

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Vliv klíštěcích slin na myší neutrofilní granulocyty
aktivované virem klíšťové encefalitidy**

Bakalářská práce

Dominika Veselá

Školitel: Mgr. Jaroslava Liesková Ph.D.

Školitel specialista: RNDr. Jana Páleníková

České Budějovice 2016

Veselá, D., 2016: Vliv klíštěcích slin na myší neutrofilní granulocyty aktivované virem klíšťové encefalitidy. [The influence of tick saliva on neutrophils upon activation by tick-borne encephalitis virus. Bc. Thesis, in Czech.] – 52 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Sliny klíšťat obsahují molekuly, které potlačují imunitní odpověď hostitele a tím výrazně usnadňují přenos patogenů klíštěcími vektory. Neutrofilní granulocyty jsou nejběžnějším typem bílých krvinek. Účastní se akutní fáze zánětu a pomocí exkrece některých cytokinů mobilizují další složky imunitního systému.

Tato bakalářská práce se zaměřila na prokázání replikace viru TBE v neutrofilech, na detekci produkce cytokinů neutrofilními granulocyty po aktivaci virem klíšťové encefalitidy a na případný vliv klíštěcích slin klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) na výše uvedené parametry.

Tick saliva contain molecules that suppress the immune response of host organism thereby facilitating the transmission of pathogens by tick vectors. Neutrophils are the most common type of white blood cells. They participate in the acute phase of inflammation and via excretion of cytokines they mobilize other components of the immune system.

This bachelor's thesis focused on demonstrating of tick-borne encephalitis virus replication in neutrophils and on detection of cytokine production by neutrophilic granulocytes upon activation by the tick-borne encephalitis virus and the possible impact of tick saliva of tick *Ixodes ricinus* on the parameters mentioned above.

Key words:

Tick, Tick-borne encephalitis, TBEV, neutrophils, tick saliva, Neudorfl strain, Hypr strain.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Vliv klíštěcích slin na myší neutrofilní granulocyty aktivované virem klíšťové encefalitidy“ 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 jejich 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

.....

Dominika Veselá

.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Jaroslavě Lieskovské Ph.D., která mi po celou dobu byla skvělým rádcem a trpělivě vedla každý můj krok k úspěšnému vypracování této práce. Velký dík patří ještě dalším třem lidem z Katedry medicínské biologie. Prof. RNDr. Janu Kopeckému Csc. za odbornou pomoc a cenné rady. Dále RNDr. Janě Páleníkové za trpělivost, se kterou mě seznamovala s metodami práce v laboratoři. A v neposlední řadě paní Evě Výletové za vlídný přístup a pomoc.

Také bych ráda poděkovala rodině a všem ostatním, kteří v tuto dobu stáli při mně a podporovali mne.

OBSAH:

1. TEORETICKÁ ČÁST.....	6
1.1 KLÍŠTĚ.....	6
1.2 KLÍŠTĚCÍ SLINY	7
1.3 KLÍŠŤOVÁ ENCEFALITIDA	10
1.4 NEUTROFILNÍ GRANULOCYTY	14
2. CÍLE PRÁCE.....	19
3. MATERIÁL A METODY.....	20
3.1 MATERIÁL.....	20
3.1.1 MYŠI.....	20
3.1.2 BUNĚČNÉ LINIE	20
3.1.3 VIRUS.....	20
3.2 METODY	21
3.2.1 ODBĚR KLÍŠTĚCÍCH SLIN.....	21
3.2.2 IZOLACE BUNĚK Z KOSTNÍ DŘENĚ	21
3.2.3 INFEKCE NEUTROFILŮ VIREM KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY	22
3.2.4 PLAKOVÁ TITRACE VIRU	23
3.2.5 STANOVENÍ CYTOKINŮ – ELISA	24
3.2.6 APOPTÓZA INFIKOVANÝCH NEUTROFILŮ MĚŘENÁ NA PRŮTOKOVÉM CYTOMETRU ..	24
3.2.7 STATISTICKÁ ANALÝZA	25
4. VÝSLEDKY	26
4.1 REPLIKACE VIRU TBE V NEUTROFILECH	26
4.2 REPLIKACE VIRU TBE V NEUTROFILECH OBOHACENÝCH O KLÍŠTĚCÍ SLINY	26
4.3 PRODUKCE INTERFERONU-B VIREM INFIKOVANÝMI NEUTROFILY.....	27
4.4 VLIV KLÍŠTĚCÍCH SLIN NA PRODUKCI CYTOKINU TNF-A VIREM INFIKOVANÝMI NEUTROFILY	28
4.5 ANALÝZA APOPTÓZY VE VIREM INFIKOVANÝCH NEUTROFILECH	29
5. DISKUZE	31
6. ZÁVĚR.....	35
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	36
8. SEZNAM LITERATURY.....	38

1. TEORETICKÁ ČÁST:

1.1 KLÍŠTĚ

Klíšťata jsou obligátní, hematofágní ektoparazité, kteří jsou rozšířeni téměř po celém světě. V současné taxonomii jsou klíšťata zařazena do kmene členovci (Arthropoda), podkmene klepítkatci (Chelicerata), třídy pavoukovci (Arachnida), řádu klíšťatovci (Ixodida) a nadčeledě Ixodoidea (Volf & Horák, 2007). Tuto nadčeleď rozdělujeme do tří čeledí – Ixodidae, Nuttalliellidae a Argasidae. Čeleď Ixodidae si vydobyla zvýšenou pozornost kvůli schopnosti jejích příslušníků přenášet významné lidské patogeny (Estrada-Peña et al., 2010). Klíšťata z této čeledě jsou nazývána „tvrdá“. Tento název je odvozen od ochranného chitinového štítku pokrývajícího hřbetní část těla (scutum). Samice „tvrdých“ klíšťat bývají větší než samci a jejich ústní ústrojí je při pohledu shora zřetelně patrné (Nava et al., 2009). Čeleď Argasidae má oproti čeledi Ixodidae jiné taxonomické členění na úrovni rodu (Pospelova-Shtrom, 1946; Pospelova-Shtrom, 1969). Podle studie Klompena & Olivera je nynější taxonomické členění v čeledi Argasidae velice nejisté. Existují dva faktory, které činí čeleď Argasidae nejistou v porovnání s čeledí Ixodidae. První je nedostatek adekvátních pokynů vykazujících stabilní morfologické rysy, podle kterých by bylo možno druhy spolehlivě zařadit do čeledě. Druhým je vysoká biodiverzita čeledě Argasidae, ke které nebylo při sestavování taxonomického klíče přihlédnuto (Klompen & Oliver, 1993a; Venzal et al., 2008). Klíšťata čeledě Argasidae jsou nazývána „měkká“, což souvisí s tím, že oproti „tvrdým“ klíšťatům mají tělo kryté pouze kožovitou kutikulou (Nava et al., 2009). Podle Sonenshina jsou samci a samice „měkkých“ klíšťat téměř shodně velcí a při pohledu shora by se mohlo zdát, že nemají žádné ústní ústrojí (Sonenshine et al., 1991). Ve skutečnosti jsou chelicery umístěny na spodní straně těla tak, že se zdají býti skryta (Nava et al., 2009). Třetí čeleď je čeleď Nuttalliellidae. Byla objevena ve 30. letech 20. století (Bedford et al., 1931; Estrada-Peña et al., 2009) v jižní Africe. Jedná se o bazální linii klíšťat. Lze je snadno odlišit od dvou výše zmíněných čeledí. Mají silně vlnitý tělní kryt a málo štětin (Bedford et al., 1931).

„Tvrdá“ a „měkká“ klíšťata se od sebe neliší pouze velikostí a tvarem těla, ale i délkou sání (Sauer et al. 1995). Klíšťata čeledi Argasidae bývají na hostiteli přichycena krátce, proces sání krve dokončí během několika hodin a v tu dobu zvětší svou tělesnou

velikost 5x až 10x. Oproti tomu klíšťata čeledi Ixodidae jsou na hostiteli přichycena několik dnů až týdnů, než dokončí proces sání. Jejich velikost se během sání může zvýšit až 100x (Sonenshine et al., 1991).

Za normálních okolností by poranění kůže hostitele a vsunutí klíštěcího sacího aparátu do rány mělo vyvolat silnou zánětlivou a imunitní reakci, která by klíštěti znemožnila dlouhodobé sání. Proto musela klíšťata během evoluce vyvinout strategie, které musí obejít vrozenou a získanou imunitu hostitele. Ochrana před imunitní reakcí hostitele je zajištěna pomocí molekul obsažených ve slinách klíšťat. Molekuly ve slinách klíšťat změny imunitní odpovědi hostitele z T_H1 profilu na T_H2 (Schoeler et al., 1999).

