

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie



Bakalářská práce

Vliv slin krevsajícího dvoukřídlého hmyzu na imunitní systém hostitele se zaměřením na buněčnou a cytokinovou odpověď

Effect of blood-feeding *Diptera* saliva on host immune system with emphasis on cellular and cytokine response

Jan Drahota

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Iva Rohoušová, PhD.

2007

OBSAH

Poděkování	3
Seznam použitých zkratk	4
Abstrakt	5
Klíčová slova	6
1. Úvod	7
2. Literární přehled	8
2.1 Stručná charakterizace krevsajcího hmyzu z řádu <i>Diptera</i>	8
2.2 Rozdělení cytokinů a imunitní odpověď na patogeny přenášené krevsajcím hmyzem	9
2.2.1 Rozdělení cytokinů	9
2.2.2 Odpověď imunitního systému na patogeny přenášené krevsajcím hmyzem	10
2.3 Flebotomové	12
3.3.1 Vliv slin flebotomů na imunitní systém neinfikovaného hostitele	12
3.3.2 Vliv slin flebotomů na přenos leishmaniové infekce	17
3.3.3 Vliv slin flebotomů na imunitní systém hostitele infikovaného leishmaniemi	18
2.4 Komáři	21
3.4.1 Vliv slin komárů na imunitní systém hostitele	21
3.4.2 Vliv slin komárů na přenos infekčních chorob	23
2.5 Muchničky	25
2.5.1 Vliv slin muchniček na imunitní systém hostitele	25
2.6 Imunomodulační vlastnosti vybraných komponent slin krevsajcích dvoukřídlých	27
3. Závěr	29
4. Přehled citované literatury	31

PODĚKOVÁNÍ

Chtěl bych poděkovat všem, kteří mi pomohli s prací na bakalářské práci, především své školitelce Dr. Ivě Rohoušové za cenné rady, ochotu a především trpělivost, kterou se mnou měla. Dále bych chtěl poděkovat své rodině za zázemí a psychickou podporu, jež mi při této činnosti poskytla.

SEZNAM ZKRATEK

Ia	podtyp myších MHC II molekul
Ae.	<i>Aedes</i>
BALB/c	myší imbrední kmen citlivý na leishmaniózu
CBA	myší imbrední kmen rezistentní na leishmaniózu
CD80, CD86	kostimulační povrchové molekuly na povrchu antigen prezentujících buněk (váží se na molekulu CD28 na povrchu lymfocytů)
<i>Cu.</i>	<i>Culex</i>
DTH	(delayed type hypersensitivity) buněčná oddálená přecitlivělost – jde především o infiltraci mononukleárních buněk
GM-CSF	(granulocyte monocyte colony stimulating factor) faktor stimulující kolonie granulocytů a monocytů
HLA-DR	(human leukocyte antigen) jde o jeden ze tří izotypů lidských MHC II. třídy
IFN	interferon
IL	interleukin
IL-1Ra	(receptor antagonist) antagonist receptoru pro IL-1
<i>L.</i>	<i>Lutzomyia</i>
<i>Le.</i>	<i>Leishmania</i>
LPS	lipopolysacharid, komponent buněčné stěny Gram negativních bakterií
MHC II. třídy	(major histocompatibility complex) = povrchové glykoproteiny, na kterých prezentuje fagocyt naštěpené pohlcené částice
OVA	ovalbumin, protein vaječného bílku stimulující T-lymfocyty
OVA-TCR DO11	myší imbrední kmen, jehož T-lymfocyty reagují na stimulaci ovalbuminem
<i>P.</i>	<i>Phlebotomus</i>
PBMC	(peripheral blood mononuclear cell) – krevní forma leukocytů s jedním jádrem – patří sem monocyty a lymfocyty
PGE2	prostaglandin E2 (patří mezi metabolity kyseliny arachidonové, má mimo jiné i prozánětlivý účinek)
Th lymfocyty	(Thymus helper) regulační lymfocyty vyvíjející se v thymu
TGF	(transforming growth factor) transformující růstový faktor
TNF	tumor nekrotizující faktor

ABSTRAKT

Sliny krevsajících členovců mají schopnost působit na hemostázi hostitele. Poměrně nedávno byla objevena schopnost slin krevsajících členovců působit také na imunitní systém hostitele a bylo prokázáno, že tato modulace má vliv na přenos a rozvoj infekčních chorob, které tyto členovci přenášejí. Tato práce má za cíl shrnout poznatky týkající se cytokinové a buněčné imunitní odpovědi hostitele na sliny krevsajících členovců, a to jak u hostitele zdravého, tak nakaženého některými z přenášených chorob. Vzhledem k budoucímu zaměření diplomové práce je tato práce orientována na dvoukřídlý hmyz.

ABSTRACT

Saliva of blood-feeding arthropod species have an ability to affect host's haemostatic system. Recently saliva of many blood-feeding arthropod species was found to have also immunomodulatory properties and it was shown that saliva affects transmission and development of blood-feeding arthropod-borne diseases. This work aims to sum up current knowledge on host cytokine and cellular immune response to saliva of blood-feeding arthropods. Modulation of the immune responses is reviewed in both infected and uninfected hosts. With regard to the goals of the future diploma thesis, this work focuses on *Diptera*.

KLÍČOVÁ SLOVA

Buněčná imunitní odpověď, cytokiny, Diptera, imunomodulace, krevsající členovci, přenos infekčních onemocnění, vakcíny

1. ÚVOD

Krevsající hmyz patří mezi velice významné přenašeče infekčních onemocnění. Podle Světové zdravotnické organizace (WHO) patří nákazy přenášené krevsajícím hmyzem mezi 7 z 10 nejzávažnějších infekčních onemocnění na světě, přičemž 6 z těchto onemocnění je přenášeno dvoukřídlým hmyzem. Proti žádnému z těchto onemocnění zatím neexistuje účinná vakcína (<http://www.who.int/tdr/diseases/>).

Již delší dobu je známo, že sliny krevsajících členovců mají antihemostatické a vazodilatační účinky, které napomáhají sání na hostiteli. 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 včetně buněčné a cytokinové odpovědi.

Poslední dobou se dále ukazuje, že u opakovaně pobodaných hostitelů vyvolávají sliny imunitní reakci, která znesnadní či dokonce znemožní přenos infekčních chorob. Jedná se zřejmě o inaktivaci imunoaktivních komponent slin, ale přesný mechanismus není dosud znám. Poznání těchto mechanismů by tak mohlo umožnit využití slin přenašeče jako součásti tzv. „transmission blocking vaccine“, ideálně v kombinaci s vakcínou zaměřenou přímo proti danému infekčnímu agens.

Tato bakalářská práce se snaží podat ucelený přehled konkrétních imunomodulačních aktivit slin na složky adaptivní imunity reprezentovaných cytokiny a buněčnou odpovědí. S ohledem na zaměření budoucí diplomové práce je hlavní důraz kladen na následující skupiny dvoukřídlého hmyzu (*Diptera: Nematocera*): flebotomové, komáři a muchničky.

Tématem diplomové práce bude specifita imunitní odpovědi opakovaně pobodaného hostitele, a to na modelu myš – flebotomus. Specifitu imunitní odpovědi budeme sledovat především pomocí mitogenem stimulované proliferace T-lymfocytů (lymfoproliferační test) a vlivu slin na produkci cytokinů (cytokinová Microarray, ELISA). Získaná data budou doplněna o detekci specifických protilátek v sérech pobodaných myší (ELISA, imunoblot).

