

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Přírodovědecká fakulta

**Detekce a kvantifikace inhibitorů proteáz v klíštěti *Ixodes ricinus*
pomocí monoklonálních protilátek**

Diplomová práce

Bc. Martina Vaníčková

Školitel: RNDr. Jindřich Chmelař, Ph.D

Školitel specialista: Mgr. Jan Kotál

České Budějovice 2017

Vaničková M., (2017): Detekce a kvantifikace inhibitorů proteáz v klíštěti *Ixodes ricinus* pomocí monoklonálních protilátek [Monoclonal antibodies in detection and quantification of tick inhibitor proteases. Mgr. Thesis, in Czech] - 76 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Inhibitors of proteases in tick saliva play an important role during tick feeding. Tick saliva contains a wide range of bioactive components which are able to modulate host immunity. Therefore, ticks are able to feed for a long time and transfer tick-borne diseases pathogens. The risk of transfer can be significantly reduced by deactivation of these protease inhibitors. In this study I made monoclonal antibodies for detection and quantification of two serine protease inhibitors in tick saliva and other tick-body parts.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....
Bc. Martina Vaničková

Poděkování

Na prvním místě děkuji svým školitelům RNDr. Jindřichu Chmelařovi, Ph.D a Mgr. Janu Kotálovi za laskavost, ochotu a trpělivost během výzkumu i tvorby mé diplomové práce, za poskytnutí odborných rad a tipů v rámci všech laboratorních pokusů včetně laboratorního zaškolení. Velice si vážím pomoci Bc. Evy Výletové, díky které jsem měla vždy k dispozici čerstvá sterilní média pro kultivaci buněk a další nezbytné roztoky pro plánované pokusy, nemluvě o přístupném sterilním laboratorním nádobí. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Elišce Maršákové a Mgr. Barboře Hejdové za sdílení biologického materiálu pro závěrečné pokusy a Janu Erhartovi za pomoc v práci se zvířaty.

Obsah

1.	Úvod	1
1.1.	Klíště obecné (<i>Ixodes ricinus</i>).....	1
1.2.	Interakce klíště - hostitel.....	2
1.2.1.	Hemostáza.....	3
1.2.2.	Vrozená imunita	4
1.2.3.	Nespecifická imunita - Komplement.....	5
1.2.4.	Specifická imunita	6
1.3.	Obranné mechanismy klíštěte, sliny klíšťat.....	7
1.4.	Inhibitory proteáz ve slinách klíšťat.....	9
1.4.1.	Cystatiny (Cystein protease inhibitors)	10
1.4.2.	Serpiny (Serin Protease Inhibitors)	11
1.5.	Monoklonální protilátky (MAbs).....	13
1.5.1.	Historie.....	13
1.5.2.	Použití v medicíně	14
1.5.3.	Monoklonální protilátky ve výzkumu klíšťat	17
2.	Cíle práce	19
3.	Materiály a metody.....	20
3.1.	Materiály (chemikálie, kity).....	20
3.2.	Metody.....	22
3.2.1.	Imunizace myši	22
3.2.2.	Izolace myši sleziny a odběr krve	22
3.2.3.	Buněčná fúze pro přípravu monoklonálních protilátek	23
3.2.4.	Ředění buněk pro přípravu monoklonálních protilátek.....	23
3.2.5.	Zamrazování a rozmrazování buněk.....	24
3.2.6.	Pročištění supernatantu obsahujícího protilátky	25
3.2.7.	Koncentrování protilátek	26
3.2.8.	ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay).....	26
3.2.9.	Stanovení titrů protilátek	27
3.2.10.	Získávání orgánů a slin klíšťat	27
3.2.11.	Stanovení koncentrace proteinů v slinách a orgánech klíšťat pomocí BCA Protein Assay.....	28
3.2.12.	Detekce proteinů S8K a IRS-2 v slinách a orgánech klíšťat pomocí monoklonálních protilátek metodou ELISA	29

3.2.13. Western blot (imunoblot).....	30
3.2.14. Detekce proteinů ve tkáních <i>Ixodes ricinus</i> pomocí monoklonálních protilátek.....	33
3.2.15. Kvantifikace proteinů IRS-2 a S8K v orgánech a slinách klíšťat	33
4. Výsledky	34
4.1. Vyhodnocení produkce monoklonálních protilátek hybridomy a jednotlivými buněčnými klony	34
4.2. Stanovení titru protilátek	34
4.2.1. Výsledky stanovení titru dvou vyrobených protilátek Anti-G16	34
4.2.2. Výsledky stanovení titrů připravených protilátek Anti-IRS-2.....	35
4.2.3. Výsledky stanovení titru dvou vyrobených protilátek Anti-S8K.....	37
4.3. Stanovení koncentrace proteinů v orgánech a slinách klíšťat pomocí BCA protein assay kit	39
4.4. Detekce IRS-2 a S8K proteinů v klíštěcích tkáních a slinách pomocí připravených monoklonálních protilátek Anti-IRS-2 a Anti-S8K	41
4.4.1. Anti-IRS-2 3G10F2.....	41
4.4.2. Anti-IRS-2 8B10F11	43
4.4.3. Anti-S8K 8G11H6.....	43
4.4.4. Anti-S8K 1C10G6.....	45
4.5. Důkaz přítomnosti IRS-2 a S8K proteinů ve slinách a orgánových suspenzích klíštěte obecného metodou Western blot pomocí připravených monoklonálních protilátek	47
4.5.1. Detekce rekombinantního proteinu IRS-2 pomocí monoklonální protilátky Anti-IRS-2 3G10F2	47
4.5.2. Detekce proteinů IRS-2 ve slinách a orgánových suspenzích klíštěte obecného.....	48
4.5.3. Detekce rekombinantního proteinu S8K pomocí monoklonální protilátky Anti-S8K 8G11H6.....	49
4.5.4. Detekce proteinů S8K obsažených ve slinách a orgánových suspenzích klíštěte obecného	50
4.6. Kvantifikace proteinů IRS-2 a S8K v orgánech a slinách klíštěte pomocí počítačového programu Image J.....	52
4.6.1. Stanovení množství IRS-2 proteinů ve slinách a orgánových suspenzích klíštěte obecného	52
4.6.2. Stanovení množství S8K proteinů v orgánech a slinách klíštěte	53
5. Diskuse	55
6. Závěr.....	58
7. Seznam použitých zkratk	59
8. Seznam použité literatury	60

1. Úvod

Monoklonální protilátky jsou protilátky produkované pouze jedním klonem samostatně stimulovaných hybridomů B-lymfocytů a nádorové linie (Judith a kol., 2013). Teoreticky by měly monoklonální protilátky reagovat pouze s jedním antigenním epitopem, čímž by měla být vyloučena zkřížená reaktivita protilátky s nežádoucím antigenem. V praxi se tak bohužel plně nechovají a zkříženě reagují v případech, kdy se vyskytne v suspenzi proteinů jiný antigen se stejným epitopem (Campbell, 1991). I přes mírnou zkříženou reaktivitu jsou však schopné zachovat si svou specifickou, díky které jsou hojně využívány k detekci a kvantifikaci konkrétních antigenních struktur ve směsi proteinů a identifikaci konkrétních patogenů. Z tohoto důvodu jsou monoklonální protilátky široce uplatňovány v biomedicíně k identifikaci, analýze či kvantifikaci konkrétních antigenů, vůči kterým byly vyrobeny (Campbell, 1991).

Monoklonální protilátky v této práci byly cíleny vůči klíčecím inhibitorům proteáz, které jsou funkční složkou slin klíšťat. Svou funkcí umožňují klíštěti modulovat imunitní odpověď hostitele po průniku cévní stěnou, a tak nerušeně sát po nezbytně dlouhou dobu. Tvorbou hostitelských protilátek, mířených proti klíčecím inhibitorům proteáz je možné omezit sání klíštěte a tím tak snížit i riziko přenosu patogenů z vektora na hostitele, který je v případě infikovaného klíštěte velmi pravděpodobný (Mans, 2004).

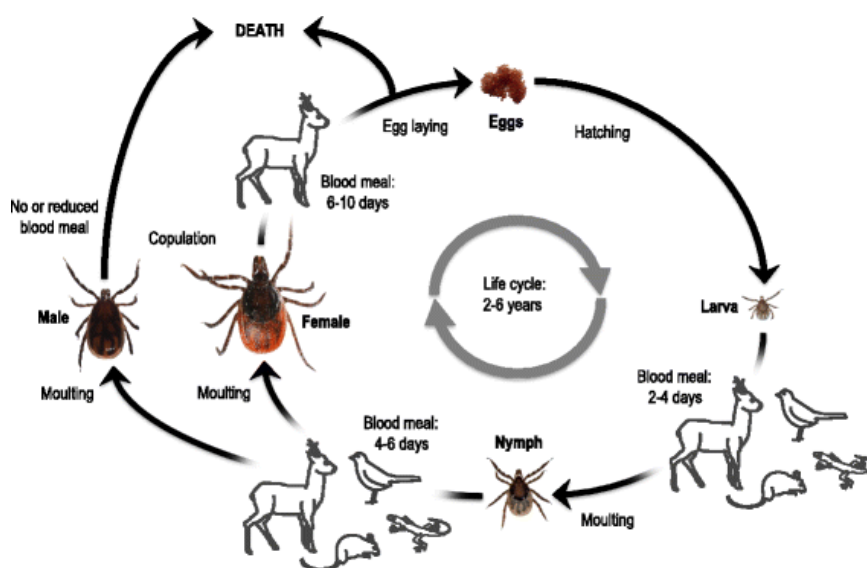
Výzkum klíčecích inhibitorů proteáz se dnes dále rozvíjí za účelem vývoje účinných aktivních i pasivních očkovacích vakcín proti klíšťaty přenášeným patogenům. Monoklonální protilátky jako takové jsou nadále vyvíjeny za účelem vzniku nových léčiv (chemoterapeutik) pro léčbu leukémií, B-buněčných lymfomů, revmatoidní artritidy a dalších (Keane, 2001; Pegram, 2005).

1.1. Klíště obecné (*Ixodes ricinus*)

Klíště obecné je nejběžnějším typem klíštěte vyskytujícím se ve střední Evropě. Jedná se o krev sajícího ektoparazita, který je systematicky řazen do kmene Členovci (*Arthropoda*), třídy Pavoukovci (*Arachnida*), řádu Roztoči (*Acari*), podřádu Klíšťatovci (*Ixodida*), čeledi Klíšťatovití (*Ixodidae*) (Perret, 2003).

V průběhu životního cyklu prochází klíště třemi vývojovými stádii: larva, nymfa, dospělý jedinec. Metamorfózy mezi jednotlivými stádii jsou vázané na předchozí příjem hostitelské krve (Sprong, 2009). Po naklazení se z vajíček vyvinou larvy, které mají pouze

3 páry nohou a jsou velké přibližně 0,8 mm. Po prvním nasátí na hostiteli odpadají a prochází první metamorfózou, přeměnou na nymfy. Nymfy dosahují velikosti 2-4 mm a mají 4 páry nohou. Po druhém nasátí nymfy z hostitele odpadají a podléhají druhé metamorfóze, přeměně na dospělé. Po dosažení stádia dospělého jedince se účastní dalšího sání pouze dospělá samička za účelem dokončení oogeneze a naklazení vajec. Mezi hlavní hostitele prvního a druhého stádia vývoje klíštěte patří drobní hlodavci, ptáci a ještěrky (Matushka, 1991). V dospělosti sají samičky převážně na vyšších savcích (liška, pes, kůň, srna) (Gray, 2009).



Obrázek 1: Životní cyklus Klíštěte obecného (Herrmann, 2015)

Klíšťata se stala předmětem studia především pro svou schopnost přenášet patogeny na hostitele v průběhu sání. Ty mohou hostitelům, a to včetně člověka, způsobit závažná virová, bakteriální či protozoální onemocnění. Klíště obecné působí tedy jako významný vektor patogenů, pro jehož vlastní vývoj a reprodukci je příjem hostitelské krve esenciální (Medlock, 2013).

1.2. Interakce klíště - hostitel

Klíště obecné sají až na 300 různých druzích hostitelů (plazi, ptáci, savci), vždy s ohledem na své vývojové stádium (Herrmann, 2015). Aktivní fáze životního cyklu klíštěte obecného je udávána od počátku března do konce října v závislosti na vnějších podmínkách (teplota, vlhkost) (Jaenson, 2011).

Klíště, které je připravené k sání, se usadí na vhodném místě na hostiteli, kde pomocí ozubených chelicer prořízne pokožku a do vzniklé ranky vsune hypostom (Obenchaim, 1982). V důsledku poranění, jsou v hostitelském těle ihned spuštěny obranné mechanismy na úrovni buněčné i humorální imunity směřující k přerušení sání krve klíštětem a odpadnutí (Willadsen, 1999).

V reakci na přísáté klíště byla v hostitelské krvi pozorována zvýšená aktivita leukocytů, vyšší koncentrace cytokinů a jiných zánětlivých faktorů soustředěných především do perivaskulární oblasti horní části pokožky v místě přísátí (Glatz, 2016). Makroskopicky mohou být tyto změny pozorovány jako malý otok na pokožce. Pro lepší přehlednost jsou změny na buněčné i látkové úrovni vypsány v Tabulce I viz níže.

Tabulka I: Zvýšená koncentrace buněk či protizánětlivých faktorů v lidském séru v reakci imunitního systému hostitele na přísátí klíštěte

Antigen prezentující buňky	makrofágy, monocyty, Langerhansovy buňky
B a T lymfocyty	Th-ly, Tc-ly
Granulocyty	neutrofilů eosinofilů, basofilů - obsahující bioaktivní látky
Složky komplementu	Všechny
Cytokiny	T _h -1 (IL-2 a INF- γ), T _h -2 (IL-4, IL-5, IL-10), IL-12, IL-6, TNF- α , TGF- β (transforming grow factor)
Chemokiny	pro neutrofilů (CXCL1 a CXCL8) pro makrofágy (CCL2, CCL3, CCL4)
Specifické protilátky	
CD14 marker	

(Titus, 2006)

Pozorovatelnými obrannými mechanismy hostitele na přísáté klíště jsou hemostáza, aktivace komplementu a reakce na úrovni vrozené i získané imunity.

1.2.1. Hemostáza

Hemostáza, neboli krevní srážení, je jedním z hlavních obranných mechanismů hostitele. Hostitel se tak snaží zabránit nasátí krve klíštětem po průniku hypostomu skrz cévní stěnu. Samotná aktivace hemostázy je spuštěna v reakci na poranění cévní stěny klíštěcími chelicerami za účelem vytvoření krevní sraženiny (zátky), která zamezí pokračování sání krve klíštětem.

Vazokonstrikce je první reakcí na přítomnost cizího tělesa, jejímž přirozeným účelem je snížit riziko rozsáhlého krvácení při poranění. Následně dochází k aktivaci trombocytů v rámci primární hemostázy. Prostřednictvím bivalentních proteinů přítomných

v lidském krevním séru (Von Willebrandtův faktor nebo fibronectin) jsou trombocyty vázány na obnažené subendoteliální struktury (Pecka, 2004). Vzniklou vazbou jsou tak zahájeny řady metabolických a biochemických dějů, které vedou ke změně konformace trombocytů a centralizaci v nich přítomných granul a jejich samotné aktivaci. Aktivované trombocyty uvolňují do svého okolí ADP a Tromboxan A₂, díky kterým je aktivováno stále vyšší množství trombocytů, které utvoří pevnou zátku. Zátka je v rámci sekundární hemostázy fixována fibrinovou sítí díky přeměně fibrinogenu na vláknitý fibrin. Sekundární hemostázy se účastní srážecí faktory plazmatického koagulačního systému přítomné v hostitelském séru (Coleman, 2006). Vznik takovéto zátky by zamezil přísunu krve klíštěti, proto je vůči těmto jevům klíště vybaveno obrannými mechanismy (viz níže).

Díky přítomnosti antihemostatických faktorů ve slinách je klíště schopné zabránit hostitelské vazokonstrikci, agregaci trombocytů i krevnímu srážení na úrovni koagulační kaskády. Například, klíště *Ornithodoros moubata* tak činí pomocí TAP proteinu (Tick Anticoagulant Peptid), který dokáže inaktivovat aktivovaný faktor Xa v hostitelském séru (Wikel, 1999; Paesen, 2000; Waxman, 1990). Fluidita krve tak zůstane zachována po celou dobu sání klíštěte.

1.2.2. Vrozená imunita

V reakci na kožní poranění způsobené klíštětem jsou v rámci vrozené imunity do okolí takového místa rekrutovány leukocyty lokální zánětlivé reakce – neutrofily, makrofágy, žírné buňky, Langerhansovy buňky, a pro-zánětlivé faktory uvolněné z poškozených buněk endotelu (Wikel, 1999).

Klíčovou roli v nespecifické imunitě hrají makrofágy, které působí v prozánětlivé odpovědi jako antigen prezentující buňky i jako významní producenti řady cytokinů a chemokinů (IL-1, TNF α , složky komplementu, hydrolytické enzymy) (Moser, 2008). V lidském organismu se mohou vyskytovat ve dvou subpopulacích: jako monocyty kostní dřeně, které jsou součástí krevní cirkulace, a tkáňové rezidentní makrofágy osidlující konkrétní místo organismu. Liší se typem pro-zánětlivých faktorů, které jsou schopné produkovat (Davies, 2013), dále množstvím membránových receptorů, pomocí kterých mohou rozpoznávat rozsáhlou škálu nežádoucích antigenů přítomných v lidském organismu (vč. mikroorganismů) (Taylor, 2005).

Makrofágy mohou být aktivovány klasickou (zvýšená přítomnost LPS, IFN γ) nebo alternativní cestou. V případě alternativní cesty působí jako stimuly aktivace makrofágů IL-4, IL-13, imunitní komplexy v kombinaci s LPS nebo IL-1 β , IL-10, TGF β a glukokortikoidy (Martinez, 2008). Aktivované makrofágy klasickou cestou umocní syntézu

MHC II receptorů na vlastním povrchu. Následkem toho mohou lépe prezentovat antigen Th lymfocytům, zvýší produkci C1 složky komplementu (Müller, 1978) a zahájí produkci oxidu dusnatého, kyslíkových radikálů, superoxidů, C3 složky komplementu, protizánětlivých cytokinů: IL-1 α , IL-1 β , IL-3, TNF, IL-6, IL-8, IL-12, GM-CSF (Hořejší, 2005) a dalších molekul umožňující degradaci cizorodého tělesa.

Z důvodu schopnosti imunitního systému hostitele bránit se vůči cizím elementům, vyvinula klíšťata bioaktivní látky, které jsou schopné produkty makrofágů neutralizovat nebo snížit jejich schopnost takové látky produkovat (Ramachandra, 1992).

Společně s makrofágy je v první fázi akutní zánětlivé reakce infiltrováno i velké množství fagocytózy schopných neutrofilů (Fox, 2010). Prostřednictvím bioaktivních látek přítomných ve slinách klíštěte je snižována schopnost adheze neutrofilů prostřednictvím down regulace β_2 -integrinů, a tím je omezena role neutrofilů v zánětlivé odpovědi (Montgomery, 2004).

1.2.3. Nespecifická imunita - Komplement

Humorální složku nespecifické imunity představuje komplement. Jedná se o skupinu proteinů a glykoproteinů, které se účastní kaskádové reakce za účelem lýzy nežádoucího patogenu. Složky komplementu tvoří až 15 % sérových proteinů, které jsou v klidovém stádiu přítomny v krevním séru v neaktivní formě (Owen, 2013).

Doposud jsou známy tři cesty aktivace komplementu: klasická (aktivace vznikem komplexu Ag-Ab (IgG, IgM), alternativní (aktivace vznikem komplexu C3b složky komplementu a specifického antigenu na povrchu buněčné stěny bakterií) a lektinová (prostřednictvím proteinu vázajícího manózu) (Thiel, 1997).

V momentě odštípnutí inhibičního fragmentu C1 dochází ke spuštění kaskády enzymatických dějů vedoucích k vytvoření mikropóru na povrchu patogenního elementu a jeho následnému zničení (Müller, 1978). K samotné lýze buňky poté dochází v závěrečné fázi spojením C5, C6, C7, C8 a C9 složky komplementu, tzv. membránu napadajícího komplexu (Membrane Attack Complex) (Granados-Durán, 2016). C3b složka komplementu může působit jako významný opsonin neutrofilů (Tosi, 1990).

Díky bioaktivním látkám přítomným ve slinách klíštěte může být zablokována alternativní i klasická cesta komplementu (skrze C3a a C5a složku) (Ribeiro, 1987).

1.2.4. Specifická imunita

Specifickou složku buněčné imunity představují B-lymfocyty a T-lymfocyty. Oba typy leukocytů se vyvíjí v rámci leukopoézy z progenitorové buňky vzniklé v kostní dřeni. Samotná progenitorová buňka je již částečně diferencovaná a tím předurčena k vývoji B nebo T-lymfocytů. T-prolymfocyty krátce po svém vzniku migrují z kostní dřene do kůry primárního lymfatického orgánu - brzlíku, kde se diferencují ve velké lymfoblasty, které putují do dřene brzlíku, kde probíhá diferenciace na antigen determinované lymfocyty. B-lymfocyty vznikají po celý život v kostní dřeni, odkud putují ve více diferencovaném stádiu do sekundárních lymfatických orgánů (slezina / lymfatické uzliny), kde plně dozrávají v momentě styku s antigenem (Földi, 2014).

Antigen determinované T-lymfocyty nesou specifické povrchové receptory, které jsou kódovány geny hlavního histokompatibilního komplexu (MHC), díky nimž jsou T-lymfocyty schopné rozpoznat vlastní antigen od nevlastního (Földi, 2014). T-lymfocyty rozpoznávají antigen prezentovaný pomocí antigen prezentujících buněk. Antigen prezentující buňky prezentují rozštěpené peptidové fragmenty na svém povrchu ve spojení s HLA molekulami I. nebo II. třídy. Molekuly HLA I. třídy jsou součástí povrchu jaderných buněk, zatímco HLA II. třídy jsou vlastní antigen prezentujícím buňkám (makrofágy, dendritické buňky, atd). Receptory T-lymfocytů jsou tvořeny z variabilních peptidových řetězců. Variabilní řetězce jsou strukturálně podobné lehkým a těžkým řetězcům imunoglobulinů a účastní se rozpoznávání antigenu v komplexu s HLA molekulami. Rozpoznávání HLA molekul je usnadněno přítomností CD-koreceptorů (Cluster Differentiation) přítomných na povrchu T-lymfocytů. Povrchové koreceptory rozlišujeme na $CD4^+$ a $CD8^+$, které jsou odlišné pro subtypy lymfocytů - pomocné T_H a cytotoxické T_C lymfocyty (Trojan, 2003).

Cytotoxické T-lymfocyty působí jako efektorové buňky schopné rozpoznat cizí antigen na povrchu jakékoli buňky. V závislosti na svém fenotypu $CD8^+$ reagují T_C lymfocyty s antigeny v komplexu s molekulami HLA I. třídy. Hlavním úkolem T_C buněk je likvidace bakterií, parazitů a infikovaných či jinak fyziologicky abnormálních buněk. Pomocné T-lymfocyty představují až 75 % T-buněk. Jejich hlavní rolí je produkce cytokinů v reakci na rozpoznání cizího antigenu. Antigen rozpoznávají v komplexu s molekulami HLA II třídy na povrchu prezentující buňky v závislosti na svém povrchovém fenotypu $CD4^+$. Z hlediska produkce cytokinů se T_H -lymfocyty podílí na kontrole imunitního systému a produkci protilátek B-lymfocyty (Penka, 2011).

B-lymfocyty jsou zodpovědné za látkovou imunitní odpověď. Po své aktivaci specifickým antigenem začnou produkovat velké množství vysoce specifických protilátek, které cirkulují v krvi a váží se na příslušný antigen za vzniku komplexu antigen-protilátka. Následný komplex je posléze fagocytován pomocí fagocytózy schopných buněk. B-lymfocyty rozpoznávají antigen prezentovaný na povrchu makrofágů, které cizorodé těleso zfagocytují a jeho fragmenty prezentují na svém povrchu. Setkáním B-lymfocytu s antigenem jsou B-lymfocyty aktivovány a zahajují vlastní proliferaci. Dochází tak ke vzniku sesterských buněk, plazmocytů, které produkují další množství protilátek. Část aktivovaných lymfocytů převezme roli tzv. paměťových buněk, které cirkulují v krvi i po destrukci antigenu. V případě opětovného napadení stejným antigenem tak mohou rychleji spustit produkci specifických protilátek a urychlit tak imunitní reakci (Lüllmann, 2012).

1.3. Obranné mechanismy klíštěte, sliny klíšťat

Jak již bylo popsáno výše, imunitní systém hostitele má silnou schopnost bránit se vůči cizím elementům. Proto se u klíšťat vyvinuly bioaktivní látky, které zamezují imunitnímu systému hostitele v plné aktivaci, případně umožňují vyhnout se imunitní odpovědi. Hlavní složku představuje prostaglandin E₂, díky kterému je klíště schopné ovlivňovat proces vazodilatace, trombocytární agregaci, degranulaci žírných buněk a aktivaci T-lymfocytů (Mans, 2004).

K syntéze bioaktivních látek dochází ve slinných žlázách - párovém orgánu složeném z alveolů a umístěném anterolaterálně v tělní dutině klíštěte. Jednotlivé alveoly slinných žláz jsou mezi sebou propojeny sběrnými kanálky, které se sbíhají do salivaria. Zde se vzniklé sliny klíšťat hromadí a jsou vylučovány do hostitele (Obenchain, 1982) společně se zmíněnými bioaktivními látkami. Slinné žlázy kromě samotné produkce slin umožňují klíštěti i významnou osmoregulaci, díky které je klíště schopno koncentrovat přijímanou potravu a zbavovat se přebytečné vody zejména v posledních dnech sání zpět do hostitele (Binnington, 1980). Společným symportem mohou být tak do hostitele přeneseny i patogeny přítomné ve slinách klíštěte (Sauer, 1995). Sekrece klíštěcích žláz je řízena neurohormonálně skrze D1 dopaminový receptor (přítomný ve slinných žlázách) stimulovaný dopaminem, který je sekretován bazálními buňkami též ve slinných žlázách (Šimo, 2011).

Sliny klíšťat jsou esenciální pro sekreci enzymů a jiných látek s antikoagulačními, antiagregačními a vazodilatačními účinky, které tlumí bolest a svědění v místě vpichu, které by jinak běžně doprovázely poranění pokožky (Binnington, 1980). Svědění a bolest hostitele

jsou tlumeny histamin-vázajícími lipokaliny a bradykinin-deaktivující dipeptidyl karboxypeptidázou, které vyvazují histamin a bradykinin přítomný v krevním séru následkem poranění (Ribeiro, 1998; Valenzuela, 1999). Krevní srážení je omezováno díky přítomnosti proteinů cíleným vůči aktivovanému koagulačnímu faktoru Xa a trombinu, které jsou v rámci hemokoagulace klíčové. Jako významné vazodilatanty, které brání stažení cévy a tím i snadnému zahojení, byly pozorovány prostaglandin E, prostaglandin I a inhibitory serinových proteáz (viz. Kapitola 1.4.2) (Ribeiro, 1998; Chmelař et al, 2012). K antiagregačnímu účinku dochází pomocí narušení hydrolyzy ATP - ADP + Pi, která za běžných fyziologických podmínek vede k aktivaci integrinů, receptorů trombocytů, a následné agregaci (Francischetti, 2010).

Sliny klíšťat obsahují i látky s imunomodulačními účinky, kterými mohou ovlivňovat vrozenou (nespecifickou) i získanou (specifickou) imunitu.

Na poranění či vniklou infekci hostitel v první řadě reaguje pomocí neutrofilů, které svými vlastnostmi přispívají k prezentaci antigenu (Ag) a fagocytóze cizorodých elementů (Ribeiro, 1990). Ve slinách *I. ricinus* byly ovšem nalezeny proteiny, lipokaliny, které svou vazbou na LT1 membránový receptor neutrofilů blokují přirozenou aktivaci a chemotaxi neutrofilů (Beaufays, 2008). U mnohých druhů klíšťat dále byla popsána schopnost inhibice interleukinu-8, který působí jako významný chemoatraktant neutrofilů (Hajnická, 2001).

