Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity

Bakalářská práce:

IMUNOLOKALIZACE TRÁVICÍCH PEPTIDÁZ V NYMFÁCH KLÍŠTĚTE *IXODES RICINUS* V PRŮBĚHU SÁNÍ NA HOSTITELI A BĚHEM PŘEMĚNY NA DOSPĚLCE

Jana Schrenková

Školitel specialista: Mgr. Helena Frantová

Školitel: RNDr. Petr Kopáček, CSc.

České Budějovice 2011

Schrenková, J., 2011: Imunolokalizace trávicích peptidáz nymf klíštěte *Ixodes ricinus* v průběhu sání na hostiteli a během přeměny na dospělce [Immunolocalization of the digestive peptidases in the nymf of the hard tick *Ixodes ricinus* during feeding and throughout metamorphosis, Bc. Thesis, in Czech] – 36 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:
Morphology changes in the gut structure of *Ixodes ricinus* nymphs during blood feeding and metamorphosis to adult was studied by light microscopy. Indirect immunofluorescence was used to localize digestive peptidases (cathepsin B and cathepsin L) during this process.

Tato práce byla vypracována s podporou grantu GAAV – IAA 600960910 (řešitel P. Kopáček).

Prohlašuji, že svoji bakalářskou 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 bakalářské 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 29. dubna 2011 Jana Schrenková

Děkuji především své školitelce Mgr. Heleně Frantové za nesmírnou trpělivost a čas, který mi věnovala. Za veškeré poznatky z laboratorní práce na tomto tématu vděčím právě jí. Dále bych chtěla poděkovat vedoucímu práce RNDr. Petru Kopáčkovi, CSc., který mi umožnil práci na tomto zajímavém projektu. Mé díky patří také pracovnicím a pracovníkům laboratoře elektronové mikroskopie, kteří mi vždy ochotně poradili a vyšli vstříc i ve svém osobním volnu. Dále děkuji zaměstnancům naší laboratoře za pomoc při orientaci v laboratořích.
V neposlední řadě děkuji rodině, která mě podporuje při studiu na vysoké škole.

Obsah

1. Úvod 1

1.1 Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) 1

1.2 Střevo klíšťat z čeledi *Ixodidae* 3

1.2.1 Trávení hostitelské krve u samic 4

1.2.2 Trávení hostitelské krve u nymf 5

1.3 Peptidázy účastnící se trávení krve u *Ixodes ricinus* 6

2. Cíle práce 8

3. Materiál a metody 9

3.1 Chov nymf *Ixodes ricinus* 9

3.2 Histochemie – LR White 9

3.3 Histochemie – EPON 11

3.4 Imunocytochemie na polotenkých řezech 11

4. Výsledky a diskuze 13

4.1 Změny morfologie střeva nymfy klíštěte *Ixodes ricinus* v průběhu a po ukončení sání 13

4.2 Lokalizace trávicích peptidáz ve střevech nymf klíšťat *Ixodes ricinus* 20

4.2.1 Imunolokalizace katepsinu B 20

4.2.2 Imunolokalizace katepsinu L 27

5. Závěr 33

6. Literatura 34

Seznam použitých zkratek

BSA (Sigma – Aldrich)	bovinní sérový albumin
DABCO (Sigma – Aldrich)	1,4 diazabicyklo [2.2.2] octane
DAPI (Sigma – Aldrich)	4´, 6 – diamidino – 2 – fenylindol
PBS	fyziologický fosfátový pufr (8g NaCl, 0,2g KH_2PO_4, 2,9g Na_2HPO_4, 0,2g KCl do 1l dH_2O
PBS – T	fyziologický fosfátový pufr s Tween® 20; 0.3% (Sigma – Aldrich)
LR White (London Resin Company Ldt.)	pryskyřice (Medium Grade Acrylic Resin) + akcelerátor (benzoyl peroxide powder stabilized) v koncentraci 0,02 g/ml
EPON	epoxidová pryskyřice, složení: Poly/Bed® 812 (Polyscience, Inc.) 51.13g DDSA – Dodecenylsuccinic Anhydride (Polyscience, Inc.) 27, DMP 30 – Epoxy akcelerátor (SPI-CHEM) 2 ml NMA – Nadic Methyl Anhydride (Polyscience, Inc.) 24,84g
IrCB	katepsin B
IrCL	katepsin L

1. Úvod

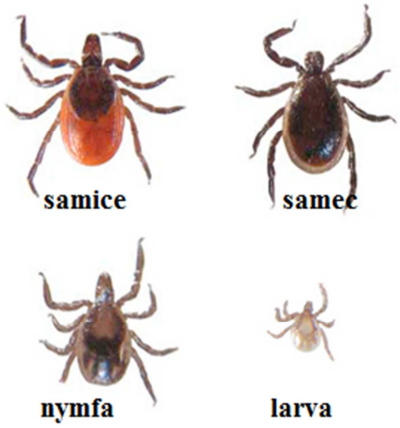
Klíšťata patří do kmene *Arthropoda*, podkmene *Chelicerata*, třídy *Arachnida* a do řádu *Acarina*. Dle nejnovějších studií rozlišujeme 896 druhů ve třech čedích: *Ixodidae* (klíšťata), *Argasidae* (klíšťáci) a *Nuttalliellidae*. Čeleď *Ixodidae* čítá 702 druhů ve 14 rodech, z nichž nejznámější rody jsou *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes* a *Rhipicephalus* (Guglielmone a kol. 2010).

Přestože rod *Ixodes* čítá v současnosti 243 druhů, v České republice se téměř výhradně setkáváme s klíštětem obecným *Ixodes ricinus*, které bylo popsáno Carlem von Linné v roce 1758 (Horak a kol., 2002). Klíšťata jsou krev sající ektoparazité a zároveň významní přenašeči chorob postihující nejen zvířata, ale i člověka (Jongejan, Uilenberg, 2004). Mezi nejnebezpečnější choroby způsobené patogeny klíštěte *Ixodes ricinus* patří klíšťová encefalitida, jejímž původcem je neurotropní *flavivirus*, lymeská borelióza, která je způsobena spirochétami *Borrelia burgodorferi* sensu lato (Nutall, 1999), tularémie způsobená bakterií *Francisella tularensis*, Q-horečka (riketsie *Coxiella*), erlichióza (riketsie *Ehrlichia* spp.), horečka Skalistých hor (*Rickettsia - rickettsii*) a jiné nebezpečné choroby (Volf, Horák a kol., 2007).

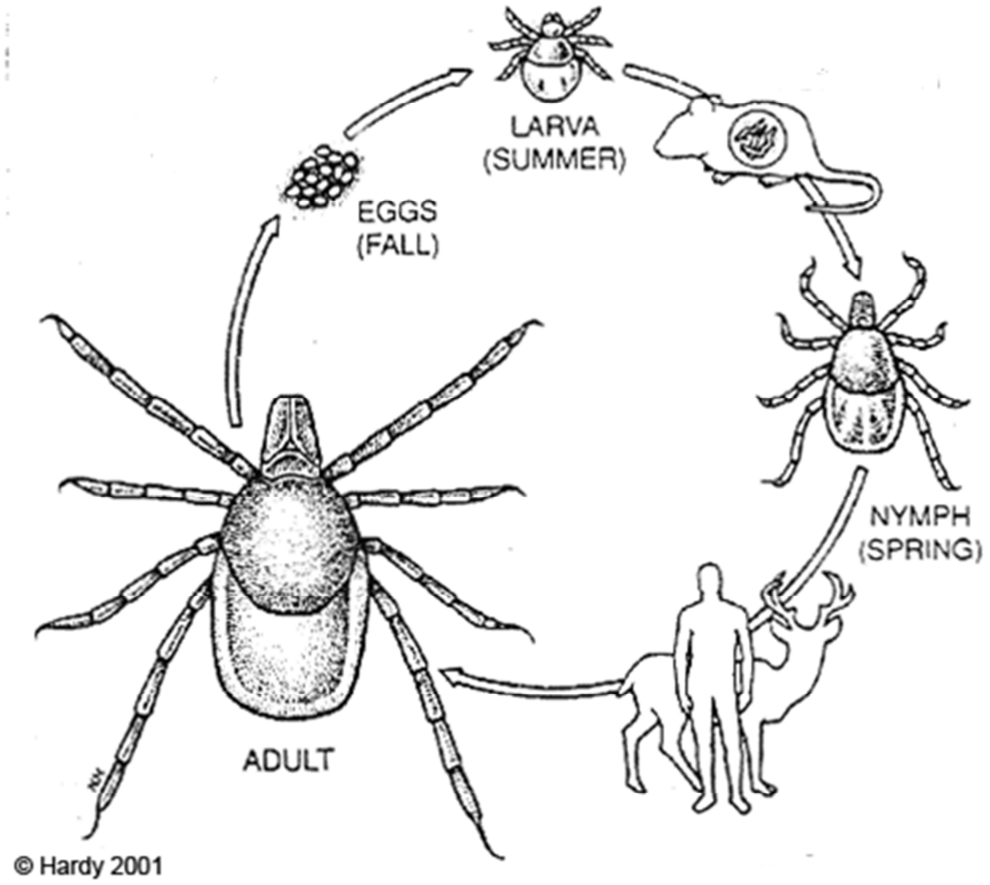
1.1 Klíště obecné (*Ixodes ricinus*)

Druh *Ixodes ricinus* (klíště obecné) je co do četnosti nejrozšířenějším druhem v Evropě. Řadí se mezi tzv. „tvrdá klíšťata“, protože má na hřbetní straně těla typický tvrdý štítek. Tento štítek je větší u samců než u samic. Díky tomu mohou samice během sání několikanásobně zvětšit svůj objem a získat tak dostatek energie pro tvorbu vajíček (Volf, Horák a kol., 2007). *Ixodes ricinus* se vyskytuje především na vlhkých a teplých stanovištích, v závislosti na počasí, a to od března do listopadu (Volf, Horák a kol., 2007). Ideální je pro něj listnatý les s dostatečným podrostem, dále se může vyskytovat například v senících. Jen výjimečně se objevuje v nadmořské výšce přesahující hranici 1000 metrů (Gray, 1991). Najdeme jej v mírném pásmu severní polokoule. Nejvíce je rozšířeno v Evropě a Asii, naleznout jej však můžeme také severní části Afriky. Jedná se o typický trojhostitelský druh (Volf a Horák, 2007).

Jednotlivé metamorfózy probíhají vždy mimo hostitele. Jsou podmíněny vyhledáním hostitele nového, dále jsou ovlivněny teplotou (při poklesu teploty pod 15 – 18 °C přeměna neprobíhá) a množstvím přijaté krve. Tvrdá klíšťata mají čtyři vývojová stádia – vajíčko, larvu, nymfu, dospělce (obr. 1). Samice, která produkuje 2500 – 4000 vajíček, po jejich nakladení umírá. Klidové stádium před obdobím sání může trvat 6 měsíců až 1 rok. Proto jsou tito parazité schopni přežívat i v chladných nebo suchých obdobích roku. Z vajíčka se líhne velmi malá larva, která má 3 páry nohou a měří přibližně 0,8 mm. Parazituje na drobných hlodavcích, ze kterých po nasátí (4 – 5 dní) odpadá a přeměňuje se na nymfu. Nymfa je stádiem vyššího vývojového stupně, dochází u ní k přeměně všech larválních orgánů. Je větší (1,2 – 1,5 mm) a má 4 páry nohou. Vyhledává větší hostitele, jakými jsou zajíci, ježci, psi, kočky, parazituje také na člověku. Délka sání nymfy se pohybuje v rozmezí 3 – 5 dnů. Po plném nasání nymfa odpadá a prochází konečnou metamorfózou na dospělého jedince (imago), který je schopný reprodukce. Samice jsou větší (3,5 – 4,5 mm) a parazitují především na zvěři, liškách, koních, dobytku, kočkách, psech, ale také na člověku. Velikost nasáté samice může být až 1,5 cm. Doba sání se pohybuje v rozmezí šesti až devíti týdnů, poté samice naklade vajíčka a umírá. Samci jsou výrazně menší (2,5 mm) a již nesají (pouze výjimečně), jejich posláním je oplodnit samici. Samotné oplození se odehrává na hostiteli (Ryšavý a kol., 1988), protože právě hostitel je nejpravděpodobnějším místem vzájemného setkání opačných pohlaví (Volf, Horák a kol., 2007). Celý vývojový cyklus od vajíčka až po reprodukce schopného jedince trvá 1 – 5 let, v našich zeměpisných šířkách nejčastěji 2 – 3 roky (obr. 2).



Obr. 1: Vývojová stádia klíšťat z čeledi *Ixodidae*, upraveno dle www.tickencounter.org.



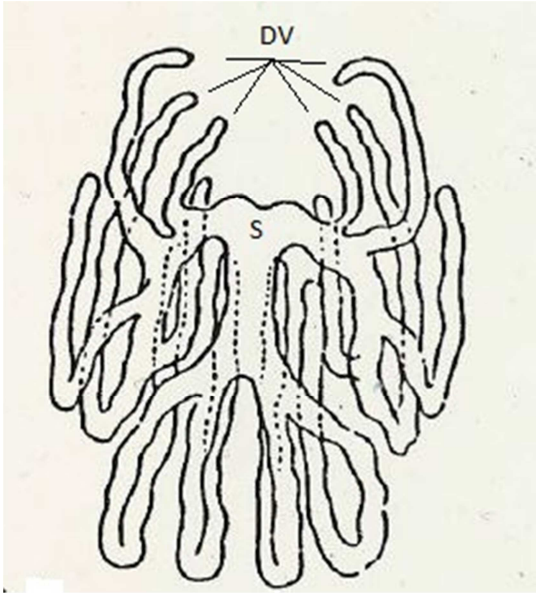
Obr. 2: Schéma vývojového cyklu klíšťat z čeledi *Ixodidae*, upraveno dle www.wwhd.org.

1.2 Střevo klíšťat z čeledi *Ixodidae*

Střevo je největším orgánem klíštěte. Jedná se o orgán, který podobně jako u obratlovců umožňuje trávení, zároveň je i hlavním zásobním orgánem. Je rozděleno do třech částí: přední střevo – foregut, střední střevo – midgut (zde dochází k trávení hostitelské krve), zadní střevo – hindgut. S výjimkou hemolýzy krevních buněk, která probíhá ve střevní dutině, veškeré další trávení probíhá nitrobuněčně (Sonenshine, 1991).

