

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Interakce viru klíšťové encefalitidy s makrofágovými  
buněčnými liniemi a její ovlivnění klíštěcími slinami**

**Bakalářská práce**

**Martina Klojdová**

**Školitel: prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.**

**České Budějovice 2016**

Klojdová, M., 2016: Interakce viru klíšťové encefalitidy s makrofágovými buněčnými liniemi a její ovlivnění klíštěcími slinami. [The interaction of tick borne encephalitis virus with macrophage cell lines and the influence of tick saliva on the interaction. Bc. Thesis, in Czech.] – 38 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

This thesis was focused on the infection of macrophage cell lines and mouse peritoneal macrophages with tick borne encephalitis. We examined the amount of virus produced by macrophage cells in different time periods. In the second part of the study we determined the influence of tick saliva derived from *Ixodes ricinus* on the infection.

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 .....

.....

Martina Klojdová

#### Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. za jeho vedení při tvorbě práce, ochotnou pomoc v laboratoři i cenné rady a kritické připomínky, bez kterých bych tuto práci nikdy nenapsala. Další můj obrovský dík patří paní Evě Výletové za vstřícnou pomoc při práci s buněčnými liniemi a za odpovědi na mé četné dotazy. V neposlední řadě chci poděkovat také svojí rodině a svému snoubenci za nekonečnou trpělivost s mými rozmazy doprovázejícími vznik této práce.

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1	Virus klíšťové encefalitidy .....	2
1.2	Klíštěcí sliny .....	6
1.3	Makrofágy .....	9
1.4	Interakce makrofág a virus.....	12
<b>2</b>	<b>CÍLE PRÁCE.....</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>15</b>
3.1	Materiál .....	15
3.1.1	BUNĚČNÉ LINIE	15
3.1.2	MYŠI	15
3.1.3	VIRUS	15
3.1.4	KLÍŠTĚCÍ SLINY	15
3.2	Metody .....	16
3.2.1	INFEKCE MAKROFÁGOVÝCH LINIÍ VIREM KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY	16
3.2.2	INFEKCE PERITONEÁLNÍCH MAKROFÁGŮ VIREM KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY	16
3.2.3	INFEKCE MAKROFÁGOVÝCH LINIÍ VIREM KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY ZA PŘÍTOMNOSTI KLÍŠTĚCÍCH SLIN	17
3.2.4	TERMOINAKTIVAČNÍ KŘIVKA VIRU	18
3.2.5	PLAKOVÁ TITRACE	18
3.2.6	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ	19
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>20</b>
4.1	Infekce makrofágových buněčných linií VKE .....	20
4.2	Infekce peritoneálních makrofágů a termoinaktivační křivka viru.....	21
4.3	Porovnání infekce makrofágových linií VKE za a bez přítomností klíštěcích slin .....	23
<b>5</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>26</b>

<b>6</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>29</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>30</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM LITERATURY.....</b>	<b>31</b>

# 1 ÚVOD

Virus klíšťové encefalitidy (VKE) patří mezi arboviry, což jsou viry přenášené členovci. K nákaze nejčastěji dochází při sání infikovaného klíštěte, v našich podmínkách konkrétně *Ixodes ricinus*. Virus proniká do těla hostitele skrze klíštěcí sliny, které mají důležitou roli pro šíření viru v organismu, a aktivuje přirozenou i specifickou imunitu.

Jako první se s virovou infekcí setkávají buňky přirozené imunity – dendritické buňky, makrofágy, monocyty a NK buňky. Mimo jiné dochází k produkci interferonu, zánětlivých cytokínů, aktivaci komplementu či apoptóze. VKE nám zatím neznámými mechanismy dokáže překonat antivirovou kontrolu, a tak při dosažení prahové hodnoty antigenu přichází na řadu specifická imunita. Uplatňuje se humorální i buněčná větev.

V této práci jsme se zabývali tím, jak se VKE množí v různých makrofágových liniích, případně v myších peritoneálních makrofázích, a tím jak je množení viru ovlivněno přítomností klíštěcích slin.

## 1.1 Virus klíšťové encefalitidy

VKE je podle Světové zdravotnické organizace (WHO) nejdůležitějším členovci přenášeným virem v Evropě, který způsobuje závažné lidské onemocnění (Ecker et al., 1999). Přestože je člověk vedle menších obratlovců pouze náhodným hostitelem, klíšťovou encefalitidou (KE) se každoročně v Evropě a Asii nakazí tisíce lidí, především díky sání infikovaného klíštěte z čeledi Ixodidae (v našich podmínkách hlavně *Ixodes ricinus*) (Mansfield et al., 2009). KE je závažným onemocněním, které napadá nervovou soustavu, avšak proti evropskému subtypu VKE dnes již existuje účinné očkování, které spočívá v užití viru inaktivovaného formaldehydem (Kunz, 2003).

### *Taxonomie*

VKE je členem rodu *Flavivirus* čeledi Flaviviridae. Rod *Flavivirus* zahrnuje cca 70 různých druhů virů (virus dengue, virus žluté zimnice, virus západního Nilu, virus japonské encefalitidy,...) (Kuno et al., 1998) a je členěn na 3 skupiny - podle vektorů jimiž jsou viry přenášeny (klíšťaty, komáry a neznámými vektory). Skupina přenášená klíšťaty se dále rozděluje na viry napadající mořské ptáky a viry napadající savce, kam spadá VKE (Gritsun et al., 2003). Savčí skupina zahrnuje mnoho antigeně příbuzných virů, které byly izolovány napříč Evropou, Asií a Kanadou a které společně tvoří tzv. komplex virů klíšťových encefalitid (Calisher, 1988). Do tohoto komplexu patří kromě VKE např. virus Louping-ill, virus Langat, virus Powassan, virus Omské hemoragické horečky, virus Kyasanurského lesa či virus Kadam (Grard et al., 2007).

Díky serologické a sekvenční analýze byly rozlišeny 3 různé subtypy VKE – evropský, sibiřský a dálněvýchodní (Ecker et al., 1999). Vektorem evropského subtypu je klíště *Ixodes ricinus*, kdežto u sibiřského a dálněvýchodního subtypu je to především klíště *Ixodes persulcatus*. Z hlediska procentuální úmrtnosti je nejzávažnější dálněvýchodní subtyp (20-60%) (Pogodina et al., 1986). Značně nižší úmrtnost vykazuje sibiřský subtyp (6-8%) i evropský subtyp (1-2%) (Burke & Monath, 2001).

### *Struktura virionu*

Zralé viriony VKE jsou sférické, obalené a mají cca 50 nm v průměru. Virion tvoří ikozaedrální nukleokapsida obklopená fosfolipidovou dvojvrstvou, která obsahuje 2 typy povrchových proteinů – obalový glykoprotein E a membránový protein M. Naproti tomu

u nezralých (intracelulárních) virionů je obsažen prekurzor M proteinu (prM), který se štěpí, zatímco virion opouští buňku a vzniká tak M protein (Murphy, 1980).

Protein E je hlavní antigenní determinantou VKE, je zodpovědný za vazbu virionu k receptoru hostitelské buňky a tím za následné proniknutí viru do buňky (Gritsun et al., 1995). Jsou známé tři hlavní antigenní domény (A, B a C). Doména A nese epitopy, které podmiňují zkříženou reaktivitu mezi různými flaviviry. Další dvě domény zajišťují typově a subtypově specifickou reaktivitu (Gritsun et al., 2003). Protein E v savcích hostitelích vyvolává produkci virus-neutralizačních protilátek, které hrají důležitou roli v navození obranné imunitní odpovědi (Heinz, 1986).

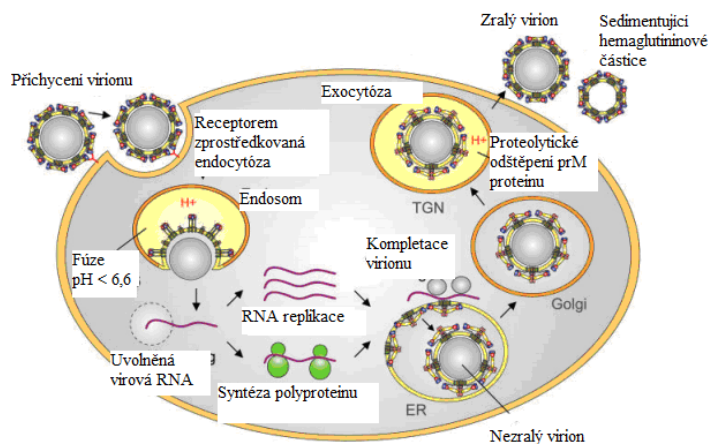
Nukleokapsida je tvořena jednovláknovou RNA pozitivní polarity o velikosti přibližně 11 kb a kapsidovým proteinem C. Genom se vyznačuje přítomností pouze jediného otevřeného čtecího rámce (open reading frame – ORF) a kóduje polyprotein složený ze zhruba 3400 aminokyselin, který je následně štěpen proteázami na 3 strukturální proteiny (C, E a M) a 7 proteinů nestrukturních (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (Chambers et al., 1990). Každý z nestrukturních proteinů má svou specifickou funkci, např. NS3 protein spolu s NS2B proteinem zajišťují proteázovou aktivitu pro štěpení nově nasyntetizovaného polyproteinu (Lindenbach & Rice, 2001).

Otevřený čtecí rámec všech flavivirů má na obou koncích netranslatované oblasti (UTR – untranslated regions), na 5' konci činí tato oblast cca 130 nukleotidů, zatímco na 3' konci 400 – 700 nukleotidů (Gritsun et al., 1997).

### *Replikace viru*

Virus vstupuje do buňky receptorem zprostředkovanou endocytózou. Kyselé pH v endozómu způsobí strukturální změny E proteinu, což vede k membránové fúzi a nukleokapsida se tak uvolní do buněčné cytoplazmy. V cytoplazmě je z nukleokapsidy uvolněna virová RNA a je zahájena replikace viru. V endoplazmatickém retikulu následně dochází ke zkompletování viru a vzniká nezralá virová částice obsahující prM protein. Nezralý virion putuje do trans Golgiho aparátu, kde dojde díky nízkému pH k odštěpení pr fragmentu M proteinu a zralý virion je poté exocytózou uvolněn ven z buňky (Stiasny & Heinz, 2006). Celý průběh replikace VKE je názorně zachycen na následujícím obrázku.





Obr. 1: Životní cyklus flavivirů (Stiasny et al., 2006).

### Šíření viru

Člověk je infikován VKE nejčastěji díky kousnutí nakaženého klíštěte, kdy se virus dostane skrze klíštěcí sliny do krve hostitele. Riziko infekce člověka závisí na několika faktorech, jako je např. hustota výskytu klíšťat v daném regionu, infekčnost a aktivita klíšťat, koncentrace viru v jednotlivých klíšťatech nebo délka jejich sání na hostiteli (Aleksjev & Čunikhin, 1989). Největší riziko nákazy hrozí v tzv. endemických oblastech, kde bylo prokázáno, že u 1 - 2% lidí, kteří přijdou do styku s infikovaným klíštětem, se rozvine onemocnění (Korenberg & Kovaleskii, 1995).