Dalšími buňkami schopnými prezentace antigenu, jejichž funkce je ovlivněna slinnými proteiny klíšťat, jsou dendritické buňky. Prostřednictvím membránových receptorů dendritických buněk CD40 or TLR9, TLR3 a TLR7 je ovlivňována vlastní maturace, diferenciaci i antigen-prezentující schopnost těchto buněk (Skallová, 2008). Pod vlivem slin klíšťate byla pozorována i snížená produkce cytokinů dendritických buněk (Oliveira, 2011).

Byla prokázána i schopnost slin *I. ricinus* utlumit zabíjení patogenu NK buňkami (Kopecký, 1999).

Ve slinách *I. ricinus* a *I. scapularis* se vyskytují skupiny proteinů, které mohou blokovat klasickou i alternativní cestu aktivace komplementu (Nunn, 2005). Blokace alternativní cesty aktivace komplementu probíhá na úrovni blokace C3b složky komplementu a faktoru B, nebo C5 složky komplementu (Schroeder, 2008).

V případě imunomodulačních účinků na B a T lymfocyty byl prokázán vliv slin na vlastní proliferaci lymfocytů hostitele (aktivovanou např. prostřednictvím lektinu konkanavalinu A u T-lymfocytů) včetně vlivu na schopnost T-lymfocytů produkovat cytokiny (Wikel, 1997). Bylo pozorováno potlačení produkce Th1 cytokinů (IL-2, INF- γ) a naopak zvýšení produkce Th2 cytokinů (IL-4, IL-10) (Ramachandra, 1992).

Ve slinách *I. scapularis* byly analyzovány proteiny s popsáním vlivem na aktivaci a také proliferaci CD4⁺ T-lymfocytů. Schopnost T-lymfocytů proliferovat je omezena na základě snížené produkce cytokinů, které jsou nezbytné pro vlastní dozrávání (Anguita, 2002; Leboulle, 2002). V případě B-lymfocytů byla pozorována inhibice IL-10, díky které mohou B-lymfocyty žít, přežít a produkovat protilátky (Howard, 1992). Mezi takové proteiny byly zařazeny například Salp 15 a Iris (*Ixodes ricinus* imunosupresor), které v testech in vitro prokazovaly stejné účinky jako sliny klíšťat (Anguita, 2002; Leboulle, 2002).

Ve slinách rodu *Ixodes* se vyskytuje velká řada inhibitorů proteáz, které jsou v závislosti na své specifitě schopny inhibovat například aktivovaný koagulační faktor Xa, či zamezit aktivaci samotného trombinu a tím modulovat hostitelskou hemostázu. Tím je klíštěti umožněno dlouhodobé sání (Mans, 2004). Inhibitory proteáz klíštěte jsou podrobněji popsány v následující kapitole.

1.4. Inhibitory proteáz ve slinách klíšťat

Proteázy jsou enzymy, které štěpí peptidické vazby cílových proteinů na menší fragmenty. Dosud byly popsány 4 typy proteáz: aspartická, metalová, serinová a cysteinová. Jejich způsob aktivace se pak typově liší (Barret, 1981). V lidském těle hrají proteázy důležitou roli i při obranných mechanismech imunitního systému v reakci na přisáté klíště. V rámci možnosti zachování dlouhodobého sání klíštěte na hostiteli obsahují jejich sliny řadu inhibitorů těchto proteáz, které působí protizánětlivě a imunosupresivně vůči hostiteli (Wikel, 1999).

Dodnes bylo popsáno velké množství inhibitorů proteáz o rozmanitých funkcích, které jsou esenciální především pro regulaci sání klíštěte (Chalaire, 2011). Samotná inhibice hostitelových proteáz je umožněna díky přítomnosti domény, která je pro každý inhibitor charakteristická. Příkladem takových domén je například Kunitz doména, která je přítomná u člověka - například u pankreatického inhibitoru trypsinu, či ISAC doména působící při blokaci komplementu (Francischetti, 2005). Ve slinách klíšťat se takové domény vyskytují ve velkém množství.

Inhibitory proteáz klíšťat tedy umožňují klíštěti modulovat hostitelskou imunitu v průběhu sání. Následkem pozměněných reakcí imunitního systému stoupá pravděpodobnost přenosu patogenů (Saliva Assisted Transmission). Z důvodu možného

zvýšení pravděpodobnosti přenosu patogenního elementu jsou dnes inhibitory proteáz stále více studovány. Zamezením exprese inhibitorů proteáz či nalezením způsobu jak dané inhibitory deaktivovat, by bylo možné sání klíštěte narušit a zamezit tak potenciálnímu přenosu patogenů (Jones, 1992).

1.4.1. Cystatiny (Cystein protease inhibitors)

Cysteinové proteázy jsou proteolytické enzymy účastníci se v lidském těle především metabolismu neesenciální aminokyseliny cysteinu, který je součástí řady biochemických dějů (syntéza glutathionu, taurinu a dalších). Komplex dvou molekul cysteinu vytváří cystin a při štěpení jeho disulfidického můstku dochází ke vzniku antioxidantů, které jsou významnými činiteli při průběhu zánětu (McPherson, 2011).

Proteiny schopné selektivní a specifické inhibice se nazývají cystatiny. Cystatiny působí jako kompetitivní inhibitory C1 cysteinových proteáz, které tvoří jednu velkou nadřazenou rodinu cysteinových proteáz. Cystatiny obsažené v orgánech a slinách klíštěte obecného inhibují správnou funkci hostitelských cysteinových proteáz. Fyziologicky se cystatiny podílí na imunitní odpovědi člověka na vznikající nádor, či přítomnost parazita (Zhou, 2006). Cystatiny C1 proteáz jsou na základě své struktury klasifikovány do tří základních rodin (viz tabulka II).

Tabulka II: Klasifikace a charakteristika 3 rodin cystatinů C1 cysteinových proteáz

Stefiny (cystatiny 1. rodiny)	Cystatiny 2. rodiny	Cystatiny 3. rodiny
<i>Stefin A, B (=cystatin A, B)</i>	<i>Cystatin C, D, S, SA, SN</i>	<i>Kininogeny</i>
nízkomolekulární ~11 kDa	nízkomolekulární 13–14 kDa	vysokomolekulární 88-114 kDa
intracelulární molekuly (exprimovány intracelulárně)	extracelulární molekuly	extracelulární molekuly
chybí disulfidické můstky a signální sekvence	přítomné disulfidické můstky a signální sekvence na C'konci	obsahují volnou cystatinovou doménu
neglykosilované	některé glykosilované	glykosilované

(Abrahamson, 1994; Abrahamson, 1997; Turk, 1991)

Kininogeny tvoří s cysteinem pevné ireverzibilní komplexy, čímž inhibují proteolytickou aktivitu enzymu. Cystatin je navázán do aktivního místa cystinu, které je tvořeno 4 cysteinovými zbytky (Abrahamson, 1994; Brown, 1997). U klíšťat byly nalezeny geny kódující inhibitory těchto cysteinových proteáz, díky kterým mohou tlumit zánět, a tím zamezit obrané reakci imunitního systému hostitele. Cystatiny klíšťat jsou lokalizovány především ve střevech a slinných žlázách. Jejich hlavním úkolem je chránit buňky mnohobuněčného organismu před nežádoucí proteolýzou. Kromě klíšťat byly cystatiny

nalezeny také u nematod (Nematoda) a trematod (Platyhelminthes) (Schechter, 1967; Klotz, 2011).

Mezi hlavní cysteinové proteázy, které reagují na cystatiny, patří rostlinné papainy a savčí katepsiny. Katepsiny jsou trávicí enzymy obsažené v savčích lysozomech, které jsou aktivní v kyselém prostředí a podílí se na intracelulárním katabolismu. Existují tři druhy katepsinů: aspartátové, serinové a cysteinové. (Horn, 2014). Příkladem cysteinových katepsinů, které podléhají vlivu cystatinů, jsou katepsin B, H, L (Turk, 1991).

Katepsin B je cysteinová proteáza, která hraje klíčovou roli v invazi nádorových buněk. Progresi nádorového bujení může ovlivňovat přímo nebo nepřímo prostřednictvím aktivace dalších latentních proteáz. Katepsin B je dále považován za nedílnou součást proteolytické kaskády během vzniku nádorového bujení (Yan, 1998). Samotný katepsin B je syntetizován intracelulárně ve formě neaktivního zymogenu, k jehož aktivaci dochází po odštěpení N-terminálního koncového propeptidu, který blokuje jeho aktivní místo (Horn, 2014). Kromě podílu na účasti vzniku nádorového bujení hrají cystatiny důležitou roli v obraně imunitního systému vůči parazitům. Prokázaným inhibitorem katepsinu B v zánětlivé odpovědi je cystatin C (Hansen, 2000).

Další cystatinem ovlivnitelnou cysteinovou proteázou je katepsin L. Ten se účastní zánětlivé odpovědi a podílí se na proliferaci cytotoxických T-lymfocytů. Ve slinách *I. scapularis* byly doposud identifikovány 2 cystatiny, u kterých byly prokázány protizánětlivé účinky a zaznamenán útlum dozrávání dendritických buněk – jedním z nich je Sialostatin L, který prostřednictvím blokace katepsinu L inhibuje proliferaci cytotoxických T-lymfocytů (Kotsyfakis, 2006).

Zvýšená exprese katepsinů byla z medicínského hlediska pozorována u pacientů s revmatoidní artritidou (Hansen, 2000) a nádorovými onemocněními jako jsou například kolorektální karcinom (Plvarez, 2009), či rakovinou prsu (Yano, 2001). Z tohoto hlediska jsou cystatiny zkoumány jako jeden ze způsobů léčby nejen nádorových onemocnění.

1.4.2. Serpiny (Serin Protease Inhibitors)

Serinové proteázy tvoří až jednu třetinu všech tělních proteáz (Blow, 1997). Serinové proteázy hrají důležitou roli při zánětu, hemokoagulaci, fibrinolýze či aktivaci komplementu (Murray, 2002; Imamura, 2005). Aktivní místo serinových proteáz je tvořeno katalytickou triádou aminokyselin serinu, histidinu a kyseliny asparágové (Asp-His-Ser). Molekulární hmotnost serpinů se pohybuje v rozmezí 40 – 50 kDa a ve své struktuře

obsahují 3 β -sheety a 8-9 α -helixů (Van Gent, 2003; Gils, 1998, Mulenga, 2000). Příkladem serinových proteáz jsou Katepsin A a G.

Katepsin A je multifunkční lysozomální enzym, jehož aktivita je závislá na pH podmínkách. V kyselém prostředí reaguje s karboxypeptidázovými vazbami, zatím co v neutrálním prostředí působí deaminázovou a esterázovou aktivitou. Katepsin A se v nativním stavu vyskytuje ve formě dimeru (98 kDa). Společně s lysozomálními hydrolázami tvoří dimery, které tímto stabilizuje (Rawlings, 2013).

Druhým příkladem serinových katepsinů je monomerní glykoprotein (28kDa) katepsin G. Katepsin G je endopeptidáza, která se vyskytuje v azurofilních granulích neutrofilů a účastní se tak zánětlivé odpovědi v obraně proti cizím patogenům. Optimální podmínky pro působení katepsinu G byly stanoveny na pH 8 (Horn, 2014). Společně s katepsinem G se účastní zánětlivé odpovědi též serinová proteáza - chymáza. Ta je produkována žírnými buňkami a společně s katepsinem G působí jako silné chemoatraktanty pro neutrofile, čímž napomáhají neutrofilům k jejich infiltraci do místa zánětu. Ta se makroskopicky projevuje jako otok postižené tkáně (Chmelař, 2011).

Serpiny ovlivňují funkci serinových proteáz (serine protease inhibitor). Inhibiční schopnost serpinů je zprostředkována specifickou doménou, díky které působí jako významný inhibitor zánětlivé odpovědi (Beinrohr, 2007). Po vytvoření komplexu inhibitor-proteáza je zabráněno aktivaci C4 složky komplementu a tím i aktivaci celé proteolytické kaskády (Kuby, 2013). Inhibitory serinových proteáz přítomné ve slinách klíšťat plní imunomodulační funkci hostitelské imunity v průběhu a tím klíště chrání v průběhu sání. (Mulenga, 2007).

V roce 2011 byl ve slinách klíštěte *I. ricinus* identifikován serpin pojmenovaný IRS-2 (*Ixodes ricinus* serpin 2), který specificky inhibuje účinky již zmíněných proteáz - katepsinu G a chymázy, které jsou produkovány aktivovanými neutrofilemi (katepsin G) a žírnými buňkami (chymáza). Serpin IRS-2 zamezuje trombinem a katepsinem G indukované agregaci trombocytů a tlumí funkci dendritických buněk. Dendritické buňky jsou tak zbaveny schopnosti prezentovat antigen T-lymfocytům (Páleníková et al., 2015). Dále působením IRS-2 serpinu dochází k útlumu infiltrace neutrofilů do místa zánětu a snížení otoku postižené tkáně (Chmelař, 2011).

Další charakterizovaný serpin nalezený ve slinách klíštěte obecného byl pojmenován Iris (*Ixodes ricinus* imunosupresor). Iris dokáže ovlivnit hostitelskou imunitní odpověď na přisáté klíště na úrovni homeostázy i buněčné imunity. Primárně je cílený proti

elastáze leukocytů. Dále svou funkcí ovlivňuje aktivaci koagulační kaskády, fibrinolýzu a adhezi trombocytů (Prevot, 2007). V rámci nespecifické i specifické imunity omezuje imunitní odpověď makrofágů a T-lymfocytů. Samotnou inhibicí Th2 lymfocytární odpovědi zamezuje vzniku zánětlivých cytokinů, které jsou pro průběh zánětu esenciální (Leboule, 2002).

Výše zmíněné serpiny obsažené ve slinách klíštěte obecného mají schopnost modulace hostitelské imunity. Vytvořením protilátek vůči těmto serpinům by mohlo dojít ke zhoršení podmínek klíštěti pro sání hostitelské krve.

1.5. Monoklonální protilátky (MAbs)

Monoklonální protilátky jsou produkované pouze jedním hybridovým klonem. Hybridomy vznikají buněčnou fúzí B-lymfocytů s buněčnou nádorovou linií. V průběhu buněčné fúze (hybridizace) dochází k záměně genů kódujících konstantní řetězce B-lymfocytů, zatímco geny kódující variabilní oblast zůstávají stejné. Výsledkem jsou tak hybridomové buňky, které jsou schopny neomezeně růst za stálé produkce protilátek, které jsou velmi specifické vůči konkrétním antigenním epitopům (Campbell, 1991).

I přesto, že je jejich výroba značně finančně náročná, už po více než dvě desítky let jsou monoklonální protilátky využívány v řadě vědeckých oborů od botaniky přes genetiku a molekulární biologii až po medicínu (embriologie, endokrinologie, enzymatologie, hematologie, neurobiologie) (Goding, 1996). Kvůli své jedinečné antigenní specifitě jsou v dnešní době monoklonální protilátky stále více využívány ve vědeckém výzkumu i medicíně – diagnostika, léčba (Wilson, 2009).

1.5.1. Historie

V roce 1975 byl objevený způsob výroby monoklonálních protilátek Georgem Köhlerem a Caeserem Milsteinem, kteří provedli úspěšnou fúzi B lymfocytů s buňkami myelomové linie. Skrz buněčnou fúzi tak získali buněčné hybridomy, které mohly díky současné přítomnosti genů lehkých a těžkých řetězců B-lymfocytů pro produkci protilátek a nádorových buněk neomezeně růst za stálé produkce protilátek (Shepherd, 2000).

Pomocí vývoje hybridomových linií byla definována i genetická podstata antigenní variability protilátek. Byly odhaleny geny kódující lehké a těžké řetězce, díky kterým mohly být protilátky připravovány pomocí rekombinantních DNA technologií. V roce 1997 bylo poprvé schváleno užití imunoterapie v klinické praxi (americkým Úřadem pro kontrolu

potravin a léčiv) pro léčbu lidských B-lymfomů. V dnešní době se léčba monoklonálními protilátkami stále rozšiřuje na další nádory (kolorekta, prsou a dalších) i jiná nenádorová onemocnění (Cwiertka, 2004).

1.5.2. Použití v medicíně

Monoklonální protilátky jsou využívány k diagnóze a léčbě řady onemocnění. Dodnes byly monoklonální protilátky využity například pro detekci povrchových antigenů cytomegaloviru, viru *Varicella zoster*, gram-negativní bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* a gram-pozitivní bakterie *Clostridium difficile*. Dále jsou využívány k detekci tumorových markerů přítomných při infarktu myokardu, nádorovém bujení a terapii nádorových, či autoimunitních chorob. V neposlední řadě jsou monoklonální protilátky využívány v rámci těhotenských testů a testování na přítomnost návykových látek (Waldman, 1991).

V terapii plní monoklonální protilátky imunomodulační funkci. Specificky se váží na povrchové receptory T-lymfocytů a antigen prezentujících buněk, čímž ovlivňují jejich funkci v zánětlivé odpovědi, a to včetně produkce zánětlivých cytokinů (TNF- α , INF- γ , IL-2).

Monoklonální protilátka se naváže na místo LFA-1 receptoru Th lymfocytů, či ICAM-1 partnerského receptoru LFA-1, který je vlastní antigen prezentujícím buňkám. Může tak ovlivnit infiltraci neutrofilů do místa zánětu a omezit tak lokální poškození tkáně například u reperfučního poškození myokardu či bakteriální meningitidy (Waldman, 1991).

Monoklonální protilátky mohou být dále cíleny i proti CD4⁺ membránovým receptorům Th lymfocytů, například v případě terapie HIV pozitivních pacientů. HIV virus napadá CD4⁺ membránový receptor Th lymfocytů a neutralizuje tak jejich funkci produkce cytokinů a aktivaci B-lymfocytů. Navázáním monoklonálních protilátek na CD4⁺ receptor je sníženo riziko napadení Th buněk HIV virem (Musich, 2017). Bylo také zjištěno, že monoklonální protilátky v séru HIV pozitivního pacienta mohou zvyšovat buněčnou cytotoxicitu NK buněk závislou na protilátkách, a způsobit tak lýzu virových částic, které jsou odolné vůči působení NK buněk aktivovaných INF- α (Tomescu, 2017).

Příznivý efekt působení monoklonálních protilátek byl zaznamenán i v rámci léčby autoimunitního onemocnění - revmatoidní artritidy. Při revmatoidní artritidě dochází k infiltraci měkkých tkání (kloubů) zánětlivými buňkami: makrofágy, plasmocyty, žírnými buňkami, T a B lymfocyty a následné produkci příslušných cytokinů (IL-1, IL-2, TNF- α ,

TNF- β , TGF- β , INF- γ , GM-CSF, a dalších). Jako bezpečná a dobře toletovaná léčba revmatoidní artritidy byla označena léčba pomocí monoklonální protilátky cílené proti TNF- α (anti-TNF- α), kde bylo pozorováno snížení CRP proteinu a IL-6 (Elliot, 1993; Martelli, 2016). Anti-TNF- α protilátka je komerčně vyráběna (Infliximab) a úspěšně aplikována i v léčbě ulcerózní kolitidy či Crohnovy choroby (Nishida, 2017). Dalším příkladem autoimunitního onemocnění léčeného monoklonálními protilátkami je lupus erythematosus, kdy je monoklonální protilátka cílena proti IL-6, čímž je blokována diferenciace B-lymfocytů, a tím i jejich produkce autoproti látek (Wallace, 2017).

Příkladem léčby nádorových onemocnění pomocí monoklonálních protilátek je chronická lymfatická leukémie (CLL), při níž dochází k proliferaci a akumulaci B-lymfocytů s charakteristickým fenotypem (Adam, 2008). Monoklonální protilátka mířená proti povrchovým receptorům těchto pozměněných B-lymfocytů, daratumumab, je cílená proti membránovému receptoru CD38⁺. Monoklonální protilátka specificky rozpozná pozměněnou buňku a svým navázáním vyvolá buněčnou cytotoxicitu zprostředkovanou protilátkami (ADCC), dále protilátkami zprostředkovanou buněčnou fagocytózu za účasti makrofágů (ADCP) a komplement dependentní cytotoxicitu (CDC), čímž jsou nežádoucí B-lymfocyty zlikvidovány (Matas-Céspedes, 2016). Dalším nádorovým onemocněním, které může být léčeno pomocí monoklonálních protilátek je metastatický kolorektální karcinom (Tol, 2010).

Monoklonální protilátky jsou využívány v posttransplantační terapii. Terapeutika jsou zpravidla podávána 6 měsíců po uskutečnění transplantace za účelem snížení rizika akutní rejekce štěpu (aloimunní i autoimunní) (Breedvelt, 2000). V dnešní době je v posttransplantační léčbě ledvin užíván antithymocytární globulin (rATG, T lymphocyte-depleting rabbit-derived antithymocyte globulin), nazývaný basiliximab, a antagonist IL-2 (daclizumab). Bylo zjištěno, že basiliximab je až o 50 % účinnější v posttransplantační léčbě ledvin než daclizumab, který je v Evropě běžnější (Hellemans, 2016). IL-2 receptor je prezentovaný na aktivovaných T-lymfocytech. Vazbou protilátky cílené proti IL-2 je zamezena funkce aktivovaných T-lymfocytů v reakci proti přítomným aloantigenům (Vincenti, 1998, Hill, 2017).

Nevýhodou monoklonálních protilátek je, že mohou být samy o sobě imunogenní. V reakci na terapii monoklonálními látkami byla pozorována IgE hypersenzibilita, kdy byly monoklonální protilátky rozpoznány imunitním systémem pacienta jako xenogenní. V závislosti na tom byly aktivovány B-lymfocyty, které produkovaly specifické IgE protilátky. Klinicky byla přecitlivělost pozorována jako anafylaktický šok. Závažnost

hypersenzibilní reakce může probíhat lehkou i smrtelnou formou. Kromě IgE hypersenzitivity byla pozorována i hypersenzitivita zprostředkovaná zánětlivými mediátory, které byly uvolněny z aktivovaných žírných buněk. Klinické následky takové hypersenzitivity jsou mírnější a lze je utlumit přerušáním infuze MAbs a případným podáním antihistaminik (Maggy, 2014; Picard, 2016).

Hypersenzitivita byla pozorována u protilátek myších, chimérických i lidských. U chimérických protilátek dochází ke spuštění hypersenzitivity v reakci na nehumanizovanou složku monoklonální protilátky (například myší). Příklady chimérických a lidských protilátek jsou uvedeny v Tabulce III. Příkladem u podání monoklonální protilátky natalizumab byla pozorována hypersenzitivní reakce u 9 % léčených pacientů. V případě adalimumab protilátky až u 5 %. Reakce imunitního systému jsou ovšem přísně individuální, proto je každá léčba sestavována s ohledem na konkrétního pacienta (Maggy, 2014; Picard, 2016).

V následující Tabulce III jsou vypsané komerčně vyráběné účinné látky registrované od 1. října 2008 v České republice, které jsou využívány ve zdravotnictví včetně udaných citací zdrojů.

Tabulka III: Komerčně vyráběné monoklonální protilátky registrované pro klinické účely v České republice od 1. října 2008.

Název	Výrobce	Typ Ab	Cílový Ag	Příklad léčby	Aplikace	Citace
adalimumab	Humira	humánní IgG	TNF α	Crohnova nemoc, lupénka	s. c.	(Karmiris, 2009)
alemtuzumab	Mab-Campath	Humani-zovaná IgG	CD52	CCL	i.v.	(Boothroyd, 2004)
basiliximab	Simulect	Chimé-rická IgG	CD25 (α -pod-jednotka IL-2)	Transplan-tace (játra, ledviny)	i.v.	(Taylor, 2003)
daklizumab	Zenapax	Humani-zovaná IgG1	CD25 (α -pod-jednotka IL-2)	roztroušená skleróza	s. c.	(Bielekove, 2004; Milo, 2014)
ekulizumab	Soliris	Humani-zovaná IgG	C5 složka komple-mentu	Paroxy-somální noční hemo-globinurie, alogenní transplan-tace hematopoet. kmenových buněk	i.v.	(Goker, 2011; Perić, 2011)
efalizumab	Raptiva	Humani-zovaná IgG	CD11a, LFA-1	chronická lupénka	s. c.	(Gordon, 2003)
infliximab	Remi-cade	Chiméri-cká IgG	TNF α	Crohnova nem. u dětí, ulceróz. kolitida, lupénka, revmatoidní artritida	i.v.	(Keane, 2001)
natalizumab	Tysabri	Humani-zovaná IgG	α_4 -integrin	roztroušená skleróza, Crohnova choroba	i.v.	(Polman, 2006; Van Assche, 2005)
rituximab	Mab-Thera	Chiméri-cká IgG	CD20	B-buněčná leukémie	i.v.	(Coffier, 2002)

1.5.3. Monoklonální protilátky ve výzkumu klíšťat

Monoklonální protilátky jsou kvůli své schopnosti specifické vazby využívány k detekci a kvantifikaci nejrůznějších povrchových antigenů. Ve výzkumu klíšťat jsou využívány pro studium přenášených virů, bakterií, risketsií a komponent, které pomáhají klíšťeti v sání a tím i přenosu patogenů.

Specifickou vazbou protilátky na povrchový antigen virů či bakterií dochází k omezení jejich patogenní schopnosti. Monoklonální protilátky jsou schopné neutralizovat také aktivitu přenášených virů, příkladem flavivirů. Flaviviry jsou malé (500 Å) jednořetězcové RNA viry, které u člověka způsobují onemocnění, jako jsou například klíšťová encefalitida nebo omská hemoragická horečka (Lasala, 2010). U flavivirů byly nalezeny 3 druhy strukturálních proteinů: jaderný nukleokapsidový protein C, transmembránový protein M a hlavní povrchový protein E. Hlavní povrchový protein E je považován za vazebný mediátorový receptor, který je zodpovědný za vazbu viru na cílovou buňku a následnou buněčnou fúzi (Rey, 1995). Specifickou vazbou IgM monoklonálních protilátek na protein M je možné virus neutralizovat a omezit tak možnost infekce buněk. U IgM monoklonálních protilátek byla pozorována jak schopnost neutralizace viru, tak i schopnost inhibice virové hemaglutinační aktivity (Heinz, 1984).

Příkladem vlivu monoklonálních protilátek na aktivitu rickettsií je zde uveden vliv na *Rickettsia rickettsii*. Rozeznáním nativních povrchových antigenů C *Rickettsia rickettsii* monoklonální protilátkou byla snížena úmrtnost imunizovaných myší nakažených touto rickettsií, na základě neutralizace patogenního účinku (Anacker, 1986). Dalším příkladem klíšťaty přenášenou rickettsií je *Anaplasma marginale* vyskytující se v tropických a subtropických oblastech (Kocan, 2003). Přečištěný rekombinantní membránový protein VirB9-1, připravený v E-coli, byl shledán jako velice imunogenní a v současné době je využívám k vývoji nanovakcíny v kombinaci s nanočásticemi oxidu křemičitého v roli adjuvans (Zhao, 2017).

Vazbou monoklonálních protilátek je tedy možné ovlivnit funkci daného elementu i samotného proteinu. Užitím monoklonálních protilátek je možné způsobit vazbu pouze do jednoho aktivního místa a neutralizovat tím příslušnou funkci proteinu. Obsahuje-li protein více aktivních míst, je možné je za použití MAbs detekovat a přiřadit tak funkci proteinu.

