IFN- γ a IL-4

Cytokiny byly měřeny v sérech myši imunizovaných sáním *P. duboscqi* po dobu patnácti a dvou týdnů a také v sérech neimunizovaných myši. Hodnoty naměřených absorbancí udává graf 4.7. Mezi žádnými z uvedených skupin však nebyly naměřeny statisticky signifikantní rozdíly produkce ani IFN- γ ani IL-4.

Graf 4.7 Vliv imunizace sáním *P. duboscqi* na produkci IFN- γ a IL-4

Séra myši imunizovaných 15 týdnů (■) a 2 týdny (■) sáním *P. duboscqi* a z myši neimunizovaných (□). Míra produkce cytokinů je vyjádřena průměrnou hodnotou absorbance, chybové úsečky označují průměr absorbance \pm střední chyba průměru.



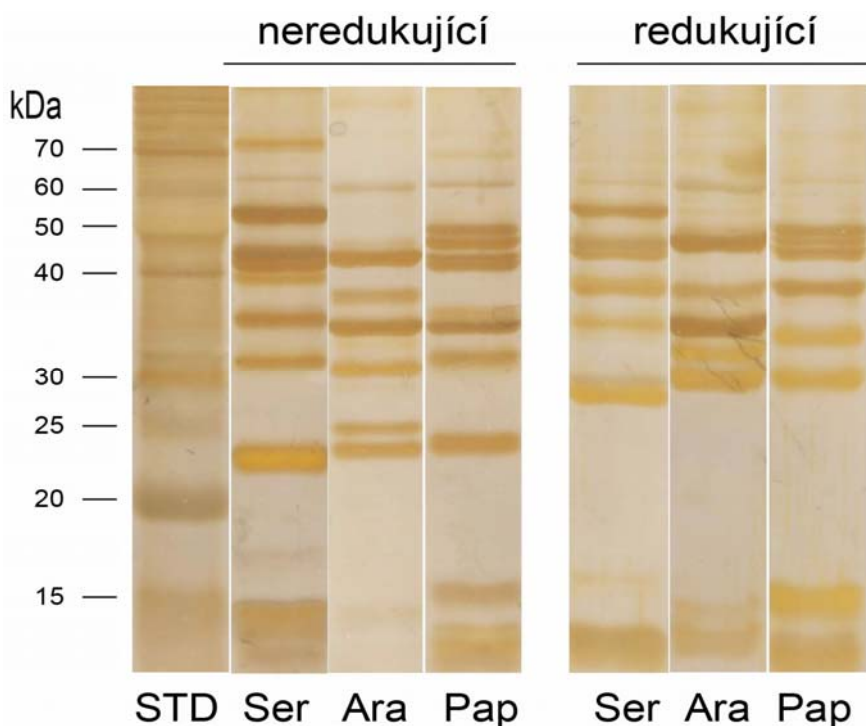
4.3 Specifita antigenů slinných žláz *P. sergenti*, *P. arabicus* a *P. papatasi*

4.3.1 Elektroforetické profily slinných žláz *P. sergenti*, *P. arabicus* a *P. papatasi*

Elektroforetický profil slinných žláz byl proveden pomocí SDS PAGE, tj. v denaturujícím prostředí, a to jak za neredukujících, tak za redukujících podmínek. Vzorčky SGH byly rozděleny v 12,5% akrylamidovém gelu. Jejich profily jsou zobrazeny na obrázku 4.1 a konkrétní odhady molekulových velikostí a intenzity zbarvení pruhů s proteiny uvedeny v tabulce 4.1. Žádný z uvedených profilů se plně neshodoval s jiným, a to ani v případě stejného SGH rozděleného za odlišných podmínek. V případě neredukujících podmínek bylo v SGH *P. sergenti* detekováno 10 hlavních proteinů, v SGH *P. arabicus* 8 a v SGH *P. papatasi* 11. V případě redukujících podmínek bylo v SGH *P. sergenti* detekováno 9 hlavních proteinů, v SGH *P. arabicus* 7 a v SGH *P. papatasi* 9.

Obrázek 4.1 Elektroforetické profily slinných žláz *P. sergenti*, *P. arabicus* a *P. papatasi*

kDa – molekulová velikost standardu v kilodaltonech, STD – standard, Ser – *P. sergenti*, Ara – *P. arabicus*, Pap – *P. papatasi*



Tabulka 4.1 Proteinové profily slinných žláz flebotomů *P. sergenti*, *P. arabicus* a *P. papatasi*

kDa – molekulová velikost v kilodaltonech, Ser – SGH *P. sergenti*, Ara – SGH *P. arabicus*, Pap - SGH *P. papatasi*, + - protein o dané velikosti

Neredukující podmínky				Redukující podmínky			
kDa	Ser	Ara	Pap	kDa	Ser	Ara	Pap
75	+						
63	+			63			+
61			+	61	+		
60		+		60		+	
52	+			52	+		
49,5			+	49,5			+
46		+	+	47	+		+
45	+			46		+	
43		+		44,5	+		+
42,5			+				
41	+		+				
40	+						
37,5		+		39	+	+	+
35	+		+	35	+		
34		+	+	34		+	
31			+	32			+
30	+			30,5		+	
29		+		28,5	+	+	+
25		+		26,5	+		
24			+				
23,5		+					
23	+						
15			+	15			+
12,5	+			13		+	
11,5			+	11,5	+		+
celkem pruhů	10	8	11	celkem pruhů:	9	7	9

4.3.2 Charakterizace antigenů ve slinách *P. sergenti*, *P. arabicus* a *P. papatasi* pomocí imunoblotu

SGH rozdělené pomocí SDS-PAGE za neredukujících i redukujících podmínek byly přeneseny na nitrocelulózovou membránu a inkubovány se séry myší imunizovaných sáním uvedených druhů flebotomů a sérem z myší imunizované sáním *P. perniciosus*. Séra použitá na imunoblotech v obrázku 4.2 pocházely z myší dlouhodobě imunizovaných, délka a intenzita imunizace se však lišila. Konkrétní počty nasátých samic pro jednotlivé séra jsou: Sérum č.1 průměrně $48 \pm 4,4$ SE, č.2 $38 \pm 6,9$ SE, č.3 $47 \pm 7,5$ SE, č.5 $32 \pm 7,5$ SE, č.6 $30 \pm 7,3$ SE. Séra použitá při inkubacích s redukovánými antigeny byla ovšem ta samá jako při inkubacích s antigeny neredukovanými. V případě obrázku 4.3 séra pocházela z myších imunizovaných 5 týdnů sáním *P. sergenti*, o kterých se píše v kapitole 4.1. Tabulky 4.2, 4.3 a 4.4 udávají konkrétní odhady molekulových velikostí a intenzity zbarvení pruhů s antigeny, na něž se vázaly protilátky z testovaných sér.