Další možností nákazy VKE je kromě sání infikovaného klíštěte také konzumace nepasterizovaného mléka, především kozího. Bylo experimentálně prokázáno, že VKE lze z kozího mléka izolovat následujících 5 – 25 dní po infekci (Šapoval, 1977). Viriony jsou stabilní v kyselém pH žaludku, které má po jídle hodnotu 2 – 7, cca 2 hodiny. Jelikož mléčná strava opouští žaludek poměrně rychle (řádově minuty až nanejvýše 2 hodiny) a produkce kyseliny chlorovodíkové je spuštěna za 45 – 60 minut, trávicí trakt proto představuje efektivní cestu nákazy VKE (Pogodina, 1960).

V přírodním prostředí lesů Evropy a Asie je VKE obsažen v cyklu, který zahrnuje klíšťata a především menší obratlovce. Vektorový hostitel (klíště) se infikuje během svého životního cyklu, kdy saje na nakaženém obratlovcu, avšak virémie není podmínkou pro přenos viru. Bylo prokázáno, že přenos viru byl podstatně efektivnější mezi klíšťaty spolusajícími v těsné blízkosti na téže neviremickém hostiteli (Labuda et al., 1993). Po nasátí infikované krve dochází u klíštěte k pomnožení viru v buňkách trávicího traktu a následně jsou tak infikovány buňky slinných žláz, odkud se virus při následujícím sání šíří na dalšího obratlovčího hostitele (Nuttall et al., 1994). Klíště zůstává infikované po celou

dobu svého životního cyklu (transstadiální přenos) a může docházet i k transovariálnímu přenosu, kdy nakažená samice přenáší infekci na svá vajíčka (Gritsun et al., 2003).

Hlavním rezervoárem VKE jsou především drobní hlodavci, větší savci jako jsou např. krávy, ovce, kozy či vysoká zvěř nehrají při přenosu viru důležitou roli, jelikož u nich titry viru nedosahují vyšších hodnot, avšak tyto živočichové mohou podporovat šíření viru především nepřímo, přenosem vektorů do nových oblastí. Člověk je spíše náhodným hostitelem a představuje tzv. slepou větev (Süss, 2003).

### *Klinické projevy a průběh KE*

V rané fázi infekce dochází nejprve k pomnožení viru v místě jeho vstupu do organismu, čili po přisátí klíštěte se virus replikuje v rámci kůže. Odtud se pomocí Langerhansových buněk dostává do spádových lymfatických uzlin. Následuje další replikace viru a ten se dostává do krevního oběhu a dále do orgánů retikuloendoteliálního systému (játra, slezina, kostní dřeň). To, jak virus infikuje CNS, zatím není dostatečně objasněno, ale má se za to, že při dlouhotrvající virémii může dojít k překonání hematoencefalitické bariéry např. pasivní difuzí nebo transcytózou (Haglund & Günther, 2003). Jakmile virus pronikne do CNS, dále se replikuje, způsobuje poškození neuronů a vznik zánětu, ovšem způsob, jakým k tomu dochází, není zcela znám (Růžek et al., 2010).

Evropský subtyp VKE způsobuje dvoufázové onemocnění. Inkubační doba KE trvá průměrně 7 – 14 dní. U některých pacientů se mohou objevit časné symptomy jako je únava trvající 1 až 2 dny, bolest krční páteře a ramen či bederní páteře. Klasické symptomy první fáze se objevují náhle, postižení jsou často schopni přesně určit přesnou dobu jejich nástupu, a patří mezi ně zvýšení tělesné teploty (38 – 39 °C), pocit nevolnosti doprovázený zvracením, návaly horka, dušnost, bolest svalů, zad či končetin. Příznaky první fáze jsou snadno zaměnitelné s nespecifickou chřipkou (Gritsun et al., 2003). Po první fázi často následuje asymptomatická perioda, která trvá 2 – 10 dní. Během této doby dochází k pronikání viru do CNS a poté následuje druhá fáze onemocnění (Holzmann, 2003).

Druhá fáze se vyznačuje vysokými horečkami, prudkými bolestmi hlavy, nevolností a zvracením, ztuhnutím svalů na šíji, svalovým třesem, poruchami spánku, paměti a koncentrace i celkovou dezorientací. Z vyšetření mozkomíšního moku je patrný nárůst počtu bílých krvinek a proteinů. Neurologické příznaky se liší na základě toho, jaká část CNS byla napadena (např. mozkové pleny, mozkový parenchym, mícha, prodloužená mícha). Zřídka je postižena pouze jedna část CNS, většinou je infikováno více různých oblastí (Lindquist & Vapalahti, 2008).

## 1.2 Klíštěcí sliny

Sliny klíšťat jsou sekretovány slinnými žlázami, které jsou tvořeny četnými lalůčky (acini) různých typů – byly nalezeny tři typy u samic a čtyři u samců (čtvrtému typu je přiřkládána reprodukční role). Jednotlivé typy jsou tvořeny různými druhy buněk a sekretují různé bioaktivní látky. Během sání klíštěte dochází ke značnému nárůstu a diferenciaci slinných žláz, jejich hmotnost a obsah proteinů se zvýší až 25x, avšak počet buněk zůstává nezměněný. Z alveolů jsou sliny pomocí slinných vývodů odváděny do salivaria, které je uloženo mezi hypostomem a chelicerami. Odtud se sliny při sání dostávají dále, do kůže hostitele v místě sání klíštěte (Sauer et al., 2000).

### *Složení slin*

Klíštěcí sliny obsahují mnohé látky napomáhající klíštěti v přemožení obrany hostitele. Farmakologicky účinné molekuly mají především antikoagulační, protizánětlivé, imunomodulační a imunosupresivní účinky.

V první řadě je nejdůležitějším úkolem klíštěte zajistit si bezpečné sání na hostiteli, aniž by bylo zpozorováno. K tomu slouží látky, které tlumí svědění a bolest např. tím, že vážou histamin uvolňující se z poškozené tkáně – histamin vázající lipokaliny (Paesen et al., 2000).

Dalším důležitým krokem pro úspěšné sání je zabránění sražení krve v místě kousnutí. K tomu, aby se klíště mohlo na hostiteli krmit po delší dobu, je potřeba narušit přirozené mechanismy vedoucí k vytvoření hemostatické zátky. Inhibiči hemostázy zajišťují látky s vazodilatačním účinkem, které blokují hostitelovu přirozenou vazokonstrikci následující porušení tkáně. Těmito látkami jsou např. deriváty lipidů zahrnující prostaglandiny a prostacyclin (Ribeiro et al., 1988). Dále jsou uplatňovány látky inhibující agregaci trombocytů (např. apyráza) a látky napadající koagulační kaskádu – tyto látky, které byly doposud objeveny, můžeme rozdělit na inhibitory aktivovaného faktoru X (FXa), trombinové inhibitory, inhibitory vnějšího tenázového komplexu a inhibitory kontaktního systému proteinů, přičemž nejčastějšími cíli jsou FXa a trombin (Kazimírová & Štibrániová, 2013).

Klíštěcí sliny mají prokázané imunomodulační účinky. Ovlivňují přirozenou i specifickou imunitu hostitele. První obrannou linii představuje přirozená (nespecifická) imunitní odpověď zahrnující komplement, proteiny akutní fáze, neutrofilů, makrofágy, žírné buňky, bazofily, eosinofily, dendritické buňky a NK (natural killer) buňky. Sliny *Ixodes ricinus* obsahují lipokalin, který zajišťuje snížení aktivace a chemotaxe neutrofilů, čímž se

značně snižuje jejich úloha v zánětu (Beaufays et al., 2008). Dále byl prokázán vliv komponent klíštěcích slin na aktivitu NK buněk (Kubeš et al., 1994), makrofágů (Kopecký & Kuthejlová, 1998) i dendritických buněk, u nichž může být inhibována diferenciaci a maturace (Skallová et al., 2008) či ovlivňována exprese receptorů pro chemokiny, díky čemuž dochází k jejich snížené migraci (Cavassani et al., 2005).

Molekuly obsažené ve slinách mohou dále inhibovat různé chemokiny (např. inhibitory interleukinu-8) nebo redukovat schopnost buněk vylučovat různé cytokiny (interferony, interleukiny, tumor necrosis faktor), které hrají důležitou roli v dalším rozvoji imunitní odpovědi (Kazimírová & Štibrániová, 2013).

V klíštěcích slinách byly dále nalezeny látky ovlivňující T i B lymfocyty. V přítomnosti slin dochází k potlačení produkce  $T_H1$  cytokinů (IL-2 a IFN- $\gamma$ ), což může inhibovat expanzi antigenně specifických T buněčných klonů, diferenciaci B lymfocytů, aktivaci makrofágů a aktivitu NK buněk. Dále nastává naopak zvýšení produkce  $T_H2$  cytokinů (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13), které mají protizánětlivý efekt (Schoeler et al., 1999). Klíštěcí sliny obsahují i další imunomodulační proteiny – např. IL-2 vázající protein (Gillespie et al. 2001), proteiny (BIF a BIP) inhibující B lymfocyty (Hannier et al., 2004) nebo protein Iris potlačující proliferaci T lymfocytů (Leboulle et al., 2002).

Další důležitou skupinou imunomodulačních látek jsou cystatiny. Jedná se o protizánětlivé proteiny, které inhibují cysteinové proteázy. Patří sem např. sialostatin L, který působí proti zánětu, inhibuje proliferaci cytotoxických T lymfocytů a LPS indukovanou maturaci dendritických buněk, nebo také sialostatin L2, který nemění funkce antigen prezentujících buněk, ale pravděpodobně je důležitý pro úspěšné sání klíštěte (Kotsyfakis et al., 2006, 2008, 2010).

Klíštěcí slinné žlázy a sliny mají kromě zajištění bezpečného sání prostřednictvím imunomodulačních a antihemostatických látek i další účinky. Slinné žlázy zastávají osmoregulační funkci, díky čemuž jsou sající klíšťata schopná koncentrovat přijaté živiny a spolu se slinami vylučovat zpět do hostitele přebytečnou vodu (Tatchell, 1967). Kromě proteinů působících na hostitele klíštěte vylučuje také proteiny, kterými se chrání – např. specifický protein, který váže imunoglobulin G (Wang & Nuttall, 1999).