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 STRUČNÁ CHARAKTERIZACE KREVSAJÍCÍHO HMYZU Z ŘÁDU *DIPTERA*

Řád *Diptera* spadá do třídy *Hexapoda*, podtřídy *Insecta*. Skupiny, na které je tato práce zaměřena jsou flebotomové, komáři a muchničky. Patří do stejného podřádu – dlouhorozí (*Nematocera*). Jejich společnými znaky jsou dlouhá tykadla, jejichž články jsou přibližně stejného tvaru, obdobná makadla a kukly. Pro flebotomy a muchničky je stejný i způsob sání, pro který se řadí do skupiny tzv. thelmofágů. Ti sají krev z potravních lézí vzniklých natržením jedné či více kapilár. Naproti tomu solenofágové, mezi které patří komáři, napichují přímo krevní kapiláry či arterioly v kůži hostitele. U všech tří skupin krev sají pouze samice (Beaty & Marquardt 1996).

2.2 ROZDĚLENÍ CYTOKINŮ A ODPOVĚĎ IMUNITNÍHO SYSTÉMU NA PATOGENY PŘENÁŠENÉ KREVSAJÍCÍM HMYZEM

2.2.1 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 bakalářské práce se budeme držet následujícího rozdělení (Hořejší & Bartůňková 2002):

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

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

Jednotlivé cytokiny jsou produkovány různými buňkami imunitního systému, pro naše účely bude dostatečná informace, že IL-1 produkují makrofágy a neutrofily 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 neutrofily, IL-8 různé typy buněk, IL-10 Th2 lymfocyty, makrofágy a neutrofily, IL-12 produkují makrofágy, IFN- γ Th1 lymfocyty a NK buňky, TNF- α monocyty, makrofágy a NK buňky a TGF- β T-lymfocyty, makrofágy a trombocyty (Hořejší & Bartůňková 2002)

2.2.2 ODPOVĚĎ IMUNITNÍHO SYSTÉMU NA PATOGENY PŘENÁŠENÉ KREVSÁJÍCÍM HMYZEM

Obrana proti intracelulárním parazitům

Mezi tyto patogeny patří mnoho skupin organismů, kromě prvoků (*Leishmania*, *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Trypanosoma*) také některé bakterie a plísňe. Pohlcení těchto organismů makrofágy vede v případě správné reakce k produkci IL-12, který směřuje diferenciaci prekurzorů Th lymfocytů na podtyp Th1, produkující IFN- γ a membránový TNF. Tyto cytokiny aktivují makrofágy a mimo jiné v nich indukují enzym iNOS (indukovatelná syntetáza oxidu dusnatého). Tento enzym produkuje z argininu vysoce baktericidní oxid dusnatý (na rozdíl od NADPH-oxidázy – ta slouží k zabíjení vněbuněčných patogenů a jejímiž produkty jsou reaktivní kyslíkové intermediáty). Kromě toho IL-6 snižuje schopnost makrofágů být aktivován IFN- γ nebo TNF- α (snižuje schopnost TNF- α zvyšovat produkci reaktivních oxidativních intermediátů u makrofágů). K aktivaci makrofágů přispívají i protilátky třídy IgG2, které jsou pod vlivem IFN- γ syntetizovány plazmatickými buňkami. Imunokomplexy obsahující tyto protilátky se dobře váží na Fc-receptory makrofágů a tím je aktivují. V obraně proti intracelulárním parazitům, kteří unikají z fagolysozomu do cytoplazmy, se uplatňují i cytotoxické lymfocyty (Tc), které v tomto případě rozeznávají komplexy peptidových fragmentů rozštěpených z proteinů parazita spolu s MHC I glykoproteiny na povrchu infikované buňky.

Obrana proti virům

První linii obrany proti virům představují antigeně nespecifické mechanismy, zvláště interferony a NK buňky. Interferony- α a - β , jejichž produkce se indukuje v infikovaných buňkách, inhibují replikaci viru a v dosud neinfikovaných buňkách navozují antivirový stav, který brání rozvoji infekce. Infikované makrofágy produkují silný aktivátor NK buněk, IL-12. Aktivované NK mohou napadat jiné infikované buňky a ničit je jakožto potenciální zdroj další infekce. Jako preventivní zbraň proti virovým částicím působí protilátky – na sliznicích především sekreční IgA, v krevním oběhu neutralizační IgG a IgM. Ty jednak blokují povrchové vazebné receptory virů a IgG a IgM také aktivují klasickou cestu komplementu, který dokáže některé druhy virů lyzovat. Velký význam mají i cytotoxické T-lymfocyty,

jejichž proliferace a diferenciaci se stimuluje po rozeznání virových fragmentů virových proteinů asociovaných s MHC I glykoproteiny. Efektorové Tc-lymfocyty v přímém kontaktu ničí infikované buňky jako potenciální zdroj další infekce. Některé cytokiny produkované Tc přispívají k potlačení virové infekce také tím, že necytotoxicky inhibují replikaci virů.

Obrana proti mnohobuněčným parazitům

Dominantním rysem antiparazitárních obranných reakcí je produkce IgE. Poté, co se imunitní systém dostane do kontaktu s antigeny parazita (primárně prostřednictvím mastocytů, bazofilů a eosinofilů), stimuluje se proliferace a diferenciaci Th2. V tomto procesu je zřejmě kritickým faktorem IL-4 produkovaný mastocyty a jinými antigen prezentujícími buňkami stimulovanými kontaktem s parazitem. Efektorové Th2-lymfocyty stimuluji dále proliferaci a terminální diferenciaci B-lymfocytů nesoucích BCR specifické pro parazitální antigeny. Opět pod vlivem cytokinového prostředí (IL-4) dochází k izotypovému přesmyku a produkci protilátek třídy IgE. Ty nasedají na vysokoafinní IgE receptory na povrchu mastocytů a bazofilů a vyzbrojují tak tyto buňky antigenně specifickými receptory. Po kontaktu takto vybavených buněk dojde k agregaci IgE receptorů a uvolnění mediátorů obsažených v cytoplazmatických granulích. Záhy dochází také k aktivaci membránové fosfolipázy A2 k produkci metabolitů kyseliny arachidonové a k amplikaci celé zánětlivé reakce. V pozdějších stádiích dochází také ke stimulaci Th1-lymfocytů i k syntéze protilátek dalších tříd, což vše přispívá k potlačení infestace. Za efektorové buňky se považují také eosinofilní granulocyty, které se diferencují pod vlivem IL-5, jenž je také produktem Th2-lymfocytů. Eosinofily mohou pohlcovat komplexy parazitálních částic s IgE prostřednictvím svých receptorů pro IgE. Vzhledem velikosti mnohobuněčných parazitů využívají eosinofily k obraně proti nim zejména extracelulární baktericidní látky uvolněné z granulí (eosinofilní kationty, různé proteázy) (Hořejší & Bartůňková 2002).

2.3. FLEBOTOMOVÉ

Flebotomové se řadí do čeledi *Psychodidae* a podčeledi *Phlebotominae*. Jejich tělo je drobné, veliké pouze 1-4 mm a spolu s křídly hustě pokryté odstávajícími štětinami. Ta mají lancetovitý tvar a při sezení svírají typický úhel 60°. Podčeleď *Phlebotominae* zahrnuje více rodů, z našeho pohledu jsou však důležité především tyto dva: *Lutzomyia* a *Phlebotomus*, které jako jediné sají krev na lidech. Rod *Phlebotomus* se vyskytuje v Evropě, Africe a Asii, rod *Lutzomyia* v Jižní Americe. Oba pak v tropických a subtropických oblastech, k nám nejbližší byl zjištěn výskyt v jižním Maďarsku (Ryšavý *et al.* 1989).