Střevo se skládá z krátké válcovité centrální části (stomach, žaludek) a ze sedmi párů válcovitých výběžků (obr. 3). U nenasátých jedinců a u výjimečně sajících samců mají tyto vychlípeniny (diverticulae) úzký trubicovitý tvar, zatímco u sajících samic tvar širokého vaku. Na rozdíl od morfologické rozmanitosti střeva, je jeho histologická struktura ve všech částech velmi podobná. Stěny střeva jsou tvořeny epitelem. Tyto epiteliální buňky nasedají na tenkou bazální membránu, která je protkána sítí svalových vláken. Střevní epitel se skládá ze dvou

typů buněk – z rezervních (zásobních) a trávicích. Z rezervních buněk střev vznikají buňky se specializovanou funkcí. Starší studie využívající světelné a elektronové mikroskopie tvrdí, že z rezervních buněk vznikají buňky sekreční a buňky trávicí (Raikhel, 1983). Avšak podle studií novějších (Sonenshine, 1991, Agyei, 1992), jsou buňky vzniklé diferenciací rezervní buňky schopny plnit obě funkce, sekreční i trávicí. U nenasátých (hladovějících) jedinců jsou v epitelu střeva přítomny pouze rezervní buňky a dále trávicí buňky zachované z předcházejícího vývojového stádia (Raikhel, 1983).



Obr. 3: Schéma stavby střeva klíšťat z čeledi *Ixodidae*, DV – slepé výběžky střeva (diverticulae), S – žaludek (stomach), upraveno dle Sonenshine, 1991.

1.2.1 Trávení hostitelské krve u samic

Samice přijímá krev hostitele ve dvou fázích. Příjem krve je nejdříve pomalý, v této první fázi se krev akumuluje a zároveň dochází k tzv. první kontinuální fázi trávení. V této fázi se objevují buňky, ze kterých se uvolňují sekreční granula v procesu exocytózy. Tato granula obsahují glykoproteinový materiál s enzymy, které způsobují rozpad (hemolýzu) erytrocytů (Miyoshi a kol., 2007). Složky hostitelské krve (hemoglobin, leukocyty, granula leukocytů) jsou receptory zprostředkovanou endocytózou a fagocytózou ve formě váčků transportovány do buněk. V cytoplasmě trávicích buněk vznikají trávicí vakuoly (endozomy), které fúzují s lysozomy. Trávení tedy probíhá v endo/lysozomálních váčcích uvnitř trávicích

buněk. V druhé fázi sání dochází k výraznému zvyšování objemu přijaté krve a tím k natažení střevní stěny. Tato fáze trvá 12 – 36 hodin a je podmíněna oplodněním samice. Během této fáze dochází ke zpomalování trávení, neboť je většina energie vynaložena na příjem krve. Složky krve jsou ukládány do endozomů v trávicích buňkách, a sice do jejich apikálních částí (Sonenshine, 1991).

Po ukončení sání na hostiteli nastává druhá kontinuální fáze trávení. Z velkých endozomů vznikají sekundární lysozomy a následně reziduální tělíska (hemozomy) obsahující agregované krevní barvivo - hem. Oplodněné samice se v této fázi připravují na produkci vajíček (Sonenshine, 1991).

1.2.2 Trávení hostitelské krve u nymf

Zatímco u nenasátých a jeden a půl dne sajících nymf je střevo velmi malé, u nymf sajících déle dochází k jeho značnému zvětšení (obr. 4). Současně dochází k zesílení stěny střeva jako reakce na zvýšení objemu přijaté krve. Střevní epitel je u nenasátých nymf tvořen vrstvou trávicích buněk, v jejichž cytoplasmě jsou přítomny velké endozomy.

Asi 12 hodin po přisátí, v tzv. přípravné fázi, mají trávicí buňky s nižší aktivitou podobný tvar jako trávicí buňky u nenasátých nymf. Dochází ale k nápadnému zmenšení endozomů a následnému zvýšení počtu reziduálních tělísek (Koh a kol., 1991).

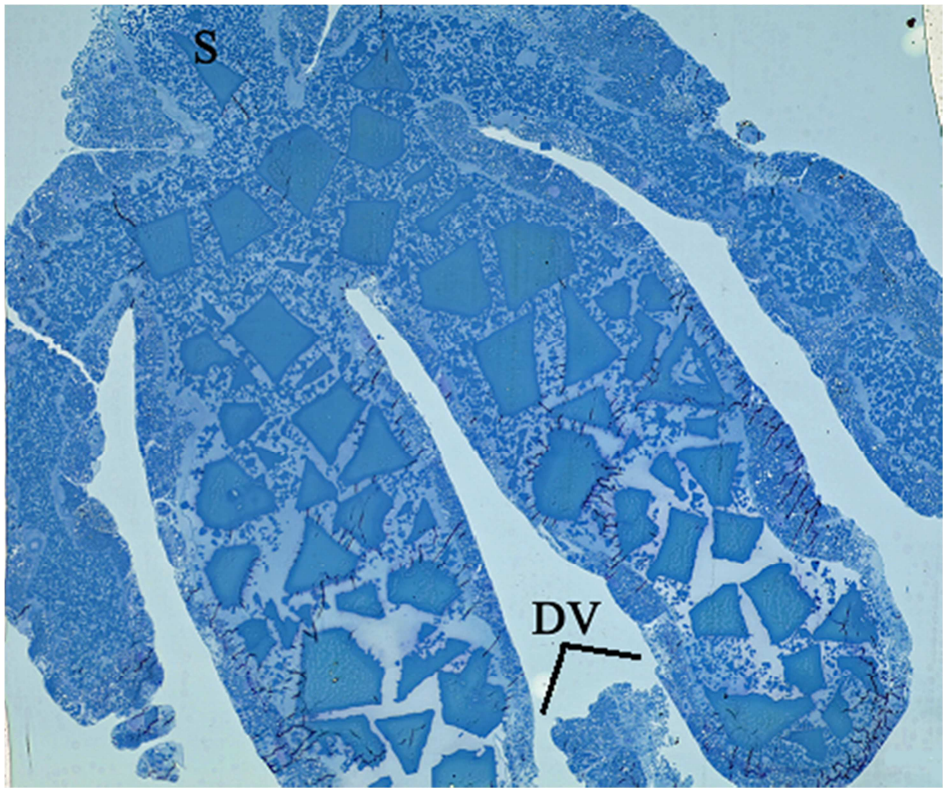
Během růstové fáze, která nastává 2,5 dne po přisátí, dochází ke zvyšování aktivity trávicích buněk, které začínají akumulovat reziduální tělíska. Buňky přeplněné těmito tělísky vystupují do nitra střeva, dochází k jejich oddělení od bazální membrány a jejich obsah je uvolněn do střeva. Poté jsou nahrazeny buňkami novými.

K největšímu rozpínání epitelu střeva dochází asi 3,5 dne po přisátí během zvětšovací fáze, kdy se trávicí buňky objevují jen v nízkém počtu.

V den, kdy se nymfa oddělí od hostitele, je epitel tvořen trávicími buňkami kvádrovitého tvaru a v jejich cytoplasmě je přítomno mnoho velkých endozomů.

Tři dny po oddělení nymfy se lumen střeva uzavírá zduřelými trávicími buňkami, které obsahují množství endozomů, které obsahují reziduální tělíska.

Týden po oddělení nymfy od hostitele dochází v trávicích buňkách ke snižování počtu a velikosti endozomů, zatímco množství hemozomů roste (Koh a kol., 1991).



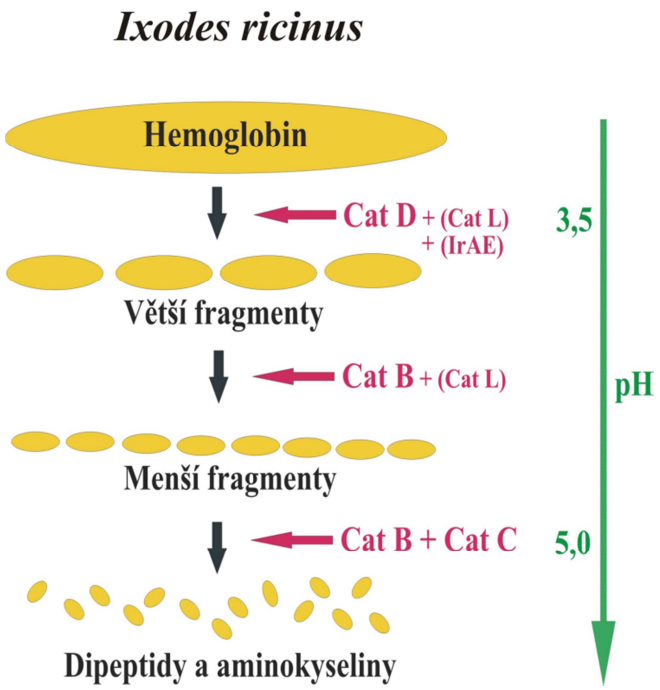
Obr. 4: Stavba střeva nymfy klíštěte *Ixodes ricinus* dva týdny po ukončení sání na hostiteli, v střevním lumen jsou nápadné krystaly hemoglobinu. DV – slepé výběžky střeva (diverticulae), S – žaludek (stomach), barveno toluidinovou modří.

1.3 Peptidázy účastnící se trávení krve u *Ixodes ricinus*

Trávicí peptidázy obecně hrají důležitou roli v mnoha fyziologických procesech. Tyto enzymy se účastní trávení, aktivace a modelace proteinů a v biologickém systému byly identifikovány od virů až po obratlovce. Podle místa štěpení substrátu je dělíme na endopeptidázy a exopeptidázy dále pak z hlediska mechanismu účinku na proteázy serinové, cysteinové, aspartátové a metaloproteázy (Vodrážka, 2002). U krev sajícího hmyzu se trávení krve účastní serinové proteázy, které byly podrobně studovány např. u komára *Aedes aegypti* (Volf, Horák a kol., 2007).

Na trávení krve u klíšťat se podílí především cysteinové a aspartátové proteázy. Zkoumáním těchto proteáz u klíšťat se zabývala celá řada studií (Sojka a kol., 2008). Trávicí peptidázy jsou přítomny v trávicích vakuolách střevních buněk, kde je jejich nejdůležitější funkcí trávení přijatého hemoglobinu a ostatních proteinů z hostitelské krve Mezi trávicí

enzymy klíšťat patří cysteinové peptidázy katepsin B, L, C, asparaginylová endopeptidáza (legumain – IrAE) a aspartátová peptidáza – katepsin D (Sojka a kol., 2008). Primárního štěpení hemoglobinu se účastní katepsin D, který je podporován katepsinem L a legumainem (IrAE). Do procesu štěpení se dále zapojuje katepsin B, který je zodpovědný za vznik menších fragmentů. Rozštěpení těchto fragmentů na dipeptidy a na jednotlivé aminokyseliny způsobuje exopeptidázová aktivita katepsinu B a C (obr. 5). Co do množství jsou katepsin B a C ve střevní tkáni zastoupeny v daleko větším množství než katepsin D, L a legumain. Hemoglobin je optimálně štěpen při pH 3,5 – 4,5. Při vzestupu hodnoty pH nad 5,5 štěpení již neprobíhá (Horn a kol., 2009). Klíštěcí peptidázy hrají rovněž významnou úlohu při přenosu infekčních onemocnění. Mohou patogeny zabít nebo jsou naopak potřebné ke spuštění dějů, které umožní patogenovi pokračovat v životním cyklu (Volf, Horák a kol., 2007)



Obr. 5: Degradace hemoglobinu v trávicích vakuolách trávicích buněk ve střevě *Ixodes ricinus* za účasti trávicích peptidáz (upraveno dle Horn a kol., 2009).

2. Cíle práce

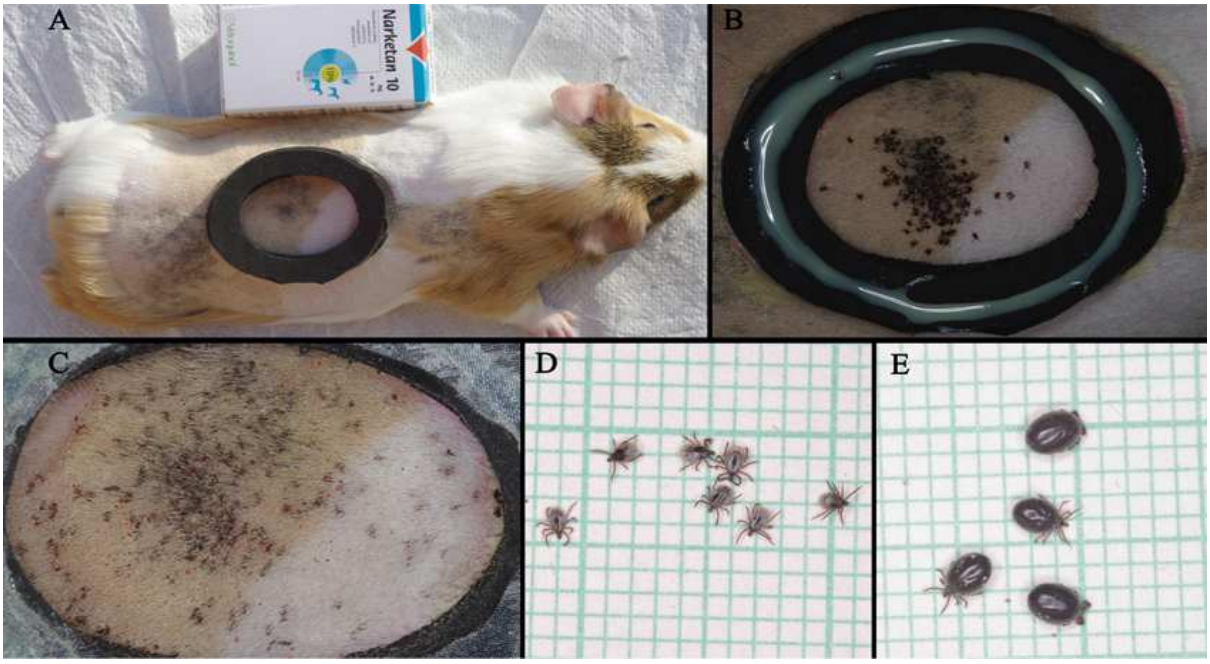
1. Studium morfologie střeva nymf *Ixodes ricinus* v průběhu sání a metamorfózy.

2. Detekce klíštěcích katepsinů B a L ve střevech nymf *Ixodes ricinus* nepřímou imunofluorescencí v průběhu sání a metamorfózy.