Dalším důležitým efektem, který může mít sání klíštěte je SAT neboli slinami aktivovaný přenos (saliva-activated transmission), při kterém je prostřednictvím slin přenesen patogen z klíštěte na hostitele. Tento patogen pak navíc může snadněji proliferovat díky oslabení obranných mechanismů hostitele. SAT efekt byl poprvé popsán u přenosu

Thogoto viru z klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus* (Jones & Nuttall, 1990). Od té doby byl tento způsob přenosu popsán u řady dalších patogenů (VKE, virus Louping ill, různé druhy borrelií,...), které nemusí být přenášeny pouze z klíštěte ale také z dalších hematofágních členovců (např. komárů) (Nuttall & Labuda, 2004).

### 1.3 Makrofágy

Tkáňové makrofágy spolu s cirkulujícími monocyty v krvi tvoří mononukleární fagocytární systém. Jsou tzv. profesionálními fagocyty (spolu s neutrofilami a dendritickými buňkami), které hrají hlavní roli v obraně organismu proti patogenům. Dále fagocytují i zbytky vlastních buněk zahynulých apoptózou, jsou schopny zabít infikované nebo pozměněné buňky, podílí se na vzniku zánětu. Makrofágy také fungují jako antigen prezentující buňky potřebné pro rozvoj specifické imunitní odpovědi a sekreční buňky (Plekhova et al., 2011).

Makrofágy vznikají za působení specifických růstových faktorů z hematopoetických prekurzorů kostní dřeně, které přímo či prostřednictvím cirkulujících monocytů diferencují v tkáňové makrofágy nebo blízké příbuzné myeloidní dendritické buňky (Steinman & Idoyaga, 2010). Monocyty a makrofágy sdílejí vlastnosti s granulocyty, obzvláště s neutrofilami, a v menší míře i s B lymfocyty. Migrují v organismu skrze kostní dřeň, krev, mízu a nehematopoetické tkáně. V tkáních jsou stále přítomné tzv. rezidentní makrofágy, které i bez přítomnosti zánětu zajišťují likvidaci apoptických buněk a slouží jako strážci případné infekce (Gordon & Martinez, 2010). Podle své tkáňové lokalizace jsou makrofágy pojmenovány – např. Kupferovy buňky v játrech nebo mikroglie v CNS.

#### *Aktivace makrofágů*

Existují dva různé způsoby makrofágové aktivace. To, jakým způsobem je makrofág aktivován, určuje další směr vývoje imunitní odpovědi. První možností aktivace je působení IFN- $\gamma$  a LPS, kdy nastává rozvoj imunitní reakce směrem k T<sub>H</sub>1. Druhou alternativou aktivace je vliv IL-4 a IL-13, kdy naopak následuje reakce T<sub>H</sub>2 (Gordon & Martinez, 2010).

K plné aktivaci makrofágů je kromě působení daných cytokinů potřeba také rozpoznání patogenu pomocí speciálních receptorů. Těmito receptory mohou být PRR (pattern-recognition receptors), které reagují s charakteristickými molekulami patogenů (PAMPS), dále může být fagocytóza zprostředkována Fc receptory, scavengerovými receptory nebo např. receptory komplementu (Aderem & Underhill, 1999)..

Aktivovaný makrofág je schopen intenzivnější fagocytózy, exprimuje na svém povrchu více MHC II molekul, sekretuje složky komplementu, dále řadu důležitých proteinů, hydrolytické enzymy přispívající k rozvoji zánětu a TNF- $\alpha$ . Po fagocytóze antigenu je sekretován IL-1 potřebný pro aktivaci T<sub>H</sub> buněk, který působí též na cévní endotel, čímž

hraje roli v zánětu a má pyrogenní účinky. Aktivita makrofágů může být zvýšena chemotaktickými faktory produkovanými T buňkami nebo složkami komplementu.

V této práci byly použity následující makrofágové linie.

### *IC-21*

Buněčná linie IC-21 byla odvozena transformací normálních peritoneálních makrofágů myši kmene C57BL/6 opičím virem 40 (simian virus 40 – SV40). K porovnání schopnosti fagocytózy normálních a transformovaných makrofágů byla provedena inkubace s opsonizovanými a neopsonizovanými ovčími erytrocyty po různě dlouhou dobu. Transformované makrofágy vykazovaly oproti těm původním mírně zvýšenou fagocytární aktivitu u obou typů erytrocytů.

Buňky linie IC-21 sdílí mnoho vlastností s primárními makrofágy - obsahují specifické makrofágové antigeny, mají fagocytární aktivitu, produkují lysozymy a kyselou fosfatázu. V některých vlastnostech se ale od primárních makrofágů odlišují, například obsahují SV40 T antigen, ze skleněných povrchů mohou být uvolněny pomocí trypsinu, nevyžadují CM faktor pro udržení replikace a jsou heteroploidní. Díky své schopnosti stabilního růstu *in vitro* jsou využívány ve studiu protivirové imunity a imunitní odpovědi (Mauel & Defendi, 1971). *In vitro* jsou také schopné lýzovat nádorové cíle a zdají se být více diferencované než makrofágová linie P388/D1 (Walker & Demus, 1975).

### *P388/D1*

Makrofágy buněčné linie P388/D1 pocházejí z ascitu myši kmene DBA/2 s lymfoidním novotvarem. Z morfologického hlediska jsou to lymfoblasty s tumorogenním efektem - u nahých myší byl po podkožním naočkování 10 buňkami prokázán 100 % vývoj nádoru během 21 dní (Koren et al. 1975).

Buňky P388/D1 adherují, mají podobou hladinu kyselé fosfatázy jako normální aktivované peritoneální makrofágy, výrazně se však odlišují ve schopnosti chemotaxe (nevykazují žádnou chemotaktickou odpověď). Dále mají nižší aktivitu adenosin deaminázy, nižší schopnost fagocytózy obou typů (Fc- dependentní i independentní). Po stimulaci LPS produkují IL-1 a LAF (lymfocyty aktivující faktor) a jsou aktivní v ADCC (buněčné cytotoxicitě závislé na protilátkách) (Snyderman et al., 1977). P388/D1 aktivované IFN-  $\gamma$  nevytvářejí indukibilní NO syntázu a neprodukuje NO (Lane et al. 1994).

### *PMJ2-R*

Buněčná linie PMJ2-R byla získána *in vivo* infekcí peritoneálních makrofágů myši kmene C57BL/6J retrovirem J2 (Adami et al. 1993). Využití J2 viru se ukázalo jako efektivní cesta získání buněčné linie peritoneálních makrofágů, díky rychlosti a minimu *in vitro* manipulace, čímž byla snížena potenciální možnost mikrobiální kontaminace.

Buňky mají morfologické znaky typické pro makrofágy, jsou kulovitěho nebo oválného tvaru s bazofilní cytoplasmou. Obsahují četné vakuoly a acentricky uložené oválné jádro. Analýza prokázala přítomnost povrchových antigenů peritoneálních makrofágů (MAC-1, MAC-2, Fc receptor, Ly-5.1, F4/80). Barvení ukázalo intracelulární expresi produktu *v-raf* genu pocházejícího z J2 viru. Na základě působení LPS buňky produkují IL-6. Buňky mají fagocytární aktivitu, cytotoxickou aktivitu proti nádorovým buňkám a obsahují nespecifickou esterázu. Konstitutivně pouze 5 – 15 % makrofágů exprimuje MHC II antigeny, avšak toto číslo se výrazně zvyšuje inkubací s IFN- $\gamma$  (Adami et al., 1993).



#### 1.4 Interakce makrofág a virus

Makrofágy se při virové infekci účastní produkce protilátek a interferonu, spolupracují s lymfocyty. Mohou mít také přímou účast v eliminaci infekčních agens a to tak, že zabíjejí buňky infikované virem v mechanismu ADCC, nebo mohou virus fagocytovat a destruovat. V současnosti se antivirová aktivita monocytů a makrofágů rozděluje na přímou a zprostředkovanou (Baskin, 1997). Vlastní přímý antivirový mechanismus je definován jako schopnost makrofágů omezit množení viru v sobě samých, díky čemuž se stávají netolerantními cíli pro virovou replikaci. Naopak nepřímý antivirový mechanismus spočívá ve schopnosti makrofágů ovlivňovat extracelulární virus a zasahovat do replikace viru v okolních virově tolerantních buňkách. Bylo zjištěno, že během některých virových infekcí jsou aktivované makrofágy schopny rozlišovat mezi neporušenými a infikovanými buňkami (Silva et al., 2007).

Na jedné straně makrofágy představují biologickou bariéru bránící rozšíření virové infekce v organismu z primárního místa zánětu a chrání tak vysoce citlivé buňky centrálního nervového systému. Na druhé straně virus může obejít kontrolní mechanismy a infikovat monocyty, které maturují v makrofágy, a představují tak zdroj viru v organismu (Plekhova et al., 2011). Bylo prokázáno, že buňky monocytární / makrofágové linie jsou důležitými zdroji lokální replikace VKE předtím, než se objeví virémie (Kreil et al., 1997), a že VKE se replikuje v myších makrofázích (Antharig et al., 2009).

Experimenty prokázaly, že infekce VKE, stejně tak jako jinými flaviviry (virus dengue, virus západního Nilu, virus japonské encefalitidy), má u makrofágů za následek produkci oxidu dusnatého (NO). NO má inhibiční efekt na virovou replikaci, a pravděpodobně tak přispívá ke kontrole flavivirových infekcí zahrnujících i KE (Kreil & Eibl, 1996), avšak přesná úloha NO zůstává neobjasněná. Kromě produkce NO aktivované makrofágy po kontaktu s virem vytvářejí komplexy enzymů, které aktivně katalyzují produkci superoxidového anionu (Babior, 1999). Aktivované makrofágy jsou oproti rezidentním větší, obsahují více proteinů i RNA a vykazují vyšší enzymatickou aktivitu.

Důležitou roli v obraně proti virové infekci hraje také již zmiňovaný IFN- $\gamma$ . Aktivované makrofágy na svém povrchu prezentují antigen v komplexu s MHC II molekulami CD4<sup>+</sup> T lymfocytům. V přítomnosti IL-12 a IL-18 (které jsou také produkovány mimo jiných aktivovanými makrofágy) dochází k rozvoji T<sub>H</sub>1 imunitní reakce (Domeika et al., 2002). Aktivované T<sub>H</sub>1 lymfocyty produkují IFN- $\gamma$ , který aktivuje další makrofágy a zvyšuje expresi jejich MHC II molekul, čímž se uzavírá pozitivní zpětná vazba. Aktivované

makrofágy mohou také při vhodné stimulaci IL-12 a IL-18 samy produkovat IFN- $\gamma$ , čímž dochází k autokrinní makrofágové aktivaci (Munder et al., 1998).

S produkcí interferonů souvisí možný způsob, jak flaviviry dokáží uniknout antivirové kontrole. Byla prokázána citlivost Langat viru (LGTV) k antivirovým účinkům interferonů, nicméně infekce buněčných linií před přidavkem IFN měla za následek inhibici interferonové signalizace. Jeden z nestrukturních proteinů LGTV (NS5) totiž inhibuje JAK-STAT signalizaci, díky které buňka za normálních okolností reaguje na IFN (Best et al., 2005).