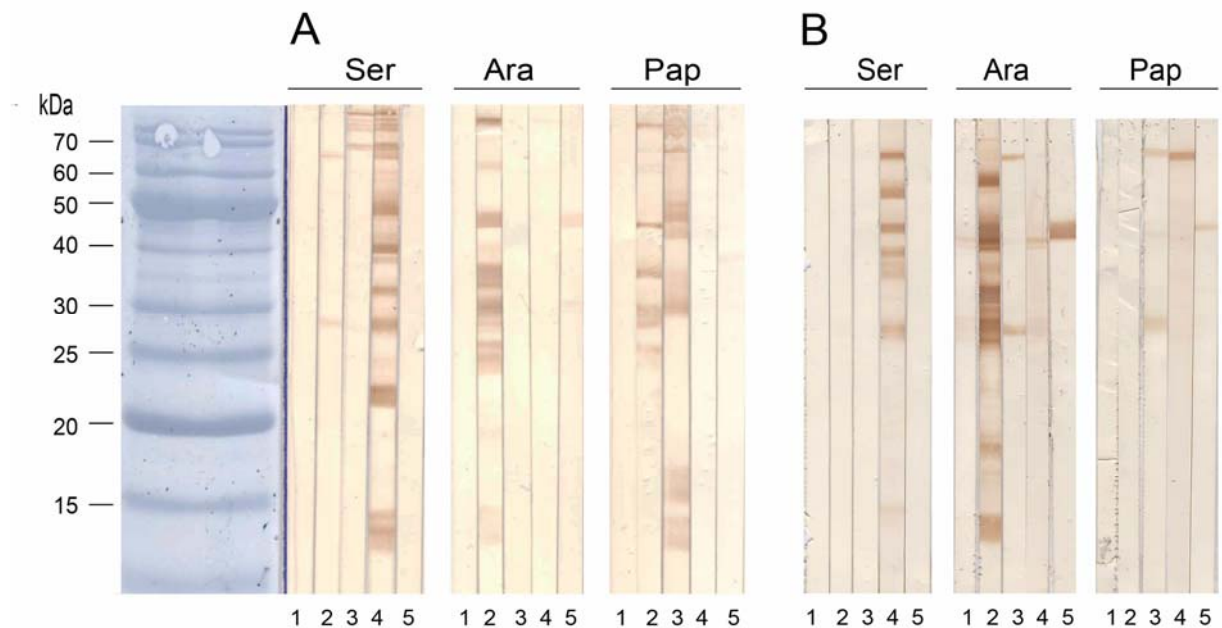
Ve žlázách *P. sergenti* bylo séry dlouhodobě imunizovaných myší sáním *P. sergenti* detekováno celkem 16 různých neredukovaných a 6 redukováných antigenů. V sérech myší imunizovaných 5 týdnů sáním *P. sergenti* se počet rozeznávaných antigenů lišil od 4 do 9. Byly pozorovány 2 neredukované antigeny o velikosti 65 a 27,5, které zkříženě reagovaly se séry dlouhodobě imunizovaných myší sáním *P. arabicus*. Se séry myší imunizovanými sáním *P. papatasi* reagovalo 6 antigenů – 4 z nich větší než 80 kDa, 2 o velikosti 70 kDa. V případě 5 týdenních imunizací to bylo 47,5, 45 a 41,5 kDa antigeny. Žádné redukováné antigeny ze žláz *P. sergenti* se séry myší imunizovanými *P. arabicus*, *P. papatasi* nebo *P. perniciosus* nereagovaly.

Ve žlázách *P. arabicus* bylo séry s protilátkami proti slinám *P. arabicus* detekováno 9 neredukovaných a 9 redukováných antigenů (nešlo však o stejně velké proteiny). Byl pozorován pouze 1 neredukovaný antigen (43 kDa) rozpoznávaný heterologním sérem – sérem z myší imunizovaných sáním *P. perniciosus*. Redukovaných antigenů bylo víc – 2 rozpoznávané séry s protilátkami anti-*P. papatasi* (66, 28 kDa), 2 rozpoznávané séry s protilátkami anti-*P. sergenti* (41,5, 40,5 kDa) a 1 rozpoznávaný séry s protilátkami anti-*P. perniciosus* (44,5 kDa). Dokonce byly rozpoznány 2 redukováné antigeny negativním sérem (41,5, 40,5 kDa).

Ve žlázách *P. papatasi* bylo séry s protilátkami anti-*P. papatasi* detekováno 8 neredukovaných a pouze 2 redukováné antigeny. Bylo pozorováno 5 neredukovaných

antigenů rozpoznávaných protilátkami anti-*P. arabicus* (> 80, 43.5, 36, 30, 24 kDa), 1 redukovaný antigen rozpoznávaných protilátkami anti-*P. sergenti* (63 kDa) a 1 redukovaný antigen rozpoznávaný protilátkami anti-*P. perniciosus* (44 kDa).

Obrázek 4.2 Imunoblot ze sér myší, na nichž dlouhodobě sály různé druhy flebotomů
 kDa – molekulová velikost standardu v kilodaltech, Ser – SGH *P. sergenti*, Ara – SGH *P. arabicus*, Pap – SGH *P. papatasi*, č.1-5 = séra imunizovaná sáním různých druhů flebotomů: 1 – negativní sérum, 2 – imunizace *P. arabicus*, 3 – imunizace *P. papatasi*, 4 – imunizace *P. sergenti*, 5 – imunizace *P. perniciosus*; obrázek A: SGH rozděleno za neredukujících podmínek; obrázek B: SGH rozděleno za redukujících podmínek



Tabulka 4.2 Neredukované antigeny v SGH *P. sergenti*, *P. arabicus* a *P. papatasi* rozpoznávané při dlouhodobé imunizaci sáním *P. sergenti*, *P. arabicus*, *P. perniciosus* a *P. papatasi*

kDa – molekulová velikost v kilodaltonech, Ser – SGH *P. sergenti*, Ara – SGH *P. arabicus*, Pap – SGH *P. papatasi*, aSer, aAra, aPap – antigeny rozpoznané protilátkami ze sér myši imunizovaných *P. sergenti*, *P. arabicus* a *P. papatasi* (v tabulce jsou uvedeny pouze ty případy, kdy reagoval se sérem alespoň jeden antigen), + - antigen o dané velikosti, číslo x – počet antigenů o dané velikosti

A) SGH *P. sergenti*

elfo profil		imunoblot			
kDa	Ser	kDa	aSer	aAra	aPap
		>80	4x +		4x +
75	+	70-65	4x +		2x + (70)
63	+			+ (65)	
52	+	50,5	+		
45	+	41,5	+		
41	+	41-40	+		
40	+				
35	+	37,5	+		
30	+	33,5	+		
23	+	27,5	+	+	
		21,5	+		
12,5	+	13,5	+		
celkem pruhů	10		16	2	6

B) SGH *P. arabicus* a *P. papatasi*

SGH <i>P. arabicus</i>					SGH <i>P. papatasi</i>					
elfo profil		imunoblot			elfo profil		imunoblot			
kDa	Ara	kDa	aAra	aPer	kDa	Pap	kDa	aAra	kDa	aPap
		>80	+				>80	+	>70	+
60	+	61	+		61	+			69	+
					50	+			50	+
46	+				46	+	43,5	+	46	+
43	+	46	+	+	42	+			42,5	+
					41	+				
37,5	+	35	+		35	+	36	+	32,5	+
34	+	30,5	+		34	+	30	+		
					31	+				
29	+	28,5	+		24	+	24	+		
25	+	26	+							
23,5	+	24	+							
		12,5	+							
					15	+			16	+
					11,5	+			13	+
celkem pruhů	8		9	1	celkem pruhů	11		5		8

Tabulka 4.3 Redukované antigeny v SGH *P. sergenti*, *P. arabicus* a *P. papatasi* rozpoznávané při dlouhodobé imunizaci sáním *P. sergenti*, *P. arabicus*, *P. perniciosus* a *P. papatasi*

kDa – molekulová velikost v kilodaltonech, Ser – SGH *P. sergenti*, Ara – SGH *P. arabicus*, Pap – SGH *P. papatasi*, aSer, aAra, aPap, aPer, neg – antigeny rozpoznané sérem myši imunizovaných *P. sergenti*, *P. arabicus*, *P. papatasi*, *P. perniciosus* a negativní sérum (v tabulce jsou uvedeny pouze ty případy, kdy reagoval se sérem alespoň jeden antigen), + - antigen o dané velikosti, číslo x – počet antigenů o dané velikosti