Kromě výzkumu ovlivnění aktivity přenášených patogenů jsou monoklonální protilátky využívány ke studiu imunoaktivních komponent, které jsou nedílnou sloučástí slin klíšťat a hrají klíčovou roli v procesu sání klíštěte (inhibitory proteáz). Svou specifickou vazbou MAbs do aktivního místa cílového proteinu dochází k ovlivnění proteinové funkce či jeho úplné deaktivaci. Výhodou monoklonálních protilátek je jejich schopnost vázat se pouze do jednoho aktivního místa. Tedy pokud protein obsahuje více aktivních míst, dojde k deaktivaci pouze příslušné funkce. Tímto způsobem jsou dnes zkoumány funkčnost a dynamika inhibitorů proteáz ve slinách klíštěte in vitro a na buněčných kulturách.

2. Cíle práce

1. Vyrobit monoklonální protilátky proti rekombinantním proteinům G16, IRS-2 a S8K. jejichž přítomnost ve slinách a orgánech *Ixodes ricinus* je předpokládána.
2. Ověřit přítomnost daných proteinů ve tkáních klíštěte *Ixodes ricinus* pomocí metody Western blot.
3. Ověřit přítomnost a zjistit koncentraci daných proteinů ve tkáních *Ixodes ricinus* pomocí metody Western blot.

3. Materiály a metody

3.1. Materiály (chemikálie, kity)

Tabulka IV: Chemické složení kultivačního média média pro kultivaci buněk

RPMI-1640 médium	2.05 mM L-glutamin •25mM HEPES	Biosera LM-R1634/500
10 % BOFES	bovinní fetální sérum	Sigma-Aldrich MFCD00132239
1% Antibiotika a antimykotika	PNC, SMC, fungison	-
1% ME	2-merkptoethanol	Sigma 60-24-2
1% GL	glutathione	Sigma-Aldrich 1729812
+ 2% HT v kultivačním médiu	hypoxantin a thymidin	Sigma H0137

Tabulka V: Buněčná fúze

RPMI-1640 médium	2.05 mM L-glutamin •25mM HEPES	biosera LM-R1634/500
Fúzní roztok PEG 1500	polyethylenglykol	Sigma-Aldrich 25322-68-3
2% HAT v RPMI médiu	hypoxanthin-aminopterin- thymidin	Sigma H0262
ME	2-merkptoethanol	Sigma 60-24-2
BOFES	bovinní fetální sérum	Sigma-Aldrich MFCD00132239

Tabulka VI: Imunizace myši

Kompletní FA	Freundovo adjuvans	
Nekompletní FA	Freundovo adjuvans	
PBS	dH ₂ O • 1,37 M NaCl • 100mM Na ₂ HPO ₄ • 12 H ₂ O • 18 mM KH ₂ PO ₄ • 27 mM KCl pH = 7,2	Vlastní výroba
Rekombinantní protein G16 IRS-2, S8K		Vlastní výroba

Tabulka VII: Zamrazování buněk

Kultivační médium	2.05 mM L-glutamin •25mM HEPES	Biosera LM-R1634/500
DMSO	10% O-dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich 67-68-5

Tabulka VIII: Odběr slin klíšťat

20% Etanol		
70% Pilokarpin		

Tabulka IX: ELISA

Fosfátový pufr PBS	dH ₂ O • 1,37 M NaCl • 100mM Na ₂ HPO ₄ • 12 H ₂ O • 18 mM KH ₂ PO ₄ • 27 mM KCl pH = 7,2	Vlastní výroba
2% PTS (Tris-buffered saline) v PBS	0,05 M Tris base • 0,15M NaCl • dH ₂ O pH 7,65	Vlastní výroba
0,05M Uhličitanový pufr	H ₂ O • 14 mM Na ₂ CO ₃ • 35 mM NaHCO ₃ • pH 9,6	Vlastní výroba
Blokovací pufr	5% roztok PTS v PBS	Vlastní výroba
TWEEN	Polyethylen glycol sorbitan monooleát	Sigma-Aldrich 9005-64-5
T-PBS	PBS + 0,1% Tween	Vlastní výroba
Fosfocitrátový pufr		Vlastní výroba
Substrátový roztok	5ml fosfocitrátového pufru, 2 mg OPD a 2 µl 30% peroxidu vodíku	Vlastní výroba
10% OPD	O-phenylenediamin	ThermoFischer Scientific 002003
30% Peroxid vodíku	-	-
2M Kyselina sírová	-	-
Sekundární protilátka ELISA	Králíčí/koňská polyklonální peroxidázou značená IgG (H+L) protilátka	Sigma-Aldrich A 6917

Tabulka X: Western blot

TRIS-Cl/SDS	pH 8,8: 1,5 M TRIS + 0,4% SDS) • pH 6,8: 0,05 M TRIS + 0,4% SDS	Vlastní výroba
40% Bisakrylamid		
TEMED (C ₆ H ₁₆ N ₂)	Tetramethyl-ethylendiamin	Serva 110-18-9
10% APS v MiliQ H ₂ O	Persulfát amonný	Sigma-Aldrich 7727-54-0
ELFO pufr	125 mM TRIS + 960 mM Glycin + 17mM SDS + H ₂ O	
Marker	proteiny o dané velikosti barevně značené	
Transfer pufr 10x	256 mM Tris + 1,92 M Glycin + 17 mM SDS + dH ₂ O	
T-TBS	TBS + 0,1% Tween	
5% Odtuč. sušené mléko v PTS		Simandl
Sekundární protilátky WB	Biotinylovaná kozí protikrálíčí IgG protilátka	BA-1000
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Detekční roztoky	Thermo Scientific - 32209

Tabulka XI: Stanovení koncentrace proteinů v orgánech klišťat

Pierce BCA Protein Assay Kit		ThermoFisher Scientific 23225
BCA reagent A	Na ₂ CO ₃ • NaHCO ₃ • BCA • vinan sodný • 0.1M NaOH	
BCA reagent B	4% síran měďnatý	
Albumin Standard	3M hovězí sérový albumin • 0.9% NaCl • 0.05% NaN ₃	
PBS	dH ₂ O • 1,37 M NaCl • 100mM Na ₂ HPO ₄ •12 H ₂ O • 18 mM KH ₂ PO ₄ • 27 mM KCl pH = 7,2	

3.2. Metody

3.2.1. Imunizace myší

Každým proteinem (S8K, IRS-2, G16) jsem imunizovala dvě myši BALB/c, celkem šest myší. Každá myš byla podrobena třem fázím imunizace v časovém rozmezí dvou týdnů. Aplikovanou dávku jsem vždy injikovala do peritoneální dutiny. První imunizační dávku jsem připravila smícháním 10 µg proteinu a 100 µl PBS se 100 µl kompletního Freundova adjuvans. Druhou imunizační dávku jsem připravila obdobně, ovšem s rozdílem přídatku 100 µl nekompletního Freundova adjuvans. Po dvou týdnech od druhé imunizace jsem myším odebrala krev z ocasní žíly v oblasti prvních ocasních obratlů. Odebranou krev jsem nechala 20 minut odstát při pokojové teplotě. Během této doby došlo k vysrážení krve a oddělení krevních elementů od plasmy. Vysráženou krev jsem následně uložila k centrifugaci při 2000 g po dobu 5 minut při teplotě 4 °C. Získané sérum jsem otestovala na přítomnost protilátek vůči aplikovanému proteinu (ELISA) a posléze uložila do lednice pro případné potřeby další analýzy. Myš, v jejímž séru jsem naměřila vyšší množství protilátek, jsem imunizovala třetí imunizační dávkou, kterou jsem připravila totožně s druhou dávkou. Po třech dnech od poslední imunizace byly myši připravené k dalšímu postupu.

3.2.2. Izolace myší sleziny a odběr krve

Myš jsem uspala pomocí diethyletheru ve skleněné nádobě. Uspanou myš jsem vyjmula z nádoby a přišpendlila na pitvací desku. Pro udržení myši v umělém spánku jsem použila buničinu navlhčenou diethyetherem. Myši jsem následně nastříhla srdeční tepnu, kde je tlak krve nejvyšší, a vytékající krev jsem odjímal do připravené 1,5 ml zkumavky.

Vysráženou krev jsem zcentrifugovala při 2000 g po dobu 5 minut při teplotě 4 °C. Myší sérum oddělené od plné krve jsem uložila do lednice pro případ potřeby další analýzy. Ihned po odběru krve byla myš usmrcena zlomením vazů. Z mrtvé myši byla vyjmuta slezina do 6 ml RPMI média bez séra.

3.2.3. Buněčná fúze pro přípravu monoklonálních protilátek

Myší slezinu jsem propasírovala pístem stříkačky přes sítko (70 µm) do petriho misky, kdy jsem sítko postupně promývala médiem RPMI bez séra. Získané splenocyty v misce jsem odebrala do 50 ml zkumavky připravené k následnému dvojímu promývání médiem bez séra (centrifugace 280 g po dobu 5 minut při teplotě 4 °C.). Tímto jsem připravila slezinné buňky pro fúzi s nádorovými buňkami.

Myelomové buňky SP-2 jsem sklídila v logaritmické fázi růstu, přičemž jsem jim den předem vyměnila médium. Buňky jsem promyla obdobným způsobem jako myelomové buňky a následně jsem je smíchala se splenocyty. Zkumavku se směsí buněk jsem ponořila do vodní lázně o teplotě 37 °C. K buňkám ve zkumavce jsem postupně přikapávala 1 ml vytemperovaného (37 °C) roztoku PEG 1500 po dobu 1 minuty. Směs byla po celou dobu manuálně míchána, poté ještě minutu po vypršení časového intervalu pro přikapávání PEG 1500. Následně jsem ke směsi přikapávala 10 ml RPMI média bez séra po dobu 10 minut. V této fázi docházelo k narušení buněčných membrán nádorové linie i splenocytů, čímž byly vytvořeny podmínky pro následnou fúzi. Takto připravenou směs buněk jsem opět zcentrifugovala a rozmíchala ve 200 ml kultivačního RPMI média s přidavkem HAT a po 200 µl nanasla do kultivačních jamek 96 jamkového panelu. Po třech dnech byly pod mikroskopem viditelné drobné kolonie. Po deseti dnech inkubace od uskutečnění fúze jsem otestovala obsah přítomných protilátek v RPMI médiu vyprodukovaných hybridomů v jamkách s viditelnými koloniemi. Hybridomy, které jsem vyhodnotila jako úspěšně produkující protilátky, jsem zamrazila pro uchování zálohy buněk v případě potřeby použití.

3.2.4. Ředění buněk pro přípravu monoklonálních protilátek

Za účelem získání kolonie vzniklé z jediné hybridomové buňky bylo potřeba danou směs buněk naředit tak, aby se na mikrotitračním panelu vyskytovala v každé jamce pouze jedna buňka. Toto ředění jsem provedla následujícím postupem:

Buňky jsem obarvila pomocí methylové modře v poměru 1:10. Obarvené buňky jsem spočítala v Bürkerově komůrce. Bürkerova komůrka je rozdělena na čtyři velké čtverce, kde se každý z nich skládá z dalších čtyř čtverců. Celkem tedy je možné pozorovat

16 malých čtverců. Spočítala jsem buňky ve všech šestnácti čtvercích a výsledný počet buněk dosadila za hodnotu x do vzorce $((x:4) \cdot 10000) \cdot 10$, kde hodnota 10 000 vyjadřuje počet buněk na mililitr a hodnotou 10 je určeno ředění buněk v methylové modři. Tímto výpočtem jsem zjistila počet buněk na 1 ml v daném roztoku s hybridomy. Následně jsem vypočítala objem roztoků obsahujících 5 buněk na 1 ml a 25 buněk na 1 ml v celkovém množství 15 ml. Patnáctimililitrový objem jsem poté nanesla po 200 μ l do jamek mikrotitračního panelu. Takto připravené panely jsem uložila ke kultivaci (37 °C) na dobu tří dnů. Po ukončení doby kultivace jsem pod mikroskopem vyhodnotila jamky, které obsahovaly pouze jednu kolonii a média z příslušných jamek jsem otestovala na přítomnost protilátek (ELISA). Klony, které jsem vyhodnotila jako úspěšné v produkci protilátek, jsem následně přepasážovala do větších jamek nejprve s objemem 2 ml RPMI média a posléze 5 ml RPMI média, kde mohly dále růst a vyrábět stále více protilátek. V konečném stádiu jsem buňky schopné produkovat protilátky přepasážovala do 15 ml RPMI média v kultivační lahvičce. Po nárůstu kolonie jsem část média s buňkami sklidila a buňky zamrazila pro uchování zálohy buněk. Po zamrazení buněk jsem odebrala zbylé médium s buňkami do 50 ml zkumavky a zcentrifugovala jej při 250 g po dobu 5 minut. Supernatant jsem slila do čisté 50 ml zkumavky. Později jsem médium s protilátkami přečistila.

3.2.5. Zamrazování a rozmrazování buněk

Zamrazování a rozmrazování buněk je důležité pro případ potřeby replikace pokusu či využití hybridomů nebo klonů v budoucnu. Veškerá práce s buňkami probíhala ve sterilním boxu.

Buňky jednoho hybridomu i klonu jsem zamrazovala následujícím způsobem: Buňky v jamce či kultivační lahvičce jsem oddělila ode dna proudem stávajícího kultivačního média a přenesla je pomocí kapátka do 15 ml zkumavky určené pro centrifugaci. Zkumavku obsahující RPMI médium se směsí buněk jsem poté centrifugovala (250 g, 4°C, 5 min.). Ze zkumavky jsem odstranila veškerý supernatant a usazený pelet jsem rozsuspendovala v 900 μ l RPMI média. Tento objem RPMI média s buňkami jsem přepipetovala do předem popsané kryozkumavky a přidala 100 μ l 10% DMSO. Zkumavku jsem uzavřela a několikrát ji lehce převrátila dnem vzhůru, abych její obsah promíchala. Kryozkumavku jsem před vložením do tekutého dusíku umístila do mrazicího boxu (-70 °C) na dobu 3 hodin.

K rozmrazení zamražených buněk v jedné kryozkumavce jsem si připravila 15 ml zkumavku s obsahem 5 ml RPMI média s HT. Zmrzlý vzorek jsem 1 min držela

mezi dlaněmi, abych tak snížila teplotní šok pro buňky. Následně jsem kryozkumavku vložila do vodní lázně (37°C). V okamžiku, kdy jsem v kryozkumavce pozorovala pouze malý kousek ledu, vyjmula jsem ji z vodní lázně a zbylý led rozsuspendovala pomocí kapátka ve sterilním boxu těsně před přenesením do připravené 15 ml zkumavky s 5 ml RPMI média s HT. Zkumavky jsem centrifugovala (250 g, 5 minut, 4°C). Po uplynulé době centrifugace jsem ze zkumavky odstranila supernatant a usazený pelet rozmíchala v 1 ml RPMI média s HT. Novou suspenzi jsem přenesla do jamky 24 jamkového panelu a uložila ke kultivaci. Po třech dnech kultivace jsem otestovala RPMI médium s HT na přítomnost buňkami vyprodukovaných protilátek.

3.2.6. Pročištění supernatantu obsahujícího protilátky

Protilátky přítomné v médiu jsem po oddělení peletu buněk pročistila pomocí komerčně vyráběného kitu Montage Antibody Purification Kit with PROSEP-A media (EMD Millipore).

Principem pročištění protilátek od nežádoucích molekul obsažených v médiu je navázání protilátek na kolonku a následně jejich postupné odmytí.

Kolonku jsem vložila do 50 ml centrifugační zkumavky. V prvním kroku jsem kolonku promyla 10 ml vazebného roztoku Binding Buffer A (dále jen BBA) centrifugací 500 g po dobu 5 minut. Na promytou kolonku jsem nanesla vzorek, který jsem před samotnou aplikací přefiltrovala přes mikrobiální filtr o velikosti pórů 0,22 µm. Tím byly ze vzorku vychytány větší částice (zbytky buněčných membrán atp). Zde jsem k 10 ml vzorku přidávala 10 ml roztoku BBA a tento roztok jsem následně centrifugovala po dobu 20 minut při 100 g. V tomto kroku docházelo k vychytání protilátek na kolonku. Velká část přebytečných molekul byla tak ze vzorku odmyta. Kolonku jsem pak následně promyla dvaceti mililitry roztoku BBA, aby mohly být z kolonky vymyty i zbylé kontaminanty. Zkumavka s kolonkou byla centrifugována při 500 g po dobu pěti minut.

K samotnému vymývání protilátek z kolonky jsem použila Elution Buffer B1 (dále jen EBB1), Elution Buffer B2 (dále jen EBB2) a Neutralization Buffer C (dále jen NBC). Do spodní části zkumavky jsem nanesla 0,5 ml NBC, který posléze dodal profiltrovanému roztoku neutrální pH, aby nedošlo k poškození struktury a funkce protilátek. Na kolonku jsem nanesla 10 ml EBB1, a takto připravenou zkumavku jsem centrifugovala 5 minut při 500 g. Tímto krokem došlo k vyvázání IgG protilátek z kolonky, a proto byl vzorek uchován pro další analýzu.

V druhém kroku jsem do spodní části zkumavky napipetovala 1,3 ml NBC, který po přefiltrování vzorku plnil stejnou funkci jako v předchozím případě. Na kolonku jsem nanesla 10 ml EBB2 a centrifugovala při 500 g po dobu 5 minut. Tento vzorek jsem následně koncentrovala (viz níže).

3.2.7. Koncentrování protilátek

Z důvodu nízké koncentrace protilátek v supernatantu bylo nutné protilátky koncentrovat, aby byly v následujících testech použitelné. Koncentrování probíhalo pomocí ultrafiltrace přes 10 000 Da filtr, na který jsem aplikovala 15 ml vzorku. Pokud bylo vzorku méně než 15 ml, byl objem doplněn do 15 ml roztokem PBS. Zkumavky s filtry jsem centrifugovala celkem třikrát při 4000 g po dobu 5 minut. Úbytek vrchního objemu jsem mezi jednotlivými centrifugacemi doplňovala roztokem PBS - celkem třikrát. Centrifugaci jsem ukončila v okamžiku, kdy ve filtru zůstal objem 1-1,5 ml supernatantu. Následně jsem uvolnila usazené protilátky na stěnách filtru a přenesla je do 0,5 ml zkumavek po 200 μ l. Popsané zkumavky jsem uchovala pro další použití při 4 °C.

3.2.8. ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Na 96 jamkový mikrotitrační panel jsem nakoutovala rekombinantní protein, vůči kterému jsem protilátky testovala. Roztok s proteinem měl koncentraci 10 μ g/ml v uhličitanovém pufru. Na každou jamku spadal objem 50 μ l. Nakoutované jamky byly následně inkubovány po dobu 24 hodin ve vlhké komůrce při teplotě 4 °C.

Po ukončení doby inkubace jsem panel vysušila poklepem na filtrační papír a vyblokovala nespecifické vazby blokovacím pufrům (5% roztok PTS v PBS), vždy po 200 μ l na jamku. Jamky s naneseným blokovacím pufrům jsem ve vlhké komůrce uložila k inkubaci při 37 °C po dobu 45 minut. Po ukončení inkubace jsem jamky promyla roztokem PBS-T.

Po promytí jsem aplikovala testované vzorky (supernatanty) s předpokládanou afinitou k nakoutovanému rekombinantnímu proteinu. Pro vyšší přesnost hodnocení přítomnosti protilátek ve vzorku jsem každý vzorek v řádku rozředila dvojkovou řadou v roztoku PBS. Pro vyvarování se kontaminaci vzorků jsem aplikaci primárních protilátek prováděna ve sterilním boxu. Jamky s nanesenými vzorky jsem inkubovala po dobu 45 minut při teplotě 37 °C. Po ukončení inkubace jsem jamky promyla roztokem PBS-T.

K označení primárních protilátek jsem použila sekundární anti-myší protilátku značenou peroxidázou (Sigma), ředěnou v 2% roztoku PTS v PBS v poměru 1:1000. Do každé jamky jsem takto připravený roztok s protilátkou aplikovala po 100 μ l objemu. Jamky

s nanesenými sekundárními protilátkami jsem inkubovala po dobu 45 minut při teplotě 37°C. Po ukončení doby inkubace jsem jamky promyla roztokem PBS-T.

Následně jsem vyvolala enzymatickou reakci pomocí 100 µl substrátového roztoku. Ten jsem nechala působit 10 minut, poté jsem reakci zastavila pomocí 100 µl 2M H₂SO₄.

Intenzitu zbarvení jsem změřila pomocí spektrofotometru (Synergy H1, BioTek) při vlnové délce 490 nm.

3.2.9. Stanovení titrů protilátek

Abych pro budoucí pokusy mohla aplikovat co nejmenší množství protilátek, které ale bude stále efektivní, stanovila jsem u každé vyrobené monoklonální protilátky její vlastní titr, neboli takové množství protilátky, které odpovídá dvojnásobné hodnotě absorbance měřené při vlnové délce 490 nm přiřazené kontroly (2% PTS v PBS). Hodnota stanoveného titru mi udává, kolikrát mohu protilátku naředit před její vlastní aplikací.

Samotný titr protilátek jsem stanovila metodou ELISA, kdy jsem postupovala jako v protokolu ELISA s rozdílem aplikace primárních monoklonálních protilátek. Pro každý klon protilátky jsem nakoutovala 12 jamek mikrotitračního panelu, plus dalších 12 jamek sloužících jako duplikace. Do prvních jamek jsem aplikovala vždy příslušnou 100x naředěnou protilátku, která byla do dalších jamek rozředěna dvojkovou řadou. Po vyhodnocení celého testu a stanovení konečných absorbancí jsem hodnoty porovnávala s kontrolou 2% PTS v PBS, kdy hodnota stanoveného titru se rovnala dvojnásobku měřené kontroly.

3.2.10. Získávání orgánů a slin klíšťat

Sliny jsem získávala z nasátých samic klíštěte *Ixodes ricinus*. Klíšťata sála na králících po dobu až 7 dnů.

Králíkům byla pomocí strojku na holení vyholena srst (cca 5x5 cm) z boční strany křížové oblasti. Na zkrácenou srst byly upevněny molitanové kroužky, na které byla z jedné poloviny přilepena síťka. Vzniklým otvorem byla následně aplikována klíšťata, samci i samice. Pak byla síťka přilepena úplně. Klíšťata byla králíkům odejmuta v konkrétní den sání, nejdéle však sedmý den. Sliny byly klíšťatům odebírány následujícím postupem:

Klíšťata jsem očistila v 70% etanolu a osušila filtračním papírem. Čistá klíšťata jsem přilepila oboustrannou lepící páskou na podložní sklíčko tak, aby byla přilepená pouze zadní část těla a hypostom byl plně přístupný manipulaci. Na hypostom jsem pod binolupou nasazovala každému klíštěti skleněnou kapiláru (10 µl). Kapiláru jsem upevnila do kuličky

plastické hmoty na druhou stranu podložního sklíčka. Na štítek (scutum) každého klíštěte jsem aplikovala 2 μ l 5% pilokarpinu. Pilokarpin dráždí klíště, které následně začne produkovat více slin. Klíšťata s nasazenými kapilárami jsem uložila do inkubátoru (37 °C) na dobu 3 hodin. V průběhu inkubace jsem klíšťata dvakrát zkontrolovala, zda-li kapiláry v průběhu procesu zůstaly správně připevněné. Po ukončení doby kultivace jsem každému klíštěti odebrala kapiláru a získané sliny jsem odebrala pomocí balonku do 1,5 ml zkumavky. Po ukončení byla klíšťata před likvidací usmrcena 0,5% roztoku persterilu. Zkumavku se získanými slinami jsem popsala a uložila do mrazícího boxu (-70 °C).

Z klíšťat jsem vypreparovala střeva (midgut), ovária (OVA) a slinné žlázy (salivary gland, SG). Klíště jsem upevnila na podložní sklíčko pomocí oboustranné lepící pásky. Chirurgickými nůžkami jsem klíště horizontálně rozstříhla po obvodu tak, abych se vyvarovala poškození samotných orgánů. Na „otevřené“ klíště jsem aplikovala 20 μ l roztoku PBS. Orgány tak byly lépe viditelné a mohla jsem s nimi snáze manipulovat. Po odkrytí střev uprostřed těla jsem vypreparovala ovária, poté střeva, a nakonec slinné žlázy, které se nacházely v hlavové části klíštěte. Jednotlivé orgány z klíšťat, v mém případě ze tří, jsem odebrala do 1,5 ml popsaných zkumavek s roztokem PBS. Orgány ve zkumavce jsem pak jedny po druhém mechanicky rozdrtila pomocí plastového pístu. Vzniklou suspenzi jsem pak dále více rozmělnila pomocí ultrazvuku (sonikace). Hotové vzorky jsem uložila do mrazícího boxu (-70 °C).

3.2.11. Stanovení koncentrace proteinů v slinách a orgánech klíšťat pomocí BCA Protein Assay

Ke stanovení koncentrace proteinů ve svých vzorcích, jsem využila komerčně dostupný Pierce BCA Protein Assay Kit.

Princip této metody je následující: Dle koncentrace přítomných peptidických vazeb proteinů v roztoku dochází k redukcí měďnatých iontů na měďné. Koncentrace měďných iontů je tak přímo úměrná koncentraci přítomných proteinů. Na jednu molekulu měďného iontu jsou dále navázány dvě molekuly bicinchonické kyseliny (bicinchoninic acid) za vzniku barevného produktu. Následně jsem změřila míru absorpance světla o vlnové délce 562 nm. Z daných hodnot jsem sestavila kalibrační přímku a k dané hodnotě přiřadila dle manuálu příslušnou koncentraci (viz. Tabulka XII). Daná koncentrace každého BCA vzorku pak odpovídala konkrétní hodnotě absorpance světla měřené při vlnové délce 562 nm.

Tabulka XII: Příprava kalibrační řady pomocí albuminového standardu, dle protokolu přiloženého v Pierce BCA Protein Assay Kit

Roztok	Objem ředícího roztoku [μ l]	Objem vzorku a BSA [μ l]	Konečná koncentrace BSA [μ g/ml]
A	0	300 vzorku	2000
B	125	375 vzorku	1500
C	325	325 vzorku	1000
D	175	175 roztoku A	750
E	325	325 roztoku C	500
F	325	325 roztoku E	250
G	325	325 roztoku F	125
H	400	100 roztoku G	25
I	400	0	0

Na základě výše uvedeného ředění a odpovídajících naměřených absorbcí jsem vytvořila kalibrační křivku (viz. Obr.: 8). Z té jsem dosazením hodnoty x (absorbance mého vzorku) vypočítala hodnotu y, tedy koncentraci daného vzorku. Koncentraci jsem stanovila pro všechny mnou připravené orgánové suspenze (viz. Tabulka XVI).

3.2.12. Detekce proteinů S8K a IRS-2 v slinách a orgánech klíšťat pomocí monoklonálních protilátek metodou ELISA

Na dno jamek mikrotitračního panelu (COSTAR, 96 jamek) jsem nakoutovala suspenzi klíštěcích orgánů, ovárií (OVA), slinných žláz (SG) a střev (MG) a slin (Saliva), o požadované koncentraci (c) 10 μ g/ml, 30 μ g/ml a 100 μ g/ml od každé tkáně. Celkem byla tato kombinace nakoutována třikrát z důvodu použití tří různých předem stanovených titrů (T) každé protilátky, viz. Tabulka XIII.

Tabulka XIII: Schématické znázornění 96 jamkového panelu pro test různých titrů protilátek na různé koncentrace nakoutovaných proteinů orgánových suspenzí klíštěcích vaječníků (OVA), střev (MG), slinných žláz (SG), a slin (Saliva)

Titr	T=100	T=500	T=1000	T=100	T=500	T=1000	T=100	T=500	T=1000
c	10 μ g/ml			30 μ g/ml			100 μ g/ml		
-	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	OVA	OVA	OVA	OVA	OVA	OVA	OVA	OVA	OVA
B	MG	MG	MG	MG	MG	MG	MG	MG	MG
C	SG	SG	SG	SG	SG	SG	SG	SG	SG
D	Saliva	Saliva	Saliva	Saliva	Saliva	Saliva	Saliva	Saliva	Saliva

3.2.13. Western blot (imunoblot)

V prvním kroku jsou proteiny elektroforeticky separovány pomocí SDS-PAGE, kdy jsou zkoumané proteiny rozděleny ve stejnoměrném elektrickém poli na základě své molekulové hmotnosti. Elektroforetické pole je tvořeno polyakrylamidovým gelem s přídavkem dodecylsírany sodného (SDS). Výhodou polyakrylamidového gelu je především jeho inertnost vůči přítomným proteinům a termostabilita. Přítomností aniontového detergentu SDS jsou vyrovnány náboje na separovaných proteinech, čímž je zvýšena pravděpodobnost správné separace bez vlivu náboje daného proteinu.