## **2 CÍLE PRÁCE**

- 1. Osvojení kultivace buněčných linií a primárních kultur myších makrofágů.**
- 2. Prokázání replikace viru klíšťové encefalitidy v makrofázích.**
- 3. Objasnění vlivu klíštěcích slin na replikaci viru klíšťové encefalitidy v makrofázích.**

### 3 MATERIÁL A METODY

#### 3.1 Materiál

##### 3.1.1 BUNĚČNÉ LINIE

Pro pokusy byly použity 3 různé makrofágové linie (IC-21, PMJ2-R, P388/D1). Buňky byly kultivovány při 37 °C v mediu RPMI obohaceném o 10 % bovinního fetálního séra (BOFES), 1 % antibiotik (ATB), 1 % L-glutaminu (GL) a 0,1 % 2-merkaptetanolu (ME) (Biosera). Linie PMJ2-R byla kultivována v 5 % CO<sub>2</sub>.

Dále byly pro pokus použity PS buňky (PS buněčná linie byla derivována z buněk prasečí ledviny), které byly kultivovány při 37 °C v mediu L<sub>15</sub> (Leibowitz) s 3% prekolostrálního telecího séra, 1% směsí antibiotik a antimykotik a 1% L-glutaminu (Biosera).

##### 3.1.2 MYŠI

V pokusech byly použity samice inbredního myšního kmene C57BL/6N (AnLab Praha s.r.o.). Myši byly chovány ve zvěřinci Katedry medicínské biologie v Českých Budějovicích za standardních podmínek.

##### 3.1.3 VIRUS

K infekci makrofágů byl použit virus KE kmene Neudoerfl o různých titrech ( $1 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  a  $4 \times 10^8$  PFU/ml).

##### 3.1.4 KLÍŠTĚCÍ SLINY

Sliny byly získány z dospělých samic klíšťat *Ixodes ricinus*. Tyto samice sály na morčatech po dobu 6 dnů. Sliny byly zachytávány do skleněných kapilár, které měla klíšťata nasazené na hypostomu. Na hřbetní část těla bylo každé samici kápnuto 1,5 µl 5% roztoku pilokarpinu (Sigma) v 95% ethanolu. Následně byla klíšťata umístěna do boxu s navlhčeným filtračním papírem a byla inkubována při 37 °C. Po 2 hodinách byly sliny z kapilár sesbírány pomocí balónku do mikrozkuřavky a uchovány při teplotě -70 °C. Obsah proteinů ve

slinách byl stanoven na 214 µg/ml pomocí metody pro určení koncentrace proteinů podle Bradfordové (Bradford, 1976).

## 3.2 Metody

### 3.2.1 INFEKCE MAKROFÁGOVÝCH LINIÍ VIREM KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY

V pokusu byly infikovány buněčné linie IC-21, PMJ2-R a P388/D1. Buňky byly kultivovány v triplikacích a odebírány 0, 24, 48 a 72 hodin po infekci. Nejprve byly buňky spočteny. Na jednu jamku bylo stanoveno 50 000 buněk, na každou linii připadlo 12 jamek (4 časy po 3 jamkách), proto bylo potřeba  $6 \times 10^5$  buněk každé linie.

Objem s požadovaným počtem buněk byl centrifugován (5 min při 1000 rpm, 4 °C), následně byl odebrán supernatant a do každé mikrozkušavky bylo přidáno 40 µl media a 60 µl viru. Titr použitého viru dosahoval  $1 \times 10^8$  PFU/ml, tudíž na 1 buňku připadalo 10 virových částic (MI = 10). Buňky s virem byly inkubovány 60 minut při 37 °C.

Po hodinové inkubaci byly mikrozkušavky zcentrifugovány (5 minut při 1000 rpm, 4 °C), byl odebrán supernatant, poté přidán 1 ml media. Obsah byl promíchán a následně znovu centrifugován (5 minut při 1000 rpm, 4 °C). Promývání a centrifugace byly 3x opakovány.

Po poslední centrifugaci byl odebrán supernatant a buněčný pelet byl rozsuspndován ve 3 ml media. Suspenze byla nanášena po 200 µl na 96 jamkový panel. Panel byl inkubován při 37 °C v 5% CO<sub>2</sub> a v časech 0, 24, 48, a 72 hodin byly sbírány jednotlivé vzorky, které byly dále uchovávány při – 70 °C.

### 3.2.2 INFEKCE PERITONEÁLNÍCH MAKROFÁGŮ VIREM KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY

Dvě samice myšního inbredního kmene C57BL/6 byly usmrceny zlomením vazy a oběma byly do peritoneální dutiny vstříknuty 3 ml vychlazeného media RPMI 1640. Medium bylo po masáži peritonea pinzetou pomalu aspirováno zpět do stříkačky. V aspirátu byly spočteny buňky. Na jednu jamku jsme uvažovali 40 000 buněk ve 200 µl, proto bylo potřeba připravit suspenzi o koncentraci 200 000 makrofágů/ml. Vzhledem k tomu, že pouze cca 20 % z peritoneálních buněk tvoří makrofágy, požadovaná koncentrace byla 1 000 000 buněk/ml. Na 12 jamek (4 odběrové časy v triplikacích) připadalo 2,4 ml buněčné suspenze. Proto bylo smícháno 2 500 000 buněk s 2,5 ml media RPMI obohaceného o 10 % BOFES, 1 % ATB a 1 % GL (Biosera).

Připravená suspenze byla rozdělena po 200  $\mu\text{l}$  na čtyři 96 jamkové panely (3 jamky na každém panelu). Panely byly označeny časy 0, 24, 48 a 72 hodin a byly inkubovány při 37 °C v 5%  $\text{CO}_2$  4,5 hodiny za účelem adheze makrofágů. Po uplynutí uvedeného času bylo z jamek odsáto medium, přidáno nové, které bylo následně znovu odsáto. Toto promývání bylo 3x opakováno. Nakonec bylo do každé jamky přidáno 40  $\mu\text{l}$  media RPMI + 10 % BOFES + 1 % ATB + 1 % GL (Biosera).

Všechny jamky byly infikovány 10  $\mu\text{l}$  viru Neudoerfl o titru  $4 \times 10^7$  PFU/ml. V každé jamce tak bylo  $4 \times 10^4$  buněk a  $4 \times 10^5$  virových částic, čili MI byla rovna 10. Panely byly inkubovány 60 minut při 37 °C v 5%  $\text{CO}_2$ . Následovalo promytí od volného viru stejným způsobem jako promytí adheze makrofágů od ostatních neadherovaných peritoneálních buněk. Nakonec bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  media RPMI + 10 % BOFES + 1 % ATB + 1 % GL (Biosera) a panely byly inkubovány při 37 °C v 5 %  $\text{CO}_2$ . V časech 0, 24, 48 a 72 hodin byly jednotlivé panely zmrazeny na  $-70$  °C.

### 3.2.3 INFEKCE MAKROFÁGOVÝCH LINIÍ VIREM KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY ZA PŘÍTOMNOSTI KLÍŠŤEČÍCH SLIN

V pokusu byly infikovány buněčné linie IC-21 a PMJ2-R. Obě linie byly infikovány jak za přítomnosti klíštěčích slin, tak i bez nich, pro následné srovnání množství přítomného viru. Vzorky byly kultivovány v triplicacích a odebírány 0, 24, 48 a 72 hodin po infekci. Nejprve byly buňky spočteny. Na jednu jamku bylo stanoveno 25 000 buněk, na každou linii připadlo 12 jamek se slinami a 12 jamek bez slin (4 časy po 3 jamkách), proto byla potřeba  $2 \times 3 \times 10^5$  buněk každé linie.

Objem s požadovaným počtem buněk byl zcentrifugován (5 min při 1000 rpm, 4 °C), následně byl odebrán supernatant a do každé ze čtyř mikrozkušavek bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  media RPMI + 10 % BOFES + 1 % ATB + 1 % GL (Biosera). Poté bylo do dvou mikrozkušavek (jedna s IC-21, druhá s PMJ2-R) přidáno 7  $\mu\text{l}$  slin. Jelikož koncentrace proteinu v použitých slinách byla 214  $\mu\text{g/ml}$ , množství přidaných slin představovalo 1,5  $\mu\text{g}$  proteinu. Výsledná koncentrace proteinu v mediu s buňkami tedy byla 15  $\mu\text{g/ml}$ . V tomto složení byly buňky inkubovány 2 hodiny při 37 °C.

Po dvouhodinové preinkubaci bylo do každé mikrozkušavky přidáno 100  $\mu\text{l}$  viru Neudoerfl o titru  $1 \times 10^7$  PFU/ml. Jelikož viru k dispozici bylo pouze 250  $\mu\text{l}$ , toto množství

bylo doředěno 200  $\mu$ l media RPMI + 10 % BOFES + 1 % ATB + 1 % GL (Biosera). Následovala 1 hodina inkubace při 37 °C.

Po hodinové inkubaci byly buňky 3x promyty k odstranění volného viru (3x centrifugace 5 min při 1000 rpm a 4 °C). Po třetí centrifugaci byl buněčný pelet rozsuspendován v 1,2 ml media RPMI + 10 % BOFES + 1 % ATB + 1 % GL (Biosera). K buňkám preinkubovaným s klíštěcími slinami bylo přidáno 85  $\mu$ l slin, čímž bylo dosaženo koncentrace proteinu v mediu 15  $\mu$ g/ml. Do zbylých dvou mikrozkušavek bylo namísto slin přidáno 85  $\mu$ l media.

Suspenze byla nanášena po 100  $\mu$ l na 96 jamkový panel. Panel byl inkubován při 37 °C v 5% CO<sub>2</sub> a v časech 0, 24, 48, a 72 hodin byly sbírány jednotlivé vzorky 100  $\mu$ l, které byly dále uchovávány při – 70 °C.

#### 3.2.4 TERMOINAKTIVAČNÍ KŘIVKA VIRU

Pro srovnání měnícího se množství živého viru v samotném mediu a v mediu s buňkami byl proveden pokus pro sestavení termoinaktivační křivky viru. Použit byl virus kmene Neudoerfl o titru  $4 \times 10^8$  PFU/ml, který byl 1000x naředěn v mediu RPMI + 10 % BOFES, 1 % ATB a 1 % GL (Biosera) do výsledného objemu 3 ml. Tento objem byl rozdělen do 3 mikrozkušavek po 1 ml, aby vzorky mohly být odebírány v triplicacích. Následně byly v časech 0, 24, 48 a 72 hodin odebírány vzorky po 200  $\mu$ l, které byly dále uchovávány při -70 °C.