A) SGH *P. sergenti* a *P. papatasi*

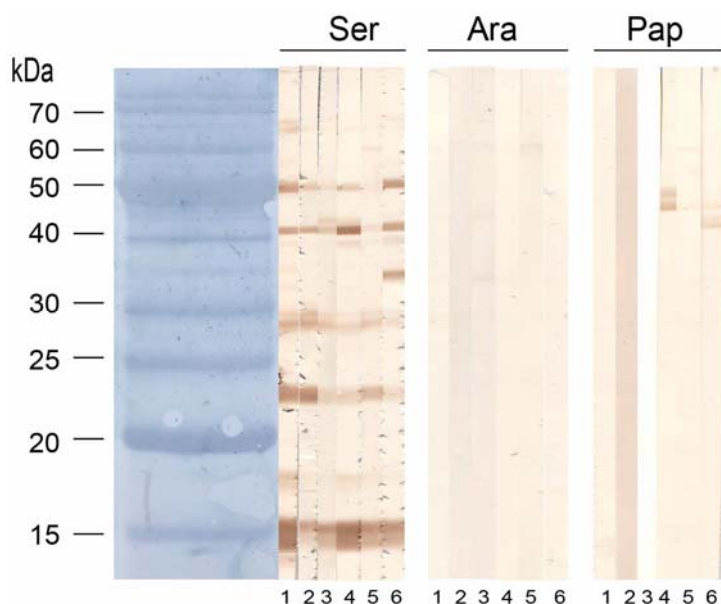
SGH <i>P. sergenti</i>				SGH <i>P. papatasi</i>						
elfo profil		imunoblot		elfo profil		imunoblot				
kDa	Ser	kDa	aSer	kDa	Pap	kDa	aPap	aSer	kDa	aPer
61	+	66	+	63	+	66	+	+		
52	+	55,5	+							
				49,5	+					
47	+	44,5	+	47	+					
44,5	+			44,5	+				44	+
39	+	39	+	39	+					
35	+	36	+	32	+					
28,5	+	28	+	28,5	+	28	+			
27,5	+									
11,5	+			15	+					
				11,5	+					
celkem pruhů	9		6	celkem pruhů	9		2			1

B) SGH *P. arabicus*

elfo profil		imunoblot								
kDa	Ara		aAra		aPap		aSer		aPer	neg
60	+			66	+					
		58,5	+							
46	+	44	+					44,5	+	
		42	+			41,5	+			41,5
		40,5	+			40,5	+			40,5
39	+	33	+							
34	+	30	+							
31-30	+									
28,5	+	28	+	28	+					
		26	+							
13	+	18	+							
		14	+							
celkem pruhů	7		9		2		2		1	2

Obrázek 4.3 Imunoblot ze sér myší, na nichž sály 5 týdnů samice *P. sergenti*

kDa – molekulová velikost standardu v kilodaltonech, Ser – SGH *P. sergenti*, Ara – SGH *P. arabicus*, Pap – SGH *P. papatasi*, č.1-6 = séra imunizovaná sáním různým počtem samic *P. sergenti*



Tabulka 4.4 Neredukované antigeny v SGH *P. sergenti*, *P. arabicus* a *P. papatasi* rozpoznávané při 5 týdnů dlouhé imunizaci sáním *P. sergenti*

kDa – molekulová velikost v kilodaltonech, Ser – SGH *P. sergenti*, Ara – SGH *P. arabicus*, Pap – SGH *P. papatasi*, č.1-6 = séra imunizovaná sáním různým počtem samic *P. sergenti*

elfo profil		imunoblot								
kDa	Ser	kDa	Ser						Pap	
			1	2	3	4	5	6	4	6
		>80	+	+	+					
75	+									
63	+	69	2x +							
52	+	50,5	+	+		+		+		
		47,5							+	
		45							+	+
45	+	41,5			+	+				+
41	+	40,5	+	+	+	+		+		
40	+									
35	+	37,5				+		+		
30	+	33,5						+		
		28	+	+	+	+	+			
		27	+	+	+	+	+			
23	+	21,5	+	+	+	+	+	+		
12,5	+	13,5	+	+	+	+	+	+		
celkem pruhů	10		9	7	7	8	4	6	2	2

5. DISKUZE

Experimentální část předkládané diplomové práce je rozdělena na tři tematické části: specifita imunitní odpovědi u myši imunizovaných *P. sergenti*, specifita imunitní odpovědi u myši imunizovaných *P. duboscqi* a infikovaných *Le. major*, charakterizace antigenů slinných žláz *P. sergenti*, *P. arabicus* a *P. papatasi*.

První část vychází z poznání, že sliny krevsajících členovců přenášejících důležitá infekční onemocnění, jakými jsou flebotomové a komáři, mají nejen účinek na hemostázi, ale ovlivňují také imunitní odpověď hostitele (shrnutí v Andrade *et al.* 2005). Sliny flebotomů mají inhibiční účinek na komplement, migraci leukocytů, proliferaci T-lymfocytů, produkci cytokinů, prezentaci antigenů, expresi kostimulačních molekul na povrchu antigen prezentujících buněk a také produkci NO v efektorových zabíjecí buňkách – makrofázích (Oliveira *et al.* 2009). Podobně je známo u slin komárů, že mají efekt na migraci leukocytů, proliferaci T-lymfocytů a produkci cytokinů (Schneider & Higgs 2008). Co se týče těch složek imunity, kterými jsem se zabýval v této práci, byl prokázán inhibiční efekt slin flebotomů rodu *Phlebotomus* i *Lutzomyia* na proliferaci T-lymfocytů (Titus 1998, Rohoušová *et al.* 2005a, Carregaro *et al.* 2008), inhibována byla také ve většině případů produkce Th1 cytokinů jako jsou IFN- γ a IL-12 (Costa *et al.* 2004, Rohoušová *et al.* 2005a), u Th2 cytokinů docházelo jak k inhibici – IL-10 (Costa *et al.* 2004) a IL-4 (Rohoušová *et al.* 2005a) slinami *L. longipalpis* a IL-4 *P. papatasi* a *P. sergenti* (Rohoušová *et al.* 2005a), tak stimulaci jejich produkce – IL-10 maxadilanem (Bozza *et al.* 1998). V případě vlivu na produkci NO, sliny *P. papatasi* byly schopné snížit expresi genu pro iNOS (inducibilní NO syntáza) a tím i produkci NO v myších makrofázích (Waitumbi & Warburg 1998, Katz *et al.* 2000), nebylo to však pozorováno v případě použití slin *L. longipalpis* (Katz *et al.* 2000).

Pokud je hostitel slinami flebotomů imunizován, dochází však často k vyrušení efektů slin nebo dokonce k opačnému nasměrování imunity: u flebotomů při opakovaném sání dochází často k navození DTH, která ovšem nebývá „čistá“ a jsou zastoupeny i jiné leukocyty než mononukleární fagocyty a T-lymfocyty (Belkaid *et al.* 2000, Silva *et al.* 2005, Teixeira *et al.* 2005, de Moura *et al.* 2007, Vinhas *et al.* 2007). Kromě buněk byly u imunizovaných myši (de Moura *et al.* 2007), psů (Collin *et al.* 2009) i lidí (Vinhas *et al.* 2007) detekovány také zvýšené hladiny cytokinů jak Th1, tak Th2 odpovědi. U komárů je DTH na rozdíl od opožděné reakce III. typu částečně potlačena (Depinay *et al.* 2006). Je

přítom snížen počet leukocytů ve spádové mízní uzlině a dále byl pozorován pokles produkce IFN- γ a vzestup IL-10 (Chen *et al.* 1998) i produkce IL-4 (Peng *et al.* 1996). Dokonce je zvýšená proliferace T-lymfocytů (Peng *et al.* 1996).