3. Materiál a metody

3.1 Chov nymf *Ixodes ricinus*

Nymfy klíšťat *Ixodes ricinus* byly uměle odchovány v laboratorním chovu Parazitologického ústavu Akademie věd České republiky v Českých Budějovicích. Byly uchovávány ve skleněných boxech o vlhkosti 95% a konstantní teplotě vzduchu 24°C. V následujících pokusech nymfy sály na laboratorním morčeti, na němž byly upevněny pomocí pryžového kloboučku (obr. 6).



Obr. 6: **A**: laboratorní morče, **B**: nymfy v pryžovém kloboučku, **C**: nymfy sající na hostiteli, **D**: nenasáté nymfy, **E**: nymfy plně nasáté, foto Jan Erhart.

3.2 Histochemie – LR White

Střeva nymf, použitá pro následující pokusy, byla pitvána v rozdílných časových intervalech (nymfy nenasáté, jeden, dva a tři dny sající na morčeti, plně nasáté, týden, dva, tři a čtyři týdny po plném nasátí). Vždy v přibližně stejnou denní dobu.

Nymfy byly přichyceny na podložní sklo pomocí oboustranné lepicí pásky a zdravotnické textilní náplasti. Byly pitvány pomocí skalpelu pod binokulárním mikroskopem v Petriho misce a promývány v roztoku PBS. Po odstranění posteriorní kutikuly pinzetou bylo střevo přeneseno do 2% agaru (předehřátého na teplotu 100°C a poté ochlazeného na teplotu 62°C). Agar byl použit z důvodů malých velikostí střev u nenasátých, resp. u střev jeden, dva a tři dny sajících nymf a pro snazší manipulaci s nimi. Po utuhnutí byl přebytečný agar odstraněn a vzniklý vzorek přenesen do fixáže. U plně nasátých nymf a u nymf, které ukončily sání, byla střeva pitvána přímo do fixáže bez použití agaru. Fixáž byla připravena z 4% roztoku formaldehydu a 0,1% glutaraldehydu v 0,1M Na-fosfátovém pufru, pH 7,2-7,4.

Pro následné zpracování vzorků bylo využito metody přípravy preparátů pomocí mikrovln. Mikrovlnná trouba byla nastavena na režim rozmrazování. Vzorky se vkládaly do vodní lázně a poté byly vždy po dobu 30 sekund vystaveny mikrovlnám. V intervalech mezi působením mikrovln byly vzorky umístěny na led a třepány na třepačce.

Tkáně ve fixáži byly 3x vystaveny účinku mikrovln a umístěny přes noc na rotačce v chladové místnosti (4°C). Následující den byla fixáž odsáta a nahrazována vypíracím roztokem (0,2M fosfátový pufr, glukóza, pH 7,2) po dobu 3 x 10 minut. Během každých deseti minut byly vzorky 3x vystaveny mikrovlnám. K odvodnění vzorků byla použita etanolová řada (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%). V každém roztoku byly vzorky ponechány po dobu 15 minut a v každém kroku byly 3x vystaveny mikrovlnám. Následně byly vzorky prosycovány roztokem 95% etanolu a pryskyřice LR White (London Resin Company Ldt.) v poměru 2:1. Veškerá práce s pryskyřicí byla prováděna v digestoři. Během hodiny a půl byly vzorky 5x vystaveny mikrovlnám. Ve vzniklých mezičasech byly vzorky umístěny do chladu (4°C) na rotačku. Stejným způsobem se pokračovalo i při zvyšování množství LR White v 95% roztoku etanolu (1:1, 2:1). Přes noc byly vzorky prosycovány čistou pryskyřicí za přístupu vzduchu.

Následujícího dne byly jednotlivé části střeva umístěny do želatinových kapslí a s pomocí stříkačky naplněny zcela stoprocentní pryskyřicí. Želatinové kapsle byly umístěny do termoboxu vyhřátého na 50°C dokud pryskyřice v kapslích nezpolymerovala (přibližně 1 den). Po zpolymerování pryskyřice byla želatinová kapsle odstraněna.

Z bločků tvořených z pryskyřice a tkáně byly na mikrotomu (Reichert - Jung) krájeny polotenké řezy (0,4 µm). Řezy byly s pomocí skleněné tyčinky nanášeny na sklíčka (SuperFrost®Plus) do 10% acetonu. K prozkoumání struktury střevní tkáně byly preparáty barveny toluidinovou modří (1% toluidinová modř v 1% tetraboritanu sodném, 1:1).

3.3 Histochemie – EPON

Pro studium změn morfologie střeva během sání byla použita střeva nenasátých nymf, jeden, dva a tři dny sajících nymf a střeva nymf plně nasátých. Stejně jako v předchozí metodě, byly nymfy přichyceny na textilní lepicí pásce a pitvány pod binokulárním mikroskopem v Petriho misce v PBS. Všechny vzorky byly kvůli snazší manipulovatelnosti zality do 2% agaru, který byl rovněž předehřát na 100 °C a poté ochlazen na 62 °C. Agarové kostičky obsahující vzorky byly přeneseny do fixáže tvořené z 2,5% glutaraldehydu v 0,1M Na-fosfátovém pufru a ponechány přes noc na rotačce v chladové místnosti (4°C). Následující den byly vzorky promývány 3 x 15 minut ve vypíracím roztoku. V jednotlivých intervalech byly vzorky celkem 3x vystaveny mikrovlnám (80W, 30 vteřin), v mezičasech umístěny na led a třepány na třepačce. Poté byla tkáň fixována v 4% roztoku oxidu osmičelého v 0,2M Na-fosfátovém pufru v poměru 1:1. Po dvou hodinách byl roztok oxidu osmičelého nahrazován vypíracím roztokem (3 x 15 minut). V každém kroku byly vzorky 3x vystaveny mikrovlnám a poté umístěny na třepačku na led. K odvodnění vzorků byla využita etanolová řada (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%), v každém roztoku byly ponechány 15 minut, během kterých byly opět 3x vystaveny mikrovlnám. Následovalo postupné sycení vzorků pryskyřicí (100% etanol a epoxidová pryskyřice Epon v poměru 2:1, 1:1, 1:2). V každém stupni hodinu a půl. Během této doby byly vzorky 5x vystaveny účinku mikrovln a poté umístěny na rotačku do chladové místnosti. Přes noc byly vzorky syceny čistou (100%) pryskyřicí a umístěny do exsikátoru, aby nedošlo k jejich navlhnutí. Příští den byly tkáně zalévány do formiček a umístěny do termoboxu vyhřátého na 60°C, dokud nezpolymerovaly (48 hodin). Na mikrotomu (Reichert – Jung) byly krájeny polotenké řezy (0,4 µm), které byly následující den barveny toluidinovou modří a pozorovány světelným mikroskopem Olympus CX41. Digitální fotografie byly pořízeny fotoaparátem Olympus 510 a následně upravovány softwarem QuickPHOTO CAMERA 2.2.

3.4 Imunocytochemie na polotenkých řezech

Afinitně přečištěné imunoglobulinové frakce králičích protilátek (dále Ra X katB, Ra X katL) byly použity pro lokalizaci trávicích peptidáz metodou nepřímé imunofluorescence

(Franta a kol., 2010). Při procesu značení protilátkami byly řezy umístěny v plastové dóze na navlhčené buničině, aby se zamezilo jejich vyschnutí, a to bez přístupu světla. Celá komůrka byla umístěna na třepačce. Tím bylo dosaženo lepšího přístupu protilátek k antigenům.

Na každý řez bylo naneseno 50µl blokovacího roztoku (1% BSA, 10% sušené mléko, 0,3% PBS-T), který vyblokoval nespecifické vazby. Před použitím byl blokovací roztok 8 minut centrifugován při 13 000 otáčkách a poté přefiltrován přes 0,22 µm filtr (Millipore). Blokovací sérum bylo na vzorcích ponecháno 10 minut, následně byly řezy promyty PBS-T (2 x 5 minut). Primární protilátky byly vyředěny v PBS-T na požadovanou koncentraci a poté 5 minut centrifugovány při 13 000 otáčkách. Inkubace primárními protilátkami probíhala ve tmě a vlhku 3,5 hodiny. Na kontrolní vzorek byl nanesen pouze PBS-T. Po odsátí primárních protilátek byly řezy promyty PBS-T (4 x 5 minut). Fluorescenční barvivo (Alexa Fluor® 488 – Molecular Probes) byla naředěna v PBS-T v poměru 1:500, inkubace trvala 1 hodinu. Poté byly vzorky opět promyty PBS-T (4 x 5 minut). K obarvení jader buněk a tedy i k lepší orientaci ve střevní tkáni byly vzorky barveny 7 minut pomocí DAPI. Na každý vzorek bylo naneseno 50µl DAPI zředěné v koncentraci 0,12 mg/ml destilované vody. Poté byly vzorky promyty PBS-T (3 x 5 minut) a destilovanou vodou (5 minut). Uschlé vzorky byly zality do 2,5% DABCO (Sigma-Aldrich) v glycerolu. K vyhodnocení řezů byl použit konfokální mikroskop Olympus FW1000.

4. Výsledky a diskuze

4.1 Změny morfologie střeva nymfy klíštěte *Ixodes ricinus* v průběhu a po ukončení sání

Změny morfologie střeva byly studovány s využitím světelné mikroskopie. Jednotlivé vzorky střev byly získávány v různých časových intervalech v průběhu pěti týdnů. Jednalo se o střeva nenasátých nymf (UF), jeden (1d), dva (2d) a tři dny (3d) sajících nymf, plně nasátých nymf (T0) a dále o střeva nymf jeden (T1), dva (T2), tři (T3) a čtyři (T4) týdny po ukončení sání. Všechny vzorky tkání byly původně zalévány do pryskyřice LR White a poté pozorovány. Vzhledem k tomu, že jsou střeva nenasátých nymf a střeva jeden, dva a tři dny sajících nymf velmi malá, byl pokus opakován s tím rozdílem, že jednotlivé vzorky tkání byly zality do pryskyřice EPON. Vlastnosti této pryskyřice umožňují detailnější pozorování morfologie střeva i u velmi drobných tkání a tím i získání hodnotnějších výsledků. U vzorků střev plně nasátých nymf a u střev nymf, které již ukončily sání bylo využito preparátů zalitých do pryskyřice LR White.

U nenasátých nymf je lumen střeva velmi úzké, protože neobsahuje žádnou přijatou krev. Stěna střeva je křehká a jednotlivé buňky jsou v této fázi velmi malé. Lumen je obklopeno rezervními buňkami a rovněž buňkami trávicími, které jsou zachovány z předcházejícího vývojového larválního stádia. Trávicí buňky mohou být vyplněny reziduálními tělísky a nestrávenými zbytky hemoglobinu (z larválního stádia), které jsou uloženy v endozomech (obr. 7 - UF).

Během prvního dne sání dochází k rozšiřování střevního lumen, jako důsledek příjmu hostitelské krve. Ve střevní dutině však zatím nejsou viditelné krystaly hemoglobinu. Střevní stěna je nyní pevnější a je tvořena vznikajícími trávicími buňkami s malým počtem endozomů. Rovněž lze pozorovat buňky rezervní, které jsou přítomny na vnější straně střeva (obr. 7 – 1. den).

Druhý den sání dochází k růstu rezervních buněk a tudíž k jejich diferenciaci na buňky trávicí. Střevní lumen se dále rozšiřuje, zatím zde však stále není viditelná krev hostitele. Namísto toho zde lze pozorovat trávicí buňky, z nichž některé se odlučují od bazální membrány. Buňky se uvolňují do střevního lumen, odkud jsou společně s dalšími metabolity vylučovány z těla nymfy (obr. 8 – 2. den).

Během 3. dne sání pozorujeme zvětšování trávicích buněk, v jejichž cytoplasmě roste množství endozomů. Společně s růstem buněk dochází také k rozšiřování střevního lumen, ve kterém je již možné pozorovat krev hostitele. V této fázi sání a trávení je celé střevo nejpevnější (obr. 8 – 3. den).

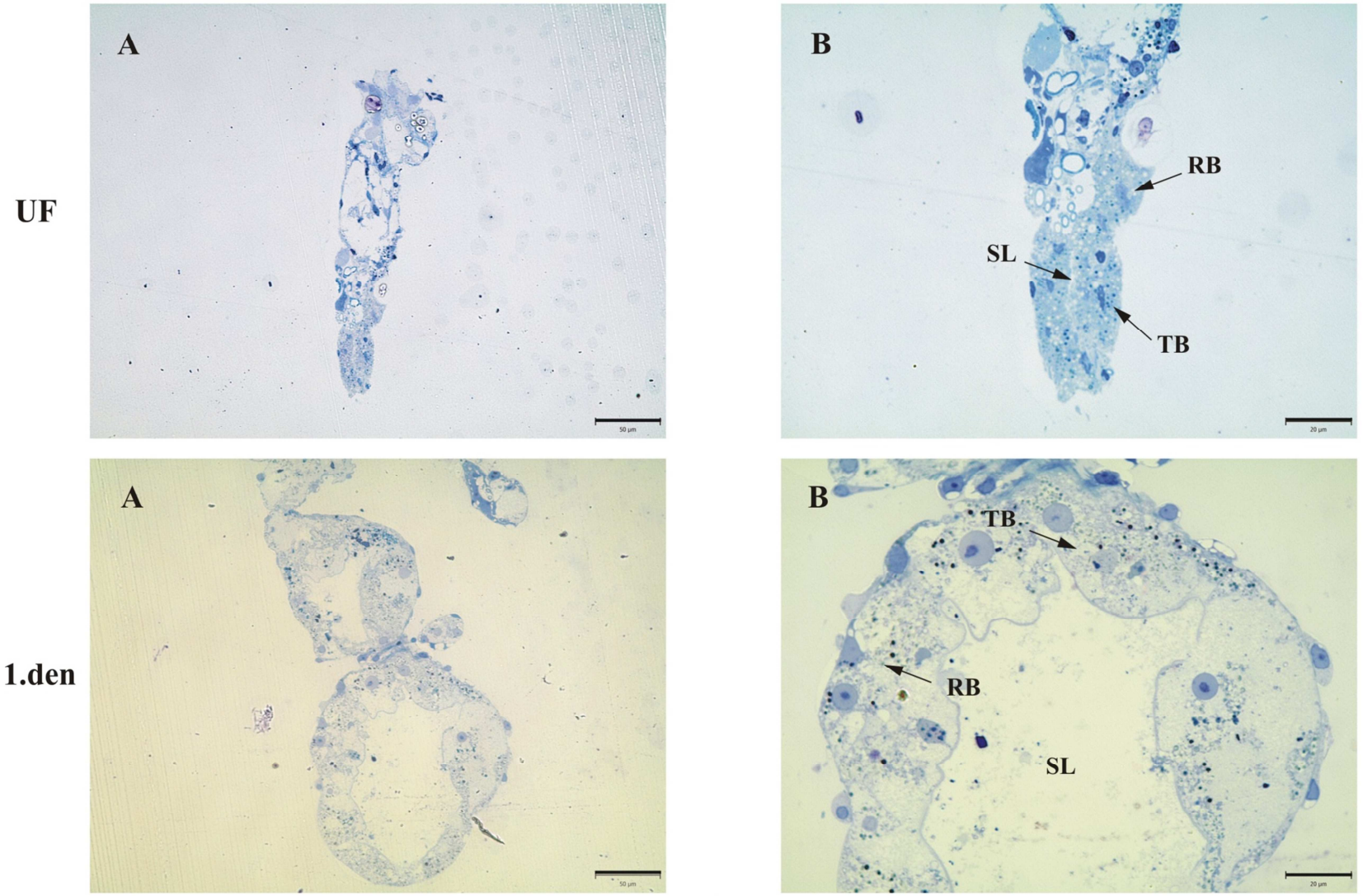
U plně nasátých nymf dosahuje lumen střeva maximální velikosti a je zcela naplněno krví. Od této fáze již nepozorujeme uvolňování trávicích buněk do nitra střeva. Epitel střeva je tvořen trávicími buňkami s velkým počtem endozomů. Jak v této fázi, tak v následujících čtyřech týdnech je celé střevo velmi křehké. (obr. 9 – T0)

Týden po ukončení sání na hostiteli nepozorujeme již další rozšiřování střevního lumen. To je vyplněno množstvím hemoglobinových fragmentů různé velikosti. Naproti tomu však dochází k výraznému růstu trávicích buněk. Ty jsou velké a obsahují množství endozomů (obr. 9 – T1).