#### 3.2.5 PLAKOVÁ TITRACE

Získané vzorky byly vyhodnoceny pomocí metody plakové titrace (de Madrid & Porterfield, 1969). Plaková titrace je metoda sloužící ke stanovování množství virových částic ve vzorku. Výsledná koncentrace virových částic je vyjádřena počtem plakatvorných jednotek (PFU – plaque forming units) na 1 ml virové suspenze. Plaková titrace byla prováděna na savčích buňkách PS.

Byly použity 24-jamkové panely (TPP), do nichž byly naředěny testované vzorky desítkovým ředěním v mediu L<sub>15</sub> + 3% prekolostrálního telecího séra + 1% antibiotik a antimykotik + 1% L-glutaminu (Biosera) (do 180  $\mu$ l media bylo přidáno 20  $\mu$ l vzorku). Následně bylo do každé jamky přidáno 300  $\mu$ l suspenze PS buněk o koncentraci 300 000 buněk/ml. Obsah panelů byl promíchán a panely byly inkubovány v boxech

s 0,5% CO<sub>2</sub> při 37 °C 4 hodiny. Po uplynutí 4 hodin bylo na každou jamku krouživým pohybem nakapáno 400 µl přelivu, který byl připraven smícháním 2x koncentrovaného kultivačního media L<sub>15</sub> s 1,5% roztokem karboxymethylcelulózy v poměru 1 : 1. Vše bylo znovu inkubováno při 37 °C v atmosféře 0,5% CO<sub>2</sub> po dobu 5 dní.

Po uplynutí 5 dní byly vzniklé plaky zviditelněny barvením. Panely byly nejprve promyty ve fyziologickém roztoku (0,9% roztok NaCl) a poté byly 60 minut barveny roztokem naftalenové černě (1 g naftalenové černě, 60 ml ledové kyseliny octové, 13,5 g octanu sodného, doplněno do 1 l destilované vody). Nakonec byly panely promyty pod tekoucí vodou. Díky tomuto barvení došlo ke zviditelnění neobarvených ložisek virem lyzovaných buněk (tzv. plaků) mezi ostatními obarvenými buňkami.

### 3.2.6 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ

Získaná data byla statisticky vyhodnocena v programu R (R Development Core Team 2008) pomocí metody jednocestné analýzy variance (ANOVA). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami ( $p < 0,05$ ) jsou v grafech označeny hvězdičkami (jedna hvězdička pro  $p < 0,05$ , dvě pro  $p < 0,01$ ). Všechny hodnoty vynesené do grafů použitých ve výsledcích představují aritmetické průměry vypočtené z naměřených hodnot triplikací. Chybové úsečky v grafech znázorňují střední chybu průměru (SEM).



## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Infekce makrofágových buněčných linií VKE

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, jak se VKE množí v různých makrofágových liniích v časových intervalech 0, 24, 48 a 72 hodin. Byly použity IC-21, PMJ2-R a P388/D1 buněčné linie.

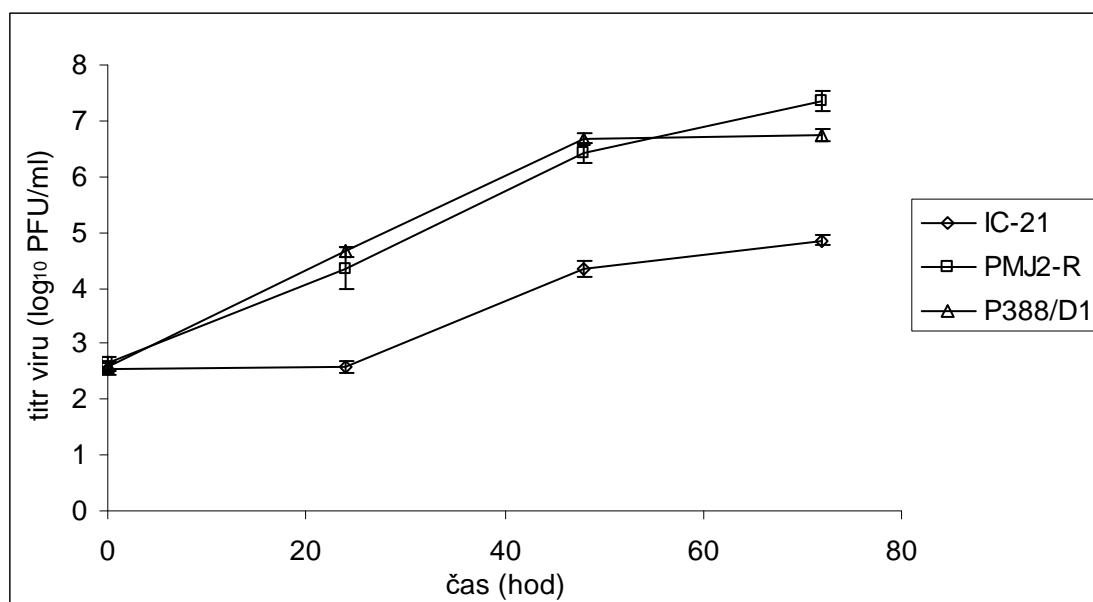
V následující tabulce jsou uvedeny titry viru pro jednotlivé makrofágové linie v daných časových intervalech. Tyto hodnoty byly vypočteny z počtu odečtených plaků plakových titrací.

**Tab.I:** Vývoj infekce makrofágových linií v daných časových intervalech.

čas (hod)	títr viru (PFU/ml)		
	PMJ2-R	P388/D1	IC-21
0	$4,09 \cdot 10^2$	$3,64 \cdot 10^2$	$3,33 \cdot 10^2$
24	$2,12 \cdot 10^4$	$4,55 \cdot 10^4$	$3,83 \cdot 10^2$
48	$2,57 \cdot 10^6$	$4,55 \cdot 10^5$	$2,12 \cdot 10^4$
72	$2,17 \cdot 10^7$	$5,45 \cdot 10^6$	$7,12 \cdot 10^4$

Z tabulky vyplývá, že nejméně se virus množil v buněčné linii IC-21. V intervalu 24 hodin byl nejvyšší nárůst pozorován u buněčné linie P388/D1, avšak celkově bylo nejvyšších titrů viru dosaženo u makrofágové linie PMJ2-R. Data z tabulky byla použita pro tvorbu následujícího grafu.

**Obr. 2:** Infekce makrofágových linií.



Jelikož se v jednotlivých časech titry viru řádově lišily, byly pro lepší přehlednost grafu upraveny dekadickým logaritmem. Vzorky byly odebrány v triplikacích, ze kterých byly po plakové titraci vypočteny průměrné hodnoty, a ty byly vyneseny do grafu. Rozdíly v jednotlivých vzorcích téže triplikace jsou charakterizovány směrodatnou odchylkou.

#### 4.2 Infekce peritoneálních makrofágů a termoinaktivační křivka viru

V následujícím experimentu byly infikovány peritoneální makrofágy myšního kmene C57BL/6. Infekce byla provedena stejným způsobem jako u makrofágových linií. Odběr vzorků probíhal ve stejných časových intervalech. V tabulce níže jsou uvedeny vypočtené průměrné titry viru.

**Tab. II:** Vývoj infekce peritoneálních makrofágů.

čas (hod)	titr viru (PFU/ml)
0	$5,15 \cdot 10^4$
24	$3,64 \cdot 10^3$
48	$2,73 \cdot 10^3$
72	$6,21 \cdot 10^2$

Z tabulky je patrné, že s prodlužujícím se časem odběru vzorků titr viru klesá, což znamená zásadní rozdíl vývoje infekce peritoneálních makrofágů oproti infekci makrofágových buněčných linií, kde se titry viru s časem zvyšovaly.

Dále byl proveden pokus pro sestavení termoinaktivační křivky viru, ze které by bylo patrné měnící se množství živého viru v samotném mediu bez buněk. Spočtené průměrné titry viru jsou uvedeny v tabulce níže.

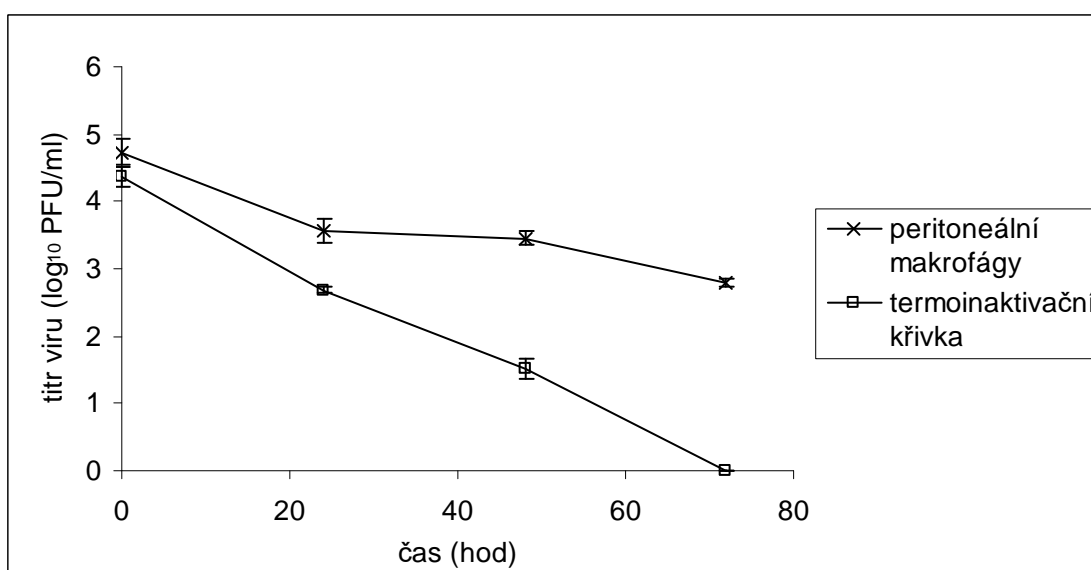
**Tab.III:** Titry viru termoinaktivační křivky.

čas (hod)	titr viru (PFU/ml)
0	$2,36 \cdot 10^4$
24	$4,82 \cdot 10^2$
48	$3,33 \cdot 10^1$
72	$< 5,00 \cdot 10^1$

Z tabulky je patrný výrazný pokles virových titrů. V čase 48 hodin byl v ředění  $1 \cdot 10^{-1}$  odečten 1 plak pouze ve 2 ze 3 vzorků triplikace, proto byla výsledná průměrná hodnota virového titru stanovena na  $3,33 \cdot 10^1$  PFU/ml. V čase 72 hodin už však při ředění  $1 \cdot 10^{-1}$  nebyl přítomen plak v žádném ze 3 vzorků triplikace. Jelikož nebyl titrován neředěný vzorek, můžeme o výsledném titru viru v čase 72 hodin říci jen to, že je menší než  $5,00 \cdot 10^1$  PFU/ml (což je hodnota rovná 1 plaku při ředění  $1 \cdot 10^{-1}$ ).