1.2 KLÍŠTĚCÍ SLINY

Klíště je schopné během sání vpravovat závažné patogeny do těla hostitele prostřednictvím slin. Jedná se o rozličné patogenní organismy, např. spirochety (např. *Borrelia burgdorferi sensu lato* – původce Lymské boreliózy), rickettsie (*Rickettsia conori* – původce Marseillské horečky, *Coxiella burnetii* – původce Q horečky, *Rickettsia slovaca* – původce TIBOLy, *Anaplasma phagocytophilum* – původce lidské granulocytární anaplazmózy), franciselly (*Francisella tularensis* – původce tularémie), viry (virus klíšťové encefalitidy) a v neposlední řadě i parazity (*Babesia microti* – původce babeziózy) [(Krbková, 2007)]. Životní cyklus patogenního organismu (konkrétně původců Lymské boreliózy a klíšťové encefalitidy) uvnitř klíštěcího vektora zahrnuje migraci do buněk střeva, rozšíření prostřednictvím hemolymfy a následně přesun do slinných žláz, odkud je, obsažený ve slinách, vpraven do obratlovce hostitele (Francischetti et al., 2009; Kotsyfakis et al., 2015).

Klíštěcí sliny jsou tekutina, která byla donedávna považována za pouhý lubrikant k zvlhčování ústního ústrojí klíštěte a k udržování stálé vodní bilance uvnitř těla vektora. V současné době je jisté, že klíštěcí sliny jsou směsí silných protizánětlivých, anti-hemostatických a imunomodulačních molekul, které těmto členovcům pomáhají lépe získávat potravu od svých hostitelů (Valenzuela, 2004).

Klíšťata před samotným sáním proříznou kůži hostitele, do rány vsunou hypostom a jím následně protrhnou cévu. Toto mechanické poškození kůže hostitele by mělo vyvolat silnou zánětlivou imunitní reakci, jejímž výsledkem by bylo zastavení krvácení a hojící proces by nakonec měl směřovat k odmítnutí a následnému odpadnutí klíštěte (Kemp et al.,

1982; Sonenshine, 1991; Coons et al., 1999). Proto klíšťata vyvinula řadu bioaktivních molekul, jež se cíleně snaží vyhnout imunitní odpovědi hostitelského organismu (Guo et al., 2009; Lewis et al., 2015). Jedná se o látky vazodilatační, imunomodulační, dále o látky zabraňující srážení krve a agregaci krevních destiček a v neposlední řadě o látky s protizánětlivým účinkem tlumící bolest a svědění (Anderson & Valenzuela, 2008).

Látky obsažené ve slinách klíšťete

Podle Jaillona představují neutrofilové první obrannou linii vrozené imunity při infekci nebo poranění (Mantovani et al., 2011; Jaillon et al., 2013). Složky klíšťecích slin vykazují supresivní efekt na vrozenou imunitu vyznačující se regulací aktivace neutrofilů. Sliny inhibují schopnost fagocytózy u neutrofilů a aktivitu NK buněk. V antigen prezentujících buňkách sliny redukuje produkci cytokinů makrofágy (Brake et al., 2012). Klíšťecí sliny navíc obsahují látky, které zabraňují nekapilarizaci a silně zpomalují hojivý proces (Hajnická et al., 2011).

Vasodilatační látky

K zastavení hemostázy dochází pomocí molekul inhibujících koagulační kaskádu (Mans, 2010). U klíšťete *Ixodes scapularis* se jedná o lipidový derivát prostacyclin, o prostaglandin E2 - PGE2 a o histamin uvolňující faktor (tHFR) [(Valenzuela, 2004; Ribeiro et al., 1992)]. U klíšťete *Ixodes ricinus* vazodilatační aktivitu vykazuje serin-proteázový inhibitor (serpin) [(Chmelař et al., 2011)].

Prostaglandiny patří mezi nejhojnější bioaktivní molekuly v klíšťecích slinách. PGE2 inhibuje aktivitu dendritických buněk, produkci cytokinů a proliferaci T lymfocytů (Inokuma et al., 1994; Poole et al., 2013). PGE2 navíc hraje roli v zánětlivých i protizánětlivých procesech (Ribeiro et al., 1992).

Faktory zabraňující agregaci krevních destiček

Agregace krevních destiček je první obranný mechanismus zabraňující ztrátám krve při poranění tkáně. Krevní destičky (trombocyty) jsou aktivovány různými agonisty včetně trombinu, kolagenu a ADP. Po aktivaci trombocytů dochází k tvorbě krevní „zátky“ v místě poranění, což výrazně eliminuje ztráty krve (Junqueira, 2005). Schopnost klíšťat klást tomuto procesu odpor spočívá v přítomnosti specifických látek ve slinách, které brání shlukování destiček, popřípadě v přítomnosti enzymů, kteří blokují aktivátory krevních destiček (Valenzuela, 2004). Mezi ně patří například integrin α IIb β 3, který reguluje adhezi a

agregaci krevních destiček (Ferguson & Zaqqa, 1999). Strategie vedoucí k inhibici agregace krevních destiček je vlastní jak „měkkým“, tak „tvrdým“ klíšťatům. Z „měkkých“ klíšťat jsou to zejména druhy *Ornithodoros moubata* a *Ornithodoros savignyi* (Mans & Neitz, 2002a). Tato klíšťata mají ve slinách protein disagregin (konkrétně savygnigrin a moubatin). Z „tvrdých“ klíšťat je to druh *Dermacentor variabilis*, jehož sliny obsahují protein variabilin (Wang et al., 1996). Sliny klíštěte *Ixodes ricinus* obsahují lipokalin, který snižuje chemotaxi neutrofilů (Beaufays et al., 2008) a protein IRS-2, jež inhibuje trombin, katepsin G a chymázu (Chmelař et al., 2011). Jiné druhy klíšťat syntetizují ve slinných žlázách evasiny, proteiny vyznačující se schopností vázat chemokiny (Frauensuh et al., 2007).

Zajímavé je, že ačkoli různé druhy klíšťat využívají rozličných anti-agregačních proteinů ve svých slinách, strategie ošálení imunitní odpovědi hostitelského organismu je u všech shodná.

Antikoagulační faktory

V případě poranění kůže je nutné eliminovat velké ztráty krve tím, že se krev v poškozeném místě srazí. Za tímto účelem jsou v krevní plazmě zcela přirozeně přítomny koagulační faktory. Jedná se o glykoproteiny spadající mezi globuliny. Po aktivaci vytvoří tyto faktory enzymovou kaskádu, jejímž výsledkem je nerozpustná bílkovina fibrin, jež hraje klíčovou úlohu při srážení krve (Trojan et al., 2003).

Zabránění srážení krve je jedním z hlavních předpokladů úspěchu vektora při sání na hostiteli. Nejpodrobněji byl prostudován antikoagulant izolovaný ze slin *Ornithodoros moubata*, zvaný „klíštěcí antikoagulační peptid“ (TAP) [(Waxman et al., 1990)].

Dalším krokem k inhibici srážení krve je blokáce aktivity trombinu (Poole et al., 2013). K tomuto účelu slouží klíšťatům (konkrétně druhům *O. savignyi*, *O. moubata*, *A. americanum* a *H. longicornis*) enzym antitrombin. Podle studie Francischettiho byl nedávno izolován antikoagulant ze slin druhu *Ixodes scapularis*. Nazývá se ixolaris a je inhibitor TFP (tissue factor pathway) [(Francischetti et al., 2002b)]. Ve slinách klíštěte *Ixodes scapularis* byla též identifikována gelatináza a fibrinolytické aktivátory. Tyto proteolytické molekuly jsou kov-dependetní a cíleně působí na gelatin, fibrin, fibrinogen a fibronectin, ale ne na kolagen a laminin. Vykazují antikoagulační účinek, čímž brání tvorbě fibrinové „zátky“, popřípadě rozrušují již vytvořenou krevní sraženinu (Francischetti et al., 2003). Sliny klíštěte *Ixodes ricinus* obsahují antikoagulační protein Ir-CPI, který inhibuje vnitřní dráhu koagulační kaskády a fibrinolýzy (Decrem et al., 2009).

Protizánětlivé složky

Významnou skupinou proteinů s imunomodulačním a protizánětlivým účinkem jsou inhibitory cysteinových proteáz – cystatiny. Mezi nejvýznamnější patří sialostatin L a sialostatin L2. Jsou to inhibitory cysteinových peptidáz a byly izolovány ze slin klíštěte *Ixodes scapularis*. Oba typy jsou silnými inhibitory katepsinu L. Sialostatin L2 hraje důležitou roli při úspěšném sání klíštěte na hostiteli (Kotsyfakis et al., 2008) a nemá modulační účinek na antigen prezentující buňky (Kotsyfakis et al., 2007). Sialostatin L má protizánětlivé účinky (Kotsyfakis et al., 2006).