V této práci jsem pozoroval vliv žláz na mitogenem stimulované proliferace T-lymfocytů inkubovaných s SGH *P. sergenti*, *P. arabicus* a *P. papatasi*. U buněk nestimulovaných i stimulovaných mitogenem je v případě neimunizovaných myší jasně patrný obecný efekt inhibice proliferace vlivem homogenátu slinných žláz flebotomů, tak jak to bylo pozorováno dříve u slin flebotomů rodu *Phlebotomus* i *Lutzomyia* (Titus 1998, Rohoušová *et al.* 2005a, Carregaro *et al.* 2008). Při inkubacích s homogenáty všech druhů flebotomů totiž došlo ke statisticky signifikantní inhibici proliferace vlivem homogenátu vůči kontrole a zároveň byly nesignifikantní rozdíly mezi homogenáty jednotlivých druhů flebotomů. Mezi myšmi imunizovanými sáním *P. sergenti* a naivními myšmi byl zjištěn prokazatelný rozdíl mezi proliferacemi buněk inkubovaných s homogenátem *P. sergenti* – byl tedy patrný účinek imunizace na imunomodulační efekt slin. U nestimulovaných buněk byl dobře patrný efekt druhově specifického zrušení inhibice proliferace, jelikož u imunizovaných myší T-lymfocyty inkubované s homogenátem *P. sergenti* proliferovaly bez signifikantního rozdílu oproti kontrole a bylo dosaženo signifikantních rozdílů od inkubací se zbývajícími dvěma homogenáty. U stimulovaných buněk však specifita nebyla úplná – byla pozorována zkřížená reaktivita se žlázami *P. papatasi*. Přesto je zde tedy poprvé dokumentován specifický účinek imunizace sáním na proliferaci T-lymfocytů.

Co se týče vlivu imunizace na produkci cytokinů, sledoval jsem vliv na produkci IFN- γ a IL-4 v supernatantech získaných z kultur splenocytů, nepodařilo se mi však detekovat žádné signifikantní změny, přestože v případě imunizace psů slinami *L. longipalpis*, byla pozorována jak zvýšená produkce Th1 cytokinů - IFN- γ a IL-12, tak cytokinů Th2 odpovědi - IL-4, TGF- β (Collin *et al.* 2009) a u lidských dobrovolníků opakovaně poštípaných *L. longipalpis* produkce IFN- γ a IL-10 stoupla (Vinhas *et al.* 2007). Přičítám to problémům s metodikou, neboť hodnota blanků byla poměrně vysoká, a možná též nízkým koncentracím cytokinů v kulturách. Výsledky proto nejsou zařazeny do kapitoly 3.1.

Imunizace sáním flebotomů na laboratorních zvířatech (Volf & Rohoušová 2001, Rohoušová *et al.* 2005, Silva *et al.* 2005, Thiakaki *et al.* 2005, Oliveira *et al.* 2006, de Moura *et al.* 2007, Gomes *et al.* 2008, Hostomská *et al.* 2008) i lidech (Barral *et al.* 2000, Gomes *et al.* 2002, Rohoušová *et al.* 2005, de Moura *et al.* 2007, Vinhas *et al.* 2007) a komárů na zvířatech (Brummer-Korvenkontio *et al.* 1997, Chen *et al.* 1998) a lidech

(Brummer-Korvenkontio *et al.* 1994, Paluoso *et al.* 1997, Peng *et al.* 2004, Waitayakul *et al.* 2006, Pradines *et al.* 2007) indukuje tvorbu specifických protilátek proti slinám různých tříd a podtříd. U obyvatel turecké Sanliurfy pak byla prokázána též druhová specifita protilátek proti slinám – přestože mají v krvi IgG protilátky proti dvěma endemickým druhům flebotomů – *P. papatasi* a *P. sergenti*, tyto protilátky nereagovaly s SGH *L. longipalpis* (Rohoušová *et al.* 2005b).

Ve své práci jsem na tyto výsledky navázal a srovnával jsem reaktivitu protilátek třídy IgG v sérech myší imunizovaných sáním *P. sergenti* po dobu 5 týdnů na SGH druhů *P. sergenti*, *P. arabicus* a *P. papatasi*, vektorů kožních leishmanióz Starého světa (*Le. tropica* - *P. sergenti* a *P. arabicus*, *Le. major* - *P. papatasi*) (viz učebnice Volf *et al.* 2007). Signifikantně zvýšená hladina protilátek u myší imunizovaných versus neimunizovaných byla detekována pouze proti SGH *P. sergenti* a rozdíl v množství protilátek detekovaných *P. sergenti* a zbylými dvěma druhy SGH byl také statisticky prokazatelný, čímž byla prokázána specifita protilátek proti antigenům obou heterologních druhů – *P. arabicus* i *P. papatasi*.

Sliny flebotomů i komárů ovlivňují nejen imunitu hostitelů, ale také přenos patogenů (shrnuto v Andrade *et al.* 2005). U flebotomů homogenát slinných žláz *L. longipalpis* zhoršuje u neimunizovaných hostitelů průběh infekce *Le. major* (Titus & Ribeiro 1988, Theodos *et al.* 1991, Theodos & Titus 1993, Warburg *et al.* 1994), dále infekci *Le. amazonensis* (Theodos *et al.* 1991, Samuelson *et al.* 1991, Laurenti *et al.* 2009), *Le. braziliensis* (Samuelson *et al.* 1991, Lima & Titus 1996, Donnelly *et al.* 1998, Bezerra & Teixeira 2001) i *Le. chagasi* (Warburg *et al.* 1994). Sliny *P. papatasi* mají vliv na infekci *Le. major* u myší (Theodos, Ribeiro & Titus 1991, Belkaid *et al.* 1998, Mbow *et al.* 1998, Zer *et al.* 2001). Mezi choroby přenášené komáry, na jejichž infekci měly sliny komárů vliv, patří Cache-Valley virus přenášený druhy *Ae. triseriatus*, *Ae. aegypti* a *Cu. pipiens* (Edwards *et al.* 1998), virus Sindbis přenášený *Ae. aegypti* (Schneider *et al.* 2004), virus West Nile přenášený též *Ae. aegypti* (Schneider *et al.* 2006), virus Dengue přenášený *Ae. aegypti* (Ader *et al.* 2004), *Plasmodium gallinaceum* přenášené *Ae. fluviatilis* (Rocha *et al.* 2004) a filárie *Brugia pahangi* přenášená *Ae. aegypti* (Gillan & Devaney 2004).

Vliv slin flebotomů na imunitu během leishmaniových infekcí byl následující: Th1 cytokiny – produkce IFN- γ byla zvýšena v případě infekci *Le. major* spolu se slinami *L. longipalpis* myší (Monteiro *et al.* 2007). V případě aplikace žláz *P. papatasi* naopak došlo při infekci *Le. major* ke snížení produkce IFN- γ (Mbow *et al.* 1998, Rogers & Titus 2003), pouze v případě sání infikovanými flebotomů byl pozorován mírný vzestup (Kamhawi *et*

al. 2000). Z Th2 cytokinů byla stimulována produkce IL-4 v případě *L. longipalpis* - *Le. braziliensis* (Lima & Titus 1996), *L. longipalpis* – *Le. amazonensis* (Norsworthy *et al.* 2004) a v tomto případě byla stimulována též produkce IL-10. U myši infikovaných *Le. major* došlo v přítomnosti slin *P. papatasi* opět ke stimulaci produkce IL-4 (Belkaid *et al.* 1998, Mbow *et al.* 1998). Byla též pozorována snížená produkce NO u makrofágů, které byly před infekcí *Le. amazonensis* vystaveny SGE *L. longipalpis* (Norsworthy *et al.* 2004) a sliny *P. papatasi* u myši infikovaných *Le. major* snížily produkce NO (Hall & Titus 1995).

Při imunizaci slinami flebotomů byl pozorován naopak protektivní efekt této imunizace na infekce: *P. papatasi* – *Le. major* (Belkaid *et al.* 1998, Kamhawi *et al.* 2000), *L. longipalpis* – *Le. amazonensis* (Thiakaki *et al.* 2005) – v tomto případě byla prokázána druhová specifita protekce: pokud byly myši imunizovány SGH *P. papatasi* nebo *P. sergenti* a při infekci byly použity žlázy *L. longipalpis*, pak byla intenzita infekce srovnatelná s neimunizovanou kontrolou. Dále byl prokázán vliv slin *L. longipalpis* – na infekci *Le. chagasi* v lidských buňkách (Vinhas *et al.* 2007). Na myším modelu *L. intermedia* - *Le. braziliensis* ovšem protektivní efekt potvrzen nebyl, naopak imunizace vedla ke zhoršení infekce (de Moura *et al.* 2007).