V následujícím grafu jsou porovnány změny virových titrů v jednotlivých časech u peritoneálních makrofágů a u vzorků termoinaktivační křivky viru. V grafu jsou opět patrné směrodatné odchylky vystihující rozdíl mezi vzorky z téže triplikace.

**Obr. 3:** Srovnání průběhu infekce peritoneálních makrofágů s termoinaktivační křivkou viru.



Z grafu lze vyčíst, že i když virový titr u peritoneálních makrofágů v čase klesá, k množení viru v makrofázích přesto dochází, jelikož křivka klesá pozvolněji než je tomu u termoinaktivační křivky.

### 4.3 Porovnání infekce makrofágových linií VKE za a bez přítomnosti klíštěcích slin

Účelem tohoto experimentu bylo zjistit, zda a případně jak klíštěcí sliny ovlivňují průběh infekce u makrofágových linií. Pro tento pokus byla vybrána linie PMJ2-R, ve které bylo v prvním experimentu pozorováno nejvyšší množení viru, a dále linie IC-21, u které titry viru dosahovaly naopak nejnižších hodnot. Použitá koncentrace proteinu klíštěcích slin byla 15 µg/ml.

V následující tabulce jsou uvedeny titry viru pro dané makrofágové linie za a bez přítomnosti klíštěcích slin v časových intervalech 0, 24, 48 a 72 hodin. Tyto hodnoty byly vypočteny z počtu odečtených plaků plakových titrací.

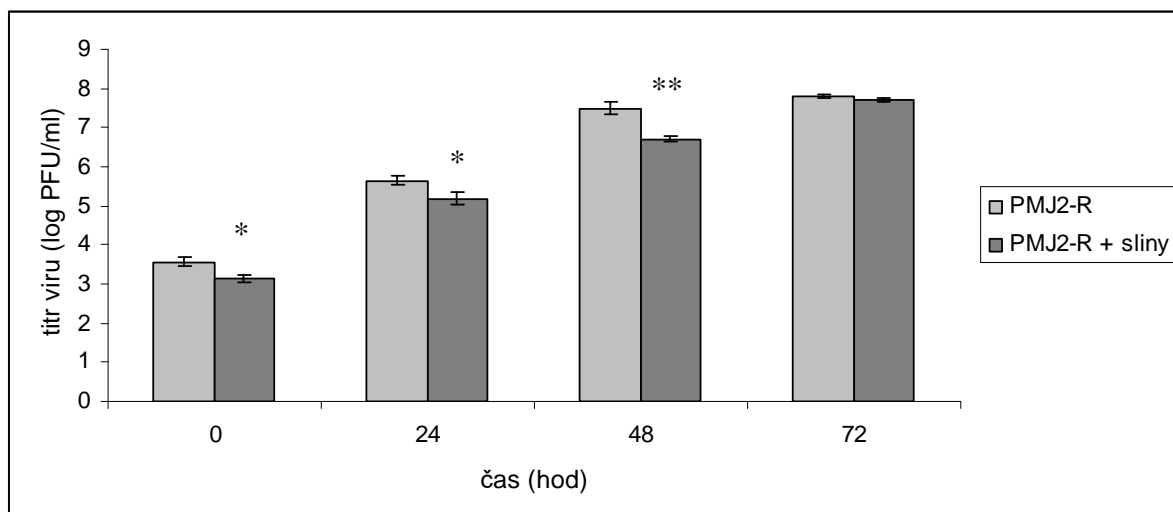
**Tab. IV:** Porovnání infekce makrofágových linií za a bez přítomnosti klíštěcích slin.

čas (hod)	titr viru (PFU/ml)			
	PMJ2-R	PMJ2-R + sliny	IC-21	IC-21 + sliny
0	$3,72 \cdot 10^3$	$1,38 \cdot 10^3$	$1,51 \cdot 10^4$	$1,41 \cdot 10^4$
24	$4,47 \cdot 10^5$	$1,51 \cdot 10^5$	$7,41 \cdot 10^4$	$4,07 \cdot 10^4$
48	$3,16 \cdot 10^7$	$5,13 \cdot 10^6$	$6,46 \cdot 10^5$	$4,37 \cdot 10^5$
72	$6,17 \cdot 10^7$	$5,13 \cdot 10^7$	$1,26 \cdot 10^6$	$2,75 \cdot 10^6$

Z tabulky IV je patrné, že virus se více množil v linii PMJ2-R, čímž byl potvrzený výsledek prvního experimentu. V makrofágové linii IC-21 byl sice vyšší titr viru v čase 0 hodin, avšak v dalších časových intervalech byl nárůst titrů viru prokazatelně nižší. Ovlivnění infekce klíštěcími slinami nebylo nikterak významné, ve většině vzorků s klíštěcími slinami bylo dosaženo poněkud nižšího titru viru oproti témuž vzorku bez slin. Pro lepší přehlednost účinku slin u jednotlivých makrofágových linií v daných časových intervalech byly vytvořeny následující 2 grafy.

**Obr. 4:** Porovnání infekce makrofágové linie PMJ2-R za a bez přítomnosti klíštěcích slin;

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

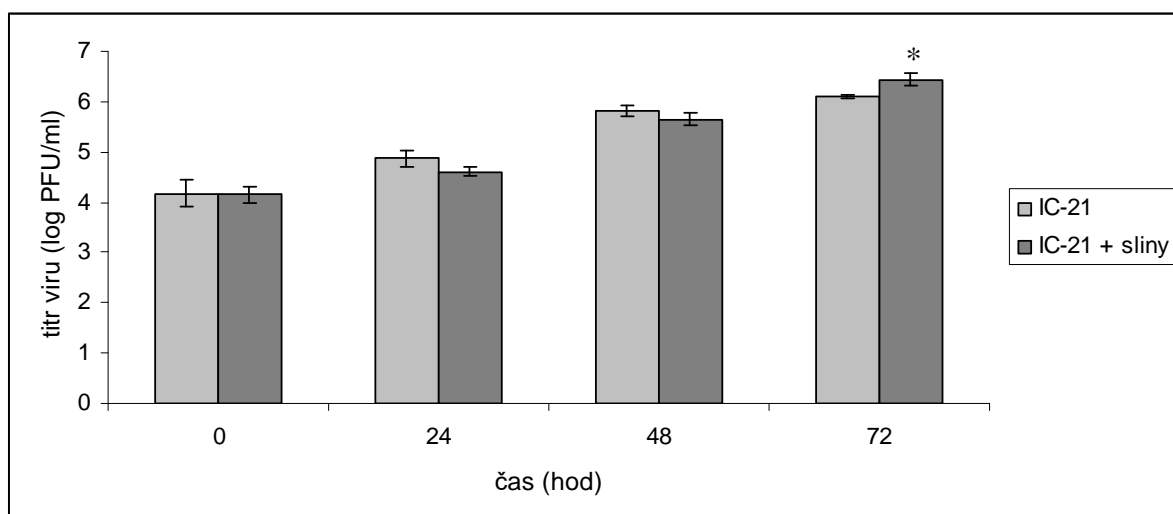


Z grafu lze odečíst, že u makrofágové linie PMJ2-R ve všech časových intervalech dosáhly vyšších titerů viru vzorky, do kterých nebyly přidány klíštěcí sliny. Nejmenší rozdíl mezi vzorkem se slinami a vzorkem bez slin byl zaznamenán v čase 72 hodin. Pokles v tomto čase také jako jediný nelze považovat za statisticky signifikantní.

Následující graf poskytuje totéž srovnání pro buněčnou linii IC-21.

**Obr. 5:** Porovnání infekce makrofágové linie IC-21 za a bez přítomnosti klíštěcích slin;

\*  $p < 0,05$ .



Z grafu je patrné, že u buněčné linie IC-21 v časovém intervalu 72 hodin dosáhl vyššího titru viru vzorek s přidanými klíštěcími slinami, tento výsledek byl jako jediný z tohoto grafu statisticky signifikantní. Naproti tomu v časech 24 a 48 hodin byl účinek slin na množení viru opět negativní, avšak pomocí statistického vyhodnocení tyto hodnoty nebyly prokázány jako signifikantní z důvodu velké variability v rámci triplikací.

## 5 DISKUZE

Cílem této práce bylo zjistit, jak se VKE množí v různých makrofágových liniích a v peritoneálních makrofázích a stanovit vliv přítomnosti klíštěcích slin na tyto interakce. Makrofágy hrají klíčovou roli v první obranné linii proti virové infekci, a to, jakým způsobem dokáží reagovat s virovými částicemi, předurčuje celkovou rezistenci organismu k virové infekci (Mims, 1964).

V experimentech byly použity 3 různé makrofágové buněčné linie (IC-21, P388/D1, PMJ2-R) a peritonální makrofágy z myši C57BL/6 infikované VKE *in vitro*. U každé z použitých buněčných linií bylo prokázáno rozdílné množení viru v čase, avšak titry viru u každé z nich v časových intervalech 24, 48 a 72 h prokazatelně narůstaly a dosahovaly znatelně vyšších hodnot, než tomu bylo u peritoneálních makrofágů, u kterých navíc titr viru v čase klesal. Důvodem odlišného množení viru v jednotlivých makrofágových liniích může pravděpodobně být vliv stupně diferenciaci makrofágů na množství vyprodukovaného viru. Konkrétně lze říci, že s rostoucím stupněm diferenciaci makrofágů klesá množství jimi produkovaného viru do media. Toto tvrzení lze podložit prací Kopeckého et al. (1991), kde byla provedena infekce VKE peritoneálních makrofágů nedospělých (8 - 11 dní života) a dospělých (25 - 30 dní života) inbredních myší. Peritoneální makrofágy nedospělých myší byly k VKE prokazatelně vnímavější.

Odlišnost v produkci viru mezi makrofágovými liniemi a peritoneálními makrofágy lze vysvětlit pravděpodobně tím, že buněčné linie neodrážejí skutečné interakce viru s makrofágy *in vivo*, jelikož mají odlišnou fyziologii z důvodu nádorové transformace.

Nejnižších titrů viru bylo dosaženo u makrofágové linie IC-21. Tato buněčná linie byla odvozena transformací normálních peritoneálních makrofágů myši kmene C57BL/6 opičím virem 40, přitom ale stále sdílí mnoho vlastností s normálními peritoneálními makrofágy - exprimuje specifické makrofágové antigeny, má fagocytární a cytotoxické vlastnosti. Tato linie se také zdá být více diferenciovaná než linie P388/D1 (Walker & Demus, 1975).

Vyšší míra diferenciaci buněční linie IC-21 oproti linii P388/D1 potvrzuje teorii, že se rostoucí úrovní diferenciaci makrofágů klesá množství jimi vyprodukovaného viru, jelikož u makrofágové linie P388/D1 byly v průběhu experimentu zaznamenány významně vyšší titry viru.