Podle studie Heleny Langhansové zabývající se vlivem slin klíštěte *Ixodes ricinus* na řadu cytokinů a chemokinů bylo prokázáno, že klíštěcí sliny výrazně zvyšují produkci chemokinu MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1). Tento chemokin může být dále indukován zase pouze slinami (Langhansová et al., 2015). Ve slinách tohoto klíštěte byl objeven protein Iris, který inhibuje T lymfocyty a potlačuje tvorbu protizánětlivých T_H1 cytokinů. Naopak produkce T_H2 cytokinů je zvýšená (Schoeler et al., 1999).

Ve slinách klíštěte se nacházejí i kininázy a lipokaliny vázající histamin, jež patří mezi látky tlumící svědění a bolest při přisátí klíštěte (Ribeiro & Mather, 1998).

Podle zjištění Niny Poolové nemají klíštěcí sliny vliv na sekreci IL-6 a IL-12p40p70, ani na protizánětlivý cytokin IL-10. Je to překvapující zjištění, neboť klíštěcí sliny normálně vykazují protizánětlivý charakter a měly by v tom případě způsobit určitou změnu v sekreci IL-6 (Poole et al., 2013).

Jak již bylo předesláno, spolu s klíštěcími slinami je do těla hostitele vpraven nespočet závažných lidských patogenů způsobujících například klíšťovou encefalitidu (virus klíšťové encefalitidy), Lymeskou borreliózu (*Borrelia burgdorferi*), horečku Skalístých hor (*Rickettsia rickettsii*), ehrlichiózu (*Ehrlichia chaffeensis* a *E. equi*), anaplazmózu (*Anaplasma phagocytophilum*), babesiózu (*Babesia spp.*), coloradskou klíšťovou horečku (*Coltivirus*) a tularémii (*Francisella tularensis*). O klíšťové encefalitidě je pojednáno v následující kapitole.

1.3 KLÍŠŤOVÁ ENCEFALITIDA

Klíšťová encefalitida je infekční virové onemocnění napadající centrální nervovou soustavu CNS (zejména mozek a mozkové blány) [(Lindquist & Vapalathi, 2008)]. Jedná se o nejzávažnější lidské onemocnění způsobené arboviry v Evropě a Rusku, s ročním

výskytem kolem 13 000 případů (Kovalev et al., 2014). Konkrétním původcem je virus (arbovirus) z čeledi Flaviviridae. Do této čeledi se kromě viru klíšťové encefalitidy (TBEV) dále řadí Powassan virus (POWV), virus Omské hemoragické horečky (OHFV) a virus nemoci Kyasanurského lesa (KFDV) [(Robertson et al., 2009)]. TBEV je klasifikován jako jeden druh se třemi subtypy – evropský subtyp, sibiřský subtyp a dálněvýchodní subtyp (Donoso-Mantke et al., 2011).

Epidemiologie klíšťové encefalitidy je blízce spojená s ekologií a biologií klíšťat rodu *Ixodes* (Donoso-Mantke et al., 2011). Evropský subtyp je přenášen klíštětem obecným (*Ixodes ricinus*), sibiřský a dálněvýchodní subtyp rodem *Ixodes persulcatus* (Burke & Moanth, 2001). Klíště *Ixodes ricinus* patří mezi dominantní „tvrdá“ klíšťata napříč Evropou. Tato klíšťata preferují lesy, kde je vysoká relativní vlhkost (Rampas & Gallia, 1949). Podle studie Piotra Cubera a Ashild Andreassena ze Slezské lékařské univerzity v Katovicích je aktivita klíšťat významně ovlivněna právě relativní vlhkostí (RH). Podle jejich studie se vlhkost, optimální pro aktivitu klíšťat, pohybuje mezi 75 a 90%. Dále má na jejich aktivitu vliv roční období. Počet aktivních klíšťat se znatelně zvyšuje na jaře, zato v létě a na podzim je jejich počet menší. Piotr Cuber se ve své studii aktivity klíšťat *Ixodes ricinus* zaměřil také na vliv teploty na jednotlivá vývojová stadia klíštěte a došel k závěru, že nejvíce nymf a dospělců se vyskytuje při teplotě od 15 do 26 °C, zatímco larvy se objevují při teplotě mírně přesahující 19 °C (Cuber et al., 2015). Klíště rodu *Ixodes persulcatus* zahrnuje 80 – 97% všech druhů klíšťat vyskytujících se v oblasti Uralu, Sibíře a Dálněvýchodním regionu Ruska (Gritsun et al., 2003a). Jedná se o klíšťata obývající především tajgu. *Ixodes persulcatus* přenášejí kromě sibiřského a dálněvýchodního subtypu TBEV i patogeny *Babesia spp.*, *Borrelia burgdorferi* (Kang et al., 1985) a pravděpodobně i *Anaplasma phagocytophilum* (Eremeeva et al., 2007). Preferují teplá, vlhká stanoviště a je pro ně charakteristické, že se při sání na člověka přichycují skutečně velice pevně (Jääskeläinen et al., 2011).

Stavba a struktura virionu

Klíšťová encefalitida byla poprvé popsána v roce 1931, virus (TBEV) byl izolován a spojen s tímto onemocněním o šest let později (Zilber, 1939). Jedná se o malý, obalený virus se sférickou strukturou, veliký přibližně 40 – 60 nm (Lindenbach & Rice, 2003). Genom tohoto viru je tvořen jednořetězcovou RNA pozitivní polaritity s délkou přibližně 11 000 bází. Vyznačuje se přítomností jediného otevřeného čtecího rámce (Chambers et al., 1990). Genom je translatován na jednoduchý polyprotein, který je následně štěpen virovými

proteázami a proteázami hostitelské buňky na tři strukturní a sedm nestrukturních proteinů (Jing Ye et al., 2013).

Celý cyklus infekce hostitelské buňky začíná přichycením virové částice na receptor buňky. Schopnost viru využít rozličné receptory na hostitelské buňce bývá zodpovědná za velký rozsah flavivirů replikujících se v členovcích. Do buňky se virus dostává endocytózou zprostředkovanou receptory. Acidifikace vnitřku endosomálního vezikulu mění konformaci E proteinu a přestavuje dimer na trimer. Tato změna způsobí fúzi virového obalu a membrány endosomálního vezikulu následovanou přesunem virového nukleokapsidu do cytoplazmy hostitelské buňky (Holzmann et al., 1995). Genomová RNA je v cytoplasmě napadené buňky translatována a vzniklý virový polyprotein je štěpen na jednotlivé proteiny. RNA polymeráza vytváří –ssRNA, komplementární k virové +ssRNA, a ta se tak stává templátem pro nové virové RNA. Další kroky replikace se odehrávají v endoplasmatickém retikulu. Vznikají neinfekční nezralé viriony, které jsou transportovány sekreční dráhou hostitelské buňky a dozrávají až v kyselých vezikulech po naštěpení prM (Mansfield et al., 2009; Hollidge et al., 2010).

Třemi strukturními proteiny jsou proteiny C, prM a E. C protein váže virovou DNA k vytvoření virového nukleokapsidu (Yamshchikov & Compans, 1993; Růžek et al. 2011). E protein je imunodominantní antigen viru, jež vyvolává neutralizaci protilátek a obranou imunitní odpověď. Protein prM v nezralých virových částicích chrání E protein proti předčasné fúzi membrány. Štěpením prM furinem vzniká M protein, který se vyskytuje u zralých virionů (Murray et al., 2008). Mezi nestrukturní proteiny patří NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B a NS5. Mají různé funkce, například protein NS1 je znám jako antigen vázající komplement. NS2A, NS4A a NS4B jsou zahrnuty jako jeden replikační komplex. NS2B-NS3 komplex slouží jako virová serinová proteáza. NS5 je RNA dependentní RNA polymeráza (Lindenbach & Rice, 2003).

Způsob přenosu viru

Přenos viru klíšťové encefalitidy úzce souvisí s pojmy rezervoár, vektor, hostitel a náhodný hostitel. Na počátku je nakažený hostitel (například šelmy, savci), na kterém vektor (v tomto případě klíště) sají. Klíště nasají infikovanou krev, ta putuje do střeva, kde dojde k pomnožení viru. Následně putují patogeny do slinných žláz, kde migrují do slin a spolu s těmi se dostávají do dalšího hostitele, na kterém infikované klíště sají (Labuda et al., 1993; Růžek et al., 2011). Důležitou roli v tomto momentě hraje například i přenos z infikovaného

klíštěte na neinfikované při sání na společném infikovaném hostiteli procesem tzv. sousání (co-feeding).

Rezervoárem jsou většinou drobní hlodavci. Rezervoárem je myšlen hostitel, který přenáší patogen, aniž by jím byl poškozován, ale slouží jako zdroj infekce pro další organismy. Větší savci nebo například ptáci nehrají příliš významnou roli při přenosu viru, zato ale jsou velmi důležití přenašeči infikovaných klíšťat do nových oblastí (Süss, 2003). Člověk je náhodný hostitel viru klíšťové encefalitidy, což znamená, že může rozšiřovat chorobu s celkem vysokou virémií, ale neúčastní se cirkulace viru v přírodě a je jakýmsi konečným článkem při oběhu viru (Donoso-Mantke et al., 2011).