Cytokiny při infekci po imunizaci byly nasměrovány k Th1 odpovědi: produkce IFN- γ a IL-12 byla zvýšena při imunizaci *P. papatasi* a infekci *Le. major* (Kamhawi *et al.* 2000, de Moura *et al.* 2007) a snížena byla produkce IL-4 (Belkaid *et al.* 1998).

Co se týče enhancing efektu u komárů, v případě přidání homogenátu *Ae. aegypti* k infekci viru *Sindbis* došlo ke snížené produkci antivirových cytokinů IFN- γ a IFN- β , zatímco produkce cytokinů IL-4 a IL-10 byla zvýšena oproti aplikaci samotných virových částic (Schneider *et al.* 2004). Jako příklad protektivního efektu imunizace slinami komárů byl prokázán účinek imunizace slinami *Ae. fluviatilis* na infekci *Plasmodium gallinaceum* u kuřat (Rocha *et al.* 2004) a slinami *An. stephensi* na infekci *Plasmodium yoelli* u myši (Donovan *et al.* 2007). Nižší parazitémie *Plasmodium yoelli* u myši (Balb/c) byla dosažena sáním komárů *An. stephensi* a byla spojena se zvýšením produkce iNOS a Th1 cytokinů IL-12 a IFN- γ (Donovan *et al.* 2007). V případě virových infekcí byl prokázán naopak enhancing efekt čili zhoršení infekce po imunizaci slinami, a to při infekci viru *West Nile* přenášeného *Ae. aegypti* (Schneider *et al.* 2007).

V druhé části experimentální práce byly myši imunizované sáním *P. duboscqi* a byly rozdělené do tří skupin – jedna byla imunizována po dobu patnácti týdnů – na té jsme testovali hypotézu, zda po dlouhodobé imunizaci dojde k desenzitizaci, druhá po dobu

dvou týdnů – krátkodobá imunizace by hypoteticky měla mít protektivní efekt, a třetí sloužila jako kontrolní – myši nebyly imunizované. Týden po poslední imunizaci byly myši infikovány *Le. major*. Následujících 6 týdnů byl myším 1x týdně měřen průměr lézí na uších. Sedmý týden byla myším odebrána krev z podpažních cév a po usmrcení také dále zpracováváný materiál – uši a spádové lymfatické uzliny, játra, slezina a peritoneální tekutina. Z velikostí lézí měřených v sedmém týdnu po infekci vyplývá, že se u skupiny 15× sátých myši projevil protektivní efekt – velikosti lézí byly nižší než u zbylých dvou skupin. Pravděpodobné vysvětlení tohoto „opozdění“ nástupu protektivního efektu spočívá v poměrně nízkých počtech nasátých flebotomů. Počty leishmanií se však signifikantně nelišily (diplomová práce Vlková 2009).

Při sledování vlivu imunizace sáním *P. duboscqi* na proliferaci T-lymfocytů, byly splenocyty inkubovány s SGH flebotomů *P. duboscqi*, *P. papatasi* a *P. perniciosus*. Statisticky prokazatelných rozdílů bylo dosaženo pouze u buněk, které nebyly stimulovány mitogenem – konkanavalin A buňky málo stimuloval a i přesto, že polovinu vzorků pomohla zpracovat dr. Havelková (ÚMG AV ČR), její výsledky byly podobné. Z tohoto důvodu jsou v diplomové práci uvedeny pouze výsledky z buněk nestimulovaných ConA. Jak u obou imunizovaných skupin, tak u skupiny naivních myši došlo k inhibici proliferací splenocytů, a to nezávisle na přidaném druhu SGH. Pokud šlo o rozdíly mezi inkubacemi s SGH jednotlivých druhů flebotomů, bylo dosaženo signifikantního rozdílu – poklesu, mezi SGH *P. duboscqi* a *P. perniciosus* u všech tří testovaných skupin myši. Nebyly však pozorované žádné rozdíly mezi skupinami v rámci inkubací s tou samou variantou SGH, takže se tento rozdíl nedá označit ani jako protektivní ani jako specifický efekt imunizace.

Na produkci NO byly testovány ty samé skupiny myši jako na proliferaci splenocytů – tj. obě dvě skupiny imunizovaných a skupina neimunizovaných – a opět byly signifikantní rozdíly pozorované pouze u nestimulovaných makrofágů – zdá se, že titrace stimulantů LPS a IFN- γ , která se ověřila v přípravných pokusech zde nebyla vhodná. Stejně byly také druhy flebotomů, z nichž byly použity SGH pro inkubaci s makrofágy. Šlo o druhy *P. duboscqi*, *P. papatasi* a *P. perniciosus*. K inhibici produkce NO vlivem SGH došlo ve většině případů - pouze u kultury buněk z myši imunizovaných 15 týdnů, které byly inkubovány s SGH *P. perniciosus* a kultury buněk z myši imunizovaných 2 týdny, které byly inkubovány s SGH *P. papatasi*, k ní nedošlo. Rozdíly mezi inkubacemi s jednotlivými žlázami na rozdíl od proliferací pozorovány nebyly – pouze u buněk z naivních myši bylo signifikantně méně NO při inkubaci s SGH *P. papatasi* než *P. duboscqi*, takže opět nebyl potvrzen specifický efekt imunizace. Byl zde však pozorován

jistý protektivní efekt, a to dokonce u inkubacemi se všemi SGH (což také potvrzuje tu nespecifitu imunizace) – nezávisle na použitém SGH byl prokázán pokles produkce NO mezi buňkami z myši imunizovaných 15 týdnů a buňkami z myši naivních. Oproti hypotéze byla tedy protektivní pouze dlouhodobá imunizace, což se shoduje s účinkem slin na velikost lézí (Vlková 2009).

Co se týče produkce cytokinů, zde již problém s metodikou nevyvstal, přesto nebyl pozorován žádný statistický rozdíl ani v produkci IFN- γ ani IL-4 mezi jednotlivými skupinami myši, i když v rámci produkce IFN- γ byla pozorován výrazně vyšší průměrná absorbance u myši imunizovaných 15 týdnů než u ostatních dvou skupin. Zde jde však o jasný rozpor s předchozí literaturou, neboť jak jsem již zmínil výše produkce cytokinů byla u myši při infekci *Le. major* po imunizaci *P. papatasi* nasměrována k Th1 odpovědi: produkce IFN- γ a IL-12 byla zvýšena (Kamhawi *et al.* 2000, de Moura *et al.* 2007) a snížena byla produkce IL-4 (Belkaid *et al.* 1998).

V poslední části experimentální práce jsem pomocí imunoblotu zjišťoval specifitu antigenů slinných žláz *P. sergenti*, *P. arabicus* a *P. papatasi* rozeznávaných IgG protilátkami. Již v práci Volf & Rohoušová (2001) byly porovnávány antigeny slinných žláz druhů *P. papatasi*, *P. perniciosus* a *P. halepensis*. Imunoblotty prokázaly 4-9 hlavních antigenů u každého druhu flebotoma, se kterými reagovala séra zvířat poštípaných tím samým druhem flebotoma. Zkřížené reakce nebyly prokázány mezi *P. papatasi* a zbylými dvěma druhy, ale mezi *P. perniciosus* a *P. halepensis* bylo několik společných antigenů, jak ve žlázách *P. perniciosus* rozpoznávaných anti-*P. halepensis* protilátkami, tak ve žlázách *P. halepensis* rozpoznávaných sérem ze zvířat poštípaných *P. perniciosus* (Volf & Rohoušová 2001). Mezi druhy *P. papatasi*, *P. sergenti* a *L. longipalpis* byl nalezen pomocí myších sér pouze jediný společný antigen, a to protein ve žlázách *P. papatasi* o velikosti mezi 24-29 kDa rozeznávaný sérem myši imunizovaných *P. sergenti* (Rohoušová *et al.* 2005b). Obyvatelé turecké Sanliurfy mají v krvi často IgG protilátky proti dvěma endemickým druhům flebotomů – *P. papatasi* a *P. sergenti*, tyto protilátky však nereagovaly s SGH *L. longipalpis* (Rohoušová *et al.* 2005b). Zajímavé též bylo, že přestože lidská a myši séra reagovala s podobnými hlavními antigeny *P. sergenti* a *P. papatasi*, tak ve žlázách *P. papatasi* myši séra rozeznávala silněji antigen o velikosti 42 kDa, zatímco lidská séra hlavně antigen o velikosti 30 kDa (Rohoušová *et al.* 2005b).