2.3.1. VLIV SLIN FLEBOTOMŮ NA IMUNITNÍ SYSTÉM NEINFIKOVANÉHO HOSTITELE

Vliv slin flebotomů jak na cytokinovou, tak na buněčnou odpověď imunitní odpověď neinfikovaného hostitele byl prokázán u druhů *L. longipalpis*, *P. papatasi* a *P. sergenti* a také v případě specifické komponenty slin *L. longipalpis* - maxadilanu. Vlivem slin *L. longipalpis* na buněčnou odpověď se zabývaly autoři Brown & Rosalsky (1984), Titus (1998), Rohoušová *et al.* (2005), Silva *et al.* (2005), vlivem na cytokinovou odpověď autoři Costa *et al.* (2004) a Rohoušová *et al.* (2005). Účinky maxadilanu na buněčnou odpověď se zabývali Qureshi *et al.* (1996), vlivem na cytokiny Bozza *et al.* (1998), Soares *et al.* (1998) a Rogers & Titus (2003). Účinky slin *P. papatasi* na buněčnou odpověď prokázali Belkaid *et al.* (2000) a Rohoušová *et al.* (2005), vlivem na cytokiny se kromě nich zabývali ještě Rogers & Titus (2003). V případě *P. sergenti* jediný tým, který se však zabýval oběma tématy, jsou Rohoušová *et al.* (2005).

L. longipalpis

Homogenát slinných žláz druhu *L. longipalpis* inhibuje proliferaci splenocytů stimulovaných jak *in vitro* pomocí mitogenu konkanavalinu A (Titus 1998, Rohoušová *et al.* 2005), tak *in vivo* ovčímí erytrocyty (Titus 1998). Co se týče dalších aspektů buněčné odpovědi, opakované sání *L. longipalpis* na myších vede k lokální infiltraci zánětlivých buněk – neutrofilů, makrofágů a eosinofilů (nejedná se tedy o klasickou DTH reakci – tam jde především o infiltraci mononukleárních buněk) (Silva *et al.* 2005). Podobnou reakci - infiltrát buněk složený převážně z neutrofilů a makrofágů - vyvolává u neimunizovaných

myší aplikace slin s imunizovaným sérem (Silva *et al.* 2005). U dalšího pokusného zvířete – morčete, byla pozorována do jisté míry podobná reakce na opakované sání *L. longipalpis* – nižší zvýšení počtu bazofilů a silné zvýšení počtu eosinofilů (Brown & Rosalsky 1984).

Dalším z imunomodulačních účinků slin *L. longipalpis* je vliv na produkci cytokinů (Costa *et al.* 2004, Rohoušová *et al.* 2005). 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 mají sliny *L. longipalpis* převážně tlumivý vliv: produkce IFN- γ a IL-2 byla snížena (Rohoušová *et al.* 2005) – v případě IL-2 až na případ 72 hodinové inkubace buněk s homogenátem slinných žláz, kdy byla naopak zvýšena, v případě IFN- γ nebyla inhibice signifikantní při 48 hodinové inkubaci. Produkce IL-12p40 byla oproti tomu zvýšena (Costa *et al.* 2004), nejde však o funkční IL-12, jen o jeho podjednotku, která sama o sobě může mít spíše opačný efekt než IL-12 (podrobněji viz úvod). Produkce prozánětlivých cytokinů IL-6 a IL-8 byla zvýšena (Costa *et al.* 2004). Dalším prozánětlivým cytokinem je TNF- α , na jehož produkci měly sliny naopak inhibiční vliv (Costa *et al.* 2004). Z cytokinů Th2 odpovědi byly studovány IL-10 (Costa *et al.* 2004) a IL-4 (Rohoušová *et al.* 2005), jejichž produkce byla vlivem slin také snížena. Cytokiny TNF- α , IL-12p40, IL-10, IL-8 a IL-6 byly studovány na lidských monocytech, makrofázích a dendritických buňkách stimulovaných bakteriálním LPS *in vitro*, přičemž uvedená modulační byla pozorována pouze na monocytech (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.* 2005).

Je tedy zřejmé, že homogenát slinných žláz druhu *L. longipalpis* převážně inhibuje produkci jak Th1, tak Th2 cytokinů, přičemž jeho efekt je zároveň alespoň částečně prozánětlivý. Celkový útlum imunitní odpovědi může v místě sání podporovat uchycení přenášených patogenů, z nichž nejvýznamnější jsou leishmanie. Prozánětlivý účinek slin, který se zdá být v rozporu s inhibicí Th1 cytokinů, naopak tuto hypotézu s ohledem na další funkce těchto cytokinů podporuje. IL-8 je totiž chemotaktický pro neutrofile, ve kterých leishmanie díky oddálení jejich apoptózy přežívají a množí se v nich (Aga *et al.* 2002), a účinky IL-6 jsou vysoce pleiotropní (např. stimuluje B-lymfocyty k produkci protilátek), což jsou účinky podporující spíše Th2 odpověď (Hořejší & Bartůňková 2001). Podrobněji viz kapitola Vliv slin flebotomů na přenos infekčních chorob.

Homogenát slinných žláz *L. longipalpis* měl také vliv na expresi povrchových kostimulačních molekul (Costa *et al.* 2004), které jsou při imunitních reakcích založených na T-lymfocytech velice důležité - podílejí se totiž 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), HLA-DR (jeden z klasických MHC glykoproteinů 2. 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. Z toho je zřejmé, že přestože nedošlo ke snížení exprese veškerých s prezentací antigenů spojených kostimulačních molekul, sliny *L. longipalpis* na ně vliv mají.

***L. longipalpis* - maxadilan**

Maxadilan je peptid, který se vyskytuje pouze ve slinách *L. longipalpis*. 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 podobný 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). Ukázalo se dokonce, že maxadilan má déle trvající účinek a je 500krát silnější než CGRP (Ribeiro *et al.* 1989, Lerner *et al.* 1991). 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). Vazbou na receptor typu I pro PACAP zvyšuje maxadilan intracelulární koncentraci Ca^{2+} (Eggenberger *et al.*, 1999) a stimuluje v buňce akumulaci cAMP (Jackson *et al.* 1996, Moro *et al.* 1996, Soares *et al.* 1998, Eggenberger *et al.* 1999).

Kromě vazodilatačních má však maxadilan i imunomodulačními účinky. Maxadilan stejně jako celý homogenát slinných žláz inhiboval proliferaci splenocytů stimulovaných jak konkanalinem A, tak i anti-TCR protilátkami (dojde tak k prokřížení TCR, v důsledku čehož se T-lymfocyty navzájem stimuluje k proliferaci produkcí IL-2) (Qureshi *et al.* 1996). Stejný tým dále prokázal, že u myší je maxadilan schopný potlačit DTH reakci neboli kožní přecitlivělost opožděného typu (Hořejší & Bartůňková 2001).

Maxadilan ovlivnil také produkci cytokinů (Bozza *et al.* 1998, Soares *et al.* 1998, Rogers & Titus 2003). Na rozdíl od homogenátu celých žlaz maxadilan inhiboval produkci IL-12p40, a to u lidských LPS-stimulovaných PBMC. K inhibici celého IL-12 (IL-12p70) nedošlo (Rogers & Titus 2003). Maxadilan inhibuje také produkci prozánětlivého TNF- α , a to *in vitro* u lidských LPS-stimulovaných PBMC a monocytů (Rogers & Titus 2003) a u myších makrofágů (Soares *et al.* 1998), ale také *in vivo* u myši, 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. V dalších experimentech proto byly použity anti-IL-10 a anti-IL-6 protilátky a indomethacin, který potlačuje produkci PGE₂. Těmito pokusy bylo potvrzeno, že vliv maxadilanu na produkci TNF- α je závislý na PGE₂ (Soares *et al.* 1998). Maxadilan má stimulační účinky na produkci cytokinů IL-6 (Bozza *et al.* 1998, Soares *et al.* 1998, Rogers & Titus 2003) a IL-10 (Bozza *et al.* 1998) a prozánětlivý prostaglandin PGE₂ (Soares *et al.* 1998). Soares *et al.* (1998) zkoumali vliv slin na IL-6 a PGE₂ na LPS-stimulovaných myších makrofázích, Rogers & Titus (2003) vliv na IL-6 na LPS-stimulovaných monocytech a Bozza *et al.* 1998 vliv slin na IL-6 a IL-10 na myších *in vivo*. Rogers & Titus (2003) dále prokázali, že vazodilatační aktivita je esenciální pro působení maxadilanu na produkci IL-6, neboť v případě, kdy byl aplikován mutovaný rekombinantní maxadilan bez této aktivity, k inhibici cytokinu 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).