Virus infikuje klíšťata pravidelně po celou dobu jejich života. Nicméně, sama klíšťata nikdy nemoc nerozvíjejí. Virus se přenáší z jednoho vývojového stádia na druhé (transstadiální přenos). Virus může být přenášen i transovariálně (tedy z infikované oplodněné samičky na vajíčka) [(Gritsun et al., 2003)]. K přenosu viru může docházet i v případě, že není u hostitele detekována virémie. Způsob přenosu hraje klíčovou roli při šíření viru klíšťové encefalitidy (Labuda et al., 1993). Horizontální přenos viru TBE mezi klíšťaty a jejich obratlovčími hostiteli je nezbytný pro virový endemismus (Nuttal & Labuda, 2003).

Klinický obraz onemocnění

Inkubační doba u onemocnění klíšťovou encefalitidou se pohybuje v rozmezí 7 až 14 dní. U TBE vyvolané požitím nepasterizovaného mléka byla pozorována kratší inkubační doba (do 7 dní) [(Kaiser et al., 2000)]. U zhruba dvou třetin pacientů nakažených klíšťovou encefalitidou jsou pozorovány nespecifické symptomy zahrnující bolest hlavy, horečku, nevolnost, bolesti svalů. Přibližně po osmi dnech se 20-30 % pacientů dostává do druhé fáze nemoci, která se projevuje postižením centrální nervové soustavy s příznaky meningitidy (bolest hlavy, ztuhlý krk), encefalitidy (ospalost, poruchy vnímání) nebo meningoencefalitidy (Lindquist & Vapalathi, 2008). Řada klinických projevů se liší u rozdílných subtypů. Horečku a následné neurologické poruchy lze pozorovat u evropského subtypu. Infekce dálnévýchodním subtypem je obvykle velmi závažná a sibiřský subtyp je odpovědný za chronickou encefalitidu. Úmrtnost u evropského subtypu je velmi vzácná (maximálně 1%). U dálnévýchodního subtypu to však může být 5-20% (Rendi-Wagner, 2008).

Makrofágy a dendritické buňky jsou molekuly, které jako první reagují na infekci při obraně organismu. Nejen že zahajují imunitní odpověď organismu, ale také představují místo prvotní periferní replikace viru (Schneider et al., 2010). Krom těchto buněk byly virové částice detekovány též v neutrofilech (Labuda et al., 1996). Zda se vir aktivně v neutrofilech replikuje, popřípadě jestli jsou neutrofile virem aktivovány, není známo.

1.4 NEUTROFILNÍ GRANULOCYTY

Imunitní systém náleží k základnímu obrannému systému organismu, který je schopen vyhledat, identifikovat a ničit patogenní organismy. Existují dva typy imunitní odpovědi organismu: vrozená a získaná. Vrozená odpověď nastává několik minut po infekci a zahrnuje mnoho faktorů ochrany organismu: například biomechanické bariéry, fyziologické, chemické a fyzikální bariéry apod. Buněčnými elementy vrozené imunity jsou fagocyty (neutrofile, monocyty/makrofágy, eozinofily, bazofily), NK buňky, LAK buňky, T γ δ buňky (jedna subpopulace lymfocytů) a Pit buňky (subpopulace NK buněk s fenotypem CD56/CD16) [(Litvitskij & Sinelnikov, 2009)]. Adaptivní imunita se projeví v momentě, kdy skutečně dojde k infekci. Pokud je adaptivní imunitě nabídnuta příležitost ve formě antigenu (například cizorodá struktura na MHC komplexu), dojde během šesti (sedmi) dní k zahájení specifické imunitní odpovědi. Pro adaptivní odpověď organismu je charakteristická tzv. imunologická paměť, to znamená, že si zapamatuje onu specifickou imunitní odpověď a budoucí imunitní reakce je mnohem silnější. Adaptivní imunitní odpověď je zprostředkována lymfocyty. T lymfocyty jsou složkou buněčné imunity, zatímco B lymfocyt je nástrojem humorální (látkové) imunity a tvoří protilátky (Goldsby et al., 2000).

Neutrofilní granulocyty patří mezi nejhojnější buňky cirkulující v lidském těle. Jsou nejběžnějším typem bílých krvinek. Donedávna byly neutrofilní granulocyty považovány za pouhé „zabíječe“ nepříliš důležité v imunitní odpovědi organismu. Nedávné studie (zejména studie Jing Wanga) prokázaly, že neutrofilní granulocyty (dále jen neutrofile) hrají velmi důležitou úlohu při infekčních a zánětlivých onemocněních (Wang & Arase, 2014). Podle mínění Amulica a jeho kolegů se neutrofile sice dají snadno izolovat, ale jejich poměrně krátká životnost je činí obtížně studovatelné (Amulic et al., 2012). Nutno podotknout, že již o mnoho let dříve bylo zpozorováno, že neutrofile jsou daleko životaschopnější, než bylo (a je dodnes) předpokládáno (Colotta et al., 1992). Neutrofile mohou být indukovány k expresi

genů kódujících klíčové zánětlivé mediátory, včetně komplementu, Fc receptorů, chemokinů a cytokinů (Cassatella et al., 1999).

Funkce neutrofilů

Neutrofilny představují první linii obrany proti širokému spektru infekčních patogenů (Wang & Arase, 2014). Podle studie Sébastiena Jaillona a jeho kolegů jsou neutrofilny majoritním zdrojem PRMs (humoral pattern recognition molecules), které rozpoznávají tzv. „patogenně spojená molekulární schémata“ a zahajují vrozenou imunitní odpověď (Jaillon et al., 2013). Neutrofilny jsou stěžejní pro vývoj NK buněk jak v lidském těle, tak v myších (Jaeger et al., 2012). Patří mezi zásadní antigen-prezentující buňky.

Neutrofilní granulocyty se tvoří v kostní dřeni v množství 10^9 buněk na jeden kilogram tělesné hmotnosti denně (Mary, 1985). V kostní dřeni se vyskytuje až 93 % neutrofilů, zbytek cirkuluje v periferní krvi. Má se za to, že neutrofilny cirkulují 6 – 12 hodin v krevním oběhu a následně se vyskytují 4 – 5 dní ve tkáni (Hořejší & Bartůňková, 2005). Zdržení a následné uvolnění neutrofilů z kostní dřene je regulováno rovnováhou mezi úrovní dvou chemokinových receptorů umístěných na neutrofilech. Jsou jimi CXCR4 a CXCR2 (Eash et al., 2010). CXCR4 je stěžejní pro udržování neutrofilů v kostní dřeni. Jeho případná nepřítomnost by způsobila nerovnováhu v množství neutrofilů v kostní dřeni a těch, cirkulujících v krvi (Hernandez et al., 2003). CXCR2 odpovídá za uvolňování neutrofilů z dřene. Jeho nedostatek vyvolá myelokatexický syndrom, při kterém jsou neutrofilní granulocyty zadržovány v kostní dřeni bez možnosti uvolnění. V tomto případě je uvolnění neutrofilů stimulováno faktorem G-CSF (= granulocyte colony – stimulating factor) [(Christopher et al., 2009)].

V případě zánětu nebo infekce jsou neutrofilny zachyceny aktivními endoteliálními buňkami v krvi, aktivovány a dále vyslány do postižené tkáně. Proces, při kterém neutrofilní granulocyty cirkulují v krvi k zasažené tkáni, se nazývá „verbování neutrofilů“ a zahrnuje fázi „přivázání“, fázi „kutálení“, fázi adheze, fázi „plazení“ a fázi „transmigrace“ (Ley et al., 2007). Během počáteční fáze zánětu patogen stimuluje endoteliální buňky lokalizované v blízkosti zasažené tkáně a podněcuje expresi adhezivních (přilnavých) molekul, jako jsou například P a E selektiny. V tu dobu neutrofilny vytvářejí glykosilované ligandy k těmto selektinům, jedním z nich je například PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand 1). Tyto molekuly naváží P a E selektiny na endoteliální buňky, poté dojde k přilnutí neutrofilů k stěnám cév. Nastala fáze „přivázání“, následována „kutálením“ neutrofilů podél stěn cév

až do krevního řečiště (Sundd & Ley, 2013). Neutrofilly vykazují odolnost vůči vysokým smykovým silám tím, že se zplošťují přes endotelium s cílem připojit několik adhezivních molekul tak, aby vznikl membránový řetězec, který by zvýšil průměr přilnavých buněk připojených k „rolujícím“ neutrofilům za účelem snížení rychlosti. Zkrátka, když se neutrofilly posunují vpřed podél stěn cév, membránový řetězec vytvoří kolem granulocytu smyčku a PSGL-1 se sune podél smyčky a poskytuje této kaskádě dějů unikátní adhezivní substráty (Sundd, 2012). Po adhezi k endoteliální tkáni neutrofilly musí překonat cestu přes endotelium k vlastní zasažené tkáni. Neutrofilly mohou migrovat přes bariéru endoteliálních buněk dvěma způsoby: paracelulární cestou – *mezi* jednotlivými endot. buňkami a transcelulární cestou – *skrz* endot. buňky. Jde o fázi „plazení“. V momentě, kdy neutrofilly překonají bariéru endoteliálních buněk, musí následně překonat bazální membránu (proteinové pletivo složené z lamininů a kolagenů). Nastává fáze „transmigrace“. Pokud se neutrofilly ocitnou v intersticiálním prostoru, mohou následně putovat přímo k místu zánětu (Carman & Springer, 2008; Burns, 2000).