Přestože v první části diskuze jsem popsal úplnou specifitu protilátkové odpovědi proti slinám *P. sergenti* vůči antigenům *P. arabicus* a *P. papatasi* (ELISA test), při podrobnější identifikaci konkrétních antigenů byly prokázány některé zkřížené reakce. Ve

žlázách *P. sergenti* bylo séry dlouhodobě imunizovaných myší sáním *P. sergenti* detekováno celkem 16 různých neredukovaných a 6 redukováných antigenů. V sérech myší imunizovaných 5 týdnů sáním *P. sergenti* se počet rozeznávaných antigenů pohyboval od 4 do 9.

Ve slinách *P. sergenti* byly pozorovány 2 neredukované antigeny o velikosti 65 a 27,5, které zkříženě reagovaly se séry myší dlouhodobě imunizovaných sáním *P. arabicus*. Se séry myší imunizovanými sáním *P. papatasi* reagovalo 6 antigenů – 4 z nich větší než 80 kDa, 2 o velikosti 70 kDa. V případě 5 týdenních imunizací to bylo 47,5, 45 a 41,5 kDa antigeny. Žádné redukováné antigeny ze žláz *P. sergenti* se séry myší imunizovanými *P. arabicus*, *P. papatasi* nebo *P. perniciosus* nereagovaly.

Ve žlázách *P. arabicus* bylo séry s protilátkami proti slinám *P. arabicus* detekováno 9 neredukovaných a 9 redukováných antigenů (nešlo však o stejně velké proteiny). Byl pozorován pouze 1 neredukovaný antigen (43 kDa) rozpoznávaný heterologním sérem – sérem z myší imunizovaných sáním *P. perniciosus*. Redukovaných antigenů bylo víc – 2 rozpoznávané séry s protilátkami anti-*P. papatasi* (66, 28 kDa), 2 rozpoznávané séry s protilátkami anti-*P. sergenti* (41,5, 40,5 kDa) a 1 rozpoznávaný séry s protilátkami anti-*P. perniciosus* (44,5 kDa). Dokonce byly rozpoznány 2 redukováné antigeny negativním sérem (41,5, 40,5 kDa).

Ve žlázách *P. papatasi* bylo séry s protilátkami anti-*P. papatasi* detekováno 8 neredukovaných a pouze 2 redukováné antigeny. Bylo pozorováno 5 neredukovaných antigenů rozpoznávaných protilátkami anti-*P. arabicus* (> 80, 43,5, 36, 30, 24 kDa), 1 redukováný antigen rozpoznávaných protilátkami anti-*P. sergenti* (63 kDa) a 1 redukováný antigen rozpoznávaný protilátkami anti-*P. perniciosus* (44 kDa).

6. SHRNU TÍ

Předkládaná diplomová práce se zabývá specifitou imunitní odpovědi myší na sání flebotomů, srovnáním dlouhodobé a krátkodobé imunizace na imunitu myší a charakterizací antigenů ve slinách vybraných druhů flebotomů.

U myší imunizovaných sáním *P. sergenti* byl prokázán specifický účinek slin *P. sergenti* na proliferaci splenocytů s částečnou zkříženou rekcí vůči antigenům slin *P. papatasi*. vlivem slin flebotomů a specifita protilátkové odpovědi na sání *P. sergenti*.

Při imunizaci sáním *P. duboscqi* zrušení inhibice proliferace T-lymfocytů dosaženo nebylo, byl ale patrný efekt na produkci NO makrofágy, která byla u dlouhodobě imunizovaných myší méně inhibována. Nebyl potvrzen vliv imunizace *P. duboscqi* na produkci cytokinů IFN- γ a IL-4.

Při imunizaci sáním *P. sergenti*, *P. arabicus*, *P. papatasi* a *P. perniciosus* byly pomocí imunoblotu nalezeny antigeny ve žlázách *P. sergenti*, *P. arabicus* a *P. papatasi*, které reagovaly pokaždé minimálně s jedním heterologním sérem. Specifita reakce byla závislá na přípravě antigenu: vyšší specifita byla pozorována za redukcí podmínek.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- Ader D.B., Celluzzi C., Bisbing J., Gilmore L., Gunther V., Peachman K.K., Rao M., Barvir D., Sun W. & Palmer D.R. (2004). Modulation of dengue virus infection of dendritic cells by *Aedes aegypti* saliva. *Viral Immunology* 17: 252–265.
- Andrade B.B., Teixeira C.R., Barral A. & Barral-Netto M. (2005). Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 77 (4): 665-93
- Anjili CO, Mbatia PA, Mwangi RW et al. (1995). The chemotactic effect of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates to murine monocytes. *Acta Trop* 1995;60:97–100.
- Barral, A., Honda, E., Caldas, A., Costa, J., Vinhas, V., Rowton, E.D., Valenzuela, J.G., Charlab, R., Barral-Netto, M., and Ribeiro, J.M.C. (2000). Human immune response to sand fly salivary gland antigens: A useful epidemiological marker? *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene* 62, 740-745.
- Belkaid Y., Kamhawi S., Modi G., Valenzuela J., Noben-Trauth N., Rowton E., Ribeiro J. & Sacks D.L. (1998). Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *The Journal of experimental medicine* 188: 1941-1953.
- Belkaid Y., Valenzuela J.G., Kamhawi S., Rowton E., Sacks D.L. & Ribeiro J.M. (2000). Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 6704-6709.
- Bezerra HS, Teixeira MJ (2001). Effect of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates on *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in BALB/c mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001 Apr;96(3): 349-51.
- Bissonnette E., Rossignol P. & Befus D. (1993). Extracts of mosquito salivary gland inhibit tumour necrosis alpha release from mast cells. *Parasite immunology* 15: 27-33
- Boppana VD, Thangamani S, Adler AJ, Wikel SK (2009). SAAG-4 is a novel mosquito salivary protein that programmes host CD4 T cells to express IL-4. *Parasite Immunol.* 2009 Jun;31(6):287-95.
- Bozza M., Soares M.B.P., Bozza P.T, et al. (1998). The PACAP-type I receptor agonist maxadilan from sand fly saliva protects mice against lethal endotoxemia by a mechanism partially dependent on IL-10. *European journal of immunology* 28: 3120–3127
- Brummer-Korvenkontio, H., Lappalainen, P., Reunala, T., and Palosuo, T. (1994). Clinical aspects of allergic disease. Detection of mosquito saliva-specific IgE and IgG4