Qureshi *et al.* (1996) zkoumali schopnost maxadilanu ovlivnit aloantigenní prezentaci pomocí směsné lymfocytární reakce. Potvrdili přímý vliv maxadilanu na T-lymfocyty, ale i antigen prezentující buňky, na které byl vliv maxadilanu dokonce větší než na T-lymfocyty (maxadilan měl větší účinek na inhibici proliferace T-lymfocytů, pokud byl preinkubován s první skupinou lymfocytů, které se říká stimulátoři (simulují vlastně antigen prezentující buňky) než při preinkubaci s druhou skupinou, zvanou respondeři). Snížení úrovně proliferace i v případě vymytí maxadilanu před vlastní reakcí mezi buňkami, poukazuje na dlouhodobější působení maxadilanu. Byla provedena ještě jedna podobná technika – smíšená reakce epidermálních buněk (Langerhanzových – jde o kožní typ dendritických buněk) a lymfocytů, přičemž byl opět dosažen pokles úrovně proliferace T-lymfocytů. Význam tohoto zjištění spočívá v tom, že maxadilan sám o sobě v kůži působí pouze vznik erytému, ale nikoli edému

a svědění, k čemuž právě snížená úroveň aloantigenní prezentace mezi epiteliálními buňkami a T-lymfocyty přispívá. Qureshi *et al.* (1996) také dokázali, že imunomodulační účinky maxadilanu jsou stejně jako ty vazodilatační zprostředkovány přes signalizační dráhu se sekundárním poslem cAMP – uměle zvýšená hladina cAMP měla na myší makrofágy stejný účinek jako maxadilan.

Rod *Phlebotomus*

Homogenát slinných žláz rodu *Phlebotomus* má rovněž imunomodulační účinky (Belkaid *et al.* 2000, Rogers & Titus 2003, Rohoušová *et al.* 2005). Rohoušová *et al.* (2005) měřili proliferační odpověď T-lymfocytů, která byla i po 72 hodinové inkubaci se slinami flebotomů signifikantně utlumena. Při srovnání vlivu slin druhů *P. papatasi* a *P. sergenti* na proliferaci došlo i v případě *P. sergenti* k inhibici, dokonce byla ve dvou případech – při použití koncentrace homogenátu 1/4 a žlázy a 1 celá žláza na 10^5 buněk, signifikantně silnější než u *P. papatasi* (Rohoušová *et al.* 2005). Při srovnání obou zastupců rodu *Phlebotomus* s druhem *L. longipalpis* stejný tým došel ke zjištění, že inhibice proliferace není statisticky rozdílná ani od jednoho z nich. O flebotomech rodu *Phlebotomus* je dále známo, že jsou schopni u svých hostitelů na rozdíl od *L. longipalpis* indukovat DTH (klinicky označovanou jako harara), a to jak po sání flebotomů, tak po aplikaci homogenát slinných žláz – stačilo dokonce aplikovat myším homogenát jen dvakrát po sobě, aby bylo dosaženo silné DTH (Belkaid *et al.* 2000). Na první pohled se může zdát, že jde pouze o vedlejší efekt účinků slin, Belkaid *et al.* (2000) však prokázali, že indukce DTH v místě sání může být pro flebotomy výhodná: v místě, kde byla patrná DTH totiž flebotomé (*P. papatasi*) sáli krev dvakrát rychleji než na místě bez této reakce, a to jak u lidí, tak u myší.

Vliv slin na cytokinovou odpověď byl měřen u myších splenocytů stimulovaných *in vitro* mitogenem konkanalinem A. U obou testovaných druhů flebotomů - *P. papatasi* a *P. sergenti* - došlo k inhibici produkce Th1 i Th2 cytokinů IFN- γ , IL-2 a IL-4 (Rohoušová *et al.* 2005). Je však třeba dodat, že produkce IL-2 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 3 uvedených časech. Opět byly v některých z uvedených příkladů rozdíly v míře modulace mezi druhy *P. papatasi* a *P. sergenti*. Dalším měřeným cytokinem byl IL-6 (Rogers & Titus 2003), jehož hladina byla zvýšena u lidských monocytů stimulovaných LPS a inkubovaných s homogenátem slinných žláz *P. papatasi*.

2.3.2 VLIV SLIN FLEBOTOMŮ NA PŘENOS LEISHMANIOVÉ INFEKCE

Flebotomové jsou přenašeči prvoků rodu *Leishmania* (*Kinetoplastida* - *Trypanosomatida*), kteří u lidí způsobují onemocnění zvané leishmanióza. To je způsobeno tím, že promastigotní forma (bičíkatá) se nechá v místě vpichu pohltit mononukleárními fagocyty (monocyty, makrofágy a dendritické buňky), ve kterých se přemění v amastigotní formu (bezbičíkatou), která je schopná se množit, dokud buňku nezabije. Podle toho, zdali infekce probíhá pouze v místě vpichu nebo se šíří dál krví do orgánů se poněkud zjednodušeně onemocnění dělí na kožní (kutánní) a orgánové (viscerální). Druhy, které jsou uváděny dále v textu způsobují následující typ onemocnění a jsou přenášeny následujícím rodem flebotomů: *Le. major* způsobuje kutánní leishmaniózu a je přenášena rodem *Phlebotomus*, *Le. braziliensis* a *Le. mexicana* jsou přenášeny rodem *L.* a způsobují též kutánní leishmaniózu, v případě *Le. braziliensis* může dojít i k napadení nazofaryngeálních sliznic. *Le. chagasi* je též přenášena rodem *L.*, na rozdíl od předchozích dvou leishmanií však způsobuje dětskou viscerální leishmaniózu (Ryšavý *et al.* 1989).

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 & Ribeiro (1988) ve svých pokusech zároveň potvrdili, že sliny jiných skupin krevsajících členovců nemají vliv na průběh leishmaniové infekce, konkrétně šlo o sliny komára *Ae. aegypti*, ploštice *Rhodnius prolixus* a klíštěte *Ixodes dammini*. Homogenát slinných žláz *L. longipalpis* zhoršuje nejenom průběh infekce *Le. major* (Titus & Ribeiro 1988, Theodos *et al.* 1991, Theodos & Titus 1993, Warburg *et al.* 1994), ale též infekci *Le. mexicana amazonensis* (Theodos *et al.* 1991, Samuelson *et al.* 1991), *Le. braziliensis* (Samuelson *et al.* 1991, Lima & Titus 1996, Donnelly *et al.* 1998) i *Le. chagasi* (Warburg *et al.*, 1994). Citováno podle review Rohoušová & Volf (2006).

Vliv maxadilanu – důležité vazodilatační komponenty slin *L. longipalpis* – na velikost lézí u myší 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. Protože kožní leishmanióza vyvolává silnou buněčnou imunitu, je možné předejít visceralizaci. 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, Ribeiro & Titus 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*. Pokud však byly myši imunizovány slinami flebotomů, byly chráněné proti následné infekci leishmaniami (Belkaid *et al.* 1998, Kamhawi *et al.* 2000, Valenzuela *et al.* 2001a, Morris *et al.* 2001, Thiakaki *et al.* 2005).

2.3.3 VLIV SLIN FLEBOTOMŮ NA IMUNITNÍ SYSTÉM HOSTITELE INFIKOVANÉHO LEISHMANIEMI

Jak již bylo řečeno, jedním z možných mechanismů enhancing efektu slin flebotomů může být vliv slin na buňky imunitního systému hostitele - imunomodulace. Sliny mohou v místě sání měnit imunitní procesy ve prospěch rozvíjející se infekce. V této kapitole je kladen důraz především na změnu produkce cytokinů, která má přímý vliv na typ imunitní reakce a zároveň na přežití leishmanií v místě inokula.