Příprava gelů pro SDS-PAGE separaci

Gel se stává ze dvou typů gelů – separační a zaostřovací. Zaostřovací gel, umístěný na horní části gelu slouží jako prostředí, kde dochází ke koncentraci proteinů před samotnou separací v prostředí separačního gelu. Separační gel slouží k samotné separaci proteinů v elektrickém poli (má vyšší hustotu).

Tabulka XIV: Příprava separačního a zaostřovacího gelu pro SDS-PAGE elektroforézu

Separační gel	Objem [ml]	Zaostřovací gel	Objem [ml]
40% acylakrylamid	3,75	40% acylakryl amid	0,49
4x SDS pH 8,8	3,75	4x SDS pH 6,8	1,25
H ₂ O	7,5	H ₂ O	3,2
10% APS	0,06	10% APS	0,03
TEMED	0,012	TEMED	0,006

Dle Tabulky XIV jsem 24 hodin před samotnou separací připravila 2 polyakrylamidové gely. Připravený roztok pro separační gel jsem aplikovala mezi skla v sestavené aparatuře a převrstvila jej 1,5 ml isobutylalkoholu. Takto připravený separační gel jsem nechala ztuhnout po dobu 60 minut. Po ztuhnutí separačního gelu jsem isobutylalkohol odstranila filtračním papírem, odmyla zbylé kapky deionizovanou vodou a pomocí filtračního papíru odsála i zbylou tekutinu. Na ztuhlý separační gel jsem nanasla připravený zaostřovací gel.

Připravený zaostřovací gel, dle Tabulky XIV, jsem nanasla po 2 ml na každý z gelů, s opatrností vložila hřebínky do gelu a nechala ztuhnout po dobu 60 minut. Ztuhlé gely jsem uložila do vlhkých ubrousků a nechala je uložené 24 hodin při teplotě 4 °C.

SDS-PAGE

Druhého dne jsem připravené gely očistila od přebytečného polyakrylamidu a odstranila sklíčko na straně bílé destičky (gel je tak plně přístupný elektrickému proudu) a upevnila jej do elektroforetické vaničky. Z vnitřní strany připevněného sklíčka jsem

aplikovala elektroforetický pufr tak, aby byly hřebínky ponořeny. Poté jsem hřebínky vyjmula a doplnila potřebné množství ELFO pufru do jamek vzniklých po hřebínku. Teprve poté jsem nanášela marker a připravené vzorky, viz dále.

Pro každý klon testované protilátky jsem připravila 1 vzorek tkáně izolované ze střev klíštěte, 1 vzorek slinných žláz klíštěte a 1 vzorek ovárií. Celkem jsem testovala 2 klony protilátek proti S8K a jeden klon proti IRS-2. Vzorky, nanášené do jamek gelu, obsahovaly dané množství proteinů ze tkání klíšťat (viz Tabulka XV), 5 µg/µl kompetentního rekombinantního proteinu a 5 µl 4x Laemmli Sample Loading Buffer (Bio-Rad laboratories) sloužícího k obarvení vzorků a usnadnění aplikace do jednotlivých jamek gelu. Důvodem přidavku rekombinantního proteinu byl předpoklad lepšího navázání testované protilátky na přenesené proteiny na membránce. Koncentrace proteinů obsažených ve tkáních orgánů klíšťat použité pro přípravu vzorku k elektroforetické separaci jsou vypsány v Tabulce XV.

Tabulka XV: Koncentrace proteinů užitých pro přípravu vzorků pro elektroforézu

Orgán	Koncentrace proteinu [µg/µl]	Aplikované množství vzorků na jamku [µl]	Koncentrace aplikov. proteinu [µg/µl]
Ovária	246,08	15	8,62
Slinné žlázy	537,48	15	8,13
Střeva	573,63	15	23,00

Z důvodu požadované denaturace byly vzorky před samotnou aplikací uloženy po dobu 3 minut k inkubaci při 95 °C. Do první jamky jsem nanesla 3,5 µl markeru (Sigma), do následujících jamek jsem aplikovala 20 µl vzorku a aparaturu zapojila k elektrickému zdroji. Separace proteinů probíhala ve stejnosměrném elektrickém poli při nastavených hodnotách 80 mA, 250 V, 150 W, s tím, že v aparatuře byly zapojeny dva gely.

Blotting

Gely s rozdělenými proteiny byly následně připravené pro „přeblotování“ tedy přenesení proteinů na nitrocelulóзовou membránu. K přeblotování jsem použila blotter V20-SDB Semi-Dry Blotters (SCIE-PLAS).

Na spodní část blotteru jsem navrstvila 3 vrstvy filtračního papíru, které jsem navlhčila 1x ředěným transferovým pufrem. Zpod filtračního papíru jsem odstranila vzniklé bubliny a položila předem aktivovanou nitrocelulóзовou membránu v methanolu (Sigma). Na membránu jsem vložila gel s rozdělenými proteiny a gel přikryla třemi vrstvami filtračního papíru, navlhčeném v transfer pufru. Celou soupravu jsem překryla svrchním dílem blotteru, v mém případě zápornou elektrodou. Proteiny tedy migrovaly shora dolů ke kladné elektrodě, a byly zachytávány na membránce. Samotné přeblotování jsem nastavila na 2,5 hodiny, abych měla jistotu přenesení všech přítomných proteinů v gelu.

Membránu s přeblotovanými proteiny jsem před navázáním primárních protilátek promyla roztokem TBS s 0,1% Tweenem a nechala je po dobu 2 hodin vysycovat v roztoku 5% odtučněného mléka v TBS s 0,1% Tweenem při teplotě 24 °C.

Aplikace primárních protilátek

Množství aplikovaných primárních protilátek jsem určila na základě jejich stanoveného titru (Kapitola 4.2. Stanovení titru protilátek). Určené množství primární protilátky jsem rozmíchala v 5% roztoku sušeného mléka v 10x TBS s 1% Tweenem.

Membránu obsahující konkrétní proteiny jsem společně s připraveným roztokem obsahující primární protilátku zatavila do igelitového pytlíčku. Proteiny společně s primární protilátkou jsem nechala inkubovat při teplotě 4 °C po dobu 12 hodin. Inkubace probíhala na rotátoru Sunflower Mini-shaker (BioSan). Důležité bylo uložení membránek přenesenými proteiny vzhůru, aby byla snížena pravděpodobnost vzniku nežádoucích artefaktů.

Po ukončení inkubace jsem membránu celkem dvakrát promyla v roztoku 10x TBS + 0,1% Tween. Následné třetí promývání probíhalo 15 minut při teplotě 24 °C. Následně jsem membránu promyla stejným způsobem ještě 2x po pěti minutách.

Aplikace sekundárních protilátek

Sekundární protilátky jsem naředila v 5% roztoku mléka v TBS s 0,1% Tweenem v poměru 1:1000 a membránu jsem společně se sekundárními protilátkami nechala inkubovat 45 minut při teplotě 24 °C.

Po ukončení inkubace jsem membránku promyla 3x po pětiminutových intervalech v 0,1% roztoku TBS s Tweenem.

Detekce proteinů

Pro detekci proteinů s protilátkami byly použity detekční roztoky A a B (Western Bright Quantum, Advansta) v poměru 1:1. Směs detekčních roztoků jsem nechala působit na membránky po dobu 1 minuty. Následně jsem membránky s proteiny lehce osušila a vložila na fólii umístěnou v detekčním přístroji (Alliance 47, Uvitec Cambridge). Následně jsem změřila chemiluminescenci navázaných protilátek v různých časových intervalech.

3.2.14. Detekce proteinů ve tkáních *Ixodes ricinus* pomocí monoklonálních protilátek

K detekci proteinů ve tkáních klíštěte jsem využila metody ELISA a Western blot, kdy místo rekombinantního proteinu byly využity sonifikované tkáně vnitřních orgánů *Ixodes ricinus* (střeva, slinné žlázy, vaječníky). Do jamek mikrotitračního panelu jsem nakoutovala 10 µg daného proteinu u enzymatické imunodetekce (ELISA) a 5 µg proteinu do jamek elektroforetického gelu v rámci metody Western blot. Obě metody jsou podrobněji popsány v kapitolách 3.2.8 a 3.2.13. Jako primární protilátku jsem použila mnou vyrobené monoklonální protilátky. Sekundární protilátkou byla komerčně vyráběná antimyší IgG polyklonální protilátka značená peroxidázou.

3.2.15. Kvantifikace proteinů IRS-2 a S8K v orgánech a slinách klíšťat

Ke kvantifikaci konkrétních proteinů na membráně jsem využila počítačový program Image J, který je schopný vygenerovat zastoupení daného proteinu v jednotlivých orgánech na základě šíře proužků vizualizovaných na membráně při metodě Western blot.

4. Výsledky

4.1. Vyhodnocení produkce monoklonálních protilátek hybridomy a jednotlivými buněčnými klony

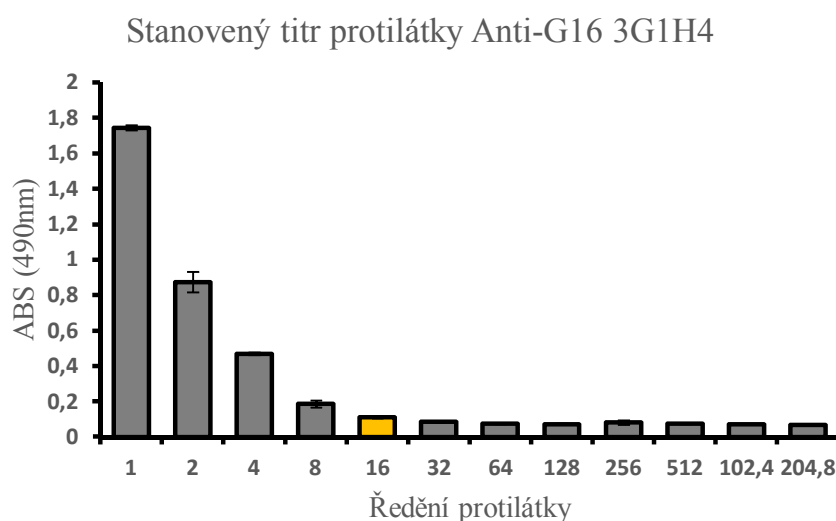
Přítomnost protilátek v kultivačním médiu byla stanovena metodou ELISA. Na základě hodnot naměřených absorbancí jsem vyhodnotila míru produkce protilátek. Jamky s naměřenou absorbancí pohybující se nad hodnotou 1,5 AU jsem stanovila jako dostatečně produkující a příslušné médium s buňkami využila k další práci.

4.2. Stanovení titru protilátek

Titř protilátek udává co nejmenší koncentraci protilátky potřebné pro detekci proteinů. Hodnotu titru protilátek jsem stanovila na základě metody ELISA. Danou protilátku jsem naředila dvojkovou řadou a výsledné naměřené hodnoty porovnávala s negativní kontrolou 2% PTS v PBS. Hodnoty titru protilátky odpovídaly dvakrát vyšším hodnotám oproti negativní kontrole.

4.2.1. Výsledky stanovení titru dvou vyrobených protilátek Anti-G16

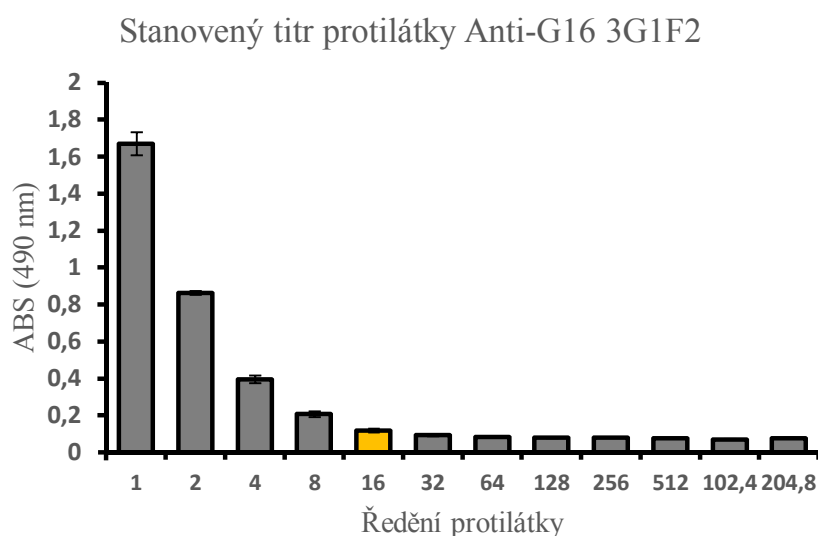
Na obrázku 2 jsou graficky znázorněny naměřené hodnoty (ELISA, 490 nm) včetně vyznačené výše určeného titru protilátky **Anti-G16 3G1H4**.



Obrázek 2: Grafické znázornění hodnot naměřených absorbancí (ELISA, 490 nm) odpovídající míře ředění protilátky Anti-G16 3G1H4 s vyznačenou hodnotou stanoveného titru protilátky

Na základě porovnání naměřených hodnot absorbancí kultivačního média s negativní kontrolou (2% PTS v PBS) jsem titr protilátky Anti-G16 3G1H4 stanovila na hodnotu 16. Toto zředění by v budoucí práci vyžadovalo použití vyššího objemu protilátky, než jsem měla k dispozici (v řádu mililitrů), proto byl tento klon G16 při použití v detekci proteinů vynechán.

Podobným hodnotám odpovídal i druhý G16 klon **Anti-G16 3G1F2**, jehož výsledné hodnoty jsou znázorněné na Obrázku 3.



Obrázek 3: Závislost míry zředění protilátky Anti-G16 3G1F2 na naměřených hodnotách absorpance ABS média obsahujícího protilátku Anti-G16 3G1F2 při vlnové délce 490 nm včetně vyznačené hodnoty stanoveného titru Ab

Tento titr jsem stanovila totožným způsobem jako v prvním případě. Titr s hodnotou 16 obsahoval nízké množství protilátek, proto byl odložen pro další práci (detekce proteinů v orgánech a slinách klíštěte).

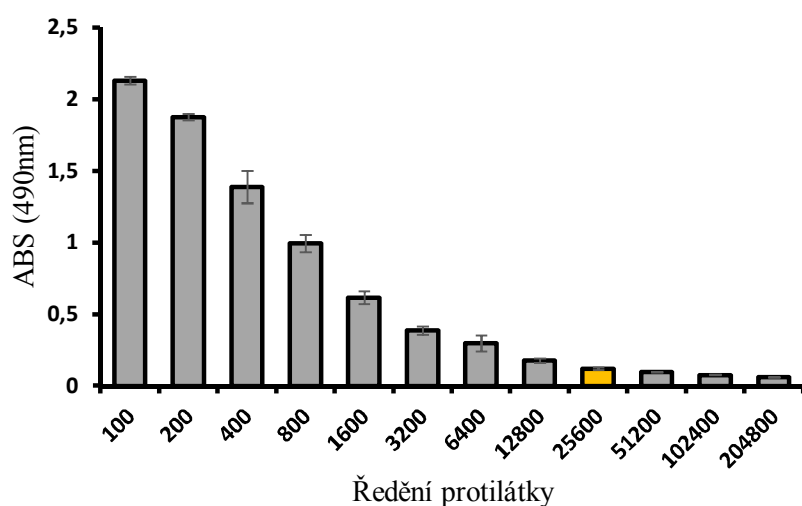
Žádný z připravených klonů Anti-G16 nebyl využit k detekci či kvantifikaci rekombinantních proteinů či proteinů v orgánech a slinách klíšťat.

4.2.2. Výsledky stanovení titrů připravených protilátek Anti-IRS-2

Následující dva grafy znázorňují hodnoty naměřených absorbancí kultivačních médií obsahujících protilátky Anti-IRS-2 3G10F2 a Anti-IRS-2 8B10F11.

Na Obrázku 4 jsou graficky znázorněné hodnoty množství protilátky vyprodukované klonem **Anti-IRS-2** s pracovním označením **3G10F2** provedené v duplikaci daného klonu. Na základě porovnání hodnot s negativní kontrolou složenou z 2% PTS v PBS byla stanovena hodnota titru protilátky, totožně jako u klonů G16. Ta je vyznačená barevně.

Stanovený titr protilátky Anti-IRS-2 3G10F2

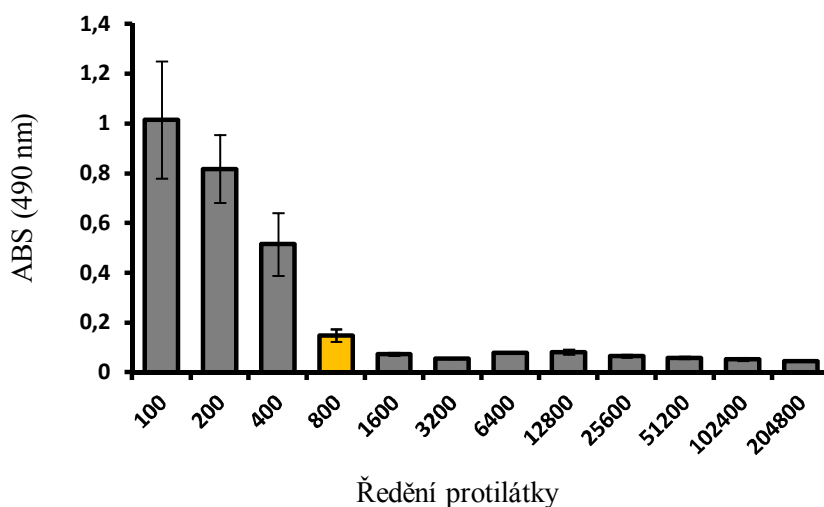


Obrázek 4: Hodnoty naměřené absorbance (ELISA) kultivačního média Anti-IRS-2 3G10F2 ku míře ředění příslušné aplikované protilátky

Dle porovnání hodnoty absorbancí s negativní kontrolou (2% PTS v PBS) jsem stanovila titr protilátky na hodnotu 25600. V tomto titru byla dále protilátka využívána při kontrolních průběžných testech (ELISA), kdy jsem ověřovala funkci protilátek. Za účely detekce a kvantifikace proteinů v orgánech a slinách klíšťat byla aplikována protilátka o titrech 100, 500 a 1000.

Protilátka Anti-IRS-2 3G10F2 byla dále využita k detekci rekombinantních proteinů i proteinů přítomných ve slinách a tkáních klíštěte obecného. Výsledky stanoveného titru protilátky **Anti-IRS-2 8B10F11** je znázorněný níže na Obrázku 5.

Stanovený titr protilátky Anti-IRS2 8B10F11



Obrázek 5: Hodnoty naměřené absorbance (ELISA) kultivačního média Anti-IRS-2 8B10F11 ku míře ředění příslušné aplikované protilátky

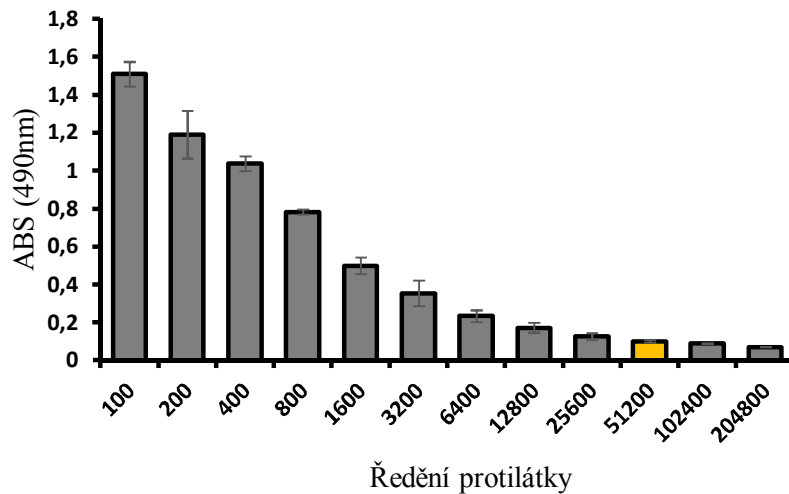
Na základě naměřených hodnot jsem stanovila vyšší titru protilátky na 800, v závislosti na porovnání s negativní kontrolou jako v předchozích případech. Takové ředění protilátky by vyžadovalo v praxi použití velkého objemu příslušné protilátky, proto protilátka byla pro budoucí pokusy vynechána.

4.2.3. Výsledky stanovení titru dvou vyrobených protilátek Anti-S8K

Následující obrázky znázorňují grafické zpracování dat naměřených hodnot absorbancí v závislosti na ředění protilátky Anti-S8K 1C10G6 a Anti-S8K 8G11H6.

Na Obrázku 6 jsou zřetelné hodnoty naměřených absorbancí v závislosti na ředění použité protilátky **Anti-S8K 1C10G6**. Protilátka byla v linii ředěna dvojkovou řadou.

Stanovený titr protilátky Anti-S8K 1C10G6

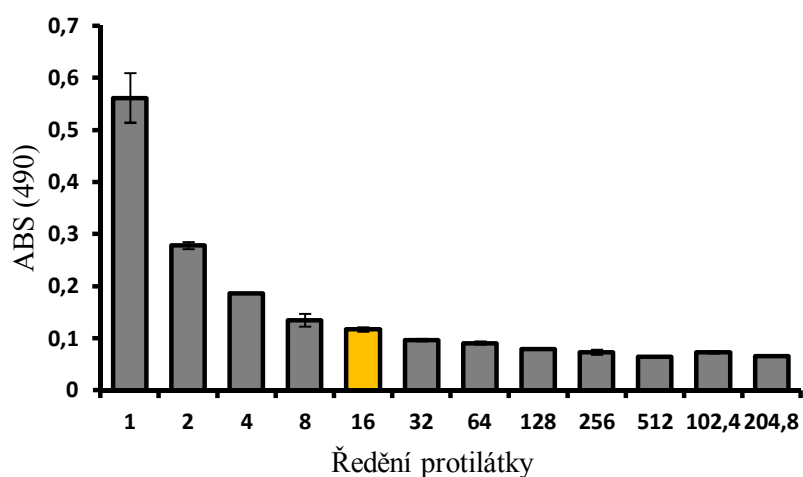


Obrázek 6: Hodnoty naměřené absorbance (ELISA) kultivačního média Anti-S8K 1C10G6 ku míře ředění příslušné aplikované protilátky

Titř protilátky Anti-S8K 1C10G6 jsem stanovila na hodnotu 51200. Titř protilátky byl dostatečně vysoký, proto jsem ji využila dále pro detekci a kvantifikaci S8K proteinů rekombinantních i přítomných v orgánech a slinách klíštěte obecného.

Na obrázku 7 jsou graficky znázorněné naměřené hodnoty absorbancí (ELISA, 490 nm) vypovídající o množství navázaných protilátek **Anti-S8K 8G11H6** na 0,5 µg/jamku S8K rekombinantního proteinu. Protilátka byla aplikována o ředění 1:1000, v dalších jamkách byla ředěna dvojkovou řadou. Pokus probíhal v duplikaci, která je v grafu zahrnuta v rámci směrodatných odchylek. Číselná hodnota titru byla stanovena na základě porovnání s hodnotou negativní kontroly 2% PTS v PBS, tedy totožným způsobem jako u klonů G16.

Stanovený titr protilátky Anti-S8K 8G11H6

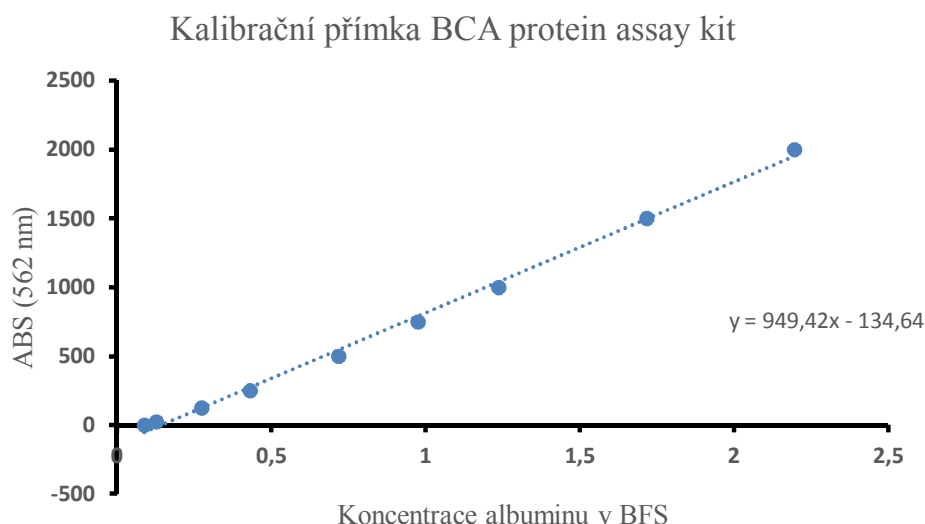


Obrázek 7: Hodnoty naměřené absorbance (ELISA) kultivačního média Anti-S8K 8G11H6 ku míře ředění příslušné aplikované protilátky

Přestože v pokusech prováděných v celém procesu přípravy protilátek byly protilátky v médiu přítomny, v závěrečných pokusech se hodnoty naměřených absorbancí pohybovaly okolo hodnoty 0,05. Nízká hodnota značila možnou degradaci protilátek v médiu v průběhu jejího skladování nebo ztráty během přečištění a koncentrování. Tato protilátka nebyla dále využita k detekci a kvantifikaci S8K proteinů rekombinantních i přítomných v orgánech a slinách klíštěte obecného.

4.3. Stanovení koncentrace proteinů v orgánech a slinách klíšťat pomocí BCA protein assay kit

Na základě protokolu, viz Tabulka XII, použití Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo scientific) jsem sestavila kalibrační řadu o známé koncentraci bovinního albuminu. Dle získaných hodnot jsem sestavila kalibrační přímku a vygenerovala rovnici regrese (Viz. Obr. 5).



Obrázek 8: Závislost koncentrace albuminu na absorbanci světla při vlnové délce 562 nm

Po dosažení hodnoty absorbance směsi proteinů (y) do rovnice regrese, jsem získala výsledné koncentrace proteinů v jednotlivých tkáních orgánů a slinách klíštěte obecného. Tyto hodnoty jsou zapsány v tabulce společně s hodnotami koncentrace proteinů, která byla nanášena do jamek polyakrylamidového gelu při metodě western blot (viz. Tabulka XVI).

Tabulka XVI: Výsledné hodnoty koncentrací jednotlivých vzorků orgánů a slin klíštěte obecného.

Orgán	A_{562}	Celková koncentrace proteinů ($\mu\text{g/ml}$)	Aplikované množství vzorků na jamku [μl]	Celkové množství aplikov. proteinu na jamku [μg]
MG 7D	0,746	573,63	15	8,62
Slin žl. 4D	0,708	537,48	15	8,13
Ovária (7D)	2,258	246,08	15	23,00
Saliva (6-7D)	0,932	750,22	15	11,25

Tyto orgány byly dále využity pro detekci a kvantifikaci proteinů pomocí monoklonálních protilátek metodou Western blot.

Největší koncentrace proteinů byla stanovena ve slinách u 6-7 denních *Ixodes ricinus*.

4.4. Detekce IRS-2 a S8K proteinů v klíčtčích tkáních a slinách pomocí připravených monoklonálních protilátek Anti-IRS-2 a Anti-S8K

Ke zjištění citlivosti protilátek vůči daným proteinům S8K a IRS-2 byly protilátky testovány ve třech různých titrech (100, 500, 1000). Každý titr byl tak současně otestován i pro tři určené koncentrace proteinu (10 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$). Absorbance byla měřena při 490 nm.