- antibodies by immunoblotting. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 93, 551-555.
- Brummer-Korvenkontio, H., Palosuo, T., Francois, G., and Reunala, T. (1997). Characterization of *Aedes communis*, *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi* mosquito saliva antigens by immunoblotting. Cabrera R, Guarda R & Gonzalez S. Parasitic Infections. In *Skin Immune System (SIS)*. London: CRC Press; 1997: 605–616.
- Calvo, E; Mans, BJ; Andersen, JF, et al. (2006). Function and evolution of a mosquito salivary protein family. *Journal of Biological Chemistry* 28: 1935-1942.
- Cavalcante, RR; Pereira, MH; Gontijo, NF. (2003). Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitology* 127: 87-93.
- Carregaro, V; Valenzuela, JG; Cunha, TM, et al. (2008). Phlebotomine salivas inhibit immune inflammation-induced neutrophil migration via an autocrine DC-derived PGE(2)/IL-10 sequential pathway. *Journal of Leukocyte Biology* 84: 104-114.
- Champagne DE, Smartt CT, Ribeiro JMC & James AA. The salivary gland-specific apyrase of the mosquito *Aedes aegypti* is a member of the 5'-nucleotidase family. *PNAS* 1995; **92**: 694–698.
- Charlab R., Valenzuela J.G., Rowton E.D., Ribeiro J.M., Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 15155–15160.
- Charlab R., Rowton E.D., Ribeiro J.M.C., The salivary adenosine deaminase from the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, *Exp. Parasitol.* 95 (2000) 45–53.
- Chen YL, Simons FE, Peng Z. A mouse model of mosquito allergy for study of antigen-specific IgE and IgG subclass responses, lymphocyte proliferation, and IL-4 and IFN-gamma production. *Int Arch Allergy Immunol* 1998;116:269–277. [PubMed: 9693276]
- Collin N, Gomes R, Teixeira C, Cheng L, Laughinghouse A, Ward JM, Elnaiem DE, Fischer L, Valenzuela JG, Kamhawi S. (2009) Sand fly salivary proteins induce strong cellular immunity in a natural reservoir of visceral leishmaniasis with adverse consequences for *Leishmania*. *PLoS Pathog.* 2009 May;5(5):e1000441.
- Collis M.G., The vasodilator role of adenosine, *Pharmacol. Ther.* 41 (1989) 143–162.
- Costa D.J., Favali C., Clarencio J., et al. (2004). *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. *Infection and immunity* 72: 1298–1305.
- Cross M.L., Cupp E.W. & Enriquez E.J. (1994). Differential modulation of murine cellular immune responses by salivary gland extract of *Aedes aegypti*. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 51: 690–696.

- de Moura, TR; Oliveira, F; Novais, FO, et al. (2007). Enhanced *Leishmania braziliensis* Infection Following Pre-Exposure to Sandfly Saliva. *Plos Neglected Tropical Diseases* 1 a.n.: e84.
- Depinay N, Hacini F, Beghdadi W, Peronet R, Mécheri S (2006). Mast cell-dependent down-regulation of antigen-specific immune responses by mosquito bites. *J Immunol.* 2006 Apr 1;176(7):4141-6.
- Demeure C.E. Brahimi K., Hacini F., Marchand F., Peronet R., Huerre M., St-Mezard, Nicolas J.F., Brey P., Delespesse G., Mecheri S. (2005). *Anopheles* mosquito bites activate cutaneous mast cells leading to a local inflammatory response and lymph node hyperplasia. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*174: 3932– 3940.
- Dionisotti S., Zocchi C., Varani K., Borea P.A., Ongini E., Effects of adenosine derivatives on human and rabbit platelet aggregation. Correlation of adenosine receptor affinities and antiaggregatory activity, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 346 (1992) 673–676.
- Donnelly K.B., Lima H.C. & Titus R.G. (1998). Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania braziliensis* in the presence or absence of sand fly vector salivary gland lysate. *The Journal of parasitology* 84: 97-103.
- Donovan, MJ; Messmore, AS; Scrafford, DA, et al. (2007). Uninfected mosquito bites confer protection against infection with malaria parasites. *Infection and Immunity* 75: 2523-2530.
- Edwards JF (1994). Cache Valley virus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1994 Nov;10(3):515-24.
- Edwards J.F., Higgs S. & Beaty B.J. (1998). Mosquito feeding-induced enhancement of Cache Valley Virus (Bunyaviridae) infection in mice. *Journal of medical entomology*35: 261– 265.
- Gillan V. & Devaney E. (2004). Mosquito transmission modulates the immune response in mice infected with the L3 of *Brugia pahangi*. *Parasite immunology.* Aug-Sep 26(8-9): 359-63.
- Gomes, R.B., Brodskyn, U., de Oliveira, C.I., Costa, J., Miranda, J.C., Caldas, A., Valenzuela, J.G., Barral-Netto, M., and Barral, A. (2002). Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti- *Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. *Journal Of Infectious Diseases* 186, 1530-1534.
- Gomes R, Teixeira C, Teixeira MJ, Oliveira F, Menezes MJ, Silva C, de Oliveira CI, Miranda JC, Elnaiem DE, Kamhawi S, Valenzuela JG, Brodskyn CI. (2008). Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(22):7845-50.

- Hall LR, Titus RG (1995). Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *J Immunol.* 1995 Oct 1;155(7):3501-6.
- Hostomska, J, Rohousova I, Volfova V, Stanneck D, Mencke N, Volf P. (2008). Kinetics of canine antibody response to saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 8: 443-450.
- Kamhawi S. (2000). The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2: 1765–1773.
- Kamhawi S., Belkaid Y., Modi G., Rowton E. & Sacks D. (2000). Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290: 1351–1354.
- Katz, O; Waitumbi, JN; Zer, R, et al. (2000). Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62: 145-150.
- Klein J. and Hořejší V. (1997). Immunology. *Blackwell Science*.
- Lima H.C. & Titus R.G. (1996). Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infection and immunity* 64: 5442–5445.
- Monteiro MC, Lima HC, Souza AA, Titus RG, Romão PR, Cunha FQ. Effect of *Lutzomyia longipalpis* salivary gland extracts on leukocyte migration induced by *Leishmania major*. *Am J Trop Med Hyg* 2007;76:88–94.
- Morris R.V., Shoemaker C.B., David J.R., Lanzaro G.C. & Titus R.G. (2001). Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167: 5226– 5230.
- Mbow M.L., Bleyenbergh J.A., Hall L.R. & Titus R.G. (1998). *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 161: 5571–5577.
- Norsworthy NB, Sun J, Elnaïem D, Lanzaro G, Soong L. (2004). Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. *Infection and immunity* 72(3):1240-7.
- Oliveira, F., Kamhawi, S., Seitz, A.E., Pham, V.M., Guigal, P.M., Fischer, L., Ward, J., and Valenzuela, J.G. (2006). From transcriptome to immunome: Identification of DTH inducing proteins from a *Phlebotomus ariasi* salivary gland cDNA library. *Vaccine* 24, 374-390.

- Oliveira, F; Lawyer, PG; Kamhawi, S, et al. (2008). Immunity to Distinct Sand Fly Salivary Proteins Primes the Anti-Leishmania Immune Response towards Protection or Exacerbation of Disease. *Plos Neglected Tropical Diseases* 2 a.n. e226.
- Oliveira, F; Jochim RC; Valenzuela, JG; Kamhawi, S (2009). Sand flies, Leishmania, and transcriptome-borne solutions. *Parasitol Int.* 2009 Mar;58(1):1-5. Epub 2008 Aug 16. Review.
- Peng Z, Yang M, Simons FE. Immunologic mechanisms in mosquito allergy: correlation of skin reactions with specific IgE and IgG antibodies and lymphocyte proliferation response to mosquito antigens. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1996;77:238–244.
- Peng, Z., Man K.H., Caihe L., and Simons F.E.R. (2004). Evidence for natural desensitization to mosquito salivary allergens: mosquito saliva specific IgE and IgG levels in children. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 93, 553-556.
- Pradines, E; Almeras, L; de Senneville, LD, et al. (2007). Antibody response against saliva antigens of *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* in travellers in tropical Africa. *Microbes and Infection* 9: 1454-1462.
- Reunala T, Brummer-Korvenkontio H, Räsänen L, François G, Palosuo T. (1994) Passive transfer of cutaneous mosquito-bite hypersensitivity by IgE anti-saliva antibodies. *J Allergy Clin Immunol.* 1994 Nov;94(5):902-6.
- Qureshi A.A., Asahina A., Ohnuma M., Tajima M., Granstein R.D. & Lerner E.A. (1996). Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilator peptide from sand fly salivary gland extracts. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 54: 665–671.
- Owhashi, M; Harada, M; Suguri, S, et al. (2008). Identification of an eosinophil chemotactic factor from anopheline mosquitoes as a chitinase family protein. *Parasitology Research* 102: 357-363.
- Ribeiro, J.M.C. (1987). Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annual Review of Entomology* 32, 463-478.
- Ribeiro J.M., Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect. Agents Dis.* 4 (1995) 143–152.
- Ribeiro J.M., Katz O., Pannell L.K., Waitumbi J., Warburg A., Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP, *J. Exp. Biol.* 202 (1999) 1551–1559.
- Ribeiro J.M., Rowton E.D. & Charlab R. (2000). The salivary 5'-nucleotidase/phosphodiesterase of the hematophagous sand lutzomyia fly, *Lutzomyia longipalpis*. *Insect biochemistry and molecular biology* 30: 279-285