Velmi podobných hodnot titrů viru jako u linie P388/D1 bylo dosaženo i u buněčné linie PMJ2-R. V časovém intervalu 72 hodin byly tyto hodnoty dokonce ještě vyšší. Ačkoli

se buněčná linie PMJ2-R v mnohém shoduje s peritoneálními makrofágy pomocí Northern blotting analýzy bylo prokázáno, že její buňky exprimují vysoké hladiny mRNA pro receptor pro CSF-1, který je potřebný pro diferenciaci makrofágů (Adami et al., 1993). To by mohlo být ukazatelem toho, že buněčná linie PMJ2-R je méně diferenciovaná, a dochází v ní tak snáze k vyššímu množení viru.

Dalším bodem této práce bylo porovnání titrů viru u peritoneálních makrofágů s termoinaktivační křivkou viru. Pokusem bylo jasně prokázáno, že u peritoneálních makrofágů titry viru v čase klesají pomaleji než je tomu u samotného viru v mediu. Otázkou však zůstává, zda se virus v peritoneálních makrofázích množí, nebo zda v nich pouze přežívá. Podle dostupných prací je možné, že se virus množí jen v malém procentu buněk, což lze prokázat imunofluorescencí (Kopecký et al., 1991).

V druhé části práce jsme se zaměřili na vliv klíštěcích slin na interakci VKE s makrofágovými liniemi PMJ2-R a IC-21. U klíštěcích slin byly potvrzeny četné imunomodulační účinky ovlivňující jak přirozenou tak i specifickou imunitu hostitele. Komponenty slin *Ixodes ricinus* způsobují snížení aktivace a chemotaxe neutrofilů (Beaufays et al., 2008), snižují aktivitu NK buněk (Kubeš et al., 1994), dendritických buněk (Skallová et al., 2008) i makrofágů (Kopecký & Kuthejlová, 1998).

Předpokládali jsme, že klíštěcí sliny budou mít pozitivní účinek na replikaci VKE v makrofázích. Hlavním důvodem pro tuto hypotézu bylo především to, že úloha makrofágů při virové infekci spočívá kromě jiného v produkci interferonu, který hraje důležitou roli v dalším rozvoji imunitní odpovědi a likvidaci viru. Zároveň bylo pomocí viru vesikulární stomatitidy, který je k IFN extrémně citlivý, prokázáno, že klíštěcí sliny inhibují antivirový efekt IFN (Hajnická et al., 2000). Mimo to virem infikované makrofágy produkují oxid dusnatý, který má inhibiční efekt na virovou replikaci. V práci Kopeckého & Kuthejlové (1998) bylo zjištěno, že extrakt ze slinných žláz *Ixodes ricinus* částečně inhibuje produkci NO myšími makrofágy.

Doposud byl prokázán vliv klíštěcích slin na replikaci VKE v dendritických buňkách. Fialová et al. (2010) ve své práci prokázali nárůst procenta infikovaných buněk VKE, pokud byly k buňkám spolu s virem přidány sliny. Procento infikovaných buněk bylo ještě vyšší, pokud byly sliny preinkubovány s buňkami 4 hodiny před přidáním viru. Klíštěcí sliny zvýšily počet infikovaných buněk jak u vysoce virulentního kmene KE Hypr, tak i u méně virulentního kmene Neudoerfl. Avšak zvýšenou produkci viru do kultivačního media účinkem slin se prokázat nepodařilo.



Jedním z cílů této práce bylo prokázat vliv klíštěcích slin na zvýšení replikace VKE v buňkách makrofágových linií. Tento vliv se nám bohužel nepodařilo jednoznačně prokázat, avšak nelze ho ani vyloučit, vzhledem k výsledkům některých časových intervalů. Bohužel není možné naše zjištění porovnat s jinými výsledky, jelikož na toto téma nebyla doposud publikována žádná práce.

Jedním z možných důvodů proč se nepodařilo prokázat zvýšení produkce viru za přítomnosti slin, může být odlišnost nádorově transformovaných makrofágových linií od fyziologických peritoneálních makrofágů. To jak by se virus množil po přidání klíštěcích slin v peritoneálních makrofázích zůstává otázkou pro další výzkum.

Dále je třeba také poukázat na odlišnost pokusu oproti skutečnosti *in vivo*, kde mohou mít sliny výraznější účinek díky tomu, že jsou do hostitele ze sajícího klíštěte uvolňovány průběžně a jejich složení se v čase mění (McNally et al., 2012). Tato skutečnost byla potvrzena v diplomové práci Jany Širmarové, která demonstrovala vliv sání klíštěte *Ixodes ricinus* na replikaci VKE *in vivo*. Sání klíšťat mělo nejvýraznější vliv na hladinu virémie 4. a 5. den po infekci. Vliv samotných izolovaných slin na virémii byl poměrně malý a to pouze 3. den po infekci. V této práci byly použity sliny ze samic *Ixodes ricinus*, které sály na morčeti po dobu 6 dní.

## 6 ZÁVĚR

- Virus klíšťové encefalitidy se množí v myších makrofágových liniích.  
Nejméně se VKE množí v buněčné linii IC-21.  
U buněčných linií P388/D1 a PMJ2-R dosahují titry viru znatelně vyšších hodnot, které jsou mezi sebou srovnatelné.
- Peritoneální makrofágy nepodporují množení viru KE, avšak virové titry v těchto buňkách klesají pomaleji, než tomu je u termoinaktivační křivky viru.
- Vliv klíštěcích slin na replikaci VKE v makrofágových liniích se nepodařilo prokázat.

## 7 SEZNAM ZKRATEK

ADCC	buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (angl. antibody dependent cell-mediated cytotoxicity)
ATB	antibiotika
BOFES	bovinní fetální sérum
CNS	centrální nervová soustava
CSF	kolonie stimulující faktor (angl. colony stimulating factor)
GL	L-glutamin
IFN	interferon
IL	interleukin
KE	klíšťová encefalitida
LAF	lymfocyty aktivující faktor
LGTV	Langat virus
LPS	lipopolysacharid
ME	2-merkptoetanol
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (angl. major histocompatibility complex)
NK	přírozený zabíječ (angl. natural killer)
ORF	otevřený čtecí rámec (angl. open reading frame)
PAMP	molekulární struktury na povrchu patogenních organismů (angl. pathogen-associated molecular patterns)
PFU	plakotvorná jednotka (angl. plaque-forming unit)
prM	prekurzor M proteinu
PRR	receptory rozeznávající molekulové struktury (angl. pattern-recognition receptors)
RNA	ribonukleová kyselina
SAT	slinami aktivovaný přenos (angl. saliva-activated trasmission)
TNF	faktor nádorové nekrózy (angl. tumor necrosis factor)
UTR	nepřekládaná oblast (angl. untranslated region)
VKE	virus klíšťové encefalidity
WHO	Světová zdravotnická organizace (angl. World Health Organization)

## 8 SEZNAM LITERATURY

**Adami, C., Brunda, M. J., & Palleroni, A. V.** (1993). *In vivo* immortalization of murine peritoneal macrophages: a new rapid and efficient method for obtaining macrophage cell lines. *Journal of Leukocyte Biology*, 53, 475-478.

**Aderem, A., & Underhill, D. M.** (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Review of Immunology*, 17, 593-623.

**Ahantarig, A., Růžek, D., Vancová, M., Janowitz, A., Št'astná, H., Tesařová, M., & Grubhoffer, L.** (2009). Tick-borne encephalitis virus infection of cultured mouse macrophages. *Intervirology*, 52, 283-290.

**Alekseev, A. N., & Chunikhin, S. P.** (1989). [The experimental transmission of the tick-borne encephalitis virus by ixodid ticks (the mechanisms, time periods, species and sex differences)]. *Parazitologiya*, 24, 177-185.

**Babior, B. M.** (1999). NADPH oxidase: an update. *Blood*, 93, 1464-1476.

**Baskin, H., Ellermann-Eriksen, S., Lovmand, J., & Mogensen, S. C.** (1997). Herpes simplex virus type 2 synergizes with interferon-gamma in the induction of nitric oxide production in mouse macrophages through autocrine secretion of tumour necrosis factor-alpha. *Journal of General Virology*, 78, 195-203.

**Beaufays, J., Adam, B., Menten-Dedoyart, C., Fievez, L., Grosjean, A., Decrem, Y., ... & Vanhaeverbeek, M.** (2008). Ir-LBP, an *Ixodes ricinus* tick salivary LTB4-binding lipocalin, interferes with host neutrophil function. *PLoS One*, 3, e3987.

**Best, S. M., Morris, K. L., Shannon, J. G., Robertson, S. J., Mitzel, D. N., Park, G. S., ... & Bloom, M. E.** (2005). Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist. *Journal of Virology*, 79, 12828-12839.

**Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

**Burke, D. S., & Monath, T. P.** (2001). Flaviviruses. *Fields Virology*, 1, 1043-1125.

**Calisher, C. H.** (1988). Antigenic classification and taxonomy of flaviviruses (family Flaviviridae) emphasizing a universal system for the taxonomy of viruses causing tick-borne encephalitis. *Acta Virologica*, 32, 469-478.

**Cavassani, K. A., Aliberti, J. C., Dias, A. R., Silva, J. S., & Ferreira, B. R.** (2005). Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells. *Immunology*, 114, 235-245.

**de Madrid, A. T., & Porterfield, J. S.** (1969). A simple micro-culture method for the study of group B arboviruses. *Bulletin of the World Health Organization*, 40, 113.

**Domeika, K., Berg, M., Eloranta, M. L., & Alm, G. V.** (2002). Porcine interleukin-12 fusion protein and interleukin-18 in combination induce interferon- $\gamma$  production in porcine natural killer and T cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 86, 11-21.

**Ecker, M., Allison, S. L., Meixner, T., & Heinz, F. X.** (1999). Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *Journal of General Virology*, 80, 179-185.

**Fialová, A., Cimburek, Z., Iezzi, G., & Kopecký, J.** (2010). *Ixodes ricinus* tick saliva modulates tick-borne encephalitis virus infection of dendritic cells. *Microbes and Infection*, 12, 580-585.

**Gillespie, R. D., Dolan, M. C., Piesman, J., & Titus, R. G.** (2001). Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis*. *The Journal of Immunology*, 166, 4319-4326.