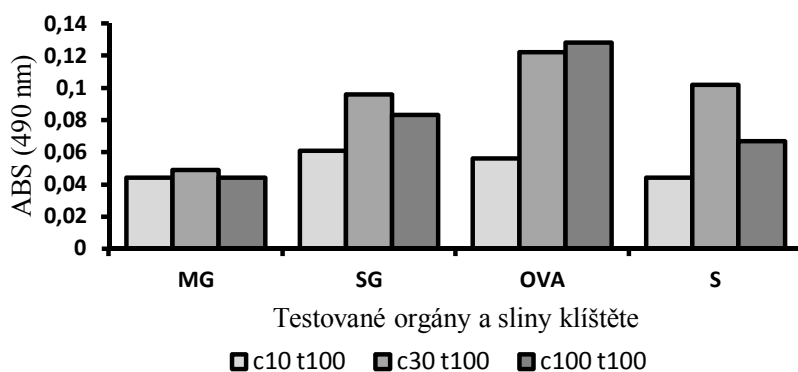
Následující grafy znázorňují vazbu protilátky aplikované v různých titrech na různé koncentrace nakoutovaného rekombinantního proteinu S8K a IRS-2 v jamkách mikrotitračního panelu.

4.4.1. Anti-IRS-2 3G10F2

Za účelem zjištění jaké množství protilátky je nejvhodnější pro detekci proteinů v orgánech a slinách klíšťat, byl proveden test, kdy na 3 různé koncentrace nakoutovaných proteinů (10, 30, 100 μg) byly aplikovány 3 různé titry protilátek (100, 500, 1000).

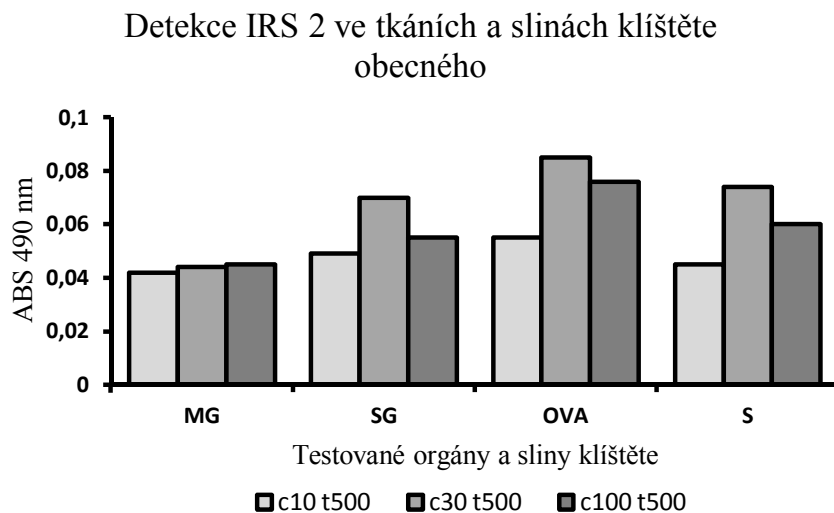
Na Obrázcích 9 až 11 jsou zobrazeny výsledné hodnoty absorbancí (ELISA, 490nm) získané při aplikaci různého titru připravené monoklonální protilátky Anti-IRS-2 3G10F2 na určenou koncentraci proteinu.

Detekce IRS 2 ve tkáních a slinách klíštěte obecného



Obrázek 9: Aplikace protilátky *Anti-IRS-2 3G10F2* o titru (t) 100 na 3 různé koncentrace (c) proteinů (10, 30, 100) ve střevech (MG), slinných žlázách (SG), vaječnicích (OVA) a slinách (S) klíštěte obecného.

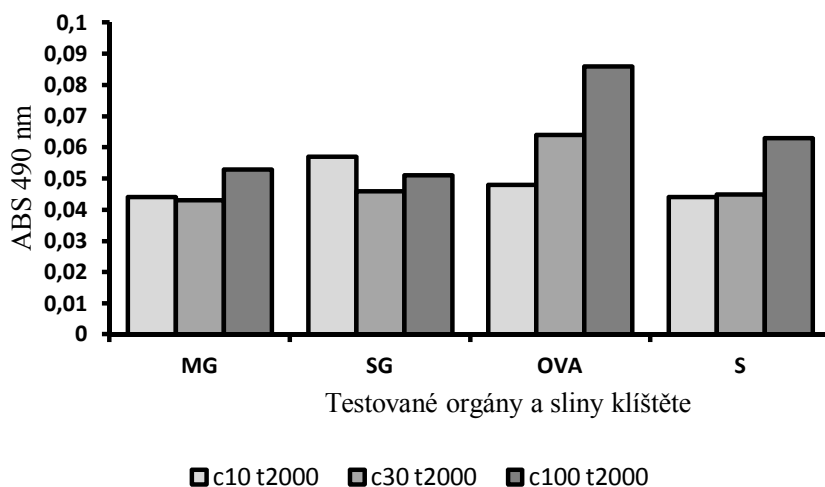
Jelikož bylo aplikováno stejné množství protilátky na různé koncentrace proteinů, očekávala jsem stoupání hodnot absorbance v daných měřeních jako je zřetelné zde v případě vaječnicků (OVA). U zbylých testovaných orgánů a slin jsem zaznamenala nižší hodnotu absorbance při testu se 100 $\mu\text{g/ml}$ proteinů oproti testu s 30 $\mu\text{g/ml}$.



Obrázek 10: Závislost míry absorbance (ELISA, 490 nm) naměřené při aplikaci protilátky *Anti-IRS-2 3G10F2* o titru (t) 500 na koncentraci (c) 10, 30, 100 μg proteinu IRS-2 obsaženého ve střevech (MG), slinných žlázách (SG), vaječnicích (OVA) a slinách (S) klíštěte obecného.

V případě střev se hodnoty pohybují na hranici negativní kontroly, proto je možné, že ve vzorku nebyl dostatek měřeného antigenu. Ve třetím případě, aplikace protilátky o titru 500 na 100 $\mu\text{g/ml}$ proteinů, opět došlo k nedostatečnému navázání protilátky na antigen z důvodu malého obsahu antigenů ve vzorku.

Detekce IRS 2 ve tkáních a slinách klíštěte obecného



Obrázek 11: Aplikace 2000 titru protilátky *Anti-IRS-2 3G10F2* na stoupající koncentraci (10, 30, 100) IRS-2 proteinu ve střevech (MG), slinných žlázách (SG), vaječnicích (OVA) a slinách (S) klíštěte obecného

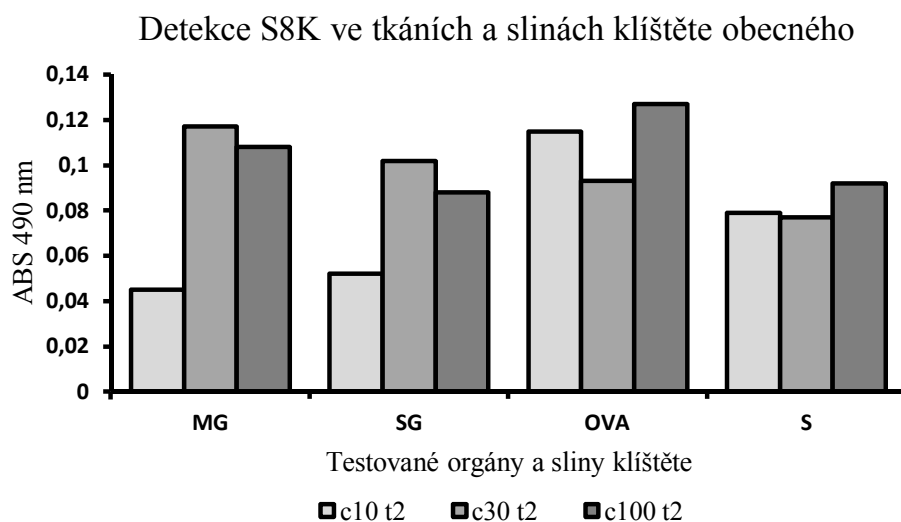
Aplikace protilátky Anti-IRS-2 3G10F2 o titru 2000 se na základě získaných výsledků zdála být dostatečná. S výjimkou vaječnic se měřené hodnoty pohybují na spodní hranici detekovatelnosti. V takových vzorcích bylo zřejmě obsaženo příliš malé množství detekovaných proteinů.

4.4.2. Anti-IRS-2 8B10F11

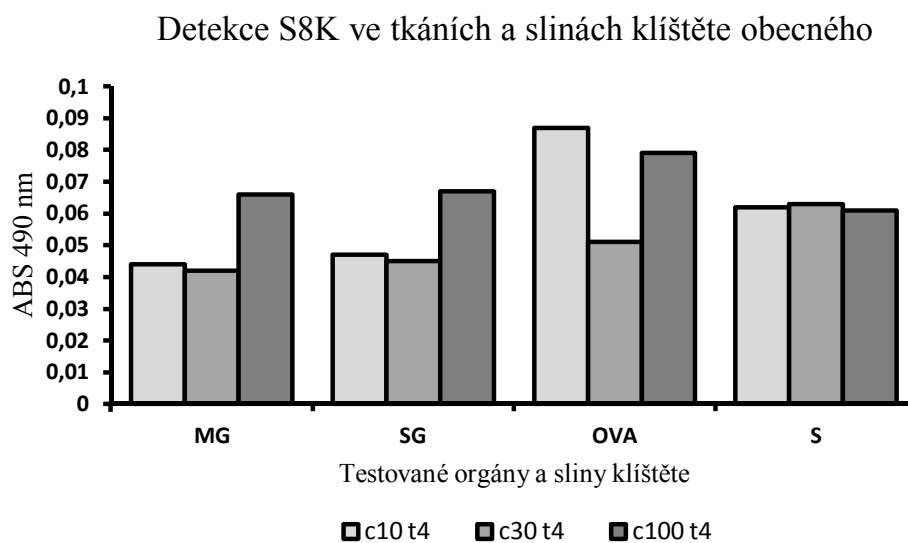
Při opětovném testování druhá připravená protilátka proti IRS-2 proteinu Anti-IRS-2 8B10F11 neprojevovala požadovanou aktivitu, proto byla pro další účely testování odložena.

4.4.3. Anti-S8K 8G11H6

Totožným způsobem jako u předchozího pokusu Anti-IRS-2 byly testovány protilátky Anti-S8K. Na Obrázcích 12 až 14 jsou zobrazeny naměřené hodnoty absorbancí (ELISA, 490 nm) vyjadřující množství navázaných protilátek na příslušné S8K proteiny přítomné v orgánech a slinách klíšťat. Na povrch destičky mikrotitračního panelu bylo nakoutováno 10, 30 a 100 µg/ml proteinu. Protilátku jsem aplikovala o nízkých titrech (2, 4, 16) z důvodu předpokládané nižší účinnosti protilátky. Použití nižšího titru protilátky znamená nutnost aplikovat vyšší množství protilátky.



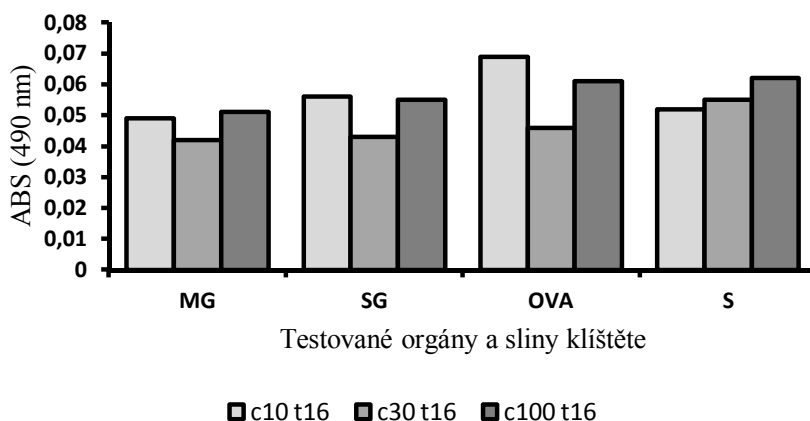
Obrázek 12: Závislost míry absorbance (ELISA, 490 nm) naměřené při aplikaci protilátky *Anti-S8K 8G11H6* o titru 2 (t2) na 10, 30, 100 μg (c10, c30, c100) proteinu S8K obsaženého ve střevech (MG), slinných žlázách (SG), vaječnících (OVA) a slinách (S) klíštěte obecného



Obrázek 13: Závislost míry absorbance (ELISA, 490 nm) naměřené při aplikaci protilátky *Anti-S8K 8G11H6* o titru (t) 4 na koncentraci (c) 10, 30, 100 μg proteinu S8K obsaženého ve střevech (MG), slinných žlázách (SG), vaječnících (OVA) a slinách (S) klíštěte obecného

Výrazně vysoká hodnota naměřené absorbance u vaječníků (OVA) v případě $c = 30 \mu\text{g/ml}$ proteinů mohla být způsobena chybou v pipetování.

Detekce S8K ve tkáních a slinách klíštěte
obecného



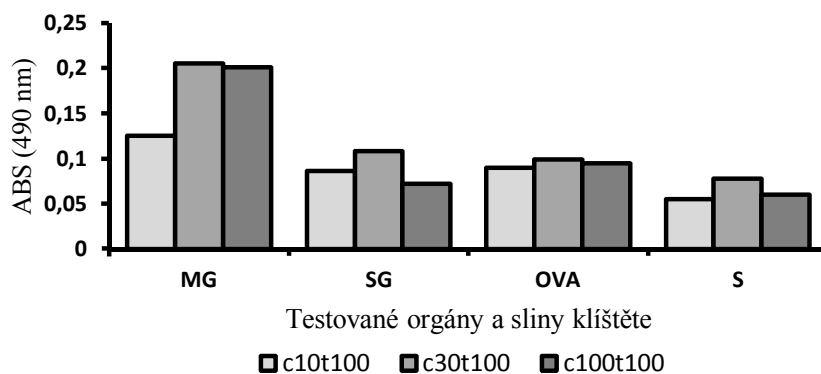
Obrázek 14: Závislost míry absorbance (ELISA, 490 nm) naměřené při aplikaci protilátky *Anti-S8K 8G11H6* o titru (t) 16 na koncentraci (c) 10, 30, 100 µg S8K proteinu obsaženého ve střevech (MG), slinných žlázách (SG), vaječnicích (OVA) a slinách (S) klíštěte obecného

4.4.4. Anti-S8K 1C10G6

Výsledky detekce S8K proteinu v orgánech a slinách klíšťat jsou zobrazeny na obrázcích níže. Detekce proteinu o koncentracích 10, 30 a 100 µg/ml byla provedena pomocí protilátky *Anti-S8K 1C10G6* v různých titrech.

Následující obrázky 15 až 17 zobrazují naměřené výsledné hodnoty absorbancí (ELISA, 490 nm) v závislosti na orgánech a slinách klíštěte obecného, ve kterých byla přítomnost proteinu S8K testována.

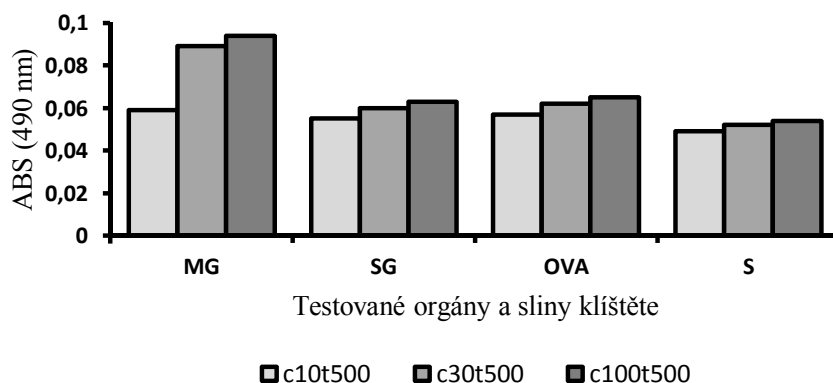
Detekce S8K ve tkáních a slinách klíštěte
obecného



Obrázek 15: Závislost míry absorbance (ELISA, 490 nm) naměřené při aplikaci protilátky *Anti-S8K 1C10G6* o titru (t) 100 na koncentraci (c) S8K proteinu 10, 30, 100 µg obsaženého ve střevech (MG), slinných žlázách (SG), vaječnicích (OVA) a slinách (S) klíštěte obecného

Totožným způsobem byla protilátka Anti-S8K 1C10G6 testována na tři různé koncentrace proteinů orgánů a slin klíštět o aplikovaném titru 500 (viz. Obrázek 16).

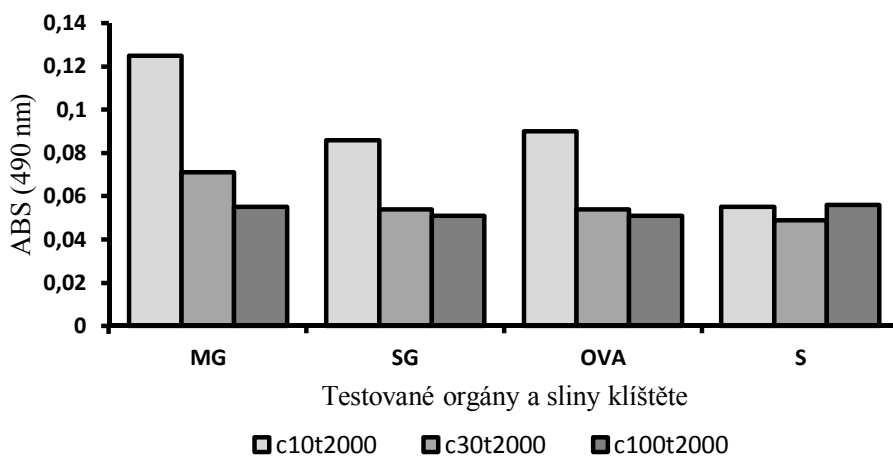
Detekce S8K ve tkáních a slinách klíštěte obecného



Obrázek 16: Závislost míry absorbance (ELISA, 490 nm) naměřené při aplikaci protilátky *Anti-S8K 1C10G6* o titru (t) 500 na koncentraci (c) S8K proteinu 10, 30, 100 µg obsaženého ve střevech (MG), slinných žlázách (SG), vaječnicích (OVA) a slinách (S) klíštěte obecného

Dle výsledných hodnot absorbance se pro užití protilátky Anti-S8K 1C10G6 při testech zdá být nejvhodnější titr 500.

Detekce S8K ve tkáních a slinách klíštěte obecného



Obrázek 17: Závislost míry absorbance (ELISA, 490 nm) naměřené při aplikaci protilátky *Anti-S8K 1C10G6* o titru (t) 2000 na koncentraci (c) S8K proteinu 10, 30, 100 µg obsaženého ve střevech (MG), slinných žlázách (SG), vaječnicích (OVA) a slinách (S) klíštěte obecného

V případě c30t2000 a c100t2000 se hodnoty pohybovaly téměř u hranice negativní kontroly (0,04), proto je možné, že v těchto vzorcích nebyl dostatek detekovatelného proteinu.

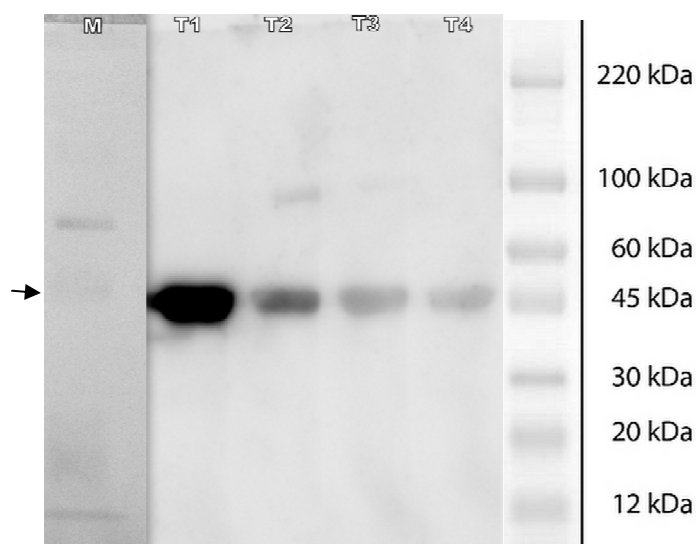
4.5. Důkaz přítomnosti IRS-2 a S8K proteinů ve slinách a orgánových suspenzích klíštěte obecného metodou Western blot pomocí připravených monoklonálních protilátek

Dle Tabulky XVI (str. 40) bylo do jamek polyakrylamidového gelu nanášeno 15 μ l orgánové suspenze, tedy 8,62 μ g proteinů orgánové suspenze ze střev; 8,13 μ g proteinů orgánové suspenze ze slinných žláz; 23 μ g proteinů orgánové suspenze z vaječníků a 11,25 μ g proteinů ze slin klíštěte obecného. V případě rekombinantního proteinu byl do jamek polyakrylamidového gelu nanášen 1 μ g rekombinantního proteinu, na který byly posléze aplikovány 4 různé výše titrů primárních protilátek.

4.5.1. Detekce rekombinantního proteinu IRS-2 pomocí monoklonální protilátky Anti-IRS-2 3G10F2

Do jamek připraveného polyakrylamidového gelu jsem nanesla 1g rekombinantního proteinu IRS-2. Na stejné množství rekombinantního proteinu jsem poté nanášela primární protilátku Anti-IRS-2 3G10F2 o různých titrech: T1=500, T2=1000, T3=2000, T4=4000.

Na Obrázku 18 je šipkou vyznačený detekovaný protein IRS-2.

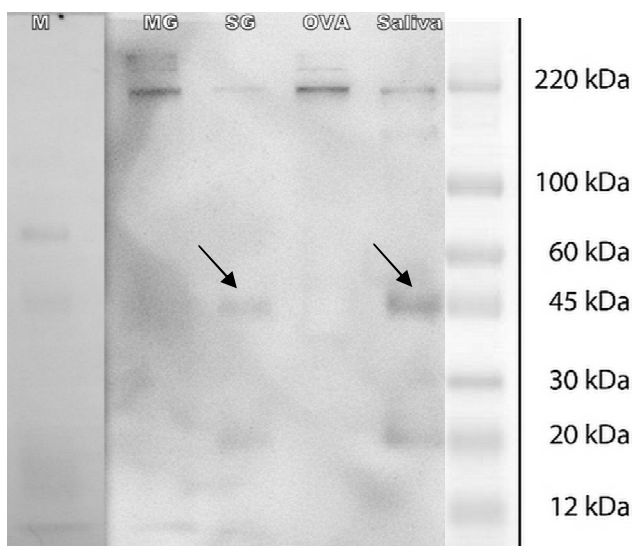


Obrázek 18: Detekce stejného množství rekombinantního proteinu pomocí různých titrů připravené monoklonální protilátky *Anti-IRS-2 3G10F2*.

Z obrázku je možné zvážit míru schopnosti protilátky vázat se k příslušnému proteinu. Dle očekávání míra signálu klesala s nižším titrem aplikované protilátky. Monoklonální protilátku *Anti-IRS-2 3G10F2* jsem zhodnotila jako dostatečně specifickou a pro detekci vyhovující.

4.5.2. Detekce proteinů IRS-2 ve slinách a orgánových suspenzích klíštěte obecného

Jako primární protilátku jsem využila připravenou monoklonální protilátku *Anti-IRS-2 3G10F2* o titru 1000. K detekci využitá sekundární protilátka byla aplikována v ředění 1:2000 (antimouse-IgG, PER-X). Do jamek SDS-PAGE gelu jsem aplikovala 15 μ l orgánové suspenze, tedy 8,62 μ g proteinů orgánové suspenze ze střev; 8,13 μ g proteinů orgánové suspenze ze slinných žláz; 23 μ g proteinů orgánové suspenze z vaječníků a 11,25 μ g proteinů ze slin klíštěte obecného.



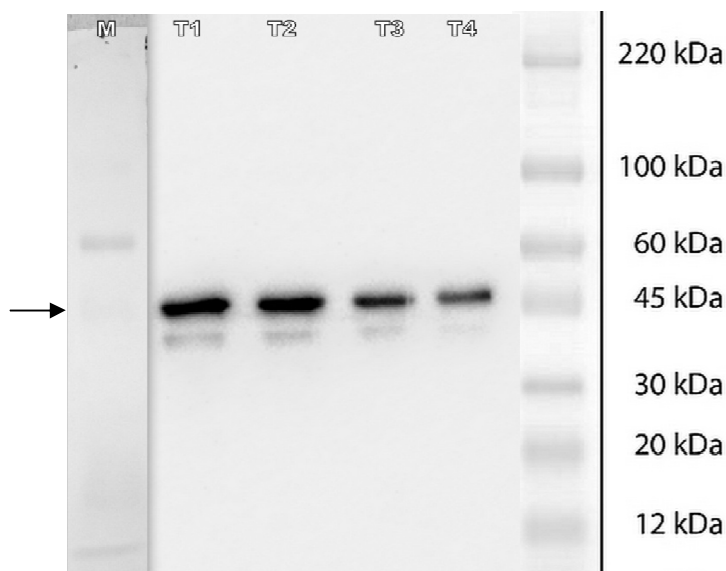
Obrázek 19: Detekce proteinu IRS-2 v klíštěcích střevech (MG), slinných žlázách (SG), vaječnicích (OVA) a slinách (Saliva) za užití primární protilátky *Anti-IRS-2 3G10F2*.

Protein IRS-2 byl úspěšně detekován ve slinných žlázách a ve slinách klíštěte obecného. Ve střevech a vaječnicích žádný signál nebyl detekován.

4.5.3. Detekce rekombinantního proteinu S8K pomocí monoklonální protilátky Anti-S8K 8G11H6

Obdobně jako v předchozím případě jsem do jamek polyakrylamidového gelu nanasla 1 g rekombinantního proteinu. Na membránky s přeblovanými proteiny jsem poté nanášela čtyři různé titry primární protilátky: T1=500, T2=1000, T3=2000, T4=4000. Aplikovaná sekundární protilátka (IgG antimouse) byla ředěna v poměru 1:2000.

Výsledek aplikace různých titrů protilátek, které byly aplikované na stejné množství rekombinantního proteinu je zobrazený na Obrázku 20.



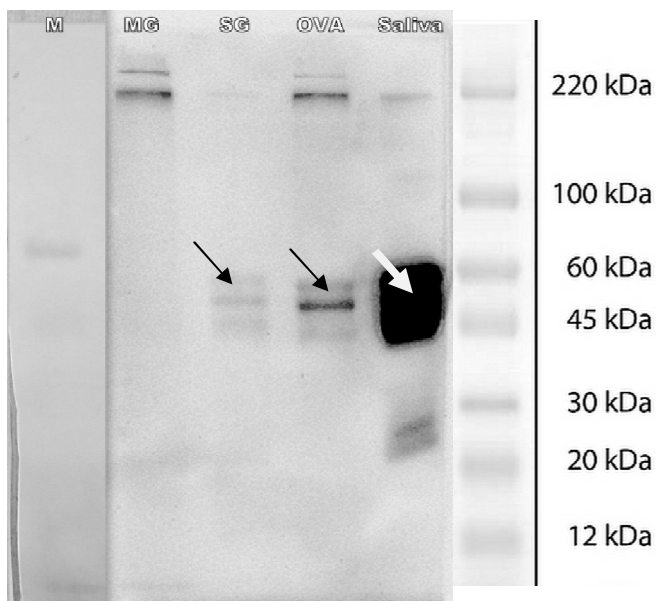
Obrázek 20: Detekce stejného množství rekombinantního proteinu pomocí různých titrů připravené monoklonální protilátky *Anti-S8K 8G11H6*

Dle předpokladu měřený signál s nižším užitým titrem aplikované protilátky klesal.

4.5.4. Detekce proteinů S8K obsažených ve slinách a orgánových suspenzích klíštěte obecného

Do jamek SDS-PAGE gelu jsem aplikovala 15 μ l orgánové suspenze, tedy 8,62 μ g proteinů orgánové suspenze ze střev; 8,13 μ g proteinů orgánové suspenze ze slinných žláz; 23 μ g proteinů orgánové suspenze z vaječníků a 11,25 μ g proteinů ze slin klíštěte obecného. Vizualizace probíhala pomocí primární protilátky (Anti-S8K 8G11H6) aplikované o titru 1000 a sekundární protilátky [IgG antimouse (made in horse)] použité v ředění 1:2000.