Jakmile neutrofilly jednou překonají bariéru endoteliálních buněk a bazální membránu, putují přímo k místu zánětlivé reakce, kde vykazují své charakteristické chování. Neutrofilly mohou zabít patogeny několika různými mechanismy včetně fagocytózy (granula neutrofilů obsahují mnohé lytické enzymy), produkce antimikrobiálních peptidů a proteinů, anebo uvolňování reaktivních forem kyslíku (ROS) během tzv. oxidačního vzplanutí (Borregaard & Sorensen, 2007). Neutrofilly mohou dokonce vypustit jaderný obsah antimikrobiálních molekul (konkrétně jejich DNA a histony) do extracelulárního prostoru za účelem vytvoření komplexu z antimikrobiálních granulek a cytoplasmatických proteinů. Pro neutrofilly je charakteristické vytváření NETs (neutrophil extracellular traps), které vycytávají různorodé typy mikrobů (včetně virů). NETs zvyšují citlivost organismu k infekci a mohou být inhibovány nukleázami získanými jak z hostitelského organismu, tak z toho patogenního (Brinkmann et al., 2004; Yousefi et al., 2009). Zajímavé je, že neutrofilly lidí trpících chronickou granulomatózní chorobou (CGD), vyznačující se produkcí nefunkční NADPH, nemohou tvořit NETs (Bianchi et al., 2009).

Podle studie Xiuyang Guo a jeho kolegů byly ze slin klíštěte *Ixodes scapularis* izolovány dva proteiny, které inhibují aktivitu neutrofilních granulocytů. Konkrétně jsou jimi ISL 929 a ISL 1373. Tyto proteiny snižují expresi integrinů a inhibují in vitro produkci O₂ polymorfonukleovými leukocyty (Guo et al., 2009).

Neutrofilly se nemohou dělit ani doplňovat svou granulární výbavu. Aktivované neutrofilly po vykonání všech funkcí odumírají a stávají se součástí zánětlivého ložiska (Hořejší & Bartůňková, 2005). Likvidace aktivovaných neutrofilů je zásadním krokem při zvládnutí zánětu a vede k uzdravení (Buckley et al., 2013). Po vykonání všech důležitých funkcí neutrofilly podstupují apoptózu. Apoptotické neutrofilly musejí být z tkáně odstraněny dříve, než by nastal proces nekrózy. Zánětlivá reakce je častokrát prodloužena právě tím, že apoptóza neutrofilů nenastala včas (popřípadě selháním makrofágů, které mají za úkol z tkáně odstranit apoptotické neutrofilly). Existuje faktor (HIF-2 α : hypoxia inducible factor-2 α), jehož množství se v neutrofilech zvyšuje během akutního a chronického zánětu, a který redukuje apoptózu neutrofilů (Thompson et al., 2014). Apoptotické neutrofilly produkují faktory, které zabraňují dalšímu „verbování neutrofilů“. Laktoferin a Annexin A1 jsou vylučovány apoptotickými neutrofilly a patří mezi negativní regulátory „verbování neutrofilů“ (Perretti et al., 2009; Bournazou et al., 2009). Odumřelé neutrofilly vytvářejí hnis. Fagocytóza odumřelých neutrofilů makrofágy spouští produkci protizánětlivých cytokinů TGF- β (transforming growth factor- β) a IL10 (Kennedy & DeLeo, 2009).

Apoptóza může být iniciována extracelulárně působením TNF- α nebo intracelulárně například velkým množstvím kyslíkových radikálů. Morfologicky se apoptóza neutrofilů projevuje sníženým počtem cytoplazmatických granulí, zaokrouhlováním jádra, kondenzací jeho chromatinu a depresí fungování buněk, a to zejména anti-infekční aktivity (Plekova et al., 2010). Celý proces apoptózy je spuštěn složitou soustavou látek a vždy vede k aktivaci cysteinových proteáz – kaspáz (Le et al., 2011).

Role neutrofilů při onemocněních

Neutrofilní granulocyty plní zásadní úlohu v patogenezi rozličných onemocnění. Vedle infekčních onemocnění se jedná i o autoimunitní choroby, chronickou obstruktivní plicní chorobu (COPD), aterosklerózu a rakovinu.

COPD je majoritní příčinou úmrtí v industrializovaných zemích a je předně vyvolána kouřením. Epiteliální buňky jsou klíčovými regulátory neutrofilů putujících do dýchacích cest, neutrofilly jsou přitahovány chemotaktickými faktory, jako je IL-8 a leukotrien B4. Leukotrien B4 je přeměněn z leukotrienu A4 leukotrien A4 hydrolázou (LTA4H). Cigaretový kouř inhibuje aminopeptidázovou aktivitu LTA4H a to způsobí „verbování“ a hromadění neutrofilů, což vyvolá chronický zánět plic (Snelgrove et al., 2010).

Revmatoidní artritida je ukázkovou autoimunitní chorobou, která postihuje 1% populace. Neutrofilie jsou imunitní molekuly zdaleka nejvíce zastoupeny v synoviální tekutině, dále se hojně vyskytují v styčných plochách chrupavek. Neutrofilie jsou aktivovány imunoglobulinovými agregáty (revmatoidní faktory), které mají schopnost spojovat receptory Fc γ , které zapříčiní degradaci tkáně a vznik oxidačního vzplanutí. Granula uvolněná z neutrofilů způsobí destrukci kolagenní sítě v chrupavce (Mohr et al., 1981).

Neutrofilie hrají svou roli i při vzniku rakoviny. „Verbování“ neutrofilů při tumorigenezi je zařazeno chemotaktickými faktory mnohých druhů buněk, i těch rakovinných. Rakovinné buňky mohou uvolňovat chemokiny IL-8 a MIP-2 (Sparmann & Bar-Sagi, 2004). Neutrofilie „verbované“ nádorovými buňkami mohou vyvolat rakovinné bujení. Zánětlivé buňky představují nezbytnou součást nádoru a hrají důležitou roli ve vývoji rakoviny (Mantovani et al., 2008). V momentě, kdy v průběhu rakovinného bujení hrají klíčovou roli „nádorově sdružené“ makrofágy (TAM), nejsou neutrofilie nijak nápadné. Jisté ovšem je, že při nádorovém onemocnění hrají významnou roli právě „nádorově sdružené“ neutrofilie (TAN), neboť výrazně zvyšují možnost uzdravení u pacientů s rakovinou (Kuang et al., 2011).

Neutrofilie hrají klíčovou roli ve vrozené imunitě, ale jejich funkce ve virové patogenezi není zcela objasněna. Neutrofilní granulocyty jsou bezpochyby nesmírně důležité v patogenezi Japonské encefalitidy, horečky Západního Nilu a horečky Dengue. Po proniknutí flavivirů způsobujících výše zmíněné choroby dochází k rychlé zánětlivé odpovědi zahrnující periferní neutrofilovou leukocytózu a infiltraci neutrofilů do vnější nervové tkáně (Khanna et al., 1994).

2. CÍLE PRÁCE:

1. Zjistit, zda se virus klíšťové encefalitidy v neutrofilech replikuje.
2. Zjistit, zda jsou neutrofilny virem aktivovány.
3. Objasnit vliv klíšťecích slin na myší neutrofilní granulocyty aktivované virem klíšťové encefalitidy.
4. Prozkoumat vliv viru klíšťové encefalitidy a klíšťecích slin na apoptózu neutrofilů.

3. MATERIÁL A METODY:

3.1 MATERIÁL:

3.1.1 MYŠI

K pokusům byly vybrány samičky inbredního myšního kmene C57BL/6NHsd, staré 5 až 6 týdnů. Myši byly zakoupeny od firmy AnLab (AnLab Praha s.r.o.) a chovány ve zvěřinci Katedry medicínské biologie na Jihočeské univerzitě v Českých Budějovicích za podmínek vyžadujících bariérový chov.

3.1.2 BUNĚČNÉ LINIE

Buněčná linie **PS** - (angl. porcine kidney stable; praseční ledvina) byla kultivována v L₁₅ médiu (Leibowitz) s 3 % prekolostrálním telecím sérem (PTS), směsí antibiotik a antimykotik [Amphotericin B (0,25 µg/ml); Penicilin (100 j/ml); Streptomycin (100 µg/ml)] a 2,2 mM L-glutaminu (PAA) při 37 °C (Biosera). Pasáž byla prováděna suchou trypsinizací.