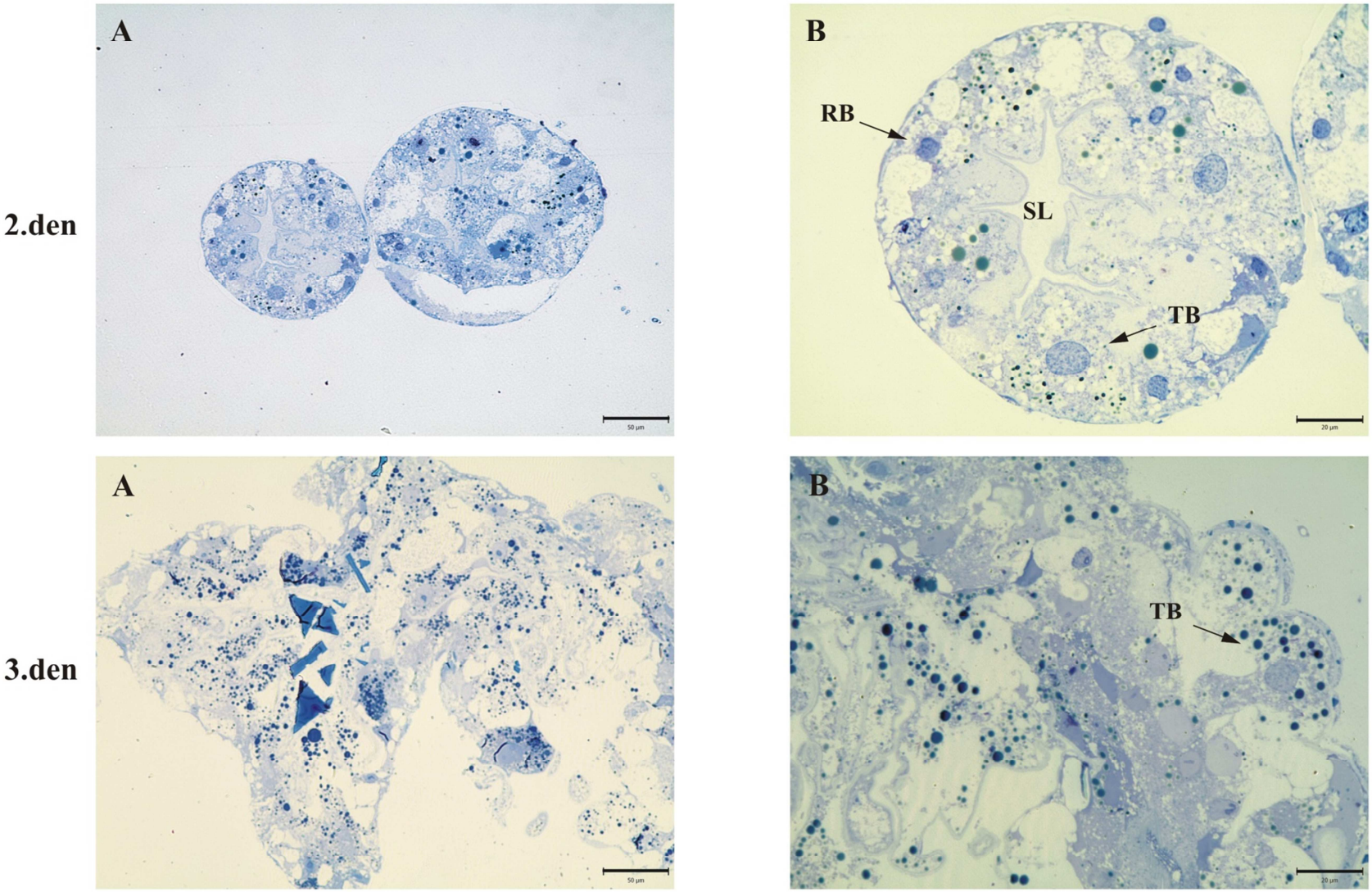
O týden později je patrné zvětšování objemu trávicích buněk na úkor velikosti lumen střeva. Trávicí buňky obsahující velké množství endozomů vyčnívají do nitra střeva, které je díky tomu zúženo (obr. 10 – T2).

Tři týdny po ukončení sání na hostiteli dochází k dalšímu růstu trávicích buněk. Ty nyní tvoří většinu objemu střeva a střevní lumen je společně se svým obsahem v užších vychlípeninách střeva zcela utlačeno trávicími buňkami. Lumen je pozorovatelné pouze v širších částech střeva (obr. 10 - T3).

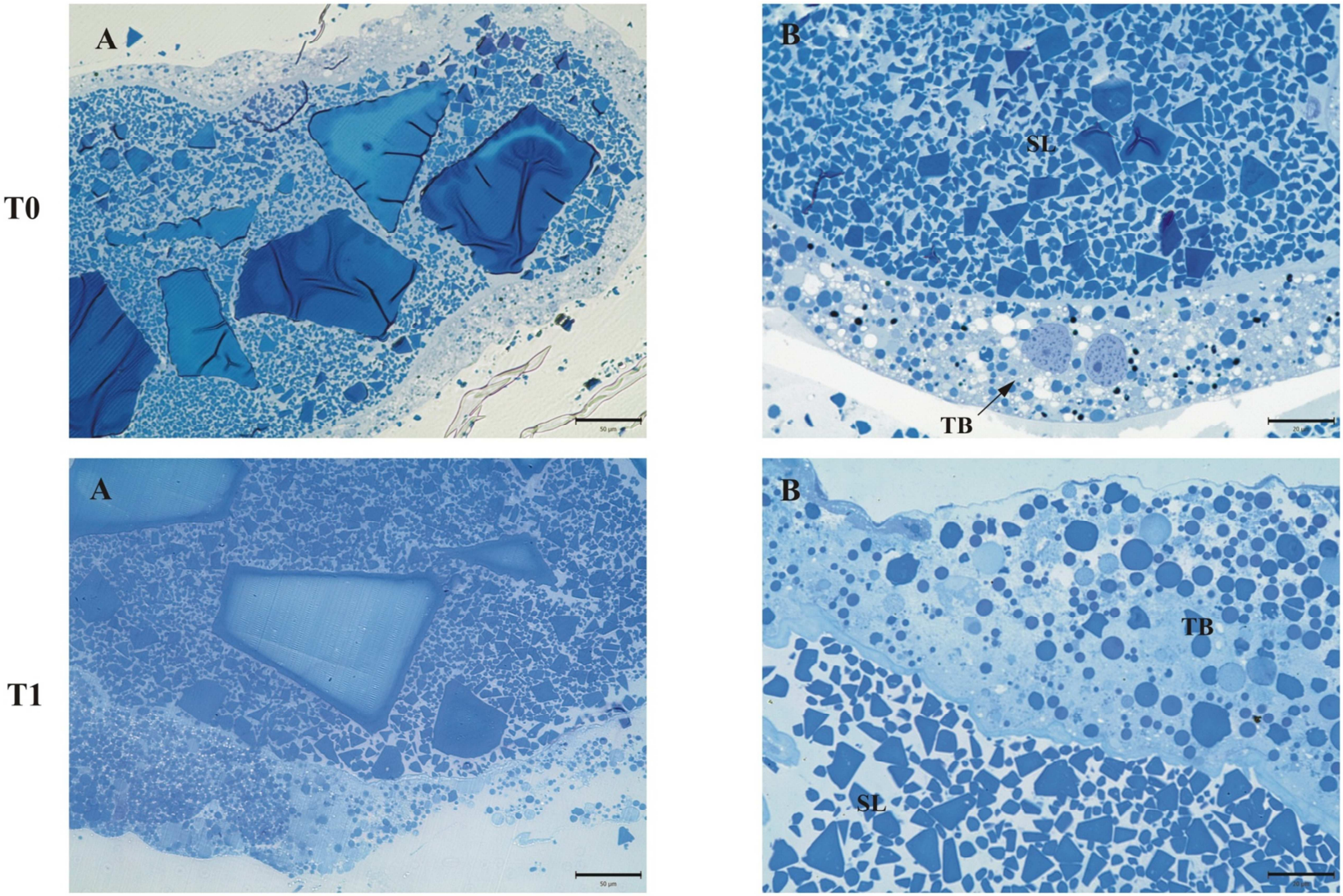
Měsíc po plném nasátí nedochází k výraznějším morfologickým změnám uvnitř střeva. Trávicí buňky jsou velké a obsahují rovněž velké množství endozomů (obr. 11 – T4).



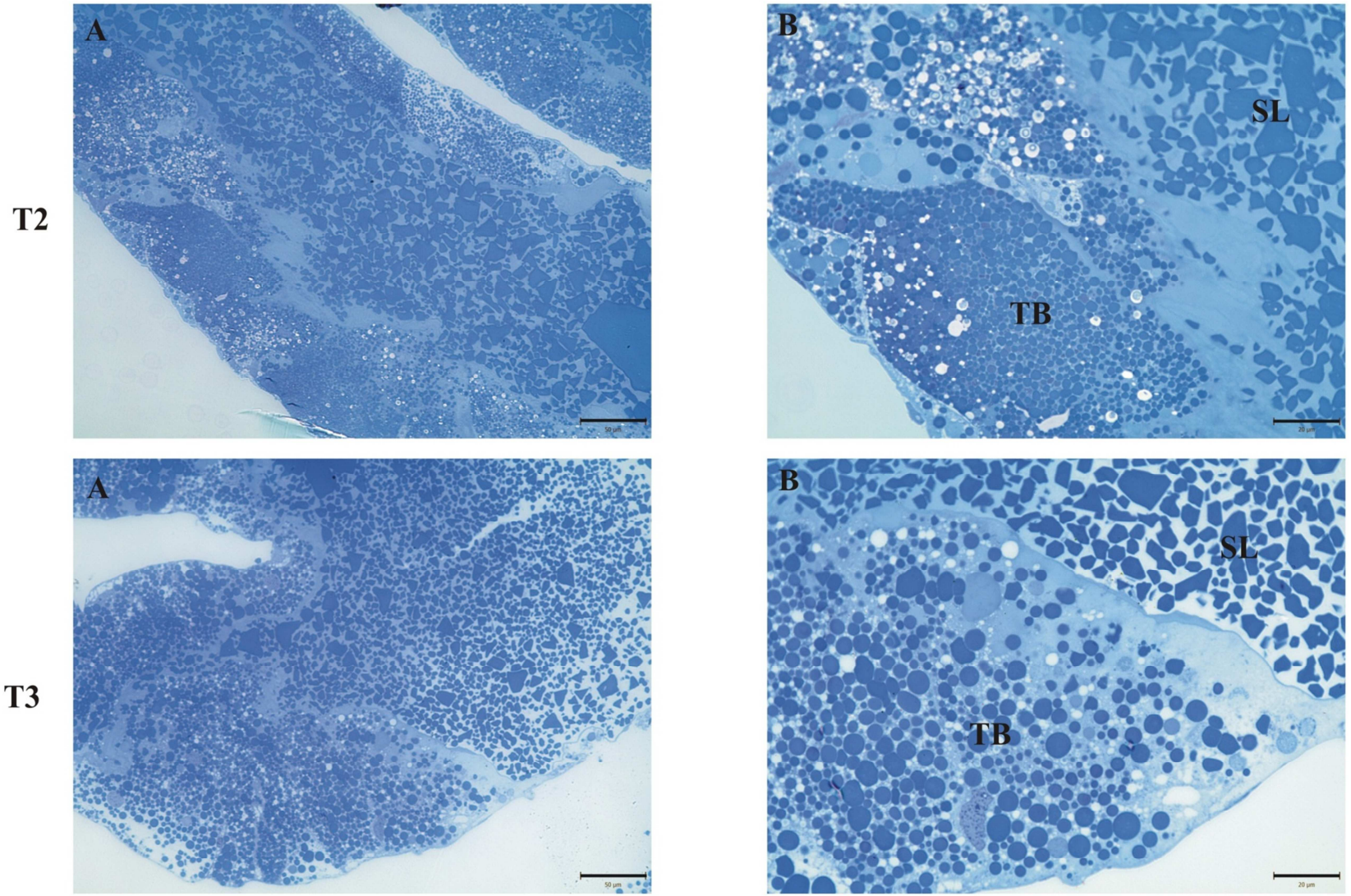
Obr. 7: Struktura střeva nymfy klíštěte *Ixodes ricinus* sající jeden den na hostiteli (**1. den**) a nymfy nenasáté (**UF**). Polotenké řezy (0,4 µm) barveny toluidinovou modří, v pryskyřici EPON, pozorované světelným mikroskopem. **A**: měřítko 50 µm, **B**: měřítko 20 µm, **SL** - střevní lumen, **TB** - trávicí buňka, **RB** - rezervní buňka.