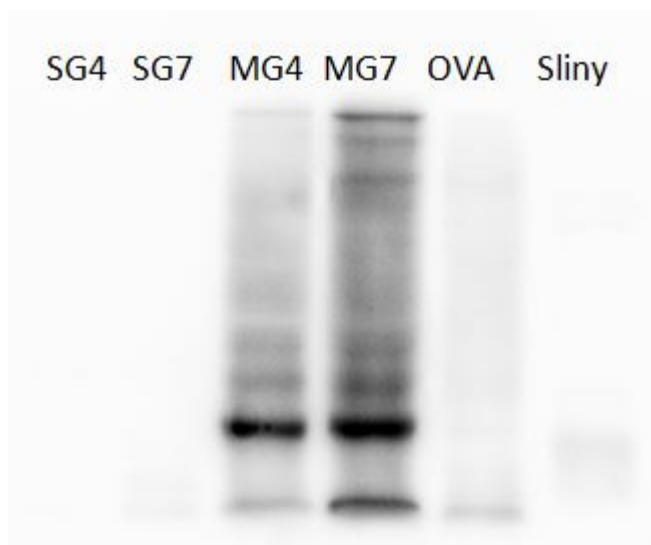
Na Obrázku 21 je výsledná fotka detekce proteinu S8K v orgánech a slinách klíšťat monoklonální protilátkou Anti-S8K 8G11H6.



Obrázek 21: Detekce proteinu S8K v klíštěcích střevech (MG), slinných žlázách (SG), vaječnicích (OVA) a slinách (Saliva) pomocí připravených monoklonálních protilátek Anti-S8K 8G11H6, využitých jako primární protilátky, vizualizované pomocí sekundárních anti-myších protilátek IgG značených peroxidázou

S8K proteiny byly v nejvyšší míře detekovány ve slinách, vaječnicích a slinných žlázách klíštěte obecného. Ve střevě klíštěte nikoli.

Vysoký signál v případě slin klíštěte je pravděpodobně artefakt. Při opakovaném pokusu byl S8K protein detekován ve slinách v několikanásobně menším množství (Viz. Obrázek 22)



Obrázek 22: Duplikace detekce proteinu S8K v klíštěcích střevech (MG), slinných žlázách (SG), vaječnicích (OVA) a slinách pomocí připravené monoklonální protilátky Anti-S8K 8G11H6, využitě jako primární protilátku, vizualizované pomocí sekundárních anti-myších protilátek IgG značených peroxidázou (Lieskovská, 2017)

4.6. Kvantifikace proteinů IRS-2 a S8K v orgánech a slinách klíštěte pomocí počítačového programu Image J

Pomocí počítačového programu Image J jsem provedla analýzu obrázků membrán a stanovila relativní přítomnost proteinu IRS-2 a S8K ve slinách klíštěte a tkáních jeho orgánů. Za předpokladu stejného množství proteinů v jamkách polyakrylamidového gelu je možné pomocí Image J vygenerovat přímé poměry množství přítomných proteinů detekovaných na membráně. Ovšem v tomto případě byla použita různá množství proteinů s ohledem na nutnost použití vyžadovaného objemu. Proto vygenerované hodnoty byly dále na základě poměrů optimalizovány. Udané poměry množství přítomných proteinů jsou zapsány v Tabulce XVII.

4.6.1. Stanovení množství IRS-2 proteinů ve slinách a orgánových suspenzí klíštěte obecného

V Tabulce XVII jsou zapsány testované orgány klíštěte obecného na přítomný IRS-2 protein, reálně aplikované množství proteinů, vygenerované poměry množství proteinů v přítomných orgánech stanovené pomocí Image J a optimalizované hodnoty na základě reálně aplikované množství proteinů do jamek polyakrylamidového gelu (Western blot).

Tabulka XVII: Aplikované množství celkových proteinů přítomných ve slinách a orgánech klíštěte obecného včetně předpokládaného podílu přítomnosti proteinu IRS-2 a normalizované hodnoty množství IRS-2 proteinu.

Orgán	Aplikovaná množství proteinů [μg]	Vygenerované poměry Image J	Normalizované hodnoty na množství proteinů
MG (7D)	8,62	12109.18	12839,01
Slin. žl. (7D)	8,13	10840.13	10840,13
Ovária (7D)	23,00	1657.49	4689,09
Saliva (6-7D)	11.25	40740.46	56375,17

V porovnání s duplikací viz. Obrázek 22.

Dle detekce pomocí Western blotu a počítačové analýzy obrazu programem Image J obsahovala nejméně proteinu IRS-2 ovária klíštěte obecného, dále pak slinné žlázy, střeva a nejvíce IRS-2 obsahovaly sliny.

4.6.2. Stanovení množství S8K proteinů v orgánech a slinách klíštěte

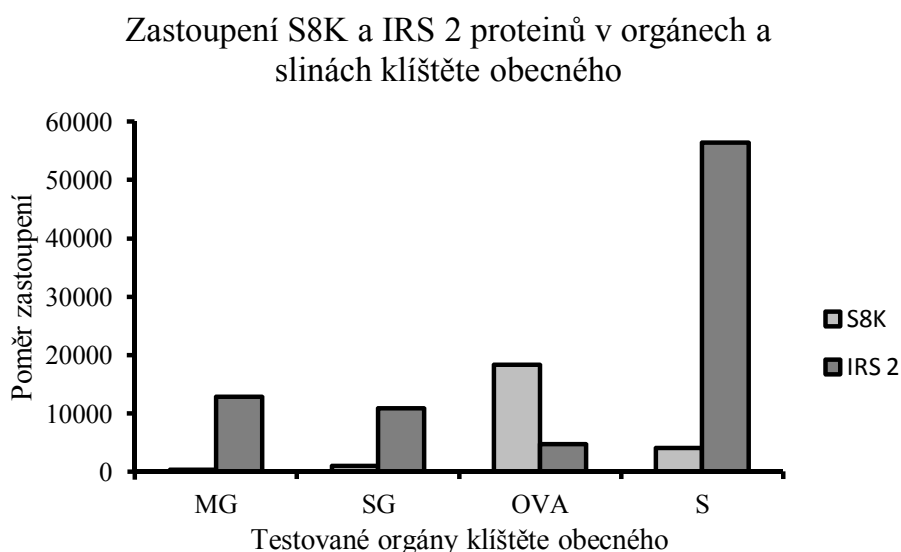
Stejným postupem jako v předchozím případě jsem stanovila i poměr zastoupení proteinu S8K ve slinách a orgánových suspenzích klíštěte obecného. V Tabulce XVIII jsou zapsány výsledné hodnoty vygenerované programem Image J a množství aplikovaného proteinu do polyakrylamidázového gelu v rámci metody Western blot.

Tabulka XVIII: Zastoupení S8K proteinů ve slinách a orgánech a klíštěte obecného.

Orgán	Aplikované množství proteinů [µg]	Vygenerované poměry Image J	Optimalizované hodnoty na množství proteinů
MG (7D)	8,62	315.09	344,08
Slin. žl. (7D)	8,13	996.28	996,28
Ovária (7D)	23,00	6483.10	18340,87
Saliva (6-7D)	11.25	131744.00	182302,58
Saliva duplikace	8	4120.548	4054,12

Bez ohledu na mnou naměřenou hodnotu zastoupení S8K proteinu ve slinách (která byla nejspíše artefaktem), bylo nejvyšší zastoupení S8K proteinu naměřeno ve vaječnicích, méně ve slinných žlázách a nejméně ve střevech.

Na Obrázku 23 je znázorněné zastoupení proteinů IRS-2 a S8K v jednotlivých slinách a orgánových suspenzích klíštěte obecného.



Obrázek 23: Porovnání zastoupení proteinů IRS-2 a S8K přítomných ve směsi proteinů obsažených v klíštěcích střevech (MG), slinných žlázách (SG), vaječnicích (OVA) a slinách (S)

IRS-2 protein byl detekován ve slinách a orgánových suspenzích 7- denních klíšťat obecných ve větší míře než S8K. Oba serpiny byly detekovány ve všech tkáních i slinách klíštěte obecného. Údaj ohledně přítomnosti S8K ve slinách je pouze orientační, jelikož byl prováděn v rámci odděleného pokusu na jiném gelu a s odlišným biologickým materiálem.

5. Diskuse

V dnešní době je příprava monoklonálních protilátek na úrovni, kdy vznik hybridomů probíhá bez větších komplikací a řada monoklonálních protilátek je již vyráběna komerčně (Davies, 2008). Jeden z významů monoklonálních protilátek ve výzkumu klíšťat se týká tendence ovlivnit obrané imunomodulační mechanismy klíštěte a omezit tak jeho sání a reprodukci (Rodriguez, 2015). Dále jsou monoklonální protilátky používány v rámci imunologických metod (ELISA, Western blot), jako tomu bylo i v této práci. V takových případech jsou pomocí monoklonálních protilátek detekovány specifické proteiny, u kterých může být nadále pomocí MAbs studována jejich struktura a funkce. Detekce pomocí monoklonálních protilátek byla využita například i u viru hepatitidy C (Touni, 2017). V dnešní době je na základě schopnosti imunomodulace zkoumána celá řada serpinů a stále jsou identifikovány nové typy u nejrůznějších druhů klíšťat.

Detekce serpinů ve slinách pomocí polyklonálního séra byla úspěšně provedena i u IRIS serpinu detekovaného u klíštěte *Ixodes ricinus* (Leboule, 2002; Prevot, 2007). V této studii probíhala detekce serpinu pomocí polyklonálních protilátek vyrobených imunizací rekombinantního proteinu na myších a byla mnou úspěšně ověřena. Výhodou monoklonálních protilátek oproti polyklonálním je jejich zvýšená citlivost vazby k antigenům (Yakes, 2016). Tato skutečnost byla prokázána napříkladu ELISA testu i v rámci potravinových analýz (Yakes, 2016).

Pomocí monoklonálních protilátek jsem detekovala 2 serpiny v orgánech a slinách klíštěte obecného. Protilátky však mohou v čase degradovat, a to z důvodu špatných podmínek při uchovávání. Podstatnými faktory jsou teplota a pH. Protilátky se během mé manipulace pohybovaly v různých teplotních rozhraních, které mohly způsobit narušení vazeb v jejich struktuře. Chemickou nestabilitu protilátek prokázal i Jack Zheng ve své studii vlivu okolních podmínek na humanizovanou monoklonální protilátku LA298 (Zheng, 2006). Při průběžných testech (ELISA), kde jsem ověřovala funkci protilátek, jsem získávala stále menší signál, aniž by bylo s protilátkami jakkoli manipulováno (změna teploty, atp.). Zním je mi pouze důvod ztráty jednoho z G16 klonů, u kterého došlo ke ztrátě vzorku během koncentrování kvůli poškozenému filtru. Jednu z možností ztráty protilátek představuje i adheze protilátek ke stěně zkumavky, ve které byly uchovávány. Ovšem i při důkladném promíchání vortexem před samotným použitím se zvýšený obsah protilátek v pokusu neprojevil.

Dalším důvodem získání malého množství protilátek vůči cystatinu G16 je možnost omezené schopnosti hybridomů G16 produkovat příslušné protilátky. Zvažovala jsem i

možnost, zda mohl být cystatin G16 dostatečně imunogenicitní. Ovšem při testování myších sér před samotnou hybridizací (ELISA), byly naměřeny dostatečně vysoké hodnoty absorbancí a séra byla tak vyhodnocena jako pozitivní na přítomné protilátky. Snižující se produkce monoklonálních protilátek byla tedy způsobena snižující se schopností hybridomů produkovat protilátky. Bohužel z časových důvodů jsem tuto skutečnost dále neověřovala. Dalším důvodem vyřazení G16 klonů z testování byl jejich nízký titr protilátek, který by znamenal nutnost užití velkého množství séra (v řádu ml). Proto jsem zaměřila svou pozornost na serpiny.

U serpinů byla ověřena dobrá schopnost imunogenicity (Yan, 2016). I díky této vlastnosti mohou být proti serpinům klíštěte vyráběny očkovací vakcíny (Mulenga, 2001). Imunogenita v reakci na serpiny, které jsou přítomné ve slinách klíšťat, byla kromě *I. ricinus* zaznamenána i u dalších druhů, například *Amblyomma americanum*, *Ixodes scapularis* a *Rhipicephalus sanguineus* (Tirloni, 2016). Úspěšná produkce protilátek na modelech myší byla zaznamenána i v reakci na hlísta *Schistosoma japonicum*, kde by takové protilátky mohly být v budoucnu použity v protiparazitální léčbě (Yan, 2016).

Serpiny jsou nejvíce studované inhibitory proteáz, které byly detekovány nejen u klíšťat, ale také u zvířat, rostlin, bakterií archeí a poxvirů. (Irving, 2002; Law, 2006). Geny kódující serpiny jsou charakteristické pro daný druh. Příkladem, u *Drosophila melanogaster* bylo nalezeno až 13 000 genů působících v expresi serpinů a u *Caenorhabditis elegans* (Hád'átko obecné) až 20 000 (Silverman, 2001). U klíšťat byla exprese řady serpinů lokalizována ve slinných žlázách i ve slinách, včetně mnou testovaného serpinu IRS-2 u *Ixodes ricinus*, jehož přítomnost jsem zde prokázala. Ve slinných žlázách klíštěte obecného jsou inhibitory proteáz exprimovány ihned po přisátí klíštěte, přičemž nejvyšší exprese IRS-2 serpinu byla pozorována ve slinách klíšťat 6. den sání (Chmelař, 2011). Tomuto stádiu odpovídala i mnou testovaná klíšťata. Tento výsledek tedy může být považován za relevantní. IRS-2 serpin byl dále již detekován i ve střevech a vaječnících (Páleníková, 2015). Tyto výsledky byly potvrzeny i v rámci mých pokusů, kdy IRS-2 serpin byl lokalizován ve všech tkáních stejně jako S8K.

Ohledně S8K nebyly publikovány oficiální publikace, proto jeho výskyt nemohu potvrdit na základě jiných prací. V rámci mého pokusu byl naměřen vysoký chmiluminescenční signál metodou Western blot ve slinách klíštěte. V porovnání s duplikací, provedenou doktorkou Lieskovskou, jsem usoudila, že se jedná o artefakt. U duplikace nebyl protein S8K ve slinách klíštěte obecného v takové míře potvrzen. Metodou Western blot byla ve střevech klíštěte detekováno nižší množství proteinu S8K než při ELISA testu. V tomto případě je výsledek závislý na druhu užití metody, kdy ELISA je

mnohem citlivější. Mnou studovaný serpin S8K z klíštěte obecného byl detekován ve všech tkáních i slinách klíštěte obecného. Ve srovnání mého výsledku testu Western blot s duplikací je jasné, že S8K je přítomný ve střevech klíštěte obecného. Rozdílné výsledky jsou spojeny s užitím jiného biologického materiálu. Na základě mého pokusu není zřetelná přítomnost S8K ve střevech klíštěte obecného na vizualizované membránce. Nicméně jeho přítomnost byla prokázána při pozdější duplikaci doktorkou Lieskovskou. Serpin S8K byl tedy detekovaný ve všech měřených orgánech a slinách dospělých samic *I. ricinus* po 7-denním sání. O rozmístění serpinu S8K v jednotlivých orgánech klíšťat nebyly dodnes vydány oficiální publikace. Distribuce serpinů záleží na druhu serpinu i jedinci. Ve střevech, ováriích a slinných žlázách byly detekovány serpiny RmS-3, RmS-6, RmS-15 *R. microplus* (Tirloni, 2014) a AamS6 *A. americanum* (Porter, 2016). Serpin AAS19 byl detekovaný pouze ve slinných žlázách a střevech *A. americanum* (Porter, 2016), stejně jako IxscS-1E1 a cystatin Sialostatin L2 u *Ixodes scapularis* (Ibelli, 2014; Kotsyfakis, 2006). U výše zmíněných serpinů byla prokázána schopnost ovlivnit funkci enzymů, které jsou nedílnou součástí krevního srážení. Ovlivňují agregaci trombocytů i srážení krevní plasmy. Inhibují enzymatické funkce katepsinu G, elastázy, chymázy (RmS-3, AamS6), plasminu, papainu (AamS6), aktivovaného koagulačního faktoru Xa, trypsinu, chymotripsinu, (RmS-6, AAS19), trombinu (RmS-15), katepsinu G i chymázy (IxscS-1E1) (Mulenga, 2013; Ibelli, 2014; Tirloni, 2014; Kim, 2015; Porter, 2016). U serpinu IRS-2 byla doposud prokázána schopnost snižovat zánětlivou reakci, produkovat IL-6 dendritickými buňkami a blokovat agregaci trombocytů. U serpinu S8K je princip imunomodulace doposud neznámý. Ovšem z hlediska jeho výskytu ve tkáních můžeme o těchto vlastnostech uvažovat.

Testované sliny obsahovaly vyšší množství serpinů než samotné slinné žlázy, ve kterých by měly být exprimovány. Důvodem, proč byla naměřena vyšší koncentrace IRS-2 proteinu ve slinách klíštěte než v jeho slinných žlázách, mohl být fakt, že sliny byly odebírány od velkého množství klíšťat, zatím co slinné žlázy byly preparované pouze ze dvou jedinců. Dále slinné žlázy byly při homogenizaci ředěny v cca 300 μ l PSB pufru.

U detekce S8K i IRS-2 inhibitorů proteáz pomocí monoklonálních protilátek metodou ELISA byly pozorovány případy, kdy s rostoucí koncentrací proteinu a rostoucí výší užitého titru, byla naměřena nižší výsledná absorbance, přestože po teoretické stránce byl očekáván nárůst – vyšší koncentrace proteinů, více přítomné protilátky, vyšší nárůst. Například na obrázku 7, kde byla aplikována protilátka Anti-IRS-2 3G10F2 o titru 100 na 3 různé koncentrace proteinů je možné pozorovat nepředpokládanou sníženou hodnotu emitovaného signálu u koncentrace proteinů o výši 30 μ l/ml. Předpokládám, že v tomto případě použitý titr protilátky obsahoval malé množství protilátek.

6. Závěr

Podářilo se vyrobit funkční monoklonální protilátky proti jednomu cystatinu G16 a dvěma serpinům IRS-2 a S8K. Vůči všem třem zkoumaným proteinům byly připraveny dva klony (celkem tedy 6 protilátek), které jsou schopné produkce monoklonálních protilátek, čímž byl splněný první cíl práce.

Na základě stanovených titrů byly vybrány dvě nejsilnější protilátky Anti-IRS-2 3G10F2 a Anti-S8K 8G11H6, pomocí kterých byla ověřena přítomnost S8K i IRS-2 serpinů ve slinách a tkáních klíštěte obecného. Tím byl splněn druhý cíl práce.

Anti-IRS-2 3G10F2 a Anti-S8K 8G11H6 byly posléze užity k detekci IRS-2 a S8K proteinů v orgánech a slinách klíštěte obecného i metodou Western blot. Na základě výsledků bylo pomocí Image J určeno zastoupení serpinů v jednotlivých orgánech a slinách klíštěte obecného. Protein IRS-2 byl v největší míře zaznamenán ve slinách, méně ve střevech a slinných žlázách a nejméně v ováriích. Na druhou stranu S8K byl nejvíce detekován v ováriích, méně ve slinách, slinných žlázách a nejméně ve střevech. Detekcí a poměrnou kvantifikací proteinů ve slinách a orgánech klíštěte obecného pomocí metody Western blot byl splněn i třetí cíl práce.

7. Seznam použitých zkratek

APS	Ammonium persulfate
Balb/c	Typ bílých myší
BBA	Binding buffer A
BCA	Bicinchoninic acid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBB1	Elution binding buffer 1
EBB2	Elution binding buffer 2
ELFO	Elektroforéza/tický
ELISA	Enzyme linked imunosorbent assay
HAT	Histamine and thimidine
HT	Hypoxantin-Thymidin
MG	Midgut; střeva
NBC	Neutralization
OVA	Ovária; vaječníky
PBS	Phosphate Buffered Saline; fosfátový pufr
PBS-T	Phosphate Buffered Saline + Tween
PEG	polyethylenglykol
RPMI	Roswell Park Memorial Institute; základní médium
S	Saliva; sliny
SDS	Dodecisíran sodný
SG	Saliva gland; slinné žlázy
T	Titř
TEMED	Tetramethylethylenediamine

8. Seznam použité literatury

ABRAHAMSON, M. Cystatin E is a Novel Human Cysteine Proteinase Inhibitor with Structural Resemblance to Family 2Cystatins. *Journal of Biological Chemistry*. 1997, **272**(16), 10853-10858. DOI: 10.1074/jbc.272.16.10853. ISSN 00219258. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.272.16.10853>

ABRAHAMSON, M. Cystatins. *Methods in Enzymology*. 1994, **244**, 685-700. DOI: 10.1016/0076-6879(94)44051-4. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0076687994440514>

ADAM, Z., M. KREJČÍ a J. VORLÍČEK. *Hematologie: přehled maligních hematologických nemocí*. 2., dopl. a zcela přeprac. vyd. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-2502-4.

ALUŠIKOVÁ, Marie, ed. *Farmakoterapeutické informace: Měsíčník pro lékaře a farmaceuty* [online]. Praha, 2011 [cit. 2015-03-02]. ISSN 1211-0647. Dostupné z: www.sukl.cz/file/65442_1_1

ALVAREZ-FERNANDEZ, M., A. J. BARRETT, B. GERHARTZ, P. M. DANDO, J. NI a M. ABRAHAMSON. *Inhibition of Mammalian Legumain by Some Cystatins Is Due to a Novel Second Reactive Site*. 1999, **174**, 19195-19203. DOI: 10.1074/jbc.274.27.19195. ISBN 10.1074/jbc.274.27.19195. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.274.27.19195>

ANACKER, R. L., G. A. MCDONALD, R. H. LIST a R. E. MANN. Neutralizing Activity of Monoclonal Antibodies to Heat-Sensitive and Heat-Resistant Epitopes of Rickettsia rickettsii Surface Proteins. *Infection and Immunity*. National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Hamilton, Montana, 1986, **55**(3), 825-827.

ANGUITA, J., N. RAMAMOORTHY, Joppe W.R HOVIUS, et al. Salp15, an *Ixodes scapularis* Salivary Protein, Inhibits CD4 T Cell Activation. *Immunity*. 2002, **16**(6), 849-859. DOI: 10.1016/S1074-7613(02)00325-4. ISSN 10747613. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761302003254>

BAO, JJ, RN SIFERS, VJ KIDD, FD LEDLEY a SL WOO. Molecular evolution of serpins: homologous structure of the human alpha 1-antichymotrypsin and alpha 1-antitrypsin genes. *Biochemistry*. 1987, **26**(24), 7755-9.

BARASH, Paul G. *Klinická anesteziologie*. 6. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-802-4740-539.

BARRETT, A. J. a H. KIRSCHKE. [41] Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. *Methods in Enzymology*. 1981, **80**, 535-561. DOI: 10.1016/S0076-6879(81)80043-2. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687981800432>

BEAUFAYS, J., B. ADAM, C. MENTEN-DEDOYART, et al. Ir-LBP, an *Ixodes ricinus* Tick Salivary LTB4-Binding Lipocalin, Interferes with Host Neutrophil Function. *PLoS ONE*. 2008, **3**(12), e3987-. DOI: 10.1371/journal.pone.0003987. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0003987>

BEINROHR, L., V. HARMAT, J. DOBO, Z. LORINCZ, P. GAL a P. ZAVODSZKY. C1 Inhibitor Serpin Domain Structure Reveals the Likely Mechanism of Heparin Potentiation and Conformational Disease. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007, **282**, 21100-21109. DOI: 10.1074/jbc.M700841200. ISBN 10.1074/jbc.M700841200. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M700841200>

BENNETT, D. H. *Srdeční arytmie: praktické poznámky k interpretaci a léčbě*. Praha: Grada, 2014, 384 s. ISBN 978-802-4751-344.

BERENBERG, J. L., P. A. WARD a D. E. SONENSHINE. Tick-Bite Injury: Mediation by a Complement-Derived Chemotactic Chemotactic Factor. *The Journal Of Immunology*. 1972, **109**(3), 451-456.

BIELEKOVA, B., N. RICHERT, T. HOWARD, et al. Humanized anti-CD25 (daclizumab) inhibits disease activity in multiple sclerosis patients failing to respond to interferon β . *The National Academy of Sciences*. 2004, **101**(23), 8705–8708. DOI: 10.1073/pnas.0402653101.

BINNINGTON, K.C. a D.H. KEMP. Role of Tick Salivary Glands in Feeding and Disease Transmission. *Advances in Parasitology*. 1980, (18), 315-339. DOI: 10.1016/S0065-308X(08)60403-0. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065308X08604030>

BLOW, David M. The tortuous story of Asp...His...Ser: Structural analysis of α -chymotrypsin. *Trends in Biochemical Sciences*. 1997, **22**(10), 405-408. DOI: 10.1016/S0968-0004(97)01115-8. ISSN 09680004. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000497011158>

BOOTHROYD, Peter a Xuân Nam. PHẠM. Socioeconomic renovation in Viet Nam: the origin, evolution, and impact of doi moi. *American Society of Hematology*. 2004, **103**(9), 3278-3281. DOI: doi.org/10.1182/blood-2003-10-3729.

BOWMAN, A. S., L. B. COONS, G. R. NEEDHAM a J. R. SAUER. Tick saliva: recent advances and implications for vector competence. *Medical and veterinary entomology*. 1997, **11**(3), 277–285. DOI: 10.1111/j.1365-2915.1997.tb00407.x. ISBN 10.1111/j.1365-2915.1997.tb00407.x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2915.1997.tb00407.x>

BREEDVELD, FC. *Therapeutic monoclonal antibodies*. 2000, **355**(9205), 735–740. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)01034-5. ISBN 10.1016/S0140-6736(00)01034-5. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673600010345>

BRÖMME, Dieter. Papain-like Cysteine Proteases. *Current Protocols in Protein Science*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2001, , 21.2.1. DOI: 10.1002/0471140864.ps2102s21. ISBN 0471140864. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471140864.ps2102s21>

BROWN, W.M. a K.M. DZIEGIELEWSKA. *Friends and relations of the cystatin superfamily-new members and their evolution*. 1997, **6**(1), 5-12. DOI: 10.1002/pro.5560060102. ISBN 10.1002/pro.5560060102. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pro.5560060102>

BUREŠ, Jan a Jiří HORÁČEK. *Základy vnitřního lékařství*. Editor Jan Bureš, Jiří Horáček. Praha: Galén, 2003, xxx, 870 s. ISBN 80-726-2208-0.

CAMPBELL., Ailsa M. *Monoclonal antibody and immunosensor technology the production and application of rodent and human monoclonal antibodies*. Amsterdam: Elsevier, 1991. ISBN 978-008-0887-357.

CARLYON, Jason A. *Ompa and asp14 in vaccine compositions and as diagnostic targets*. Virginie. WO2014004378 A1 Application. Uděleno 2014. Zapsáno 2012.

COIFFIER, Bertrand, Eric LEPAGE, Josette BRIÈRE, et al. CHOP Chemotherapy plus Rituximab Compared with CHOP Alone in Elderly Patients with Diffuse Large-B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med.* 2002, **346**, 235-242. DOI: 10.1056/NEJMoa011795. ISBN 10.1056/NEJMoa011795. Dostupné také z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa011795>

COLMAN, Robert W. *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams, c2006, 1827 p. ISBN 07-817-4996-4.

COSIMI, A. Benedict, Robert B. COLVIN, Robert C. BURTON, et al. Use of Monoclonal Antibodies to T-Cell Subsets for Immunologic Monitoring and Treatment in Recipients of Renal Allografts. *N Engl J Med.* 1981, **305**, 308-314. DOI: 10.1056/NEJM198108063050603. ISBN 10.1056/NEJM198108063050603. Dostupné také z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM198108063050603>

CROWE, Brian A., Ian LIVEY, Maria O'ROURKE a Michael SCHWENDINGER. *Ospa chimeras and use thereof in vaccines*. CA2798331 A1 Application. Uděleno 2010. Zapsáno 2011.