Buněčná linie **Vero** – jedná se o buněčnou linii získanou z ledvinných buněk afrického kočkodana (Yasumura et al., 1963). Je využívána jako linie hostitelských buněk pro pěstování viru. Buňky byly kultivovány v L₁₅ médiu (Leibowitz) s 3 % prekolostrálním telecím sérem (PTS), směsí ATB [Amphotericin B (0,25 µg/ml); Penicilin (100 j/ml); Streptomycin (100 µg/ml)] a 2,2 mM glutaminu při 37 °C (Sigma). Pasážování bylo prováděno suchou trypsinizací.

3.1.3 VIRUS

Virus klíšťové encefalitidy kmen **Neudoerfl**. Jedná se o prototypový kmen viru TBE Západního subtypu. Izolován byl roku 1971 z klíštěte v Rakousku. Virus byl pomnožen na Vero buňkách. Titr viru dosahoval hodnoty 1×10^7 PFU/ml.

Virus klíšťové encefalitidy kmen **Hypr**. Izolován byl v roce 1953 z krve desetiletého nemocného dítěte (Pospíšil et al., 1954) a následně pasážován na mozcích sajících myši. Kmen Hypr vykazuje vyšší virulenci než prototypový kmen Neudoerfl. Titr viru pomnoženého na Vero buňkách dosahoval hodnoty $4,4 \times 10^6$ PFU/ml.

3.2 METODY:

3.2.1 ODBĚR KLÍŠTĚCÍCH SLIN

Klíšťata použitá k odběru slin pocházela z volné přírody oblasti Českých Budějovic. Byla odchyťována metodou vlnkování. Samičky klíštěte *Ixodes ricinus* sály na morčeti po dobu 6 dní. Po nasátí byly samice sejmuty z pokusného zvířete a byly připevněny k podložním sklíčkům pomocí oboustranné lepicí pásky. Na hypostom a jednu z palp jim byla nasazena skleněná kapilára, která se zafixovala modelínou. Na hřbetní část těla jim bylo nakapáno po 1 – 2 μ l 5 % roztoku pilokarpinu (pilocarpine hydrochloride, Sigma) rozmíchaném v 95 % etanolu. Takto připravená klíšťata byla umístěna do vlhké komůrky a uložena do termostatu po dobu 2 hodin při 37 °C. Množství vyprodukovaných slin se u klíšťat velmi lišilo, rozmezí bylo zhruba 1 – 10 μ l. Sliny byly následně přefiltrovány přes filtr (0,22 μ m Hydrophilic Durapore, Millex ® Filter Unit).

Obsah proteinů ve slinách byl stanoven pomocí metody podle Bradfordové pro stanovení koncentrace proteinů (Bradford, 1976). Koncentrace proteinů v slinách byla stanovena na 333 μ g/ml. Sliny byly rozplněny po 10 mikrogramových alikvotech a uchovány při teplotě -70 °C.

3.2.2 IZOLACE BUNĚK Z KOSTNÍ DŘEŇ

Myš byla usmrcena zlomením vazů. Ze zadních nohou byla stažena kůže a končetina byla oddělena tak, aby stehenní a holenní kost zůstaly neporušené. Nožičky se opláchly ve sterilním PBS – Phosphate Buffer Saline. Šlachy a svalovina byly odstraněny, stehenní a holenní kosti byly odděleny v kolenní a očištěné kosti se opláchly v izopropanolu a vložily se do Petriho misky s MEM (Minimal Essential Medium).

Oba konce kostí byly odstříhány a pomocí injekční stříkačky s MEM a sterilní jehly (velikost 26 G) byly konce kostí promyty tak, aby se do nové Petriho misky uvolnila kostní dřev. Kostní dřev byla následně rozsuspendována 1 ml pipetou v minimálním esenciálním médiu (MEM), přefiltrována přes BD filtr (50 μ m) do centrifugační zkumavky. Následovala centrifugace při zrychlení 350 g po dobu 10 minut při 4 °C. Vzniklý supernatant byl slit a pelet byl rozsuspendován ve 2 ml lyzačního roztoku (0,84 % NH_4Cl), aby došlo k lýze erytrocytů. Po 2 minutách působení lyzačního roztoku bylo přilito 10 ml MEM. Následně

byly buňky stáčeny 10 minut v centrifuze při 350 g a 4°C. Supernatant byl slit a vzniklý pelet byl rozsuspendován v 200 µl MACS pufru (PBS + 2 % FCS + 2mM EDTA).

IZOLACE NEUTROFILŮ NA ZÁKLADĚ MAGNETICKÉ SEPARACE

Metoda magnetické separace je založena na principu negativní sorpce. Suspenze buněk je označena směsí primárních biotinylovaných monoklonálních protilátek proti antigenům neexprimovaným na neutrofilech. Následné značení buněk sekundární protilátkou s feromagnetickými částicemi zajistí, že v separační kolonce zůstanou zachyceny všechny buňky kromě neutrofilů. K samotné separaci byla použita komerční souprava protilátek Neutrophil Isolation Kit – mouse (Myltenyi Biotec, USA), magnetické separační kolonky-LS column a magnetický separátor – Midi MACS separator (Myltenyi Biotec, USA). Suspenze, která protékla kolonkou, obsahovala neutrofilů. Koncentrace neutrofilů byla stanovena po smíchání 10 µl buněčné suspenze se 45 µl trypanové modře a 45 µl MACS pufru (10x naředěno). Následovalo počítání v Bürkerově komůrce. Poté byly buňky naředěny v příslušném médiu a podle potřeby nasazeny.

3.2.3 INFEKCE NEUTROFILŮ VIREM KLÍŠŤOVÉ ENCEFALITIDY

Infekce neutrofilů byla prováděna vždy v den izolace. Neutrofilů se naředily (v základním médiu RPMI se sérem) tak, aby na každou mikrozkušavku připadlo 2×10^5 buněk ve 100 µl média.

Byly použity kmeny Neudoerfl a Hypr. V prvním pokusu měl titer viru Neudoerfl hodnotu 2×10^7 PFU/ml. Infekční dávka viru byla 5:1, což znamená, že 5 virových částic připadalo na 1 buňku.

Nejprve bylo do mikrozkušavky napipetováno $1,2 \times 10^6$ buněk v 600 µl kompletního média (RPMI se sérem). K buňkám bylo přidáno 300 µl virové suspenze (6×10^6 virových částic). Buňky s virem se nechaly inkubovat 1 hodinu při 37 °C. Po adsorbci viru na buňky následovalo odmytí neadsorbovaného viru. Mikrozkušavky s buňkami se centrifugovaly (3 min, 160 g, 4 °C), supernatant byl odstraněn a pelet byl rozsuspendován v 1,3 ml čistého kompletního média (RPMI se sérem). Promytí buněk bylo dvakrát zopakováno, až nakonec byl finální pelet opět rozsuspendován v 1,3 ml kompletního média (RPMI se sérem), buňky byly založeny do 96 jamkového panelu v množství 1×10^5 buněk ve 100 µl média na jamku a inkubovány v termostatu na 37 °C s 5 % CO₂. Ještě před uložením do termostatu došlo k odběru supernatantu v čase 0. Následoval odběr po 24, 48 a

72 hodinách. Odebraný supernatant byl zmrazen na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Titr viru byl zjišťován metodou plakové titrace.

V pokusu, kdy se sledoval vliv slin na replikaci viru v neutrofilech bylo před přidáním virové suspenze k buňkám přidáno 9 μl klišťecích slin na dvě hodiny, přičemž výsledná koncentrace slin byla 10 $\mu\text{g/ml}$. Po dvouhodinové preinkubaci byla k buňkám přidána virová suspenze na 1 hodinu. Byl použit opět kmen Neudoerfl, infekční dávka byla snížena na MOI 1. Titr viru dosahoval hodnoty 1×10^8 PFU/ml. Poté následovalo promytí neadsorbovaného viru (2x centrifugace 3 min, 160 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Po promytí viru následovalo nasazení buněk rozsuspendovaných v kompletním médiu na 96 jamkový panel v množství 1×10^5 buněk ve 100 μl média na jamku. Do příslušných jamek byly znovu přidány sliny o výsledné koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ a poté následovala 24 hodinová a 48 hodinová inkubace v termostatu na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ při 5 % CO_2 .