- Ribeiro JMC & Francischetti IMB. Platelet-activating-factorhydrolyzing phospholipase C in the salivary glands and saliva of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *J Exp Biol* 2001; **204**: 3887–3894.
- Ribeiro JMC, Charlab R & Valenzuela JG. The salivary adenosine deaminase activity of the mosquito *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. *J Exp Biol* 2001; **204**: 2001–2010.
- Ribeiro JMC & Valenzuela JG. The salivary purine nucleosidase of the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 2003; **33**: 13–22.
- Rogers K.A. & Titus R.G. (2003). Immunomodulatory effects of Maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary *in vitro* immune responses. *Parasite immunology* 25: 127–134.
- Rohoušová I., Volf P. & Lipoldová M. (2005a). Modulation of murine cellular immune response and cytokine production by salivary gland lysate of three sand fly species. *Parasite immunology* 27, 469-473
- Rohousova, I., Ozensoy, S., Ozbel, Y., and Volf, P. (2005b). Detection of species specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. *Parasitology* 130, 493-499.
- Rocha A.C., Braga E.M., Araujo M.S., Franklin B.S. & Pimenta P.F. (2004). Effect of the *Aedes fluviatilis* saliva on the development of *Plasmodium gallinaceum* infection in *Gallus (gallus) domesticus*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*99: 709– 715.
- Samuelson J., Lerner E., Tesh R. & Titus R. (1991). A mouse model of *Leishmania braziliensis braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. *The Journal of experimental medicine*173: 49-54.
- Schneider B.S., Soong L., Zeidner N.S. & Higgs S. (2004). *Aedes aegypti* salivary gland extracts modulate anti-viral and TH1/TH2 cytokine responses to sindbis virus infection. *Viral Immunology* 17: 565– 573.
- Schneider, BS; Soong, L; Girard, YA, et al. (2006). Potentiation of West Nile encephalitis by mosquito feeding. *Viral Immunology* 19: 74-82.
- Schneider, BS; Higgs, S. (2008).The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102: 400-408.
- Silva F., Gomes R., Prates D., Miranda J.C., Andrade B.B., Barral-Netto M. & Barral A. (2005). Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 72: 94– 8.
- Soares M.B.P., Titus R.G., Shoemaker C.B., David J.R. & Bozza M. (1998). The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate

- cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 160: 1811–1816.
- Stark KR & James AA. Isolation and characterization of the gene encoding a novel factor Xa-directed anticoagulant from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J Biol Chem* 1998; **273**: 20802–20809.
- Theodos C.M., Ribeiro J.M. & Titus R.G. (1991). Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. *Infection and immunity* 59: 1592-1598.
- Theodos C.M. & Titus R.G. (1993). Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* has an inhibitory effect on macrophage function *in vitro*. *Parasite immunology* 15: 481–487.
- Thiakaki M., Rohousova I., Volfova V., Volf P., Chang K.P., Soteriadou K. (2005). Sand fly specificity of saliva-mediated protective immunity in *Leishmania amazonensis*-BALB/c mouse model. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 7(4):760-6.
- Titus R.G. (1998). Salivary gland lysate from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* suppresses the immune response of mice to sheep red blood cells *in vivo* and concanavalin A *in vitro*. *Experimental parasitology* 89: 133–136.
- Titus R.G. & Ribeiro J.M. (1988). Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 239: 1306–1308.
- Valenzuela JG, Francischetti IMB & Ribeiro JMC. Purification, cloning, and synthesis of a novel salivary anti-thrombin from the mosquito *Anopheles albimanus*. *Biochemistry* 1999; **38**: 11209–11215
- Valenzuela J.G., Belkaid Y., Garfield M.K., Mendez S., Kamhawi S., Rowton E.D., Sacks D.L., Ribeiro J.M. (2001a). Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *The Journal of experimental medicine* 194(3):331-42.
- Valenzuela J.G., Belkaid Y., Rowton E. & Ribeiro J.M. (2001b). The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel *Cimex* family of apyrases. *The Journal of experimental biology* 204: 229-237.
- Valenzuela JG, Charlab R, Gonzalez EC, de Miranda-Santos IKF, Marinotti O, Francischetti IMB. (2002). The D7 family of salivary proteins in blood sucking diptera. *Insect Molecular Biology* 11: 149-155
- Vinhas, V; Andrade, BB; Paes, F, et al. (2007). Human anti-saliva immune response following experimental exposure to the visceral leishmaniasis vector, *Lutzomyia longipalpis*. *European Journal of Immunology* 37: 3111-3121.
- Volf, P. and Rohousova, I. (2000). Sandfly salivary antigens and antibody response in bitten animals. *Proceedings of the 13th European SOVE Meeting* 17-20.

- Volf, P. and Rohousova, I. (2001). Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies. *Parasitology* 122, 37-41
- Volfová, V; Hostomská, J; Černý, M. (2008). Hyaluronidase of Bloodsucking Insects and Its Enhancing Effect on Leishmania Infection in Mice. *Plos Neglected Tropical Diseases* 2 - e294.
- Waidhet-Kouadio P, Yuda M, Ando K & Chinzei Y. Purification and characterization of a thrombin inhibitor from the salivary glands of a malarial vector mosquito, *Anopheles stephensi*. *Biochim Biophys Acta* 1998; **1381**: 227–233.
- Waitayakul A, Somsri S, Sattabongkot J, Looareesuwan S, Cui LW, Udomsangpetch R. (2006). Natural human humoral response to salivary gland proteins of *Anopheles* mosquitoes in Thailand. *Acta Tropica* 98: 66-73.
- Waitumbi, J; Warburg, A. (1998). *Phlebotomus papatasi* saliva inhibits protein phosphatase activity and nitric oxide production by murine macrophages. *Infection and Immunity* 66: 1534-1537.
- Wanasen N., Nussenzveig R.H., Champagne D.E., Soong L. & Higgs S. (2004). Differential modulation of murine host immune response by salivary gland extracts from the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Medical and veterinary entomology* 18: 191–199.
- Warburg A., Saraiva E., Lanzaro G.C., Titus R.G. & Neva F. (1994). Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 345: 223-230.
- Wasserman H.A., Singh S. & Champagne D.E. (2004). Saliva of the Yellow Fever mosquito, *Aedes aegypti*, modulates murine lymphocyte function. *Parasite immunology* 26, 295 – 306
- Wheat WH, Pauken KE, Morris RV, Titus RG. (2008). *Lutzomyia longipalpis* salivary peptide maxadilan alters murine dendritic cell expression of CD80/86, CCR7, and cytokine secretion and reprograms dendritic cell-mediated cytokine release from cultures containing allogeneic T cells. *J Immunol.* 2008 Jun 15;180(12):8286-98. [Click here to read](#)
- Wikel SK. Immune responses to arthropods and their products. *Ann Rev Entomol* 1982; **27**: 21–48
- Zeidner N.S., Higgs S., Happ C.M., Beaty B.J. & Miller E.N. (1999). Mosquito feeding modulates Th1 and Th2 cytokines in flavivirus susceptible mice: an effect mimicked by injection of sialokinins, but not demonstrated in flavivirus resistant mice. *Parasite immunology* 21: 35–44.
- Zer R., Yaroslavski I., Rosen L., Warburg A. (2001). Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. *International Journal for Parasitology* 31: 810 – 814.