CWIERTKA, Karel, Radek TROJANEC, Kateřina ŠPAČKOVÁ a Marián HAJDÚCH. Terapeutické monoklonální protilátky v onkologii. *Klin Farmakol Farm.* 2004, **18**, 165–170.

CZUCZMAN, M. S., A. J. GRILLO-LÓPEZ, C. A. WHITE, et al. Treatment of Patients With Low-Grade B-Cell Lymphoma With the Combination of Chimeric Anti-CD20 Monoclonal Antibody and CHOP Chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology.* 1999, **17**(1), 268. DOI: 10.1200/JCO.1999.17.1.268. ISBN 10.1200/JCO.1999.17.1.268. Dostupné také z: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.1999.17.1.268>

ČIHÁK, R. *Doporučení pro léčbu pacientů s fibrilací síní* [online]. In: . *Klinika kardiologie IKEM, Praha, 2014* [cit. 2015-03-26]. Dostupné z: <http://www.kardio.cz/index.php?&desktop=clanky&action=view&id=83>

DAVIES, Luke C, Stephen J JENKINS, Judith E ALLEN a Philip R TAYLOR. Tissue-resident macrophages. *Nature Immunology.* 2013-9-18, **14**(10), 986-995. DOI: 10.1038/ni.2705. ISSN 1529-2908. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.2705>

DVOŘÁK, Zdeněk. Embryologie vývoje obličeje a jeho poruchy. In: *Rozštěpové centrum: při klinice plastické a estetické chirurgie* [online]. Brno, 2009 [cit. 2016-04-13]. Dostupné z: <http://www.rozstep.cz/embryologie-vyvoje-obliceje-a-jeho-poruchy/>

DYLEVSKÝ, Ivan. *Funkční anatomie*. Praha: Grada, 2009, 532 s. ISBN 978-80-247-3240-

ELLIOTT, Michael J., Ravinder N. MAINI, Marc FELDMANN, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor α . *Arthritis and rheumatology.* 1993, **36**(12), 1681–1690. DOI: 10.1002/art.1780361206. ISBN 10.1002/art.1780361206. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/art.1780361206>

FEAGAN, B. G., P. RUTGEERTS, B. E. SANDS, et al. Vedolizumab as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *The new England journal of medicine.* 2013, **369**, 699-710. DOI: 10.1056/NEJMoa1215734. ISBN 10.1056/NEJMoa1215734. Dostupné také z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1215734>

FENDRYCHOVÁ, J.. *Hodnotící metodiky v neonatologii*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2004, 87 s. ISBN 80-701-3405-4.

FISCHER, A., S. BLANCHE, J. LE BIDOIS, P. BORDIGONNI, J. L. GARNIER, P. NIAUDET, F. MORINET a et. al. Anti B-Cell monoclonal antibodies in the treatment in severe B-Cell lymphoproliferative syndrome following bone marrow and organ transplantation. *The new England journal of medicine*. 1991, **324**(21), 1451-1456.

FÖLDI, Mihály a Etelka FÖLDI, ed. *Lymfologie*. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-4300-4.

FOX, S., A. E. LEITCH, R. DUFFIN, Ch. HASLETT a A. G. ROSSI. Neutrophil Apoptosis: Relevance to the Innate Immune Response and Inflammatory Disease. *Journal of Innate Immunity*. 2010, **2**(3), 216-227. DOI: 10.1159/000284367. ISSN 1662-8128. Dostupné také z: <http://www.karger.com/doi/10.1159/000284367>

FRANCISCHETTI, I. M.B. Platelet aggregation inhibitors from hematophagous animals. *Toxicon*. 2010, **56**(7), 1130-1144. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.12.003. ISSN 00410101. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004101010900556X>

FRANCISCHETTI, I. M.B., Van MY PHAM, Ben J. MANS, John F. ANDERSEN, Thomas N. MATHER, Robert S. LANE a José M.C. RIBEIRO. The transcriptome of the salivary glands of the female western black-legged tick *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2005, **35**(10), 1142-1161. DOI: 10.1016/j.ibmb.2005.05.007. ISSN 09651748. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174805001232>

GARVEY, L.H., J. ROED-PETERSEN a B. HUSUM. Anaphylactic reactions in anaesthetised patients – four cases of chlorhexidine allergy. *Acta Anaesthesiol Scand* [online]. Denmark, 2001, (45), 1290–1294 [cit. 2016-03-21]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1034/j.1399-6576.2001.451020.x/epdf>

GILS, A. a P. J. DECLERCK. Structure-function Relationships in Serpins: Current Concepts and Controversies. *Thrombosis and Haemostasis*. 1998, **80**(4 (Oct)), 531-541. ISSN 0340-6245.

GLATZ, M., T. MEANS, J. HAAS, A. C. STEERE a R. R. MÜLLEGGGER. Characterization of the early local immune response to *Ixodes ricinus* tick bites in human skin. *Experimental Dermatology*. 2016, , -. DOI: 10.1111/exd.13207. ISSN 09066705. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/exd.13207>

GODING., James W. *Monoclonal antibodies principles and practice: production and application of monoclonal antibodies in cell biology, biochemistry and immunology*. 3rd ed. London: Academic Press, 1996. ISBN 01-228-7023-9.

GOKER, H., B. UZ, Y.BUYUKASIK, et al. Eculizumab before and after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Turkish Journal of Hematology*. 2011-8-1, **28**(3), 223-227. DOI: 10.5152/tjh.2011.58. ISSN 13007777. Dostupné také z: http://www.journalagent.com/z4/download_fulltext.asp?mdir=tjh

GONZALEZ, M., J. JÉGU, M.-C. KOPFERSCHMITT, et al. Asthma among workers in healthcare settings: role of disinfection with quaternary ammonium compounds. *Clinical* [online]. 2014, **44**(3), 393-406 [cit. 2016-03-21]. DOI: 10.1111/cea.12215. ISSN 09547894. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/cea.12215>

GORDON, K. B., K. A. PAPP, T. K. HAMILTON, et al. *Efalizumab for Patients With Moderate to Severe Plaque Psoriasis*. 2003, **190**(23), 3073-3080. DOI: 10.1001/jama.290.23.3073. ISBN 10.1001/jama.290.23.3073. Dostupné také z: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.290.23.3073>

GRANADOS-DURÁN, P., M. D. LÓPEZ-ÁVALOS, T. R. HUGHES, K. JOHNSON, B. Paul MORGAN, P. P. TAMBURINI, P. FERNÁNDEZ-LLEBREZ a Je.sús M. GRONDONA. Complement system activation contributes to the ependymal damage induced by microbial neuraminidase. *Journal of Neuroinflammation*. 2016, **13**(1), -. DOI: 10.1186/s12974-016-0576-9. ISSN 1742-2094. Dostupné také z: <http://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-016-0576-9>

GRAY, J. S. The Bionomics of *Ixodes ricinus* L., The “Sheep Tick” of Scotland. *Parasitology*. 2009, **24**(03), 382-. DOI: 10.1017/S0031182000020795. ISSN 0031-1820. Dostupné také z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182000020795

GUMULEC, J.. *Krvácivé komplikace a předávkování antikoagulační léčby* [online]. 2012, (26(2), 84-89 [cit. 2015-03-05]. Dostupné z: <http://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2012/02/07.pdf>

HÁJEK, Z.. *Rizikové a patologické těhotenství*. Vyd. 1. české. Praha: Grada, 2004, 443 s. ISBN 80-247-0418-8.

HÁJEK, Z., E. ČECH, K. MARŠÁL a kolektiv. *Porodnictví: 3., zcela přepracované a doplněné vydání*. Třetí. Praha: Grada Publishing, 2014. ISBN 978-80-247-9427-3.

HAJNICKA, V., P. KOCAKOVA, M. SLAVIKOVA, M. SLOVAK, J. GASPERIK, N. FUCHSBERGER a P. A. NUTTALL. Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. *Parasite Immunology*. 2001, **23**(9), 483-489. DOI: 10.1046/j.1365-3024.2001.00403.x. ISSN 0141-9838. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-3024.2001.00403.x>

HANÁKOVÁ, T.. *Velká česká kniha o matce a dítěti*. 2. vydání. Praha: CPress, 2015. ISBN 978-80-264-0755-3.

HANSEN, T, PK PETROW, A GAUMANN, GM KEYSZER, P EYSEL, A ECKARDT, R BRÄUER a J KRIEGSMANN. Cathepsin B and its endogenous inhibitor cystatin C in rheumatoid arthritis synovium. *The Journal of Rheumatology*. 2000, **27**(4), 859-865.

HEALY, Jane M. *Different learners: identifying, preventing, and treating your children's learning problems*. New York: Simon, c2010, x, 402 p. ISBN 14-165-5641-9.

HEINZ, F. X., W. TUMA, F. GUIRAKHOO, R. BERGER a C. KUNZ. Immunogenicity of Tick-borne Encephalitis Virus Glycoprotein Fragments: Epitope-specific Analysis of the Antibody Response. *Journal of General Virology*. 1984, **65**, 1921-1929. DOI: 10.1099/0022-1317-65-11-1921. ISBN 10.1099/0022-1317-65-11-1921. Dostupné také z: <http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-65-11-1921>

HELLEMANS, R., J.-L. BOSMANS a D. ABRAMOWICZ. Induction Therapy for Kidney Transplant Recipients: Do We Still Need Anti-IL2 Receptor Monoclonal Antibodies? *American journal of transplantation*. 2016, **17**(1), 22-27. DOI: 10.1111/ajt.13884. ISBN 10.1111/ajt.13884. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/ajt.13884>

HERRMANN, Coralie a Lise GERN. Search for blood or water is influenced by *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. *Parasites*. 2015, **8**(1), 6-. DOI: 10.1186/s13071-014-0526-2. ISSN 1756-3305. Dostupné také z: <http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/6>

HILL, Penny, Nicholas B CROSS, A Nicholas R BARNETT, Suetonia C PALMER a Angela C WEBSTER. Polyclonal and monoclonal antibodies for induction therapy in kidney transplant recipients. *Cochrane Library*. 2017. DOI: 10.1002/14651858.CD004759.pub2. ISBN 10.1002/14651858.CD004759.pub2. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD004759.pub2>

HOLEČEK, Milan. *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. Praha: Grada, 2006, 286 s. ISBN 80-247-1562-7.

Horáková, J., Band'ouchová, H., Pikula, J.: Surveillance of small rodents and related health risks in a game bird farm. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, 2007, LV, No. 2, pp. 33–42

HORN, Martin, Adéla JÍLKOVÁ a Michael MAREŠ. Katepsinové proteázy v patologii. *Chemické listy*. Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, 2014, **108**, 358–363.

HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTUŇKOVÁ. *Základy imunologie*. Vyd. 3. Praha: Triton, 2005. ISBN 80-725-4686-4.

HOWARD, Maureen, Anne O'GARRA, Hiroshi ISHIDA, René DE WAAL MALEFYT a Jan DE VRIES. Biological properties of interleukin 10. *Journal of Clinical Immunology*. 1992, **12**(4), 239-247. DOI: 10.1007/BF00918147. ISSN 0271-9142. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00918147>

HRUŠKOVÁ, Jana. *Kardioblog* [online]. [cit. 2014-11-21]. Dostupné z: <http://kardioblogie.blogspot.cz/>

HUCH, Renate. *Šťastné těhotenství od A do Z: 461 hesel*. Praha: Grada, 2007, 150 s. Pro rodiče. ISBN 978-80-247-1717-3.

CHALAIRE, K. C., T. K. KIM, H. GARCIA-RODRIGUEZ a A. MULENGA. Amblyomma americanum (L.) (Acari: Ixodidae) tick salivary gland serine protease inhibitor (serpin) 6 is secreted into tick saliva during tick feeding. *Journal of Experimental Biology*. 2011, **214**(4), 665-673. DOI: 10.1242/jeb.052076. ISSN 0022-0949. Dostupné také z: <http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.052076>

CHEN, J.-M., P. M. DANDO, N. D. RAWLINGS, et al. Cloning, Isolation, and Characterization of Mammalian Legumain, an Asparaginyl Endopeptidase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997, (272), 8090-8098. DOI: 10.1074/jbc.272.12.8090. ISBN 10.1074/jbc.272.12.8090. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.272.12.8090>

CHMELAŘ, J., C. J. OLIVEIRA, P. REZACOVA, et al. A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation. *Blood*. 2011, **117**(2), 736-744. DOI: 10.1182/blood-2010-06-293241. ISSN 0006-4971. Dostupné také z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2010-06-293241>

CHMELAŘ, Jindrich, Eric CALVOC, Joao H.F. PEDRAD, Ivo M.B. FRANCISCHETTI a Michail KOTSYFAKIS. Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *JOURNAL OF PROTEOMICS*. 2012, **75**, 3842 – 3854.

IBELLI, Adriana M.G., Tae K. KIM, Creston C. HILL, Lauren A. LEWIS, Mariam BAKSHI, Stephanie MILLER, Lindsay PORTER a Albert MULENGA. A blood meal-induced *Ixodes scapularis* tick saliva serpin inhibits trypsin and thrombin, and interferes with platelet aggregation and blood clotting. *International Journal for Parasitology*. 2014, 44(6), 369–379. DOI: 10.1016/j.ijpara.2014.01.010. ISBN 10.1016/j.ijpara.2014.01.010. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751914000526>

IMAMURA, Saiki, Itabajara da Silva Vaz JUNIOR, Maiko SUGINO, Kazuhiko OHASHI a Misao ONUMA. A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. *Vaccine*. 2005, 23(10), 1301-1311. DOI: 10.1016/j.vaccine.2004.08.041. ISSN 0264410x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X04006668>

ISSA, Ziad, John MILLER a Douglas ZIPES. *Clinical arrhythmology and electrophysiology: a companion to Braunwald's heart disease*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, 2012. ISBN 978-145-5712-748.

JABOR, Antonín. *Vnitřní prostředí*. Praha: Grada, 2008, xxvi, 530 s. ISBN 978-80-247-1221-5.

JAENSON, Thomas G.T. a Elisabet LINDGREN. The range of *Ixodes ricinus* and the risk of contracting Lyme borreliosis will increase northwards when the vegetation period becomes longer. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2011, 2(1), 44-49. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2010.10.006. ISSN 1877959x. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877959X10000919>

JANDOVÁ, Františka. *Metabolismus glukózy* [online]. In: . [cit. 2016-01-14]. Dostupné z: <http://slideplayer.cz/slide/3213292/>

JONES, LINDA D., ELIZABETH HODGSON, TREVOR WILLIAMS, STEVE HIGGS a PATRICIA A. NUTTALL. Saliva activated transmission (SAT) of Thogoto virus: relationship with vector potential of different haematophagous arthropods. *Medical and Veterinary Entomology*. 1992, 6(3), 261-265. DOI: 10.1111/j.1365-2915.1992.tb00616.x. ISSN 0269-283x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2915.1992.tb00616.x>

JUDITH A. OWEN .. [ET AL.]. *Kuby immunology*. 7. Aufl. New York: W.H. Freeman, 2013. ISBN 14-641-3784-6.

KALVACH, Z., Z. ZADÁK, R. JIRÁK, H. ZAVÁZALOVÁ a P. SUCHARDA. *Geriatric a gerontologie*. Praha: Grada, 2004, 861 s. ISBN 80-247-0548-6.

KARETOVÁ, D.. *Nová éra perorální antikoagulační léčby* [online]. In: 2012 [cit. 2015-03-10]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/nova-era-peroralni-antikoagulacni-lecby-464531>

KARETOVÁ, Debora a Jan BULTAS. Antikoagulační léčba v ambulanci praxi. In: *Interní medicína pro praxi* [online]. II. interní klinika 1. LF UK a VFN, Praha, 2004 [cit. 2015-02-26]. Dostupné z: <http://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2004/03/04.pdf>

KARMIRIS, K., G. PAINAUD, M. NOMAN, et al. Influence of Trough Serum Levels and Immunogenicity on Long-term Outcome of Adalimumab Therapy in Crohn's Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2009, 7(11), 1195-1201. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.07.062. ISBN 10.1053/j.gastro.2009.07.062. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508509013870>

KASPER, H.. *Výživa v medicíně a dietetika*. Praha: Grada, 2015, 572 s. ISBN 978-80-247-4533-6.

KEANE, J., S. GERSHON, R. P. WISE, E. MIRABILE-LEVENS, J. KASZNICA, W. D. SCHWIETERMAN, J. N. SIEGEL a M. Miles BRAUN. Tuberculosis Associated with Infliximab, a Tumor Necrosis Factor α -Neutralizing Agent. *N Engl J Med.* 2001, **345**, 1098-1104. DOI: 10.1056/NEJMoa011110. ISBN 10.1056/NEJMoa011110. Dostupné také z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa011110>

KESSLER, P.. *Antikoagulační léčba v těhotenství* [online]. In: . 2007 [cit. 2015-03-09]. Dostupné z: <http://www.thrombosis.cz/sources/guidelines-antikoagulace-tehotenstvi.pdf>

KIM, Tae Kwon, Lucas TIRLONI, Zeljko RADULOVIC, et al. Conserved Amblyomma americanum tick Serpin19, an inhibitor of blood clotting factors Xa and XIa, trypsin and plasmin, has anti-haemostatic functions. *International Journal for Parasitology.* 2015, **45**(9–10), 613–627. DOI: 10.1016/j.ijpara.2015.03.009. ISBN 10.1016/j.ijpara.2015.03.009. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751915001150>

KITCHENS, C. S, C. M KESSLER a B. A KONKLE. *Consultative hemostasis and thrombosis.* 3rd ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, 2013, p. ISBN 978-145-5722-969.

KLENER, Pavel. *Vnitřní lékařství díl 1.: Kardiovaskulární onemocnění.* Dotisk. Praha: Karolinum Praha 1, 1997. ISBN 80-7066-802-4.

KLOTZ, Ch., T. ZIEGLER, E.DANIŁOWICZ-LUEBERT a S. HARTMANN. *Cystatins of Parasitic Organisms: Papain-like Cysteine Proteases.* 2001, , 208. DOI: 10.1007/978-1-4419-8414-2_13. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-8414-2_13

KNÁPEK, Miroslav. *Multimediální trenážer plánování ošetrovatelské péče* [online]. 2010 [cit. 2015-03-02]. Dostupné z: <http://ose.zshk.cz/vyuka/terapie.aspx?tid=52>

KOCAN, K. M., J. DE LA FUENTE, A. A. GUGLIELMONE a R. D. MELENDEZ. Antigens and Alternatives for Control of Anaplasma marginale Infection in Cattle. *Clinical microbiology reviews.* 2003, **16**(4), 698-712. DOI: 10.1128/CMR.16.4.698-712.2003. ISBN 10.1128/CMR.16.4.698-712.2003. Dostupné také z: <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.16.4.698-712.2003>

KOHOUT, P., P. KESSLER a L. RŮŽIČKOVÁ. *Dieta při antikoagulační léčbě.* Praha: Forsapi, 2007, 59 s. Stručné informace pro pacienty, sv. 1. ISBN 978-80-903820-1-5.

KOPECKÝ, J., M. KUTHEJLOVA a J. PECHOVA. Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks inhibits production of interferon-gamma by the upregulation of interleukin-10. *Parasite Immunology.* 1999, **21**(7), 351-356. DOI: 10.1046/j.1365-3024.1999.00233.x. ISSN 0141-9838. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-3024.1999.00233.x>

KOTSYFAKIS, M. Antiinflammatory and Immunosuppressive Activity of Sialostatin L, a Salivary Cystatin from the Tick *Ixodes scapularis*. *Journal of Biological Chemistry.* 2006, **281**(36), 26298-26307. DOI: 10.1074/jbc.M513010200. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M513010200>

KOVÁŘ, L., J.KOPECKÝ a B. ŘÍHOVÁ. Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* tick polarizes the cytokine profile toward T_H2 and suppresses proliferation of T lymphocytes in human PBMC Culture. *Journal of Parasitology.* 2001, **87**(6), 1342-1348. DOI: 10.1645/0022-3395(2001)087[1342:SGEFIR]2.0.CO;2. ISSN 0022-3395. Dostupné také z: [http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[1342:SGEFIR\]2.0.CO;2](http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/0022-3395(2001)087[1342:SGEFIR]2.0.CO;2)

KRÁL, M.. *Moderní trendy v antiagregační terapii ischemického iktu* [online]. In: 2015 [cit. 2015-02-10]. Dostupné z: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/moderni-trendy-v-antiagregacni-terapii-ischemickeho-iktu-477773>

KRESSER, Ch.. Hormony při porodu. In: *Www.prirozeny-porod.eu* [online]. 2012 [cit. 2016-04-26]. Dostupné z: <http://www.prirozeny-porod.eu/hormony-porod/>

KRESSER, Chris. Natural childbirth IV: the hormones of birth. In: *Chris Kesser: Let's take back your health* [online]. New York, 2011 [cit. 2016-04-26]. Dostupné z: <http://chriskresser.com/natural-childbirth-iv-the-hormones-of-birth/>

LABUSOVÁ, Eva. Mít tak dítě s neporazitelnou imunitou!. *Rodiče*. 2010, (04/2010), 4.

LASALA, P. Rocco a Michael HOLBROOK. Tick-Borne Flaviviruses. *Clinics in Laboratory Medicine*. 2010, **30**(1), 221–235. DOI: 10.1016/j.cll.2010.01.002. ISBN 10.1016/j.cll.2010.01.002. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S027227121000003X>

LEBOULLE, G., M. CRIPPA, Y. DECREM, N. MEJRI, M. BROSSARD, A. BOLLEN a E. GODFROID. Characterization of a Novel Salivary Immunosuppressive Protein from *Ixodes ricinus* Ticks. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, **277**(12), 10083-10089. DOI: 10.1074/jbc.M111391200. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M111391200>

LEIFER, Gloria. *Úvod do porodnického a pediatrického ošetrovatelství*. Vyd. 1. české. Praha: Grada, 2004. ISBN 978-802-4706-689.

LOWY, I., DC MOLRINE, BA LEAV, et al. Treatment with monoclonal antibodies against Clostridium diffi cile toxins. *New England Journal of Medicine*. 2010, **362**, 197-205.

LUKL, Jan. *Fibrilace siní*. Praha: Grada, 2009, 268 s. ISBN 978-802-4727-684.

LÜLLMANN-RAUCH, Renate. *Histologie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3729-4.

LÜLLMANN, H., K. MOHR a L.HEIN. *Barevný atlas farmakologie*. Vyd. 4., české. Překlad Maxmilián Wenke. Ilustrace Jürgen Wirth. Praha: Grada, 2012, xiv, 366 s. ISBN 978-80-247-3908-3.

LUNDIN, J., E. KIMBY, M. BJÖRKHOLM, et al. Phase II trial of subcutaneous anti-CD52 monoclonal antibody alemtuzumab (Campath-1H) as first-line treatment for patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood: American society of hematology*. 2002, **100**, 768-773. DOI: 10.1182/blood-2002-01-0159. ISBN 10.1182/blood-2002-01-0159. Dostupné také z: <http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2002-01-0159>

LYSENKO, G., V. SQUIRES a W. H. VERHEYE. *Interactions: Food, agriculture and enviroment, Volume II: Encyklopedia os life support systems*. Second edition. USA: EOLSS Publishers Co, 2010. ISBN 9781848263345.

MAGGI, E., A. VULTAGGIO a A. MATUCCI. Acute infusion reactions induced by monoclonal antibody therapy. *Expert Review of Clinical Immunology*. 2014, **7**(1), 55-63. DOI: 10.1586/eci.10.90. ISBN 10.1586/eci.10.90. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/eci.10.90>

MACHACKOVA, M., M. OBORNIK a J. KOPECKY. Effect of salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks on the proliferation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in vivo. *Folia Parasitologica*. 2006-6-1, **53**(2), 153-158. DOI: 10.14411/fp.2006.020. ISSN 00155683. Dostupné také z: <http://folia.paru.cas.cz/doi/10.14411/fp.2006.020.html>

MALÁ, M., H. KNEŘOVÁ a M. KRATOCHVÍLOVÁ. *Antikoagulační léčba u nemocného s hlubokou žilní trombózou* [online]. [cit. 2014-11-15]. Dostupné z: <http://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2008/03/11.pdf>

MALÁ, M., H. KNEŘOVÁ a Marie KRATOCHVÍLOVÁ. *Medicína pro praxi: Antikoagulační léčba u nemocného s hlubokou žilní trombózou*. *Medicína pro praxi*. 2008, (5(3)), 133-135. Dostupné také z: <http://www.medicinapropraxi.cz/pdfs/med/2008/03/11.pdf>

MAŇASKOVÁ, D., MUDr. Těhotenství a farmakoterapie. In: [Http://medicinman.cz/](http://medicinman.cz/) [online]. 2011 [cit. 2016-04-26]. Dostupné z: <http://medicinman.cz/?p=nemoci-sympt/tehotenstvi-medikace>

MANS, B.J a A.W.H NEITZ. Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2004, **34**(1), 1-17. DOI: 10.1016/j.ibmb.2003.09.002. ISSN 09651748. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174803001656>

MANTHA, Ravi. *All about bacteria*. India: HarperColins Publisher, 2013. ISBN 9789350294048.

MAREK, J.. *Farmakoterapie vnitřních nemocí*. 3., zcela přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2005, 773 s. ISBN 80-247-0839-6.

MARTELLI, L., P. OLIVERA, X. ROBLIN, A. ATTAR a L. PEYRIN-BIROULET. Cost-effectiveness of drug monitoring of anti-TNF therapy in inflammatory bowel disease and rheumatoid arthritis: a systematic review. *Journal of Gastroenterology*. 2016, **59**(19). DOI: 10.1007/s00535-016-1266-1. ISSN 10.1007/s00535-016-1266-1. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00535-016-1266-1>

MARTINEZ, FO, A. SICA, A. MANTOVANI a M. LOCATI. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*. 2008, (13), 453-461.

MATAS-CÉSPEDES, A., A. VIDAL-CRESPO, V. RODRIGUEZ, et al. The Human CD38 Monoclonal Antibody Daratumumab Shows Antitumor Activity and Hampers Leukemia-Microenvironment Interactions in Chronic Lymphocytic Leukemia. *American Association for Cancer Research*. 2016, **23**(6), 1493-1505. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2095. ISSN 10.1158/1078-0432.CCR-15-2095. ISSN 1557-3265. Dostupné také z: <http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-15-2095>

MATUSCHKA, FRANZ-RAINER a at. al. Hosts on which nymphal *Ixodes ricinus* most abundantly feed. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Harvard School of Public Health: The American Society of Tropical Medicine and, 1991, (44(1)), 100-107 (90-182).

MBOW, M. L., R. D. GILMORE JR. a R. G. TITUS. An OspC-Specific Monoclonal Antibody Passively Protects Mice from Tick-Transmitted Infection by *Borrelia burgdorferi* B31. *Infection and immunity*. 1999, **67**(10), 5470-5472.