***L. longipalpis* a maxadilan:**

Sliny *L. longipalpis* měly vliv na hladinu cytokinů produkovaných T-lymfocyty v myších infikovaných *Le. braziliensis* (Lima & Titus 1996). Konkrétně 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 & 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. V případě dalších cytokinů (IL-2, IL-6, TNF- α a IFN- γ) již ke změně produkce nedošlo (Norsworthy *et al.* 2004). Theodos & Titus (1993) dokázali na základě inhibice proliferace T-lymfocytů, 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 & Titus 1993).

Co se buněčné odpovědi dále týče, lyzát slinných žláz *L. longipalpis* výrazně modifikuje zastoupení buněk během zánětlivé odpovědi při infekci *Le. braziliensis*. V první fázi infekce 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).

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 & Titus 2003).

P. papatasi

Homogenát slinných žláz *P. papatasi* má rovněž vliv na průběh leishmaniové infekce. Jeho vliv na cytokinovou imunitní odpověď byl měřen na modelu *P. papatasi* – *Le. major*, což má za výhodu to, že na rozdíl od druhu *L. longipalpis* je *P. papatasi* přirozeným hostitelem *Le. major* (Theodos *et al.* 1991, Belkaid *et al.* 1998, Mbow *et al.* 1998, Rogers & Titus 2003).

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 & Titus 2003). Při měření vlivu sání flebotomy a nikoli aplikace homogenátu slinných žláz došlo ke zvýšení ke stimulaci IL-2 a dokonce mírnému zvýšení produkce IFN- γ . (Kamhawi *et al.* 2000). Posledních z Th1 cytokinů, jehož produkci homogenát slinných žláz ovlivnil, a to tak, že zvýšil, je GM-CSF (Belkaid *et al.* 1998).

Sliny *P. papatasi* mají vliv i na produkci Th2 cytokinů. U myši infikovaných *L. 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 myši 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).

Lyzát slinných žláz stimuloval také produkci prozánětlivého IL-6 u monocytů stimulovaných promastigoty *Le. major* (Rogers & Titus 2003) a při sání flebotomů došlo ke zvýšení produkce IL-3, cytokinu s funkcí růstového faktoru (Kamhawi *et al.* 2000).

2.3 KOMÁŘI

Komáři patří do čeledi *Culicidae*. Jsou to dvoukřídlí střední velikosti – tělo dosahuje délky v průměru 3-6 mm, není pokryto štětinami tak hustě jako u flebotomů, křídla mají podobný tvar a nápadný je dlouhý rovný sosák zvaný proboscis. Čeď zahrnuje z epidemiologického hlediska tři důležité rody: *Anopheles*, *Aedes* a *Culex*, přičemž rod *Anopheles* patří do podčeledi *Anophelinae* a rody *Culex* a *Aedes* do podčeledi *Culicinae*. Většina druhů komárů žije v tropech celého světa, na našem území však najdeme zástupce všech tří zmiňovaných rodů (Ryšavý *et al.* 1989).

3.3.1 VLIV SLIN KOMÁŘŮ NA IMUNITNÍ SYSTÉM NEINFIKOVANÉHO HOSTITELE

Z druhů komárů, u kterých to bylo prokázán vliv na produkci cytokinů to jsou *Ae. aegypti* (Bissonnette *et al.* 1993, Cross *et al.* 1994a, Zeidner *et al.* 1999, Wanassen *et al.* 2004, Wasserman *et al.* 2004), *Cu. quinquefasciatus* (Zeidner *et al.* 1999) a *Cu. pipiens* (Wanassen *et al.* 2004). Co se buněčné odpovědi týče, vliv slin byl prokázán u druhů *Ae. aegypti* (Cross *et al.* 1994a, Wanassen *et al.* 2004, Wasserman *et al.* 2004) a *Anopheles stephensi* (Demeure *et al.* 2005).

Ae. aegypti

Sliny *Ae. aegypti* mají inhibiční vliv na proliferaci naivních slezinných T-lymfocytů, a to u myších (OVA-TCR DO11 - jejich T-lymfocyty reagují na stimulaci ovalbuminem – jde o hlavní protein vyskytující se ve vaječném bílku, jenž se používá jako antigen T-lymfocytů) buněk stimulovaných ovalbuminem (Wasserman *et al.* 2004). Dále pak došlo též k inhibici myších splenocytů (BALB/cJ) předem stimulovaných OVA, a to jak v případě IL-2, tak i IL-4 vyvolané proliferace. Silnější vliv byl ovšem pozorován v případě IL-2 stimulované proliferace (Cross *et al.* 1994a). Wanassen *et al.* (2004) se pokusili zjistit, zda je tento vliv (konkrétně šlo o OVA imunizované myší splenocyty) způsoben cytotoxickou aktivitou slin, či zda jde pouze o potlačení buněčného dělení. Byl potvrzen vliv na oba tyto parametry – při inkubaci CD4+ a CD8+ T-lymfocytů s homogenátem slinných žláz byl pozorován zvýšený

počet mrtvých buněk a dále byl také pozorován větší poměr sytě obarvených buněk vůči méně obarveným buňkám, což znamená, že došlo k méně buněčným dělením.

Z cytokinů Th1 odpovědi byl ve všech měřených případech prokázán tlumivý efekt slin na produkci IFN- γ (Cross *et al.* 1994a, Zeidner *et al.* 1999, Wanassen *et al.* 2004, 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.* 1994a, Wasserman *et al.* 2004), u poštipaných 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 (v obou pracích se aplikovalo víc než 25 ng/ml homogenátu slinných žláz, kdežto během sání se nasálo v průměru deset komárů). Další možností je, že homogenát slinných žláz obsahuje oproti slinám nějaké komponenty navíc. 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. V závislosti na zvoleném modelu (*in vitro* \times *in vivo*) byla produkce Th2 cytokinů inhibovaná (tady šlo o *in vitro* přístup) – IL-10 v práci Wanassen *et al.* (2004) a IL-4 a IL-5 v práci Wasserman *et al.* (2004) nebo stimulovaná – *in vivo* přístup a cytokiny IL-4 a IL-10 (Zeidner *et al.* 1999), popřípadě byla změna v produkci IL-4 a IL-5 opět při *in vitro* přístupu statisticky nesignifikantní (Cross *et al.* 1994a).

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

Zeidner *et al.* (1999) zkoumali také 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.

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 IFN- γ a IL-10, který byl pozorován na myších (C3H/HeJ) splenocytech stimulovaných konkanavalinem A, však imunomodulačního efektu dosaženo nebylo. Jiným zkoumaným druhem byl *Cu. pipiens*, jehož sání mělo na myši 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 při odběru 7-10 dní po sání a hladina IL-4 a IL-10 naopak zvýšena, tentokrát při odběru 4-7 dní po sání.

rod *Anopheles*

Poštípání myši komárem *Anopheles stephensi* vyvolalo degranulaci žírných buněk a to dále vedlo k vylití tkáňového moku a přílivu neutrofilů. K těmto změnám nedošlo u W/Wv myši, které nemají žádné žírné buňky. Aktivace žírných buněk měla dále za následek hyperplázii (nadměrný vývin tkáně nebo orgánu způsobený zvětšením počtu buněk) lymfatické uzliny, ve které se nakumulují T-lymfocyty a další leukocyty. (Demeure *et al.* 2005).