Obr. 8: Struktura střeva nymfy klíštěte *Ixodes ricinus* sající dva (**2. den**) a tři (**3. den**) dny na hostiteli. Polotenké řezy (0,4 µm) barveny toluidinovou modří, v pryskyřici EPON, pozorované světelným mikroskopem. **A**: měřítko 50 µm, **B**: měřítko 20 µm, SL - střevní lumen, **TB** - trávicí buňka, **RB** - rezervní buňka.

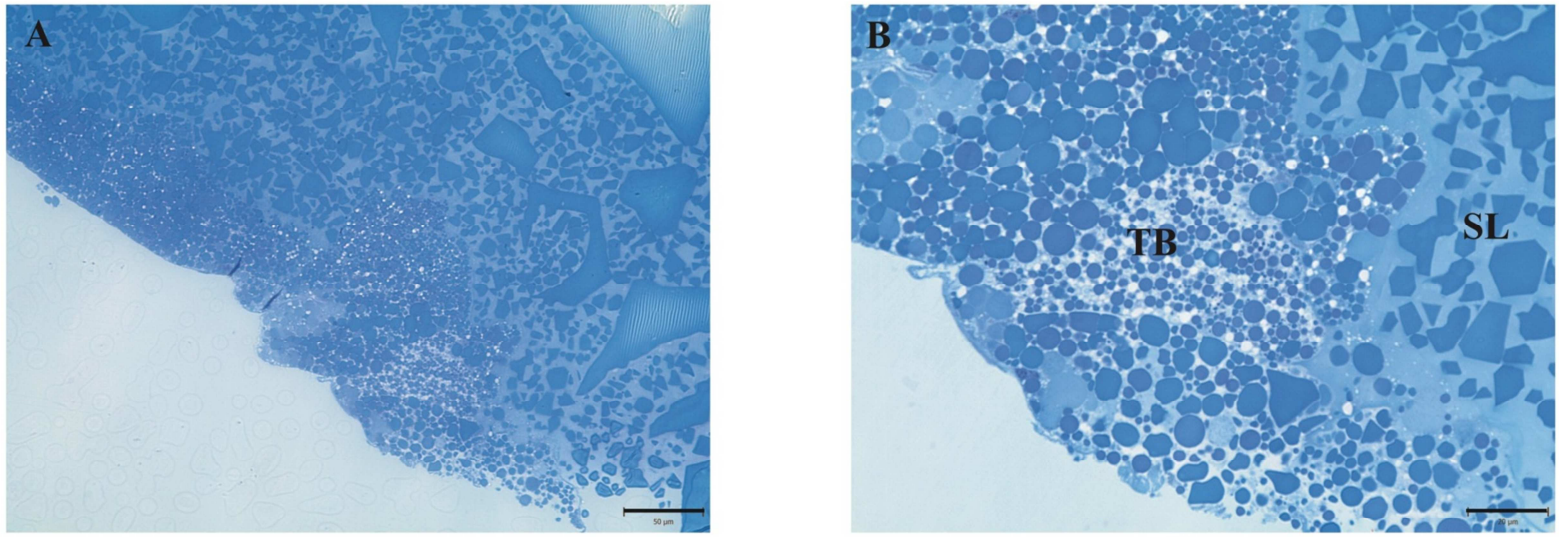


Obr. 9: Struktura střeva nymfy klíštěte *Ixodes ricinus* plně nasáté (**T0**) a týden po ukončení sání na hostiteli (**T1**). Polotenké řezy (0,4 µm) barveny toluidinovou modří, v pryskyřici EPON (T0) a LR White (T1), pozorované světelným mikroskopem. **A**: měřítko 50 µm, **B**: měřítko 20 µm, **SL** - střevní lumen, **TB** - trávicí buňka.



Obr. 10: Struktura střeva nymfy klíštěte *Ixodes ricinus* dva (**T2**) a tři týdny po ukončení sání na hostiteli (**T3**). Polotenké řezy (0,4 µm) barveny toluidinovou modří, v pryskyřici LR White, pozorované světelným mikroskopem. **A**: měřítko 50 µm, **B**: měřítko 20 µm, **SL** - střevní lumen, **TB** - trávicí buňka.

T4



Obr. 11: Struktura střeva nymfy klíštěte *Ixodes ricinus* čtyři týdny po ukončení sání na hostiteli (**T4**). Polotenké řezy (0,4 µm) barveny toluidinovou modří, v pryskyřici LR White, pozorované světelným mikroskopem. **A**: měřítko 50 µm, **B**: měřítko 20 µm, **SL** - střevní lumen, **TB** - trávicí buňka.

4.2 Lokalizace trávicích peptidáz ve střevech nymf klíšťat *Ixodes ricinus*

Dalším cílem práce byla lokalizace trávicích peptidáz katepsinu B a L ve střevě nymf. Pro lokalizaci byly využity imunoglobulinové frakce králičích protilátek přečištěné pomocí afinitní chromatografie. Těchto protilátek bylo využito k lokalizaci daných peptidáz metodou nepřímé imunofluorescence.

4.2.1 Imunolokalizace katepsinu B

Lokalizace katepsinu B (IrCB) byla prováděna na polotenkých řezech. Jednotlivé vzorky byly získávány v různých časových intervalech sání (nenasáté nymfy, nymfy sající jeden, dva a tři dny, plné nasáté nymfy a nymfy jeden, dva, tři a čtyři týdny po ukončení sání na hostiteli). Negativní kontroly bylo dosaženo vynecháním primární protilátky a využitím pouze fluorescenčního barviva. Tato kontrola byla díky vysoce specifickým protilátkám dostačující. U všech zkoumaných vzorků byla v různé míře zjištěna přítomnost IrCB. Za účelem zisku co nejkvalitnějších výsledků byly protilátky proti katepsinu B použity ve dvou koncentracích, a sice 75 µg/ml a 30 µg/ml. Pro detekci nepřímou imunofluorescencí bylo pro optimální poměr signál-pozadí použito ředění Ra X katB na koncentraci 30 µg/ml.

U nenasátých nymf byl pozorován relativně vysoký signál katepsinu B (IrCB). Jelikož v této fázi nedochází ještě k trávení hostitelské krve, je pravděpodobné, že přítomné trávicí peptidázy jsou zachovány z trávení hostitelské krve larev (předchozí vývojové stádium) nikoli nymf. Vysoká hladina katepsinu B může být zapříčiněna dvěma faktory. Jelikož je střevo nenasátých nymf a rovněž jednotlivé trávicí buňky velmi malé, je možné, že detekovaný signál IrCB je způsoben nahromaděním velkého množství malých buněk vedle sebe a tím i zdánlivé zvýšení množství katepsinu B. Další možnou příčinou vysoké hladiny IrCB je možnost, že nymfa čekající na hostitele má již nasyntetizovanou určitou hladinu katepsinu B. Tuto hladinu IrCB si zachovává v době, kdy čeká na hostitele a pomalu tráví poslední zbytky potravy. Jakmile najde hostitele nového a tím i nový zdroj potravy, začne proteázy ponechané z larválního stádia degradovat a postupně nahrazovat proteázami novými (obr. 12 – UF). To by vysvětlovalo skutečnost, že v první a druhý den sání je hladina katepsinu B snížena.

Ve střevech nymf, které sály na hostiteli jeden den, rovněž pozorujeme přítomnost IrCB. Intenzita signálu je však mnohem slabší než v předchozí den. Díky zvýrazněným buněčným jádrům je možné pozorovat výrazné zvětšení celého střeva v průběhu jednoho dne,

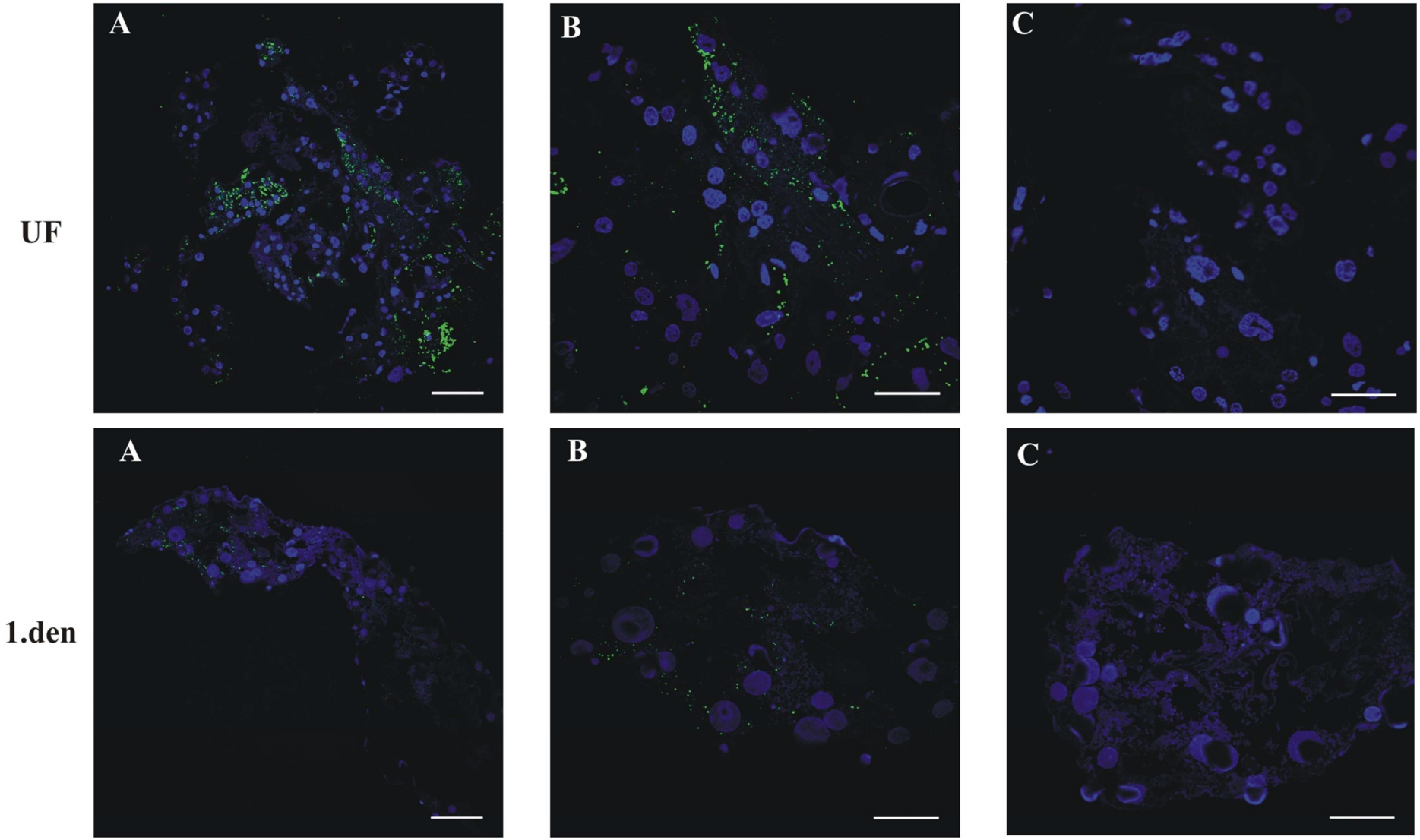
kdy se jednotlivá jádra buněk od sebe oddalují tím, jak jejich cytoplasmy rostou. Je tedy pravděpodobné, že s růstem střeva dochází zároveň k roztahování míst, kde je přítomen katepsin B a tudíž je jeho množství zdánlivě nižší (obr. 12 – 1. den).

Druhý den sání dochází k výraznému zvýšení objemu přijaté krve a tím i k nárůstu množství IrCB v trávicích buňkách (obr. 13 – 2. den). Tento nárůst vrcholí 3. den sání, kdy je signál pro IrCB nejsilněji patrný v trávicích buňkách, které se oddělily od bazální membrány do střevního lumen. Rovněž dochází k výraznému zvětšování celého střeva (obr. 13 – 3. den).

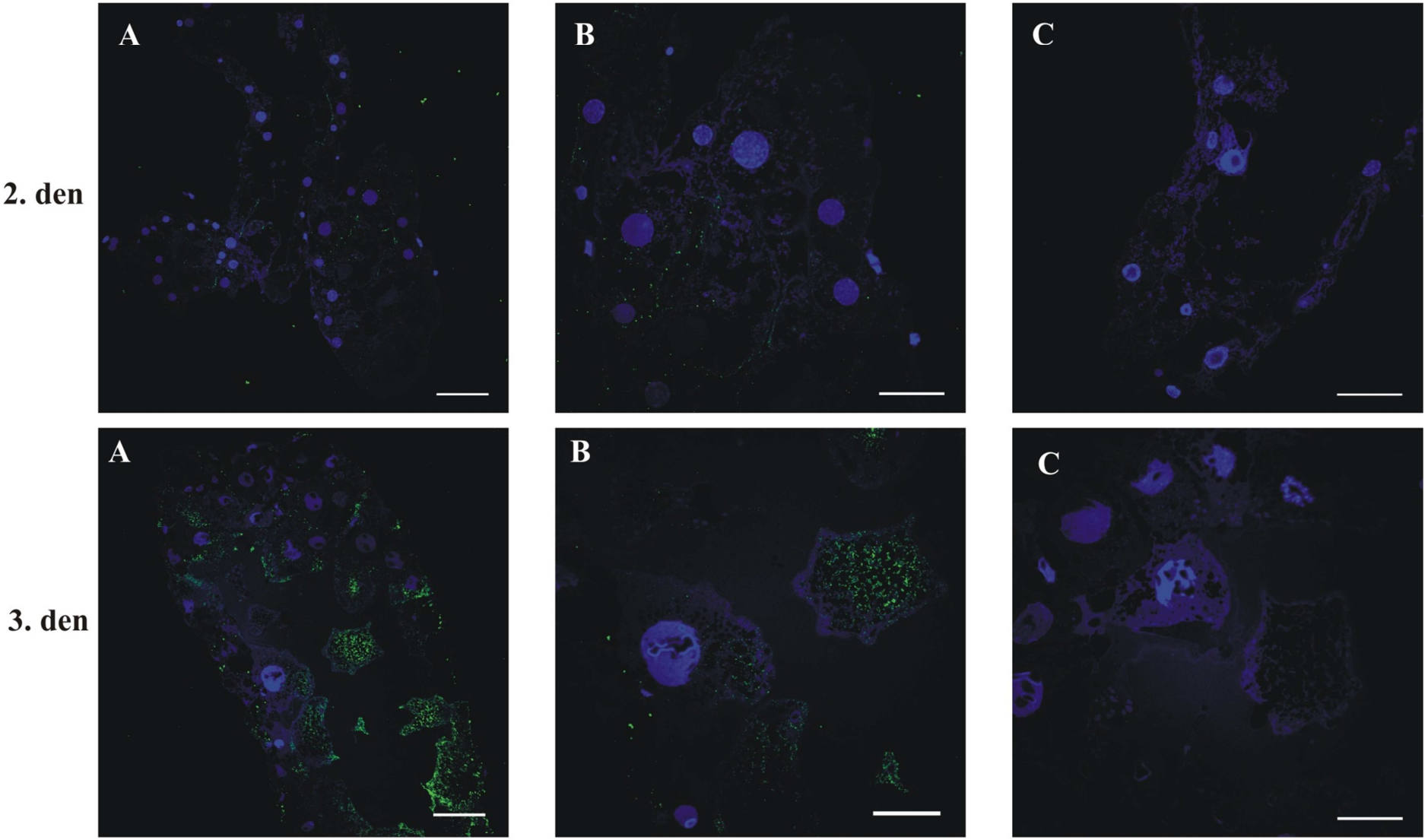
U plně nasátých nymf pozorujeme snižování intenzity signálu IrCB. Pravděpodobně zde dochází ke zpomalování trávení, protože nymfa v tomto stádiu již nepřijímá potravu a energii z potravy bude postupně spotřebovávat pro přeměnu na dospělce a dále během možného dlouhého čekání na nového hostitele. Velikost střeva se v této fázi již nemění. (obr. 14 – T0).