- Gordon, S., & Martinez, F. O.** (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*, *32*, 593-604.
- Grard, G., Moureau, G., Charrel, R. N., Lemasson, J. J., Gonzalez, J. P., Gallian, P., ... & de Lamballerie, X.** (2007). Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. *Virology*, *361*, 80-92.
- Gritsun, T. S., Holmes, E. C., & Gould, E. A.** (1995). Analysis of flavivirus envelope proteins reveals variable domains that reflect their antigenicity and may determine their pathogenesis. *Virus Research*, *35*, 307-321.
- Gritsun, T. S., Lashkevich, V. A., & Gould, E. A.** (2003). Tick-borne encephalitis. *Antiviral Research*, *57*, 129-146.
- Gritsun, T. S., Venugopal, K., de A Zanotto, P. M., Mikhailov, M. V., Sall, A. A., Holmes, E. C., ... & Gould, E. A.** (1997). Complete sequence of two tick-borne flaviviruses isolated from Siberia and the UK: analysis and significance of the 5' and 3'-UTRs. *Virus Research*, *49*, 27-39.
- Haglund, M., & Günther, G.** (2003). Tick-borne encephalitis - pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine*, *21*, S11-S18.
- Hajnická, V., Kocakova, P., Slovak, M., Labuda, M., Fuchsberger, N., & Nuttall, P. A.** (2000). Inhibition of the antiviral action of interferon by tick salivary gland extract. *Parasite immunology*, *22*, 201-206.
- Hannier, S., Liversidge, J., Sternberg, J. M., & Bowman, A. S.** (2004). Characterization of the B-cell inhibitory protein factor in *Ixodes ricinus* tick saliva: a potential role in enhanced *Borrelia burgdoferi* transmission. *Immunology*, *113*, 401-408.
- Heinz, F. X.** (1986). Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. *Advances in Virus Research*, *31*, 103-168.
- Holzmann, H.** (2003). Diagnosis of tick-borne encephalitis. *Vaccine*, *21*, S36-S40.

**Chambers, T. J., Hahn, C. S., Galler, R., & Rice, C. M.** (1990). Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual Reviews in Microbiology*, *44*, 649-688.

**Jones, L. D., & Nuttall, P. A.** (1990). The effect of host resistance to tick infestation on the transmission of Thogoto virus by ticks. *Journal of General Virology*, *71*, 1039-1043.

**Kazimírová, M., & Štibrániová, I.** (2013). Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *3*.

**Kopecký, J., Grubhoffer, L., & Tomková, E.** (1991). Interaction of tick/borne encephalitis virus with mouse peritoneal macrophages. The effect of antiviral antibody and lectin. *Acta virologica*, *35*, 218-225.

**Kopecký, J., & Kuthejlava, M.** (1998). Suppressive effect of *Ixodes ricinus* salivary gland extract on mechanisms of natural immunity *in vitro*. *Parasite Immunology*, *20*, 169-174.

**Koren, H. S., Handwerger, B. S., & Wunderlich, J. R.** (1975). Identification of macrophage-like characteristics in a cultured murine tumor line. *The Journal of Immunology*, *114*, 894-897.

**Korenberg, E. I., & Kovalevskii, Y. V.** (1995). Variation in parameters affecting risk of human disease due. *Folia Parasitologica*, *42*, 307-312.

**Kotsyfakis, M., Anderson, J. M., Andersen, J. F., Calvo, E., Francischetti, I. M., Mather, T. N., ... & Ribeiro, J. M.** (2008). Cutting edge: Immunity against a “silent” salivary antigen of the Lyme vector *Ixodes scapularis* impairs its ability to feed. *The Journal of Immunology*, *181*, 5209-5212.

**Kotsyfakis, M., Horka, H., Salat, J., & Andersen, J. F.** (2010). The crystal structures of two salivary cystatins from the tick *Ixodes scapularis* and the effect of these inhibitors on the establishment of *Borrelia burgdorferi* infection in a murine model. *Molecular Microbiology*, *77*, 456-470.

- Kotsyfakis, M., Sá-Nunes, A., Francischetti, I. M., Mather, T. N., Andersen, J. F., & Ribeiro, J. M.** (2006). Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. *Journal of Biological Chemistry*, *281*, 26298-26307.
- Kreil, T. R., Burger, I., Bachmann, M., Fraiss, S., & Eibl, M. M.** (1997). Antibodies protect mice against challenge with tick-borne encephalitis virus (TBEV)-infected macrophages. *Clinical and Experimental Immunology*, *110*, 358.
- Kreil, T. R., & Eibl, M. M.** (1996). Nitric Oxide and Viral Infection: NO Antiviral Activity against a Flavivirus *in vitro*, and Evidence for Contribution to Pathogenesis in Experimental Infection *in vivo*. *Virology*, *219*, 304-306.
- Kubes, M., Fuchsberger, N., Labuda, M., Zuffova, E., & Nuttall, P. A.** (1994). Salivary gland extracts of partially fed *Dermacentor reticulatus* ticks decrease natural killer cell activity *in vitro*. *Immunology*, *82*, 113.
- Kuno, G., Chang, G. J. J., Tsuchiya, K. R., Karabatsos, N., & Cropp, C. B.** (1998). Phylogeny of the genus Flavivirus. *Journal of Virology*, *72*, 73-83.
- Kunz, C.** (2003). TBE vaccination and the Austrian experience. *Vaccine*, *21*, 50-55.
- Labuda, M., Jones, L. D., Williams, T., Danielova, V., Nuttall, P. A.** (1993). Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between cofeeding ticks; *Journal of Medical Entomology*, *30*, 295-299.
- Lane, T. E., Otero, G. C., Wu-Hsieh, B. A., & Howard, D. H.** (1994). Expression of inducible nitric oxide synthase by stimulated macrophages correlates with their antihistoplasma activity. *Infection and Immunity*, *62*, 1478-1479.
- Leboulle, G., Crippa, M., Decrem, Y., Mejri, N., Brossard, M., Bollen, A., & Godfroid, E.** (2002). Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks. *Journal of Biological Chemistry*, *277*, 10083-10089.



- Lindenbach, B. D., & Rice, C. M.** (2001). Flaviviridae: the viruses and their replication. *Fields Virology, 1*, 991-1041.
- Lindquist, L., & Vapalahti, O.** (2008). Tick-borne encephalitis. *The Lancet, 371*, 1861-1871.
- Mansfield, K. L., Johnson, N., Phipps, L. P., Stephenson, J. R., Fooks, A. R., & Solomon, T.** (2009). Tick-borne encephalitis virus—a review of an emerging zoonosis. *Journal of General Virology, 90*, 1781-1794.
- Mauel, J., & Defendi, V.** (1970). Transformation of mouse peritoneal macrophages by SV40 virus. *Bacteriological Proceedings, 70*, 180.
- McNally, K. L., Mitzel, D. N., Anderson, J. M., Ribeiro, J. M., Valenzuela, J. G., Myers, T. G., Godinez, A., Wolfenbarger, J. B., Best, S. M., Bloom, M. E.** (2012). Differential salivary gland transcript expression profile in *Ixodes scapularis* nymphs upon feeding or flavivirus infection. *Ticks and tick-borne diseases, 3*, 18-26.
- Mims, C. A.** (1964). Aspects of the pathogenesis of virus diseases. *Bacteriological Reviews, 28*, 30.
- Munder, M., Mallo, M., Eichmann, K., & Modolell, M.** (1998). Murine macrophages secrete interferon  $\gamma$  upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: a novel pathway of autocrine macrophage activation. *The Journal of Experimental Medicine, 187*, 2103-2108.
- Murphy, F.**, (1980). Togavirus morphology and morphogenesis. In Schlesinger, R. W. (Ed.), *The Togaviruses. Biology, Structure, Replication. Academic Press, New York*, 241 – 316.
- Nuttall, P. A., Jones, L. D., Labuda, M., & Kaufman, W. R.** (1994). Adaptations of arboviruses to ticks. *Journal of Medical Entomology, 31*, 1-9.

**Nuttall, P. A., & Labuda, M.** (2004). Tick–host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology*, *129*, S177-S189.

**Paesen, G. C., Adams, P. L., Nuttall, P. A., & Stuart, D. L.** (2000). Tick histamine-binding proteins: lipocalins with a second binding cavity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, *1482*, 92-101.

**Plekhova, N. G., Somova, L. M., Lyapun, I. N., Kondrashova, N. M., Krylova, N. V., Leonova, G. N., & Pustovalov, E. V.** (2011). The cells of innate systems in tick-borne encephalitis. *Flavivirus Encephalitis. Rijeka, Croatia: In Tech*, 167-194.

**Pogodina, V. V.** (1960). Experimental Study of the Pathogenesis of Tick-Borne Encephalitis on Alimentary Infection. II. Study of Pathways of Excretion of Virus from White Mice. *Problems of Virology*, *5*, 304-10.

**Pogodina, V. V., Frolova, M. P., & Erman, B. A.** (1986). Chronic tick-borne encephalitis. *Science. Novosibirsk*.

**Ribeiro, J. M., Makoul, G. T., & Robinson, D. R.** (1988). *Ixodes dammini*: evidence for salivary prostacyclin secretion. *The Journal of Parasitology*, *74*, 1068-1069.

**Růžek, D., Dobler, G., & Mantke, O. D.** (2010). Tick-borne encephalitis: pathogenesis and clinical implications. *Travel Medicine and Infectious Disease*, *8*, 223-232.

**Sauer, J. R., Essenberg, R. C., & Bowman, A. S.** (2000). Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion. *Journal of Insect Physiology*, *46*, 1069-1078.

**Shapoval, A.N.** (1977). The Prophylaxis of Tick-Borne Encephalitis. *Medicine, Moscow*, 47.

**Schoeler, G. B., Manweiler, S. A., & Wikel, S. K.** (1999). *Ixodes scapularis*: effects of repeated infestations with pathogen-free nymphs on macrophage and T lymphocyte cytokine responses of BALB/c and C3H/HeN mice. *Experimental Parasitology*, *92*, 239-248.

- Silva, M. C., Guerrero-Plata, A., Gilfoy, F. D., Garofalo, R. P., & Mason, P. W. (2007).** Differential activation of human monocyte-derived and plasmacytoid dendritic cells by West Nile virus generated in different host cells. *Journal of Virology*, *81*, 13640-13648.
- Skallová, A., Iezzi, G., Ampenberger, F., Kopf, M., & Kopecký, J. (2008).** Tick saliva inhibits dendritic cell migration, maturation, and function while promoting development of Th2 responses. *The Journal of Immunology*, *180*, 6186-6192.
- Snyderman, R., Pike, M. C., Fischer, D. G., & Koren, H. S. (1977).** Biologic and biochemical activities of continuous macrophage cell lines P388D1 and J774. 1. *The Journal of Immunology*, *119*, 2060-2066.
- Steinman, R. M., & Idoyaga, J. (2010).** Features of the dendritic cell lineage. *Immunological Reviews*, *234*, 5-17.
- Stiasny, K., & Heinz, F. X. (2006).** Flavivirus membrane fusion. *Journal of General Virology*, *87*, 2755-2766.
- Süss, J. (2003).** Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine*, *21*, S19-S35.
- Tatchell, R. J. (1967).** Salivary secretion in the cattle tick as a means of water elimination. *Nature*, *213*, 940-941.
- Walker, W. S., & Demus, A. (1975).** Antibody-dependent cytolysis of chicken erythrocytes by an *in vitro*-established line of mouse peritoneal macrophages. *The Journal of Immunology*, *114*, 765-769.
- Wang, H., & Nuttall, P. A. (1999).** Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *56*, 286-295.