2.3.2 VLIV SLIN KOMÁRŮ NA PŘENOS INFEKČNÍCH CHOROB

Komáři jsou přenašeči mnoha nemocí. Z těch, které jsou zmíněny dále v textu v souvislosti s vlivem slin komárů na jejich přenos, to jsou: flaviviry přenášené *Ae. aegypti*, které způsobují například horečku dengue (Ader *et al.* 2004), virus *Sindbis* působící horečku sindbis (Schneider *et al.* 2004) a filárie *Brugia pahangi* (Gillan & Devaney 2004). *Cache-Valley* virus přenášejí druhy *Ae. triseriatus*, *Ae. aegypti* a *Cu. pipiens* (Edwards *et al.* 1998). *Cu. pipiens* přenáší též některé flaviviry (Zeidner *et al.* 1999). Rod *Anopheles* pak šíří prvoky rodu *Plasmodium*, kteří způsobují horečnaté onemocnění – malárii. Druhem, na kterém byl dělán výzkum je *Ae. fluviatilis*, jenž přenáší ptačí parazity *Plasmodium gallinaceum* (Rocha *et al.* 2004)

Cache-Valley virus je bunyavirus, který způsobuje neplodnost a vrozené malformace (znetvoření) u přežvýkavců Severní Ameriky (Andrade *et al.* 2005). Tímto virem se zabýval Edwards *et al.* (1998) a prokázali, že u myší, které byly poštípány druhy *Ae. triseriatus*, *Ae. aegypti* a *Cu. pipiens*, a do místa, kde došlo k poštípání byly následně vstříknuty virové částice, došlo k projevu infekce. Ten však v případě infekce viry bez pokousání komáry či dokonce inokulace extraktu z thoraxu komárů spolu s virovými částicemi pozorován nebyl.

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

Flaviviry a vlivem slin druhu *Cu. pipiens* na jejich infekci se zabýval Zeidner *et al.* (1999). Na myších (C3H/HeJ – jde o kmen citlivý na nákazu flaviviry) T-lymfocytech inkubovaných *in vivo* byl prokázán útlum produkce IFN- γ a stimulace produkce IL-4 a IL-10. Za to v případě proti nákaze flavivirů 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.

Virus *Dengue* je flavivirus, který je přenášen komárem *Ae. aegypti* a způsobuje horečku dengue. Pouze v tomto případě nemají sliny přenašeče stimulační účinek na rozvoj infekce, naopak způsobují její potlačení (Ader *et al.* 2004). Mechanismus tohoto jevu je zřejmě založen na snížení vymírání dendritických buněk a na zvýšené produkci prozánětlivých cytokinů IL-12 a TNF- α . Ochranný efekt slin byl ještě výraznější v případě preexpozice buněk slinami (Ader *et al.* 2004).

Kromě virů jsou komáři samozřejmě také přenašeči prvoků rodu *Plasmodium* působících malárii. Na příkladu ptačího druhu - *Plasmodium gallinaceum* byl demonstrován efekt slin druhu *Ae. fluviatilis* (Rocha *et al.* 2004). Kuřata byla podkožně infikována sporozoity a homogenátem slinných žláz a došlo k posílení infekce – zvýšil se počet parazitů. Důležitý vliv slin byl potvrzen i tím, že po předchozí imunizaci kuřat slinami, což vedlo k produkci protilátek, byla hladina parazitémie naopak snížena.

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

2.4 MUCHNIČKY

Muchničky patří do čeledi *Simuliidae*. Ty mají na rozdíl od předchozích skupin tělo zavalité, křídla široká a především výrazně kratší tykadla. Vyskytují se po celém světě včetně našeho území. Nejznámějším druhem z hlediska výzkumu slin je *Simulium vittatum*.

2.4.1 VLIV SLIN MUCHNIČEK NA IMUNITNÍ SYSTÉM HOSTITELE

Také sliny muchniček mají imunomodulační aktivitu, mimo jiné byl prokázán vliv na buněčnou a cytokinovou imunitní odpověď hostitele (Cross *et al.* 1993, Cross *et al.* 1994a).

Vliv homogenátu slinných žláz *Simulium vittatum* na proliferaci T-lymfocytů byl zkoumán *in vivo* inokulací homogenátu slinných žláz do myšního peritonea a také *in vitro* inkubací homogenátu s T-lymfocyty a konkanavalinem A (Cross *et al.* 1993). V případě *in vitro* inkubace došlo k signifikantnímu útlumu proliferace, v případě *in vivo* inokulace však nikoli. Jelikož v obou případech byla proliferace měřena po dvou dnech od aplikace homogenátu slinných žláz, autoři se domnívají, že na výsledek by mohla mít vliv doba kontaktu T-lymfocytů s homogenátem, která je zřejmě kratší v případě *in vivo* inokulace. Proliferace splenocytů byla inhibována i u buněk stimulovaných pomocí rekombinantních cytokinů IL-2 a IL-4 (Cross *et al.* 1994a). Dokonce se zdá, že homogenát slinných žláz brání buňkám využít veškerý dostupný IL-4. Důležitým poznatkem je také to, že v žádném z uvedených případů nedošlo ke snížení životaschopnosti buněk, takže homogenát slinných žláz není toxický (Cross *et al.* 1993).

Vliv slin muchniček na produkci cytokinů byl měřen u myší imunizovaných homogenátem slinných žláz a stimulovaných ovalbuminem (OVA). *Ex vivo* pak byly buňky stimulovány OVA a zjistilo se, že imunizované myši měli nižší hladiny Th2 cytokinů IL-5 a IL-10. U dalších měřených cytokinů - IL-4, IFN- γ a IL-2 – nebyla pozorována žádná změna (Cross *et al.* 1994a). Snížení produkce IL-5 souvisí s úbytkem počtu eosinofilů u imunizovaných myší, neboť IL-5 je růstový faktor eosinofilů (Hořejší & Bartůňková 2002).

Sliny muchniček mají vliv také na prezentaci antigenů. V populaci splenocytů byla totiž zjištěna redukce zastoupení buněk exprimujících na svém povrchu podtyp myších MHC II molekul Ia (Cross *et al.* 1993). K inhibici exprese Ia ovšem došlo pouze v případě odběru buněk téhož dne po *in vivo* inokulaci homogenátu slinných žláz. Při 2 denní inkubaci buněk

s homogenátem slinných žláz *Simulium vittatum* již žádné rozdíly pozorovány nebyly. Dále pak nedošlo ke změně zastoupení Ia pozitivních buněk pokud byly místo splenocytů použity buňky z axilární lymfatické uzliny nebo epidermální buňky (Cross *et al.* 1993).

2.5 IMUNOMODULAČNÍ VLASTNOSTI VYBRANÝCH KOMPONENT SLIN KREVSAJÍCÍCH DVOUKŘÍDLÝCH

Imunomodulační aktivita slin krevsajícího hmyzu je většinou studována po aplikaci homogenátu celých slinných žláz a jen málo je známo o účincích jednotlivých molekul. Vyjimku tvoří např. maxadilan, vazodilatační molekula obsažená ve slinách *L. longipalpis*, která je dostupná v rekombinantní podobě a tedy v dostatečném množství a čistotě pro nejrůznější funkční testy (Lerner & Shoemaker 1992).

Díky technikám molekulární biologie známe složení slin u většiny důležitých přenašečů (Charlab *et al.* 1999). Jsou mezi nimi i molekuly, u kterých můžeme podle literárních údajů předpokládat imunomodulační vlastnosti. V následujícím textu jsou zmíněné některé z nich.

Enzymy s apyrázovou aktivitou a adenosin

Nejčastěji se ve slinách krevsajících členovců vyskytují enzymy s apyrázovou aktivitou (Ribeiro *et al.* 1984, Cupp *et al.* 1995, Champagne *et al.* 1995, Charlab *et al.* 1999, Ribeiro *et al.* 2000b, Valenzuela *et al.* 2001). Tuto aktivitu mohou mít proteiny ze tří různých enzymatických rodin: 5' nukleotidázy, aktin/hsp70/sacharidové kinázy a nově popsaná rodina apyráz, která je charakterizovaná vlastnostmi apyrázy *Cimex lectularius* (Valenzuela *et al.*, 2001). Tyto molekuly spojuje schopnost hydrolyzovat mono-, di- nebo trifosfáty adenosinu a jednotlivé enzymatické rodiny se liší závislostí apyrázové aktivity na přítomnosti dvojmocných kationtů kovů (Ca^{2+} , Mg^{2+}). Produkty štěpení pak hrají hlavní úlohu při inhibici agregaci destiček, ale mají vliv i na buňky imunitního systému (Zídek *et al.* 1999).