Tato tendence pokračuje i u nymf jeden (obr. 14 – T1) a dva (obr. 15 – T2) týdny po ukončení sání na hostiteli. I zde můžeme pozorovat pokles množství přítomného katepsinu B.

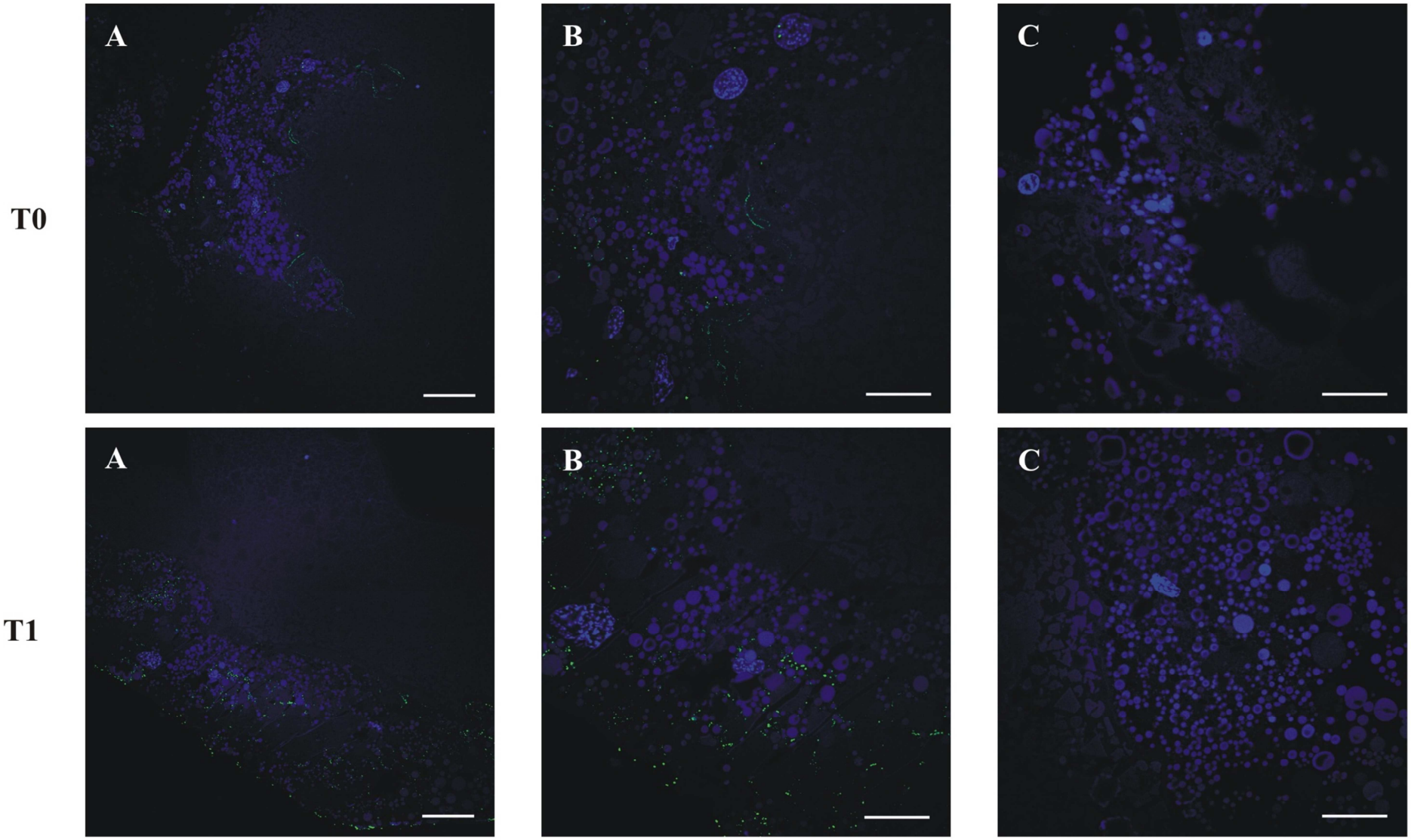
Tři týdny (obr. 15 – T3) po ukončení sání se množství přítomného IrCB opět zvyšuje. Tento nárůst vrcholí 4. týden, kdy pozorujeme vysokou intenzitu signálu přítomného katepsinu B (obr. 16 – T4). Ta je však mnohem nižší než v 3. den sání. Nymfa se v této fázi pravděpodobně začíná připravovat na přeměnu na dospělce. Tato přeměna je energeticky náročná a pravděpodobně právě proto pozorujeme opětovně zintenzivnění trávení



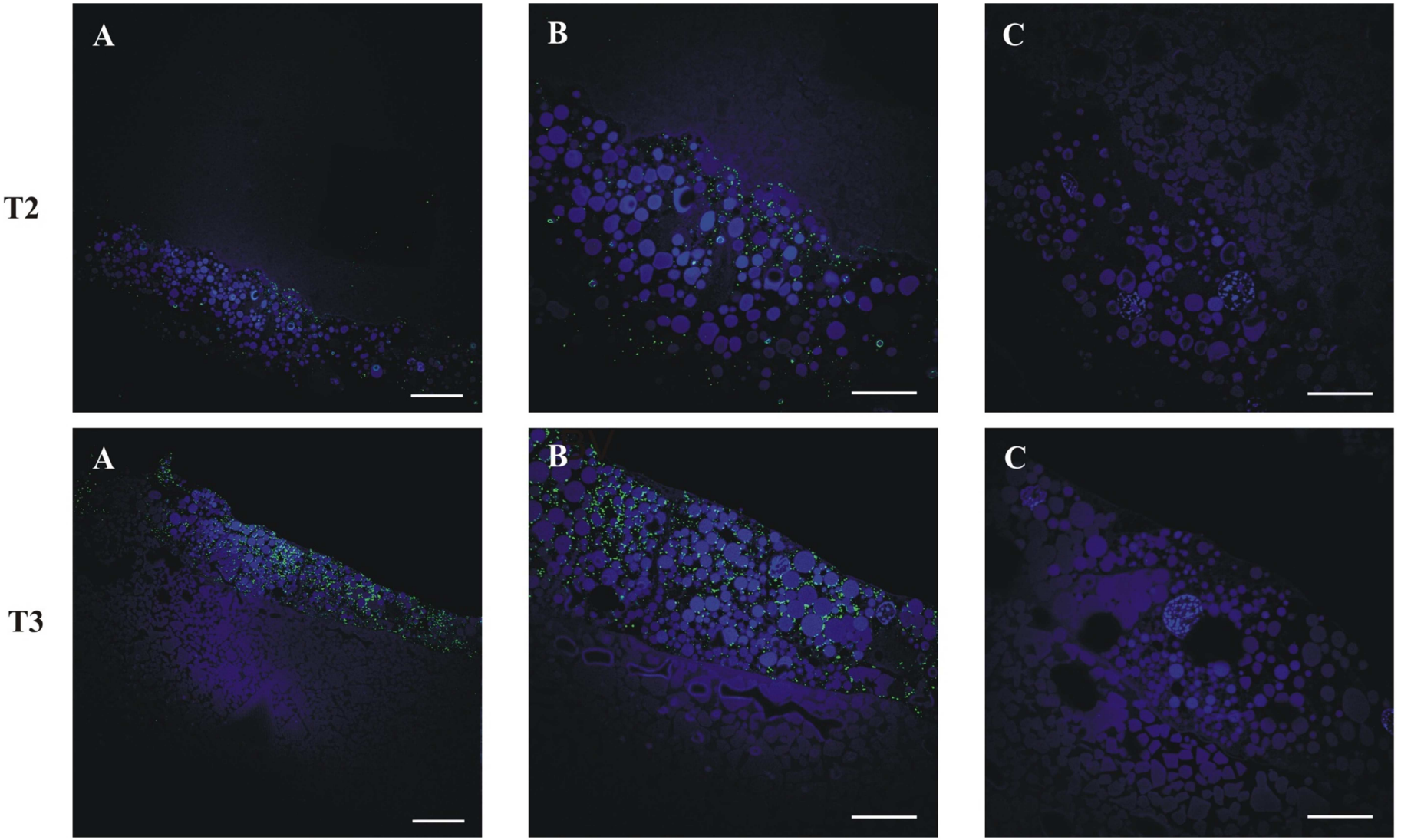
Obr. 12: Imunolokalizace katepsinu B (A, B) ve střevech nymf klíštěte *Ixodes ricinus* u nenasátých nymf (**UF**) a u nymf sajících jeden den na hostiteli (**1. den**). Polotenké řezy (0,4 µm), v pryskyřici LR White, pozorované konfokálním mikroskopem. **A**: měřítko 40 µm, **B**: měřítko 20 µm, **C**: kontrola, měřítko 20 µm.



Obr. 13: Imunolokalizace katepsinu B (A, B) ve střevech nymf klíštěte *Ixodes ricinus* u dva (**2. den**) a tři (**3. den**) dny sajících nymf na hostiteli. Polotenké řezy (0,4 µm), v pryskyřici LR White, pozorované konfokálním mikroskopem. **A**: měřítko 40 µm, **B**: měřítko 20 µm, **C**: kontrola, měřítko 20 µm.

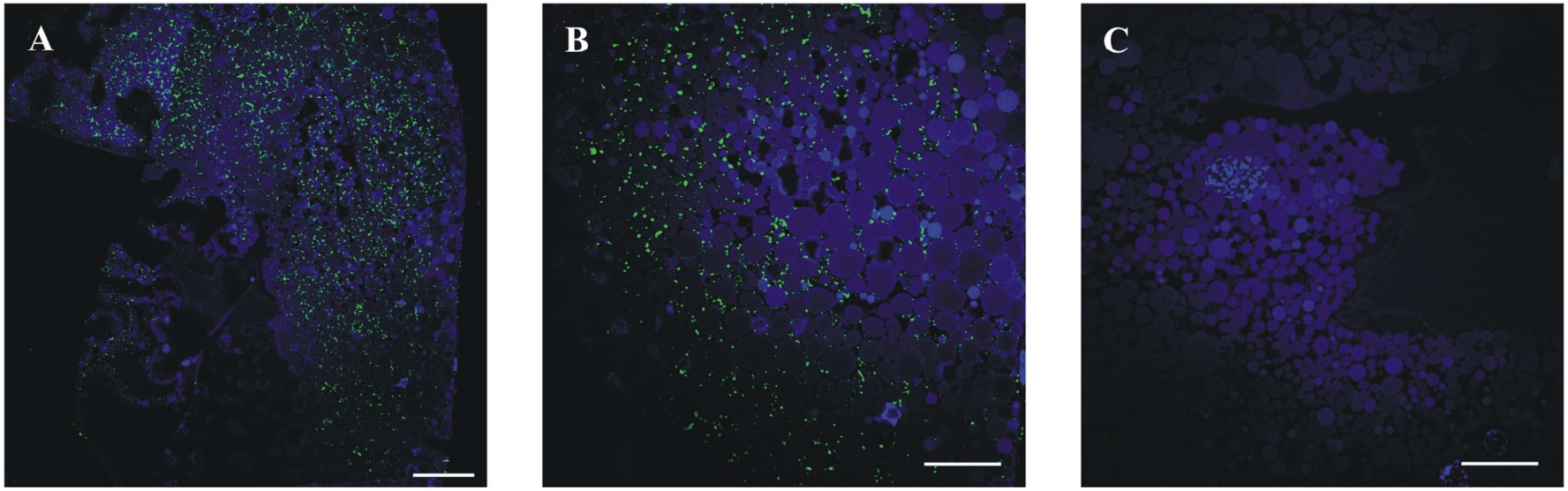


Obr. 14: Imunolokalizace katepsinu B (A, B) ve střevech nymf klíštěte *Ixodes ricinus* u plně nasátých nymf (**T0**) a u nymf týden (**T1**) po ukončení sání na hostiteli. Polotenké řezy (0,4 µm), v pryskyřici LR White, pozorované konfokálním mikroskopem. **A**: měřítko 40 µm, **B**: měřítko 20 µm, **C**: kontrola, měřítko 20 µm.



Obr. 15: Imunolokalizace katepsinu B (A, B) ve střevech nymf klíštěte *Ixodes ricinus* u nymf dva (**T2**) a tři (**T3**) týdny po ukončení sání na hostiteli. Polotenké řezy (0,4 µm), v pryskyřici LR White, pozorované konfokálním mikroskopem. **A**: měřítko 40 µm, **B**: měřítko 20 µm, **C**: kontrola, měřítko 20 µm.

T4



Obr. 16: Imunolokalizace katepsinu B (A, B) ve střevech nymf klíštěte *Ixodes ricinus* čtyři týdny po ukončení sání na hostiteli (**T4**). Polotenké řezy (0,4 µm), v pryskyřici LR White, pozorované konfokálním mikroskopem. **A**: měřítko 40 µm, **B**: měřítko 20 µm, **C**: kontrola, měřítko 20 µm.