- MCPHERSON, R. A. a G. HARDY. Clinical and nutritional benefits of cysteine-enriched protein supplements. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2011, **14**(6), 562-568. DOI: 10.1097/MCO.0b013e32834c1780. ISSN 1363-1950. Dostupné také z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage>
- MEDLOCK, J. M, K. M HANSFORD, A. BORMANE, et al. Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasites*. 2013, **6**(1), 1-. DOI: 10.1186/1756-3305-6-1. ISSN 1756-3305. Dostupné také z: <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-6-1>
- MIHALOVIC, D.. Number of Chemicals Known To Be Toxic To Children's Brains Has Doubled In The Last 7 years. In: *Waking times* [online]. 2014 [cit. 2016-04-13]. Dostupné z: <http://www.czechfreepress.cz/zdravi/pocet-chemikalii-o-nichz-se-vi-ze-jsou-toxicke-pro-detsky-mozek-se-za-poslednich-7-let-zdvojnasil.html>
- MIKŠOVÁ, Z. *Kapitoly z ošetřovatelské péče*. Aktualiz. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2006, 248 s. Sestra (Grada). ISBN 80-247-1442-6.
- MILLER, R. A., D. G. MALONEY, R. WARNKE a R. LEVY. Treatment of B-Cell Lymphoma with Monoclonal Anti-Idiotypic Antibody. *The new england journal of medicine*. 1982, **305**, 308-314. DOI: 10.1056/NEJM198203043060906. ISBN 10.1056/NEJM198203043060906. Dostupné také z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM198203043060906>
- MILO, R. *The efficacy and safety of daclizumab and its potential role in the treatment of multiple sclerosis*. 2014, **7**(1), 7–21. DOI: 10.1177/1756285613504021. ISBN 10.1177/1756285613504021. Dostupné také z: <http://tan.sagepub.com/cgi/doi/10.1177/1756285613504021>
- MOSSER, D. M. a J. P. EDWARDS. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*. 2008, **8**(12), 958-969. DOI: 10.1038/nri2448. ISSN 1474-1733. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri2448>
- MULENGA, A., Ch. SUGIMOTO a M. ONUMA. Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. *Microbes and Infection*. 2000, **2**(11), 1353-1361. DOI: 10.1016/S1286-4579(00)01289-2. ISSN 12864579. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457900012892>
- MULENGA, A., R. KHUMTHONG a M. A. BLANDON. Molecular and expression analysis of a family of the *Amblyomma americanum* tick Lospins. *Journal of Experimental Biology*. 2007, **210**(18), 3188-3198. DOI: 10.1242/jeb.006494. ISSN 0022-0949. Dostupné také z: <http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.006494>
- MULENGA, A., R. KHUMTHONG a K. C CHALAIRE. *Ixodes scapularis* tick serine proteinase inhibitor (serpin) gene family; annotation and transcriptional analysis. *BMC Genomics*. 2009, **10**(1), 217-. DOI: 10.1186/1471-2164-10-217. ISSN 1471-2164. Dostupné také z: <http://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-10-217>
- MULENGA, A., T. KIM a A. M. G. IBELLI. A mbyomma americanum tick saliva serine protease inhibitor 6 is a cross-class inhibitor of serine proteases and papain-like cysteine proteases that delays plasma clotting and inhibits platelet aggregation. *Insect molecular biology*. 2013, **22**(3), 306–319. DOI: 10.1111/imb.12024. ISBN 10.1111/imb.12024. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/imb.12024>

MÜLLER, W., H. HANAUSKE-ABEL a M. LOOS. *Biosynthesis of the First Component of Complement by Human and Guinea Pig Peritoneal Macrophages: Evidence for an Independent Production of the C1 Subunits*. 1978, **121**(4), 1578-1584. ISSN 1578-1584.

MÜLLEROVÁ, D. a A. AUJEZDSKÁ. *Hygiena, preventivní lékařství a veřejné zdravotnictví*. Praha: Karolinum, 2014, 254 s. ISBN 978-80-246-2510-2.

MURRAY, R. K. *Harperova Biochemie*. 23. vyd., (4. české vyd.), v H. Jinočany: H, 2002. Lange medical book. ISBN 80-731-9013-3.

MUSICH, T., L. LI, L. LIU, S. ZOLLA-PAZNER, M. ROBERT-GUROFF, M. K. GORNY a G. SILVESTRI. Monoclonal Antibodies Specific for the V2, V3, CD4-Binding Site, and gp41 of HIV-1 Mediate Phagocytosis in a Dose-Dependent Manner. *Journal of virology*. 2017, **91**(8). DOI: 10.1128/JVI.02325-16. ISBN 10.1128/JVI.02325-16. Dostupné také z: <http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.02325-16>

NAVA, S., Alberto A. GUGLIELMONE a A. J. MANGOLD. *An overview of systematics and evolution of ticks*. Argentina: Frontiers in Bioscience, 2009, **14**, 2857-2877.

NIEUWENHUIJSEN, M. J., J. GRELLIER, R. SMITH, N. ISZATT, J. BENNETT, N. BEST a M. TOLEDANO. The epidemiology and possible mechanisms of disinfection by-products in drinking water. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* [online]. 2009, **367**(1904), 4043-4076 [cit. 2016-03-21]. DOI: 10.1098/rsta.2009.0116. ISSN 1364-503x. Dostupné z: <http://rsta.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsta.2009.0116>

NISHIDA, Y., S. HOSOMI, H. YAMAGAMI, et al. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio for Predicting Loss of Response to Infliximab in Ulcerative Colitis. *PLoS ONE*. 2017, **12**(1), e0169845. DOI: 10.1371/journal.pone.0169845. ISBN 10.1371/journal.pone.0169845. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0169845>

NUNN, M. A., A. SHARMA, G. C. PAESEN, S. ADAMSON, O. LISSINA, A. C. WILLIS a P. A. NUTTALL. Complement Inhibitor of C5 Activation from the Soft Tick *Ornithodoros moubata*. *The Journal of Immunology*. 2005, **174**(4), 2084-2091. DOI: 10.4049/jimmunol.174.4.2084. ISSN 0022-1767. Dostupné také z: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.174.4.2084>

OBENCHAIN, F. D. a R. GALUN. *Physiology of ticks*. New York: Pergamon Press, 1982. ISBN 978-0080249377.

O'ROURKE, R. A., R. A. WALSH a V. FUSTER. *Kardiologie: Hurstův manuál pro praxi*. Překlad Hana Pospíšilová. Praha: Grada, 2010, xxxi, 767 s. ISBN 978-802-4731-759.

OLIVEIRA, C. J. F., A. SA-NUNES, I. M. B. FRANCISCHETTI, et al. Deconstructing Tick Saliva: NON-PROTEIN MOLECULES WITH POTENT IMMUNOMODULATORY PROPERTIES. *Journal of Biological Chemistry*. 2011, **286**(13), 10960-10969. DOI: 10.1074/jbc.M110.205047. ISSN 0021-9258. Dostupné také z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M110.205047>

OWEN, J. A., J. PUNT a S. STRANDFORD. *Kuby immunology*. 7. Aufl. New York: W.H. Freeman, 2013. ISBN 978-146-4137-846.

PAESEN, G. C., P. L. ADAMS, P. A. NUTTALL a D. L. STUART. Tick histamine-binding proteins: lipocalins with a second binding cavity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2000, **1482**(1-2). DOI: 10.1016/S0167-4838(00)00168-0. ISSN 01674838. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167483800001680>

PÁLENÍKOVÁ, J., J. LIESKOVSKÁ, H. LANGHANSOVÁ, M. KOTSYFAKIS, J. CHMELAR, J. KOPECKÝ a A. J. BÄUMLER. *Ixodes ricinus* Salivary Serpin IRS-2 Affects Th17 Differentiation via Inhibition of the Interleukin-6/STAT-3 Signaling Pathway. *Infection and Immunity*. 2015, **83**(5), 1949-1956. DOI: 10.1128/IAI.03065-14. ISSN 0019-9567. Dostupné také z: <http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.03065-14>

PECKA, M.. *Laboratorní hematologie v přehledu*. Český Těšín: Finidr, 2004. ISBN 80-866-8200-5.

PECKA, M. *Laboratorní monitorování antikoagulační léčby* [online]. 2006 [cit. 2015-03-04]. Dostupné z: http://www.thrombosis.cz/sources/Guidelines-Monitoring_antikoagulace_STH_III062.pdf

PEGRAM, M a D REESE. Combined biological therapy of breast cancer using monoclonal antibodies directed against HER2/ protein and vascular endothelial growth factor. *Seminars in Oncology*. 2005, **29**(3), 29–37. DOI: 10.1016/S0093-7754(02)70124-3. ISBN 10.1016/S0093-7754(02)70124-3. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093775402701243>

PENKA, M. a E. SLAVÍČKOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství*. Praha: Grada, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.

PERIĆ, Z., K. DUBRAVČIĆ, S. BAŠIĆ-KINDA, N. DURAKOVIĆ, A. BOBAN, M. MIKULIĆ, D. BATINIĆ a B. LABAR. Ekulizumab u liječenju paroksizmalne noćne hemoglobinurije. *Medicina Fluminensis*. 2011, **47**(4), 426-431.

PERRET, J.-L. Darkness induces mobility, and saturation deficit limits questing duration, in the tick *Ixodes ricinus*. *Journal of Experimental Biology*. 2003, **206**(11), 1809-1815. DOI: 10.1242/jeb.00345. ISSN 00220949. Dostupné také z: <http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.00345>

PESCOVITZ, M. D. *Rituximab, an Anti-CD20 Monoclonal Antibody: History and Mechanism of Action*. 2006, **6**(5), 859–866. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2006.01288.x. ISBN 10.1111/j.1600-6143.2006.01288.x. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-6143.2006.01288.x>

PICARD, M. a V. R.GALVÃO. Current Knowledge and Management of Hypersensitivity Reactions to Monoclonal Antibodies. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. 2017. DOI: 10.1016/j.jaip.2016.12.001. ISBN 10.1016/j.jaip.2016.12.001. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213219816306195>

PLVAREZ-DÍAZ, S., N. VALLE, J. Miguel GARCÍA, et al. Cystatin D is a candidate tumor suppressor gene induced by vitamin D in human colon cancer cells. *J Clin Invest*. 2009, **119**(8), 2343–2358. DOI: 10.1172/JCI37205. ISBN 10.1172/JCI37205. Dostupné také z: <http://www.jci.org/articles/view/37205>

POLMAN, Chris H., Paul W. O'CONNOR, Eva HAVRDOVA, et al. A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 2006. 2006, **354**, 899-910. DOI: 10.1056/NEJMoa044397. ISBN 10.1056/NEJMoa044397. Dostupné také z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa044397>

PORTER, Lindsay, Željko RADULOVIĆ, Tae KIM, Gloria R.C. BRAZ, Itabajara DA SILVA VAZ a Albert MULENGA. Bioinformatic analyses of male and female *Amblyomma americanum* tick expressed serine protease inhibitors (serpins). *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2016, 6(1), 16–30. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2014.08.002. ISBN 10.1016/j.ttbdis.2014.08.002. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877959X1400171X>

PREISS, M., H. KUČEROVÁ a kol. *Neuropsychologie v psychiatrii*. Grada, 2006. ISBN 80-247-1460-4.

PREVOT, P.-P., B. COUVREUR, V. DENIS, M. BROSSARD, L. VANHAMME a E. GODFROID. Protective immunity against *Ixodes ricinus* induced by a salivary serpin. *Vaccine*. 2007, 25(17), 3284-92. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.01.008. ISBN 10.1016/j.vaccine.2007.01.008. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X07000126>

RAMACHANDRA, R. N. a S. K. WIKEL. Modulation of Host-Immune Responses by Ticks (Acari Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*. 1992, 29(5), 818-826. DOI: 10.1093/jmedent/29.5.818. ISSN 0022-2585. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/jme/article-lookup/doi/10.1093/jmedent/29.5.818>

RAWLINGS, Neil D. a G. SALVESEN. *Handbook of proteolytic enzymes*. Third edition. Oxford: Elsevier's, 2013. ISBN 978-0-12-407742-3.

REY, F. A, F. X HEINZ, Ch. MANDL, Ch. KUNZ a S. C HARRISON. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 angstrom resolution. *Nature*. London, 1995, 375(6529), 291-8.

RIBEIRO, J. M.C. a T. N. MATHER. *Ixodes scapularis*: Salivary Kininase Activity Is a Metallo Dipeptidyl Carboxypeptidase. *Experimental Parasitology*. 1998, 89(2), 213-221. DOI: 10.1006/expr.1998.4296. ISSN 00144894. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489498942965>

RIBEIRO, J. M.C. *Ixodes dammini*: Salivary anti-complement activity. *Experimental Parasitology*. 1987, 64(3), 347-353. DOI: 10.1016/0014-4894(87)90046-4. ISSN 00144894. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0014489487900464>

RIBEIRO, J. M.C., J. J. WEIS a S. R. TELFORD. Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. *Experimental Parasitology*. 1990, 70(4), 382-388. DOI: 10.1016/0014-4894(90)90121-R. ISSN 00144894. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/001448949090121R>

RIEDLBAUCHOVÁ, L.. *Fibrilace síní jako jedna z nejčastějších příčin mozkové mrtvice* [online]. In: . [cit. 2014-11-21]. Dostupné z: <http://www.isenior.cz/zdravi/fibrilace-sini-jako-jedna-z-nejcastejsich-pricin-mozkove-mrtvice>

RITTER, M. A a H LADYMAN. *Monoclonal antibodies: production, engineering, and clinical application*. New York, NY: Published in association with the Royal Postgraduate Medical School, University of London by Cambridge University Press, 1995, xv, 480 p. ISBN 05-214-2503-4.

RUSSELL AND AYLIFFE'S, FRAISE, Adam, Jean-Yves MAILLARD a Sied SATTAR, ed. *Principles and Practice of Disinfection, preservation and sterilization*. Fifth edition. USA: Wiley-Blackwell, 2013.

RYBKA, J.. *Diabetologie pro sestry*. Praha: Grada, 2006, 283 s. ISBN 80-247-1612-7.

S. OLIVERA, A., J. XAVIER-FILHO a M. P.SALES. Cystatine proteinases and Cystatins. *Brasil archives of biology and technology: an international journal*. Brazil: Brazilian archives of biology and technology, 2003, **46**(1), 91-104. ISSN 1516-8913.

SABERSKY, A.. *Zdravá výživa pro těhotné a kojící matky*. Praha: Grada, 2009, 184 s. Pro rodiče. ISBN 978-80-247-2740-0.

SAUER, J R, J L MCSWAIN, A S BOWMAN a R C ESSENBERG. Tick Salivary Gland Physiology. *Annual Review of Entomology*. 1995, **40**(1), 245-267. DOI: 10.1146/annurev.en.40.010195.001333. ISSN 0066-4170. Dostupné také z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.en.40.010195.001333>

SHEPHERD, P. a Ch. DEAN. *Monoclonal antibodies: a practical approach*. New York: Oxford University Press, 2000, xxix, 479 p. ISBN 01-996-3722-9.

SCHECHTER, I. a A. BERGER. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1967, **27**(2), 157-162. DOI: 10.1016/S0006-291X(67)80055-X. ISBN 10.1016/S0006-291X(67)80055-X. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X6780055X>

SCHROEDER, H., V. DAIX, L. GILLET, J.-Ch. RENAULD a Alain VANDERPLASSCHEN. The paralogous salivary anti-complement proteins IRAC I and IRAC II encoded by *Ixodes ricinus* ticks have broad and complementary inhibitory activities against the complement of different host species. *Microbes and Infection*. 2007, **9**(2), 247-250. DOI: 10.1016/j.micinf.2006.10.020. ISSN 12864579. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1286457906003832>

SILBERNAGL, S. a A. DESPOPOULOS. *Atlas fyziologie člověka*. 6. přeprac. a rozš. vyd. Praha: Grada, 2004, XII, 435 s. ISBN 80-247-0630-X.

SILVERMAN, G., P. BIRD, R. CARRELL, et al. The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. *JBC Papers in Press*. 2001, (R100016200), 36.

SKALLOVÁ, A., G. IEZZI, F. AMPENBERGER, M. KOPF a J. KOPECKÝ. Tick Saliva Inhibits Dendritic Cell Migration, Maturation, and Function while Promoting Development of Th2 Responses. *The Journal of Immunology*. 2008, **180**(9), 6186-6192. DOI: 10.4049/jimmunol.180.9.6186. ISSN 0022-1767. Dostupné také z: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.180.9.6186>

SONENSHINE, D. E. a R. Michael. ROE. *Biology of ticks*. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 2014. ISBN 01-997-4406-8.

SPELLMAN, F. *Choosing Disinfection Alternatives for Water/Wastewater Treatment Plants*. USA: CRC Press, 1999.

SPRONG, H., P. R WIELINGA, M. FONVILLE, Ch. REUSKEN, A. H BRANDENBURG, F. BORGSTEEDE, C. GAASENBEEK a J. WB VAN DER GIESSEN. *Ixodes ricinus* ticks are reservoir hosts for Rickettsia helvetica and potentially carry flea-borne Rickettsia species. *Parasites*. 2009, **2**(1), 41-. DOI: 10.1186/1756-3305-2-41. ISSN 1756-3305. Dostupné také z: <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-2-41>

SVAČINA, Š. Laktátová acidóza. In: *MedicaBaze.cz* [online]. 2007 [cit. 2016-01-11]. Dostupné z: http://medicabaze.cz/index.php?&sec=term_detail&termId=544&tname=Lakt%C3%A1tov%C3%A1+acid%C3%B3za

ŠVELA, K. a P. ŠEVČÍK. *Akutní intoxikace a léková poškození v intenzivní medicíně*. 2., dopl. a aktualiz. vyd. Praha: Grada, 2011, 328 s. ISBN 978-80-247-3146-9.

ŠIMO, L., J. KOČI, D. ŽITŇAN, Y. PARK a I. HANSEN. Evidence for D1 Dopamine Receptor Activation by a Paracrine Signal of Dopamine in Tick Salivary Glands. *Plos One*. 2011, (January 31). DOI: 10.1371/journal.pone.0016158. ISBN 10.1371/journal.pone.0016158. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0016158>

ŠKODA, O.. Antiagregační léčba po ischemické cévní mozkové příhodě. In: *Interní medicína* [online]. 2006 [cit. 2017-04-10]. Dostupné z: <http://www.internimedica.cz/pdfs/int/2006/12/05.pdf>

ŠPINAR, J. a J. VÍTOVEC. *Jak dobře žít s nemocným srdcem*. Praha: Grada Publishing, 2007, 255 s. ISBN 978-802-4718-224.

ŠTEJFA, M.. *Kardiologie*. 3., přepr. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2007, xxxiii, 722 s. ISBN 978-802-4713-854.

ŠTEMBERA, Z., J. DITTRICHOVÁ a D. SOBOTKOVÁ. *Perinatální neuropsychická morbidita dítěte*. V Praze: Karolinum, 2014, 659 s. ISBN 978-80-246-2168-5.

ŠTÍPAL, R. *Základy vnitřního lékařství I*. Opava: Slezská univerzita v Opavě, Fakulta veřejných politik v Opavě, Ústav ošetřovatelství, 2012, 122 s. ISBN 978-80-7248-734-9.

TAYLOR, M. M., R. M. VERMA, A. PARKE, et al. Basiliximab (Simulect) for the treatment of steroid-resistant rejection in pediatric liver transplant recipients: a preliminary experience. *Transplantation*. 2003, **75**(6), 796-799.

TAYLOR, P.R., L. MARTINEZ-POMARES, M. STACEY, H-H. LIN, G.D. BROWN a S. GORDON. Macrophage receptors and immune recognition. *Annual Review of Immunology*. 2005, **23**(1). DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115816. ISSN 0732-0582. Dostupné také z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115816>

TESAŘ, V. a O. SCHÜCK. *Klinická nefrologie*. Praha: Grada, 2006, 650 s. ISBN 80-247-0503-6.

THIEL, S., B. STEEN, T. VORUP-JENSEN, C. M STOVER, W. SCHWAEBLE a B LAURSEN ET AL. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature*. London, 1997, **386-6624**(April 3), 506-10.

TIRLONI, Lucas, Adriana SEIXAS, Albert MULENGA, Itabajara DA SILVA VAZ a Carlos TERMIGNONI. A family of serine protease inhibitors (serpins) in the cattle tick *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus. *Experimental Parasitology*. 2014, **137**, 25–34. DOI: 10.1016/j.exppara.2013.12.001. ISBN 10.1016/j.exppara.2013.12.001. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489413003044>

TITUS, R. G., J. V. BISHOP a J. S. MEJIA. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunology*. 2006, , 060222011842002-. DOI: 10.1111/j.1365-3024.2006.00807.x. ISSN 0141-9838. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3024.2006.00807.x>

TOL, J. a C.J.A. PUNT. Monoclonal antibodies in the treatment of metastatic colorectal cancer: A review. *Clinical Therapeutics*. 2010, **32**(3), 437-453. DOI: 10.1016/j.clinthera.2010.03.012. ISBN 10.1016/j.clinthera.2010.03.012. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149291810001037>

TOMESCU, C., P. TEBAS a L. J. MONTANER. IFN- α augments natural killer-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity of HIV-1-infected autologous CD4 T cells regardless of major histocompatibility complex class I downregulation. *An official international AIDS society journal*. **31**(5), 613–622. DOI: 10.1097/QAD.0000000000001380. ISBN 10.1097/QAD.0000000000001380. Dostupné také z: <http://Insights.ovid.com/crossref?an=00002030-201703130-00002>

TOSI, M F, H ZAKEM a M BERGER. Neutrophil elastase cleaves C3bi on opsonized pseudomonas as well as CR1 on neutrophils to create a functionally important opsonin receptor mismatch. *Journal of Clinical Investigation*. 1990-7-1, **86**(1), 300-308. DOI: 10.1172/JCI114699. ISSN 0021-9738. Dostupné také z: <http://www.jci.org/articles/view/114699>

TROJAN, S. *Lékařská fyziologie*. Vyd. 4., přeprac. a dopl. Praha: Grada, 2003. ISBN 80-247-0512-5.

TURK, B., D. TURK a V. TURK. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2000, **1477**(1-2), 98-111. DOI: 10.1016/S0167-4838(99)00263-0. ISBN 10.1016/S0167-4838(99)00263-0. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167483899002630>

TURK, V. a W. BODE. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *Federation of European Biochemical Societies*. Germany, 1991, **285**(2), 213-219.

VALENZUELA, J. G. Exploring tick saliva: from biochemistry to ‘sialomes’ and functional genomics. *Parasitology*. 1999, **129**(7), S83-S94. DOI: 10.1017/S0031182004005189. ISSN 0031-1820. Dostupné také z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182004005189

VAN ASSCHE, Gert, Marc VAN RANST, Raf SCIOT, et al. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy after Natalizumab Therapy for Crohn's Disease. *N Engl J Med*. 2005, **353**, 362-368. DOI: 10.1056/NEJMoa051586. ISBN 10.1056/NEJMoa051586. Dostupné také z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa051586>

VAN GENT, D., P. SHARP, K. MORGAN a N. KALSHEKER. Serpins: structure, function and molecular evolution. *The International Journal of Biochemistry*. 2003, **35**(11), 1536-1547. DOI: 10.1016/S1357-2725(03)00134-1. ISSN 13572725. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272503001341>

VINCENTI, F., R. KIRKMAN, S. LIGHT, et al. Interleukin-2–Receptor Blockade with Daclizumab to Prevent Acute Rejection in Renal Transplantation. *New England Journal of Medicine*. 1998, **338**(3), 161-165. DOI: 10.1056/NEJM199801153380304. ISSN 0028-4793. Dostupné také z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199801153380304>

VÍTOVEC, J. a J. ŠPINAR. *Farmakoterapie kardiovaskulárních onemocnění*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2004, 248 s. ISBN 80-247-0866-3.

VLASUK, GP, D RAMJIT, T FUJITA, CT DUNWIDDIE, EM NUTT, DE SMITH a RJ SHEBUSKI. Comparison of the in vivo anticoagulant properties of standard heparin and the highly selective factor Xa inhibitors antistasin and tick anticoagulant peptide (TAP) in a rabbit model of venous thrombosis. *Thrombosis and Haemostasis*. 1991, **65**(3), 257-262.

VLČEK, J. a D. FIALOVÁ. *Klinická farmacie I*. Praha: Grada, 2010, 368, [2] s. ISBN 978-802-4731-698.

VOJÁČEK, J. a M. MALÝ. *Arteriální a žilní trombóza v klinické praxi*. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0501-X.

VOKURKA, M. a J. HUGO. *Praktický slovník medicíny*. 7., rozš. vyd. Praha: Maxdorf, 2004, xv, 490 s. ISBN 80-734-5009-7.

WALDMANN, T. Monoclonal antibodies in diagnosis and therapy. *Science*. 1991, **252**(5013), 1657-1662. DOI: 10.1126/science.2047874. ISSN 0036-8075. Dostupné také z: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.2047874>

WALLACE, D. J, Vibeke STRAND, Joan T MERRILL, et al. Efficacy and safety of an interleukin 6 monoclonal antibody for the treatment of systemic lupus erythematosus: a phase II dose-ranging randomised controlled trial. *Annals of the rheumatic diseases*. 2017, **76**(3), 534-542. DOI: 10.1136/annrheumdis-2016-209668. ISBN 10.1136/annrheumdis-2016-209668. Dostupné také z: <http://ard.bmj.com/lookup/doi/10.1136/annrheumdis-2016-209668>

WAXMAN, L., D. SMITH, K. ARCURI a G.VLASUK. *Science*. Washington, 1990, **248**(4955), 593.

WEINER, L. M., R. SURANA a S.WANG. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*. 2010, **10**, 317-327. DOI: 10.1038/nri2744. ISBN 10.1038/nri2744. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/nri2744>

WIKEL, S.K a D BERGMAN. Tick-host immunology: Significant advances and challenging opportunities. *Parasitology Today*. 1997, **13**(10), 383-389. DOI: 10.1016/S0169-4758(97)01126-5. ISSN 01694758. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169475897011265>

WIKEL, S. K. Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. *International Journal for Parasitology*. 1999, **29**(6), 851-859. DOI: 10.1016/S0020-7519(99)00042-9. ISSN 00207519. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751999000429>

WIKEL, S. K. Host Immunity to Ticks. *Annual Review of Entomology*. 1996, **41**(1), 1-22. DOI: 10.1146/annurev.en.41.010196.000245. ISSN 0066-4170. Dostupné také z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.en.41.010196.000245>

WIKEL, S.. Ticks and tick-borne pathogens at the cutaneous interface: host defenses, tick countermeasures, and a suitable environment for pathogen establishment. *Frontiers in Microbiology*. 2013, **4**, -. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00337. ISSN 1664-302x. Dostupné také z: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2013.00337/abstract>

WILLADSEN, P. a F. JONGEJAN. Immunology of the Tick–Host Interaction and the Control of Ticks and Tick-borne Diseases. *Parasitology Today*. 1999, **15**(7), 258-262. DOI: 10.1016/S0169-4758(99)01472-6. ISSN 01694758. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169475899014726>

WILSON, K. a J. M. WALKER. *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. 7th ed. New York: Cambridge University Press, 2009. ISBN 978-0-521-51635-8.

YAN, M, M SAMENI a BF SLOANE. Cathepsin B and human tumor progression. *BioChem*. Detroit, USA, 1998, **379**(2), 113-23.

YANO, M., K. HIRAI, Z. NAITO, M. YOKOYAMA, T. ISHIWATA, Y. SHIRAKI, M. INOKUCHI a G. ASANO. Expression of Cathepsin B and Cystatin C in Human Breast Cancer. *Surgery today*. 2001, **31**(5), 385–389. DOI: 10.1007/s005950170126. ISBN 10.1007/s005950170126. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s005950170126>

ZHAO, L., A. S. CAVALLARO, D. WIBOWO, et al. A partially purified outer membrane protein VirB9-1 for low-cost nanovaccines against *Anaplasma marginale*. *Vaccine*. 2017, **35**(1), 77-83. DOI: 10.1016/j.vaccine.2016.11.037. ISBN 10.1016/j.vaccine.2016.11.037. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X16310982>

ZHENG, Jack Y. a Linda J. JANIS. Influence of pH, buffer species, and storage temperature on physicochemical stability of a humanized monoclonal antibody LA298. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006, **308**(1-2), 46-51. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2005.10.024. ISSN 03785173. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517305007076>

ZHOU, J., M. UEDA, R. UMEMIYA, B. BATTSETSEG, D. BOLDBAATAR, X. XUAN a K. FUJISAKI. A secreted cystatin from the tick *Haemaphysalis longicornis* and its distinct expression patterns in relation to innate immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2016, **36**(7), 527–535. DOI: 10.1016/j.ibmb.2006.03.003. ISBN 10.1016/j.ibmb.2006.03.003. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174806000701>