Jednou z těchto látek je adenosin, který se vyskytuje přímo ve slinných žlázách rodu *Phlebotomus* (Ribeiro *et al.* 1999, Katz *et al.* 2000) nebo je produktem enzymu 5' nukleotidáza, který byl prokázán např. ve slinách *L. longipalpis* (Charlab *et al.* 1999). Adenosin dokáže inhibovat produkci cytokinů TNF- α , IL-12, IFN- γ , IL-3, IL-4, GM-CSF a chemokinů MIP-1 α/β a naopak stimulovat produkci IL-10 a IL-5. Vliv na produkci IL-1 prokázán nebyl (Zídek *et al.* 1999). Z těchto výsledků tedy vyplývá výrazný protizánětlivý efekt adenosinu.

Adenozin deamináza a inozin

Ve slinných žlázách *L. longipalpis* (Charlab *et al.* 2000) a glossin (Li & Aksoy 2000) byl nalezen enzym adenozin deamináza. Jak již z názvu enzymu vyplývá, štěpí adenozin, produkt již zmíněné 5' nukleotidázy, na inozin, který je relativně neúčinný při inhibici hemostatických procesů, ale působí imunosupresivně (Charlab *et al.* 2000). Tyto imunosupresivní účinky inozinu jsou následující: u stimulovaných makrofágů a splenocytů byla prokázána inhibice cytokinů TNF- α , IL-1, IL-12, IFN- γ a chemokinů MIP-1a, ale inozin neměl vliv na produkci hlavního protizánětlivého cytokinu IL-10. Z toho vyplývá jasný protizánětlivý účinek inozinu a tudíž i adenozin deaminázy (Hasko *et al.* 2000). Přítomnost tohoto enzymu ve slinách krevsajících dvoukřídlých se zdá být na první pohled paradoxní, neboť adenozin má protizánětlivé a vazodilatační účinky a působí inhibičně na agregaci trombocytů (Chinellato *et al.* 1994 podle Charlab *et al.* 2000), za to inozin má úlohu pouze protizánětlivou (Hasko *et al.* 2000). *L. longipalpis* však ve svých slinách má narozdíl od zástupců rodu *Phlebotomus* molekuly, které tyto funkce adenozinu mohou plně nahradit: maxadilan je silným vazodilatátorem (Lerner *et al.* 1991) a apyráza inhibuje agregaci trombocytů (Ribeiro *et al.* 1986).

Hyaluronidáza

Poslední molekulou slin krevsajícího hmyzu, kterou zde zmíním a která má schopnost ovlivnit imunitní systém, je enzym hyaluronidáza. Nedávno byla její aktivita objevena ve slinách flebotomů (Charlab *et al.* 1999, Ribeiro *et al.* 2000, Černá *et al.* 2002) a také muchniček (Ribeiro *et al.* 2000a). 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.* 2000a). Hyaluronidáza, či spíše produkty jejího štěpení, mají však i imunomodulační účinky. Snižují produkci IFN- γ (Romano *et al.* 1983) a v makrofázích indukují expresi genů pro chemokiny (McKee *et al.* 1996).

3. ZÁVĚR

Tato bakalářská práce shrnuje poznatky o problematice buněčné a cytokinové imunitní odpovědi na sliny krevsajícího dvoukřídlého hmyzu. Co se týče buněčné odpovědi, byla měřena proliferace T-lymfocytů a ve všech případech – u slin *L. longipalpis*, maxadilanu *L. longipalpis*, slin *P. papatasi*, *P. sergenti*, *Ae. aegypti* a *Simulium vittatum* došlo k inhibici proliferace (Andrade *et al.* 2005). Jedinou výjimkou byla aplikace homogenátu slinných žláz *Simulium vittatum in vivo*, kdy k žádné změně nedošlo (Cross *et al.* 1993). U imunizovaných hostitelů dochází v místě sání i ke změně zastoupení jednotlivých zánětlivých buněk (Cross *et al.* 1994, Qureshi *et al.* 1996, Belkaid *et al.* 2000, Demeure *et al.* 2005, Silva *et al.* 2005). Zajímavým poznatkem, který se potvrdil ve více případech, je, že sliny inhibují schopnost antigen prezentujících buněk prezentovat antigen, což bylo prokázáno snížením proliferace specifických T-lymfocytů (Theodos & Titus 1993) nebo změnou exprese MHC molekul (Cross *et al.* 1993, Costa *et al.* 2004).

Dostáváme se ke vlivu slin na cytokinovou odpověď. Pokud byly leukocyty stimulovány mitogenem, většina Th1 cytokinů byla inhibována nebo jejich produkce nebyla ovlivněna (Andrade *et al.* 2005). U imunizovaných hostitelů došlo v přítomnosti patogena ke zvýšení produkce IFN- γ a IL-2, konkrétně na myším modelu *P. papatasi-Le. major* (Kamhawi *et al.* 2000) a *Cu. pipiens*-flaviviry (Zeidner *et al.* 1999).

Zajímavá situace panovala mezi prozánětlivými cytokiny. V případě IL-6, cytokinu s vysoce pleiotropními účinky, docházelo vždy ke stimulaci produkce (Bozza *et al.* 1998, Soares *et al.* 1998, Costa *et al.* 2003, Rogers & Titus 2003), výjimečně jeho produkce ovlivněna nebyla (Norsworthy *et al.* 2004), naopak v případě TNF- α , který působí aktivačně na hlavní složku Th1 odpovědi – makrofágy, docházelo při nespecifické stimulaci vždy k jeho inhibici (Bissonnette *et al.* 1993, Bozza *et al.* 1998, Soares *et al.* 1998, Costa *et al.* 2003, Rogers & Titus 2003, Wasserman *et al.* 2004). Produkce TNF- α však nebyla zvýšena pokud byly imunitní buňky stimulovány patogenem (Lima & Titus 1996, Norsworthy *et al.* 2004), s výjimkou práce, kdy došlo naopak ke stimulaci (Ader *et al.* 2004). Produkci TNF- α dokázal inhibovat i adenosin (Zídek 1999) a inozin (Hasko *et al.* 2000).

Co se týče Th2 cytokinů, docházelo jak k inhibici, tak stimulaci jejich produkce v případě nespecifické stimulace leukocytů (Andrade *et al.* 2005), naopak v případě stimulace patogeny výrazně převažovala tendence zvýšit produkci Th2 cytokinů (Lima & Titus 1996, Belkaid *et al.* 1998, Mbow *et al.* 1998, Zeidner *et al.* 1999, Schneider *et al.* 2004). Th2

cytokiny byly slinami inhibovány *Cu. pipiens* podávaných spolu s flaviviry (došlo ke snížení produkce IL-4) (Zeidner *et al.* 1999) a slinami *Ae. aegypti* při infekci filárií *Brugia pahangi* (inhibice produkce IL-4, IL-5 a IL-10) (Gillan & Devaney 2004).

Z těchto výsledků tedy vyplývá jasný imunomodulační vliv slin, který působí mimo jiné na proliferaci lymfocytů, aktivaci makrofágů, expresi kostimulačních molekul a produkci cytokinů. Sliny krevsajího hmyzu převážně tlumí Th1 odpověď a stimulují Th2 odpověď. Takto modifikované místo sání je prostředí výhodné pro vývoj většiny patogenů přenášených hmyzem. Poznatky o tom, že preexpozice hostitelů slinám přenašeče navodí takovou imunitní odpověď, která je schopná částečně nebo úplně neutralizovat imunomodulační efekt slin dává poměrně jasný směr pro budoucí výzkum na poli léčby infekcí přenášených krevsajíci členovci.