4.2.2 Imunolokalizace katepsinu L

Pro imunolokalizaci katepsinu L byly stanoveny stejné podmínky jako pro imunolokalizaci katepsinu B. Přítomnost katepsinu L však nebyla tak jednoznačná jako přítomnost katepsinu B. Stejně jako protilátky proti katepsinu B i protilátky proti katepsinu L byly použity ve dvou koncentracích (80 µg/ml, 32 µg/ml), vzhledem k nízké intenzitě signálu IrCL bylo k získání vhodných výsledků využito Ra X katL o koncentraci 80 µg/ml. Rovněž při stanovení katepsinu L bylo dosaženo negativní kontroly vynecháním primární protilátky a použitím pouze fluorescenčního barviva.

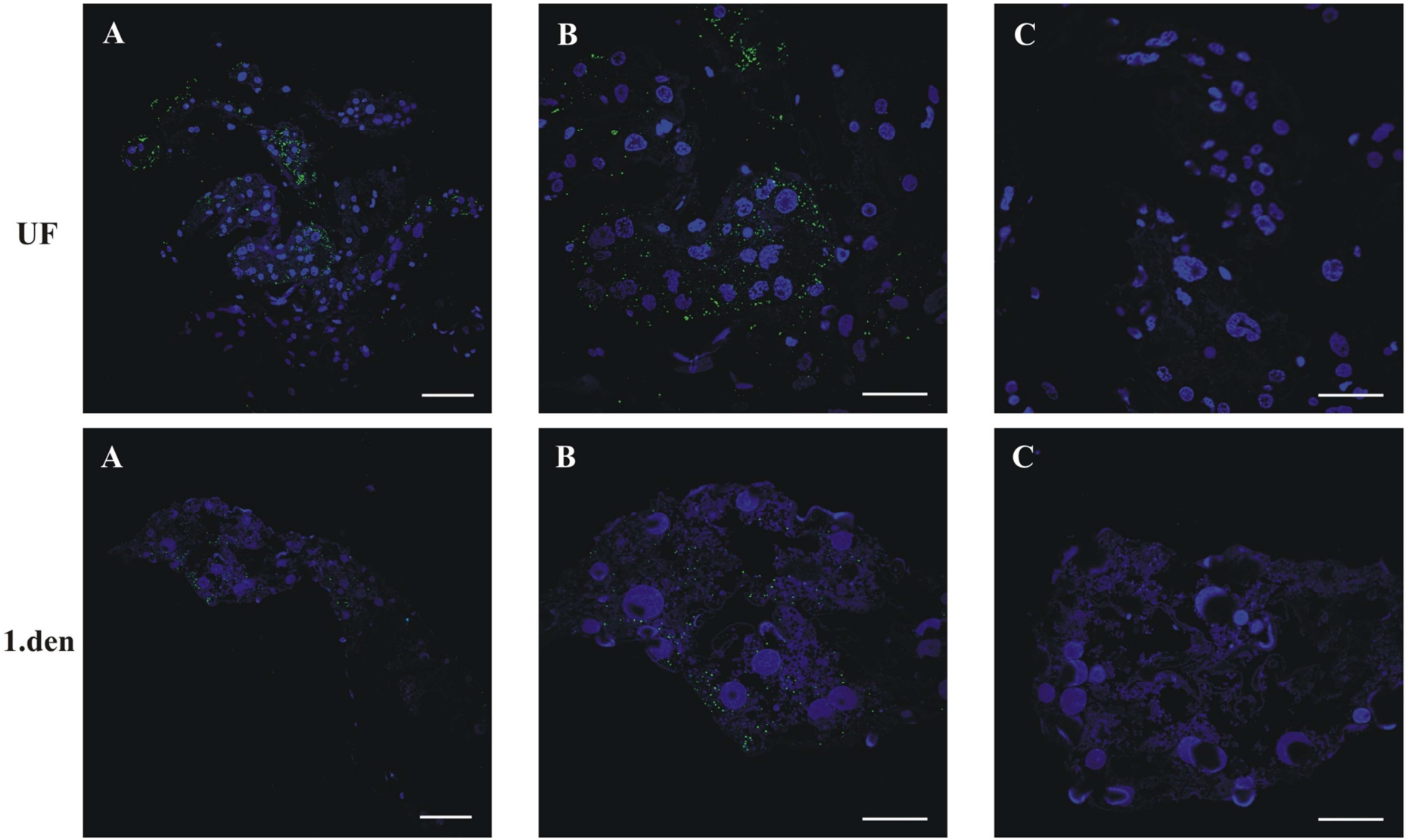
U nenasátých nymf (obr. 17 – UF) bylo množství katepsinu L vyšší než u den (obr. 17 – 1. den), resp. dva (obr. 18 – 2. den) dny sajících nymf. Tento jev byl pravděpodobně způsoben přítomností peptidáz z předcházejícího vývojového stádia.

Nejvýraznější přítomnost katepsinu L byla, stejně jako u katepsinu B, pozorována v průběhu třetího dne sání. V tomto dni zřejmě dochází k maximálnímu trávení přijaté krve (obr. 18 – 3. den).

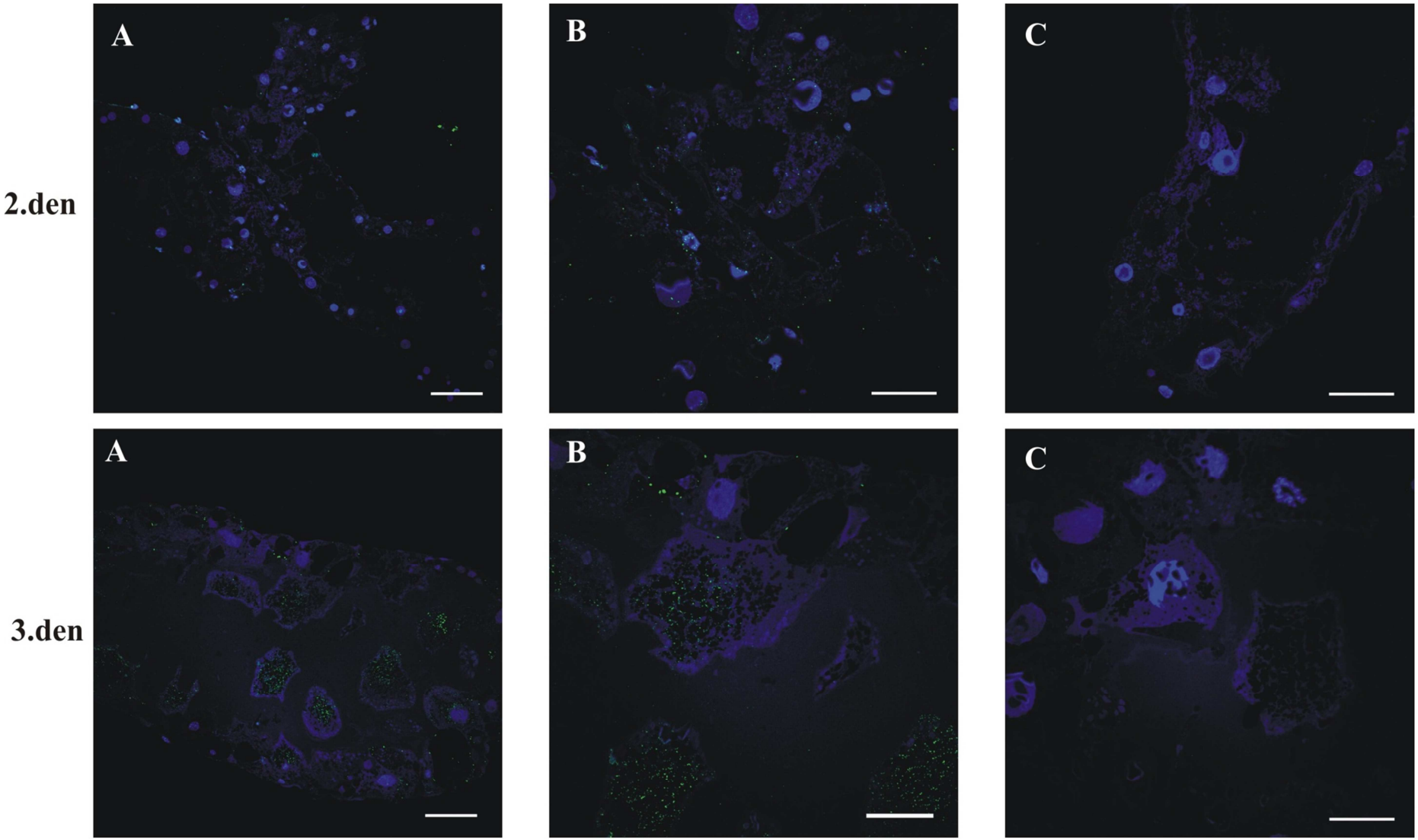
Po ukončení sání (obr. 19 – T0) a v následujících dvou týdnech (obr. 19 – T1, 20 – T2) dochází k poklesu množství katepsinu L v trávicích buňkách na minimum, protože dochází ke zpomalování trávení. Během této doby dochází k výraznému poklesu intenzity signálu.

Tři týdny po ukončení sání na hostiteli dochází opět k intenzivnějšímu trávení. Intenzita signálu pro IrCL se zvyšuje (obr. 20 – T3).

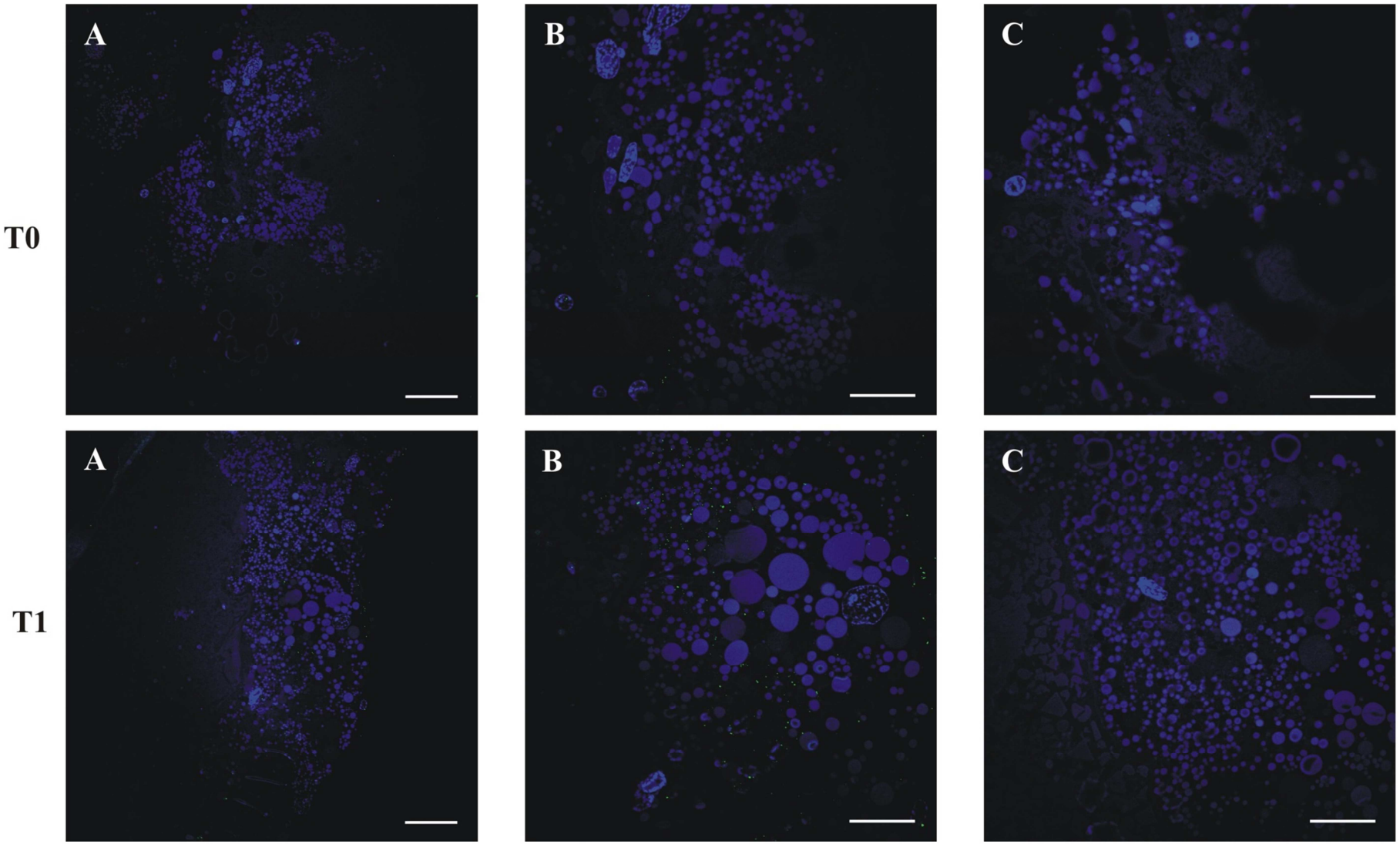
Měsíc po ukončení sání pozorujeme vysoký obsah katepsinu L v tkáních (obr. 21 – T4).