3.2.4 PLAKOVÁ TITRACE VIRU

Titry virů byly stanovovány metodou plakové titrace a vyjádřené v PFU (angl. plaque-forming units = plaketovné jednotky) [(Porterfield & de Madrid, 1969)]. Tato metoda umožňuje stanovit množství infekčních virových částic ve vzorku. K tomuto účelu byla použita buněčná linie PS, která byla naředěna v kultivačním médiu ($L_{15} + 3\%$ PTS) tak, aby vznikla buněčná suspenze. Testované vzorky byly naředěny desítkovým ředěním ve 24 jamkovém panelu (TPP, Švýcarsko) v kultivačním médiu. V každé jamce bylo 200 μl ředěného vzorku. Poté bylo do každé jamky přidáno po 300 μl buněčné suspenze v množství $1,2 \times 10^5$ buněk (koncentrace 3-5 $\times 10^5$ buněk/ml) a obsah jamek byl řádně promíchán. Panel s nasazenými buňkami byl uložen na 4 hodiny do inkubátoru do $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, při 0,5 % CO_2 . Po uplynutí uvedené doby byl obsah všech jamek převrstven 400 μl přelivu, což je roztok CMC (1,5 % karboxymethylcelulóza) a 2x koncentrované kultivační médium L_{15} v poměru 1:1. Takto připravené panely byly inkubovány v termostatu po dobu 3-5 dní (teplota $37\text{ }^{\circ}\text{C}$; 0,5 % CO_2).

Po 3-5 dnech byly panely promyty ve fyziologickém roztoku (0,9 % roztok NaCl), přičemž mrtvé buňky byly odstraněny. Následně byly plaky vizualizované barvením, kdy živé buňky byly obarveny ponořením panelů na 45 minut do roztoku naftalenové černě (0,88 mM naftalenové černě; 1,054 M ledové kyseliny octové; 0,24 M octanu sodného). Na základě toho bylo možné stanovit počet vytvořených plaků.

Po vizualizaci plaků roztokem naftalenové černě následovalo jejich počítání. Pro každý časový interval byly plaky pečlivě spočítány a poté následoval výpočet počtu PFU na 1 ml vzorku. Počítalo se podle vzorce:

$$\frac{(1000 \cdot 10^{\text{na jamku}} \cdot \text{počet plaků v dané jamce})}{180}$$

Následovalo zlogaritmování výsledků přepočtu plaků na PFU/ml, hodnoty byly poté vyneseny do grafu.

3.2.5 STANOVENÍ CYTOKINŮ – ELISA

Izolované neutrofilů byly nasazeny tak, aby na každou jamku připadlo 2×10^5 buněk ve 100 μl kompletního média. Následně byl do každé jamky přidán vir v koncentraci 1 virové částice na jednu buňku. Supernatanty byly odebrány po 24 a 48 hodinách a zamraženy na -70°C . Produkce cytokinů byla stanovena metodou ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). V pokusech, kdy byly použity sliny, se tyto přidávaly na buňky před samotnou infekcí na dvě hodiny o výsledné koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$.

Množství IFN- β bylo stanoveno pomocí kitu Legend MaxTM Mouse IFN- β Elisa Kit (BioLegend). Množství IL-6 bylo stanoveno s pomocí kitu Mouse IL-6 ELISA Ready – SET - Go![®] (eBioscience) a množství TNF- α bylo stanoveno pomocí kitu Mouse TNF alpha ELISA Ready – SET – Go![®] (eBioscience). Při stanovení se postupovalo přesně podle instrukcí výrobce.

3.2.6 APOPTÓZA INFIKOVANÝCH NEUTROFILŮ MĚŘENÁ NA PRŮTOKOVÉM CYTOMETRU

Apoptóza neutrofilů je zkoumána na základě množství aktivní kaspázy-3, která se účastní poslední fáze apoptózy a bývá aktivována jinými kaspázami.

Neutrofilů byly rozkapány na 96 jamkový panel po 2×10^5 buněk ve 100 μl média na jamku. Do některých jamek byly přidány sliny o výsledné koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$. Po dvou hodinách byly buňky infikovány virem Neudoerfl při MOI 1. Následovala inkubace v termostatu při 37°C a 5 % CO_2 . Množství aktivní kaspázy-3 v neutrofilech bylo stanoveno pomocí kitu (FITC Active Caspase-3 Apoptosis Kit, BD PharmingenTM). Neutrofilů byly uvolněny z jamek škrabkou a přeneseny do předem označených mikrozkušavek. Buňky byly promyty, fixovány a značeny protilátkou rozeznávající aktivní kaspázu-3 dle přesných

instrukcí výrobce. Vzorky byly měřeny na průtokovém cytometru BD FACS Canto II, s použitím speciálního softwaru FACSDiva Software.

3.2.7 STATISTICKÁ ANALÝZA

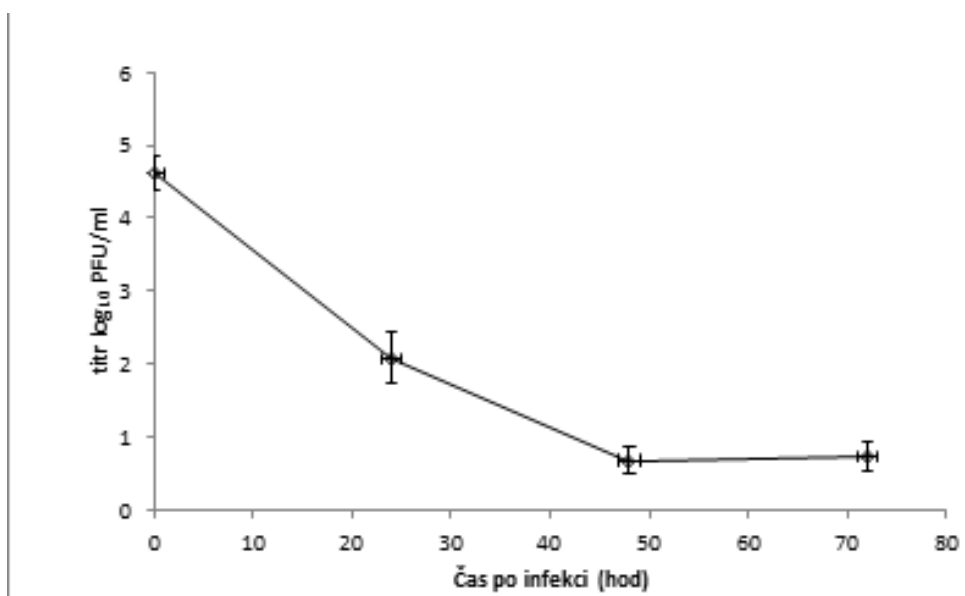
Pro zpracování výsledků byly použity grafy programu EXCEL. Získaná data byla statisticky vyhodnocena v programu GraphPad Prism pomocí metody jednocestné analýzy variance (ANOVA). Všechny hodnoty vynesené do grafu představují aritmetické průměry hodnot z naměřených triplikací. Chybové úsečky v grafech znázorňují střední chybu průměru (SEM).

4. VÝSLEDKY

4.1 REPLIKACE VIRU TBE V NEUTROFILECH

Cílem prvního pokusu bylo zjistit, zda se virus klíšťové encefalitidy v izolovaných neutrofilních granulocytech replikuje. Neutrofilny byly infikovány kmenem Neudoerfl, přičemž použita infekční dávka se rovnala 5 (MOI 5, multiplicita infekce). Množství virových částic bylo stanoveno v intervalech 24, 48 a 72 hodin po infekci metodou plakové titrace.

Obrázek č. 1 demonstruje grafické vyobrazení daných hodnot.



Obr. 1: Replikace viru v neutrofilech zkoumaná ve třech časových intervalech.

Z grafu je patrné, že po adsorbci viru (tedy v čase 0) lze pozorovat nejvyšší hodnotu PFU/ml, poté se ale titr viru již snižoval a za 72 hodin již byl snížen na méně než 100 PFU/ml (Obr. 1). Celá křivka má sestupný charakter, dá se tedy říci, že se virus klíšťové encefalitidy v neutrofilech nereplikuje.