4. Přehled citované literatury

- 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.
- Aga E., Katschinski D. M., van Zandbergen G., Laufs H., Hansen B., Muller K., Solbach W. & Laskay T. (2002). Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169: 898–905.
- 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
- Beatty B.J. and Marquardt W.C. (1996). The biology of disease vectors. *University Press of Colorado*.
- 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.
- 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
- Brown S.J. & Rosalsky J.H. (1984). Blood leukocyte response in hosts parasitized by the hematophagous arthropods *Triatoma protracta* and *Lutzomyia longipalpis*. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 33: 499-505.
- 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
- 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 F.J. (1994a). Modulation of murine cellular immune responses and cytokines by salivary gland extract of the black fly *Simulium vittatum*. *Tropical medicine and parasitology : official organ of Deutsche Tropenmedizinische Gesellschaft and of Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ)* 45: 119-124.

- Cross M.L., Cupp E.W. & Enriquez E.J. (1994b). 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.
- Cross M.L., Cupp M.S., Cupp E.W., Galloway A.L. & Enriquez F.J. (1993). Modulation of murine immunological responses by salivary gland extract of *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae). *Journal of medical entomology* 30: 928-935.
- Cupp M.S., Cupp E.W., Ochoa-A J.O. & Moulton J.K. (1995). Salivary apyrase in New World blackflies (Diptera: Simuliidae) and its relationship to onchocerciasis vector status. *Medical and veterinary entomology* 9: 325-330.
- Černá P., Mikeš L., Volf P. (2002). Salivary gland hyaluronidase in various species of phlebotomine sand flies (Diptera: psychodidae). *Insect biochemistry and molecular biology* 32(12):1691-7.
- 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.
- Dhar R. & Kumar N. Role of mosquito salivary glands. (2003). *Current science* 85: 1308–1313.
- 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.
- 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.
- Eggenberger M., Born W., Zimmermann U., Lerner E.A., Fischer J.A. & Muff R. (1999). Maxadilan interacts with receptors for pituitary adenylyl cyclase activating peptide in human SH-SY5Y and SK-N-MC neuroblastoma cells. *Neuropeptides* 33: 107-114.
- 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.
- Gillespie R.D., Mbow M.L. & Titus R.G. (2000). The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite immunology* 22: 319–331.
- Hasko G., Kuhel D.G., Nemeth Z.H., Mabley J.G., Stachlewitz R.F., Virag L., Lohinai Z., Southan G.J., Salzman A.L. & Szabo C. (2000). Inosine inhibits inflammatory cytokine production by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164: 1013– 1019
- Hořejší V. & Bartůňková J. (2002): *Základy imunologie*. Triton, Praha, 247s

- Champagne D.E., Smartt C.T., Ribeiro J.M. & James A.A. (1995). The salivary gland-specific apyrase of the mosquito *Aedes aegypti* is a member of the 5'-nucleotidase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 694-698.
- Charlab R., Valenzuela J.G., Rowton E.D. & Ribeiro J.M. (1999). Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 15155-15160.
- Charlab R., Rowton E.D. & Ribeiro J.M. (2000). The salivary adenosine deaminase from the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Experimental parasitology* 95: 45-53.
- Chinellato A., Ragazzi E., Pandolfo L., Froidi G., Caparrotta L., Fassina G. (1994). Purine- and nucleotide-mediated relaxation of rabbit thoracic aorta: common and different sites of action. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 46(5): 337-41.
- Jackson T.S., Lerner E., Weisbrod R.M., Tajima M., Loscalzo J. & Keaney J.F. Jr (1996). Vasodilatory properties of recombinant maxadilan. *The American journal of physiology* 271: H924-930.
- 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 J.N., Zer R. & Warburg A. (2000). Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 62: 145-150.
- King C.L. & Nutman T.B. (1991). Regulation of immune response in lymphatic filariasis and onchocerciasis. *Immunology today* 12(3): A54-8
- Lerner E.A., Ribeiro J.M., Nelson R.J. & Lerner M.R. (1991). Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *The Journal of biological chemistry* 266: 11234-11236.
- Lerner E.A. & Shoemaker C.B. (1992). Maxadilan. Cloning and functional expression of the gene encoding this potent vasodilator peptide. *The Journal of biological chemistry*; 267: 1062-1066.
- Li S. & Aksoy S. (2000). A family of genes with growth factor and adenosine deaminase similarity are preferentially expressed in the salivary glands of *Glossina m. morsitans*. *Gene* 252: 83-93.

- 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.
- McKee C.M., Penno M.B., Cowman M., Burdick M.D., Strieter R.M., Bao C., Noble P.W. (1996). Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages. The role of HA size and CD44. *The Journal of clinical investigation* 98(10): 2403-13
- Moro O. & Lerner E.A. (1997). Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist. *The Journal of biological chemistry* 272: 966-970.
- Moro O., Tajima M. & Lerner E.A. (1996). Receptors for the vasodilator maxadilan are expressed on selected neural crest and smooth muscle-derived cells. *Insect biochemistry and molecular biology* 26: 1019-1025.
- 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, Elnaiem 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.
- 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.
- Ribeiro J.M., Charlab R., Rowton E.D. & Cupp E.W. (2000a). *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) and *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) salivary gland hyaluronidase activity. *Journal of medical entomology* 37: 743-747.
- Ribeiro J.M., Katz O., Pannell L.K., Waitumbi J. & Warburg A. (1999). Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP. *The Journal of experimental biology* 202 (Pt 11): 1551-1559.
- Ribeiro J.M., Rossignol P.A. & Spielman A. (1986). Blood-finding strategy of a capillary feeding sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Comparative biochemistry and physiology. A, Comparative physiology* A 83: 683-686.

- Ribeiro J.M., Rowton E.D. & Charlab R. (2000b). The salivary 5'-nucleotidase/phosphodiesterase of the hematophagous sand lutzomyia fly, *Lutzomyia longipalpis*. *Insect biochemistry and molecular biology* 30: 279-285
- Ribeiro J.M., Sarkis J.J., Rossignol P.A., Spielman A. (1984) Salivary apyrase of *Aedes aegypti*: characterization and secretory fate. *Comparative biochemistry and physiology. A, Comparative physiology B*. 79(1): 81-6.
- Ribeiro J.M., Vachereau A., Modi G.B. & Tesh R.B. (1989). A novel vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Science* 243: 212-214.
- Romano A., Ladijinsky E. & Aboud M. (1983). Effect of hyaluronidase on cell response to the antiviral and interferon inducing activity of poly(rI) . poly(rC). *Archives of virology* 78: 315– 319.
- 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. (2005). Modulation of murine cellular immune response and cytokine production by salivary gland lysate of three sand fly species. *Parasite immunology* 27, 469-473
- 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.
- Ryšavý B., Černá Ž. Chalupský J., Országh I., Vojtek J. (1989): *Základy parazitologie. Státní pedagogické nakladatelství, Praha*, 216s
- 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.
- 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.
- Smartt C.T., Kim A.P., Grossman G.L., James A.A. (1995) The Apyrase gene of the vector mosquito, *Aedes aegypti*, is expressed specifically in the adult female salivary glands. *Experimental parasitology*. 81(3): 239-48.
- 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.
- 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.
- Titus R.G. & Ribeiro J.M. (1990). The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne disease. *Parasitol Today* 6: 157– 160.
- 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.
- 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
- 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.

Zídek Z. (1999). Adenosine - cyclic AMP pathways and cytokine expression. *European cytokine network*. 10(3): 319-28

<http://www.who.int/tdr/diseases/>