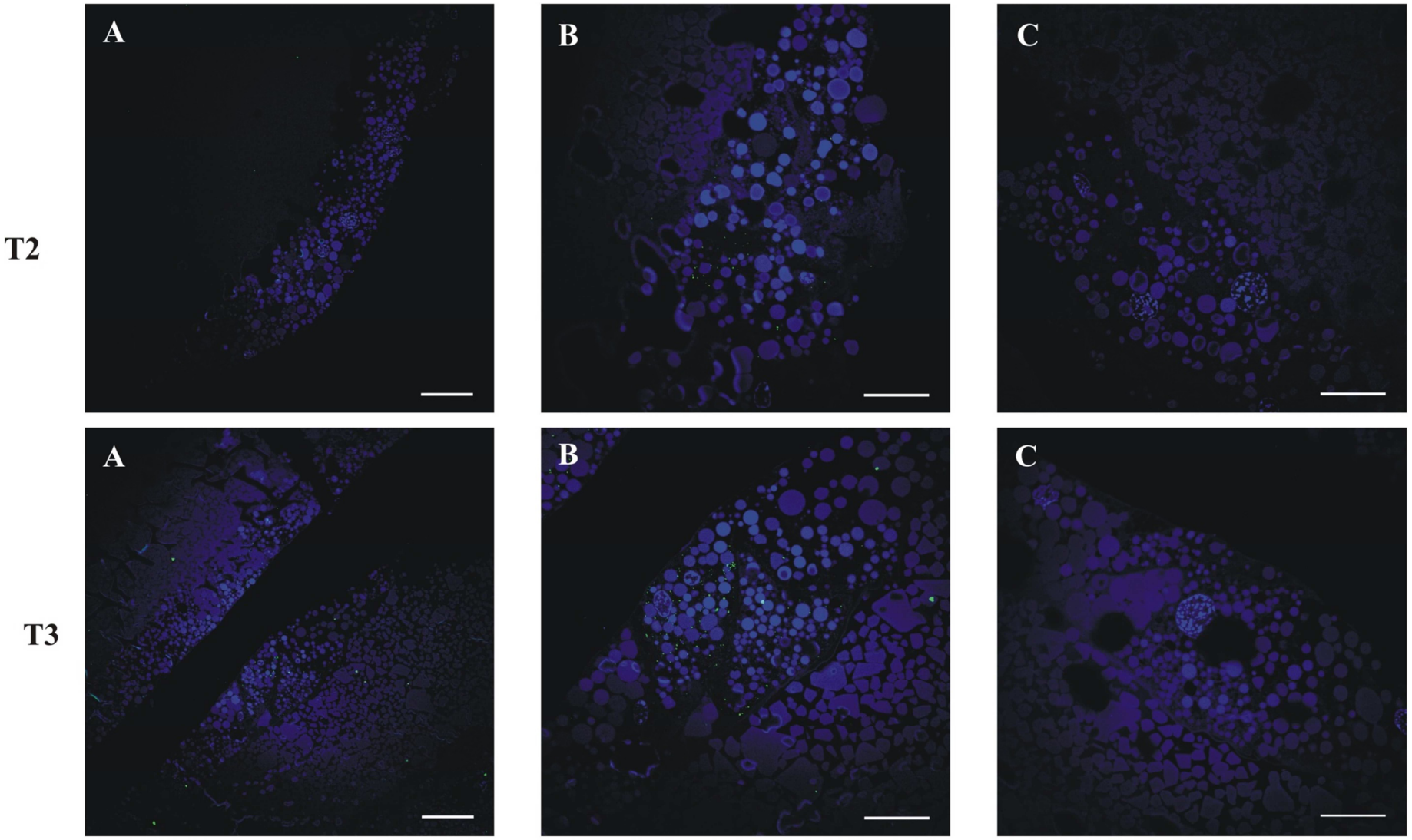
Obr. 17: Imunolokalizace katepsinu L (A, B) ve střevech nymf klíštěte *Ixodes ricinus* u nenasátých nymf (**UF**) a u nymf sajících jeden den na hostiteli (**1. den**). Polotenké řezy (0,4 µm), v pryskyřici LR White, pozorované konfokálním mikroskopem. **A**: měřítko 40 µm, **B**: měřítko 20 µm, **C**: kontrola, měřítko 20 µm.



Obr. 18: Imunolokalizace katepsinu L (A, B) ve střevech nymf klíštěte *Ixodes ricinus* u dva (**2. den**) a tři (**3. den**) dny sajících nymf na hostiteli. Polotenké řezy (0,4 µm), v pryskyřici LR White, pozorované konfokálním mikroskopem. **A**: měřítko 40 µm, **B**: měřítko 20 µm, **C**: kontrola, měřítko 20 µm.

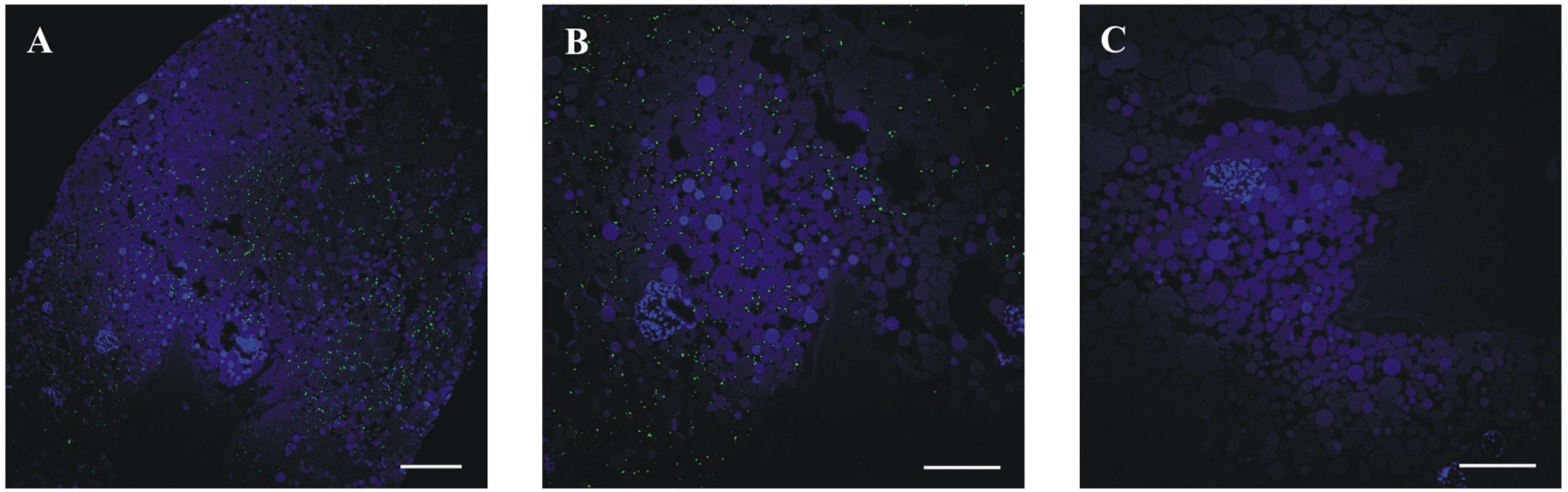


Obr. 19: Imunolokalizace katepsinu L (A, B) ve střevech nymf klíštěte *Ixodes ricinus* u plně nasátých nymf (**T0**) a u nymf týden po ukončení sání na hostiteli (**T1**). Polotenké řezy (0,4 µm), v pryskyřici LR White, pozorované konfokálním mikroskopem. **A**: měřítko 40 µm, **B**: měřítko 20 µm, **C**: kontrola, měřítko 20 µm.



Obr. 20: Imunolokalizace katepsinu L (A, B) ve střevech nymf klíštěte *Ixodes ricinus* u nymf dva (**T2**) a tři (**T3**) týdny po ukončení sání na hostiteli. Polotenké řezy (0,4 µm), v pryskyřici LR White, pozorované konfokálním mikroskopem. **A**: měřítko 40 µm, **B**: měřítko 20 µm, **C**: kontrola, měřítko 20 µm.

T4



Obr. 21: Imunolokalizace katepsinu L (A, B) ve střevech nymf klíštěte *Ixodes ricinus* u nymf čtyři týdny po ukončení sání na hostiteli (**T4**). Polotenké řezy (0,4 µm), v pryskyřici LR White, pozorované konfokálním mikroskopem. **A**: měřítko 40 µm, **B**: měřítko 20 µm, **C**: kontrola, měřítko 20 µm.

5. Závěr

Jedním z cílů bakalářské práce bylo studium morfologických změn ve střevě nymf klíštěte *Ixodes ricinus* v průběhu sání nymfy na hostiteli a při následné metamorfóze na dospělce. K pozorování morfologických změn bylo využito světelné mikroskopie. V práci byl popsán postupný vznik trávicích buněk a v dalších fázích trávení tvorba trávicích vakuol. Rovněž bylo popsáno rozepínání střevního lumen a zároveň růst celého střeva nymfy.

Konfokálního mikroskopu bylo využito k lokalizaci trávicích peptidáz. Tyto peptidázy účastnící se štěpení hemoglobinu hostitelské krve byly detekovány metodou nepřímé imunofluorescence. Díky použití přečištěných protilátek nedocházelo k falešným lokalizacím peptidáz mimo trávicí buňky. U nenasátých nymf, u jeden, dva, tři dny sajících nymf, plně nasátých nymf a u nymf jeden, dva, tři a čtyři týdny po ukončení sání byla stanovena lokalizace katepsinu B a katepsinu L. Cysteinová peptidáza katepsin B (IrCB) byla v různém množství lokalizována v průběhu sání i metamorfózy u všech pozorovaných vzorků. Cysteinovou peptidázu katepsin L (IrCL), bylo možno detekovat pouze ke konci sání nymf a pak až těsně před převlečením na dospělce, tedy zřejmě ve dvou vrcholech trávicí aktivity.

U nenasátých nymf byl přítomný IrCB i IrCL pozůstalý zřejmě z předchozího larválního stádia. Největší nárůst přítomnosti obou peptidáz byl pozorován 3. den, kdy byl signál nejintenzivnější. U plně nasátých nymf a rovněž u nymf týden, resp. 2 týdny po ukončení sání bylo pozorováno snížení intenzity signálu obou peptidáz. Zatímco signál IrCB byl patrný, byť v nižší intenzitě, u všech třech vzorků, signál pro katepsin L nebyl detekován. Tři týdny po ukončení sání na hostiteli byl pozorován opětovný vzestup intenzity signálu pro obě peptidázy, tento nárůst přetrval i do týdne čtvrtého. Ve všech vzorcích byla zaznamenána nižší intenzita signálu katepsinu L než intenzita signálu katepsinu B i přes to, že protilátka proti katepsinu L byla použita ve vyšší koncentraci.

Pro bližší pochopení pozorovaných změn v hladinách katepsinu B a L bude nutné tyto výsledky korelovat s enzymatickými aktivitami ve střevních homogenátech nymf. Tato stanovení jsou v současné době prováděna v rámci jiné diplomové práce.

6. Literatura

Agbede R. I. S., Kempt D. H., 1985. Digestion in the cattle-tick *Boophilus Microplus*: Light microscope study of the gut cells in nymphs and females. Int. J. Parasitol, 15: 147-157.

Agyei A. D., Runham N. W., Blackstock N., 1992, Histochemical changes in the two ixodid tick species *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* during digestion of the blood meal. Exp. Appl. Acarol, 13: 187-212.

Agyei A. D., Runham N. W., 1995. Studies on the morphological changes in the midguts of two ixodid tick species *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* during digestion of the blood meal. Int. J. Parasitol., 25: 55-62.

Balashov Y. S., 1983. An atlas of Ixodid tick ultrastructure. Special Publication Entomological Society of America.

Balashov Y. S., Grigoryeva L. A., 2003. Cytological chenges in the midgut of tick females of the genus *Ixodes* during and after feeding. Doklady Biological Sciences, 393: 527-530.

Coons L. B., Rosell-Davis R., Tarnowski B. I., 1986. Blood meal digestion in tick. In morphology, physiology, and behavioural biology of ticks. Edited by: Sauer J. R., Hair J. A.. New York: Ellis Horwood Ltd., John Wiley, 248-279.

Franta Z., Frantová H., Konvičková J., Horn M., Sojka D., Mareš M., Kopáček P., 2010. Dynamics of digestive proleolytic systém during blood feeding of the hard tick *Ixodes ricinus*. Parasites and Vectors, 3:119.

Grandjean O., 1984. Blood digestion in *Ornithodoros moubata* Murray sensu stricto Walton (Ixodidea: Argasidae) females. I. Biochemical changes in the midgut and ultrastructure of the midgut cell, related to intracellular digestion. Acarologia, 25: 147-165.

Gray J. S., 1991. The development and seasonal activity of the tick I. ricinus: a vector of Lyme borreliosis. Rev. Med. Vet. Entomol, 6: 324-333.

Gugleielmone A. A., Robbins R. G., Apanaskevich D. A., Petney T. N., Estrada-Peňa A., Horak I. G., Shao R., Barker S. C., 2010. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. Zootaxa, 2528: 1-28.

Horak I. G., Camicas J.-L., Keirans J. E., 2002. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names in Tick and tick-borne pathogens. Edited by Jongejan F. and Kaufman W. R.. Experimental and Applied Acarology, 28: 27-54.

Horn M., Zikmundová-Nussbaumerová M., Šanda M., Kovářová Z., Srba J., Franta Z., Sojka D., Bogyo M., Caffrey C.R., Kopáček M., Mareš M., 2009. Hemoglobin digestion in blood-feeding ticks: mapping a multipeptidase pathway by functional proteomics. Chem. Biol. 16, 1053-1063.

Jongejan F., Uilenberg G., 2004. The global importance of tick. Parasitology 129, S3-S14.

Koh K., Mōri T., Shiraishi S., Uchida T. A., 1991. Ultrastructural changes of the midgut epithelial cells in feeding and moulting nymphs of the tick Haemaphysalis longicornis. Int. J. Parasitol., 21: 23-36.

Miyoshi T., Tsuji N., Islam M. K., Huang X., Motobu M., Alim M. A., Fujisaki K., 2007. Molecular and reverse genetic characterization of serine proteinase-induced hemolysis in the midgut of the ixodid tick Haemaphysalis longicornis. J. Insect Physiol., 53: 195-203.

Nutall P. A., 1999. Pathogen-tick-host interactions: *Borrelia bugdorferi* and TBE virus. Zentralbl. Bakteriol. 289, 492-505.

Raikhel A. S., 1983. The intestine. In An atlas of Ixodid tick ultrastructure. Special Publication of the Entomological Society of America. Edited by Balashov Y. S.. 59-97 pp.

Ryšavý B., Černá Ž., Chalupský J., Országh I., Vojtek J., 1989. Základy parazitologie. SPN, Praha, 154-156 pp.

Sojka D., Franta Z., Horn M., Hajdušek O., Caffrey C. R., Mareš M., Kopáček P., 2008. Profiling of proteolytic enzymes in the gut of the tick *Ixodes ricinus* reveals an evolutionarily covserved network of aspartic and cysteine peptidases. Parasit. Vectors.,1: 7.

Sonenshine D. E., 1991. Biology of Tick, Vol. 1, Oxford University Press, New York.

Stejskal V., 1995. Klíšťata, komáři, blechy, vosy. Scriptum, Praha, 18-26 pp.

Vodrážka Z., 2002. Biochemie – Obdivuhodné katalysátory - enzymy, Academia, Praha, 145-147 pp.

Volf P., Horák P., Čepička I., Flegr J., Lukeš J., Mikeš L., Svobodová M., Vávra J., Votýpka J., 2007. Paraziti a jejich biologie. TRITON, Praha, 241-247, 262-264 pp.

Walker A. R., Fletcher J. D., 1987. Histology of digestion in nymphs of *Rhipicephalus appendiculatus* fed on rabbits and cattle naive and resistant to the ticks. Int. J. Parasitol., 17: 1393-1411.