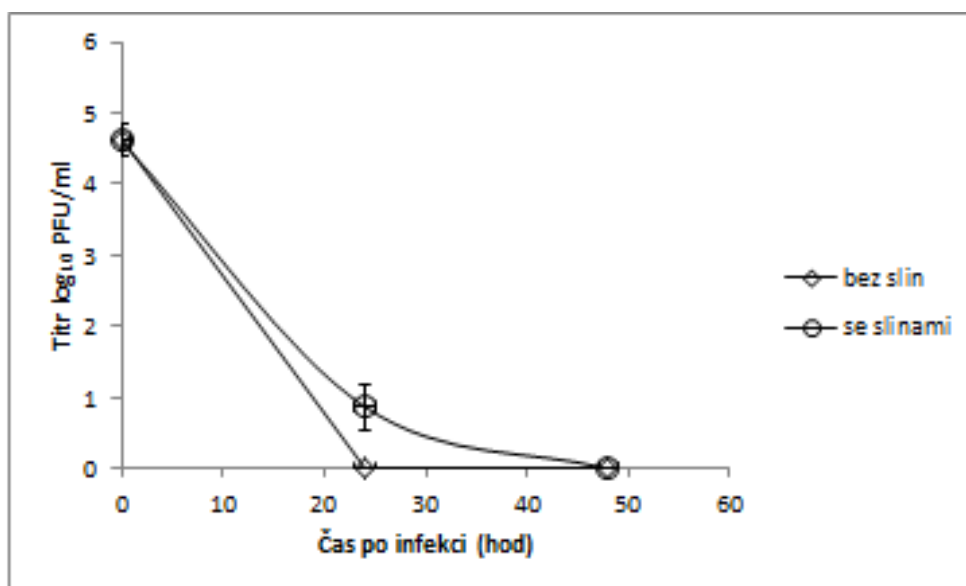
4.2 REPLIKACE VIRU TBE V NEUTROFILECH OBOHACENÝCH O KLÍŠTĚCÍ SLINY

V některých typech imunitních buněk, např. v dendritických buňkách a makrofázích bylo pozorováno zvýšení replikace viru TBE v přítomnosti klíštěcích slin. Proto cílem

dalšího experimentu bylo zjistit, zda v neutrofilech přítomnost slin replikaci viru také podpoří.

V pokusu se postupovalo velmi podobně jako v prvním, pouze s tím rozdílem, že buňky byly inkubovány se slinami po dobu 2 hodin před samotnou adsorbci viru a infekční dávka byla snížena na MOI 1. Výsledná koncentrace slin byla 10 µg/ml.

Obrázek č. 2 znázorňuje grafické vyjádření množství PFU/ml v jednotlivých časových intervalech.



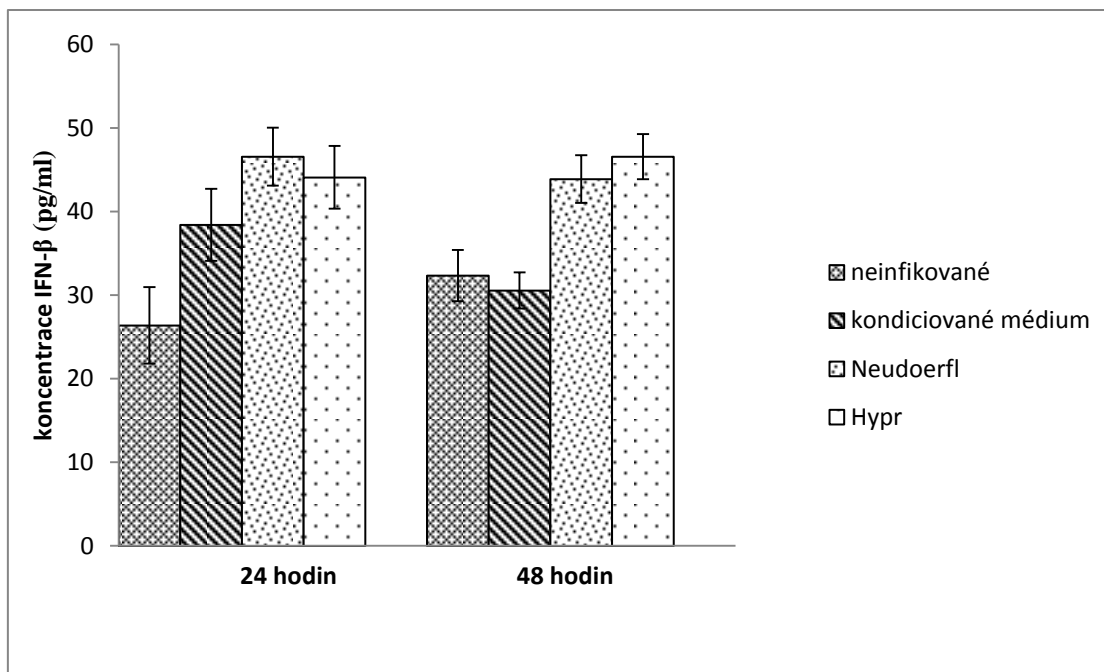
Obr. 2: Replikace viru kmene Neudoerfl v neutrofilech po přidání klíštěcích slin.

Z grafu je patrné, že i když byl zaznamenán nepatrný rozdíl titru v časovém intervalu 24 hodin, k replikaci TBEV v neutrofilech nedochází ani v přítomnosti slin.

4.3 PRODUKCE INTERFERONU-β VIREM INFIKOVANÝMI NEUTROFILY

Mnoho typů buněk odpovídá na virovou infekci produkcí interferonu typu I. Cílem následujícího experimentu bylo zjistit, zda po infekci neutrofilních granulocytů virem klíšťové encefalidity taky dochází k produkci interferonu, konkrétně IFN-β. Produkce IFN byla stanovena metodou ELISA.

Produkcí IFN-β neutrofilů lze vidět na obrázku č. 3.



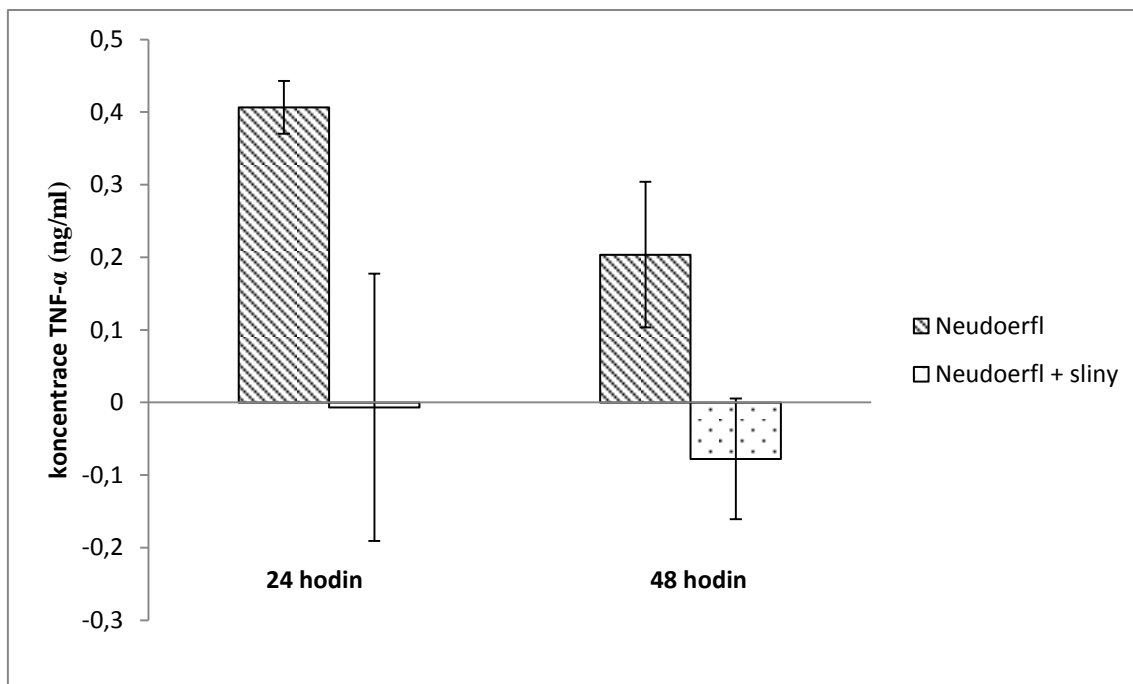
Obr. 3: Produkce IFN- β infikovanými neutrofilými po 24 a 48 hodinách.

Z obrázku 3 vyplývá, že k nepatrné produkci IFN- β infikovanými neutrofilými došlo jak po stimulaci Neudoerflem (MOI 1), tak po stimulaci Hyprem, a to v obou časových intervalech. Rozdíl v množství produkovaného interferonu mezi těmito dvěma kmeny pozorován nebyl. Proto jsme v další práci používali pouze méně virulentní kmen Neudoerfl.

4.4 VLIV KLÍŠTĚCÍCH SLIN NA PRODUKCI CYTOKINU TNF- α VIREM INFIKOVANÝMI NEUTROFILY

Naším dalším cílem bylo zjistit, jestli po infekci virem dochází k aktivaci neutrofilů, a jak je tato aktivace ovlivněna klíštěcími slinami. Jako parametr aktivace jsme si zvolili produkci cytokinu TNF- α . Nejprve jsme analyzovali vzorky použité v druhém replikačním experimentu. Byl použit kmen Neudoerfl s infekční dávkou MOI 1.

Produkce cytokinu TNF- α v časových intervalech 24 a 48 hodin je znázorněna na obrázku č. 4.



Obr. 4: Produkce cytokinu TNF- α infikovanými neutrofily ve dvou časových intervalech.

Z grafu (obr. 4) je zřejmé, že produkce TNF- α neutrofily infikovanými Neudoerflem (MOI 1) byla zvýšená, a to v obou časových intervalech. Klíštěcí sliny produkci TNF- α nesignifikantně snižovaly.

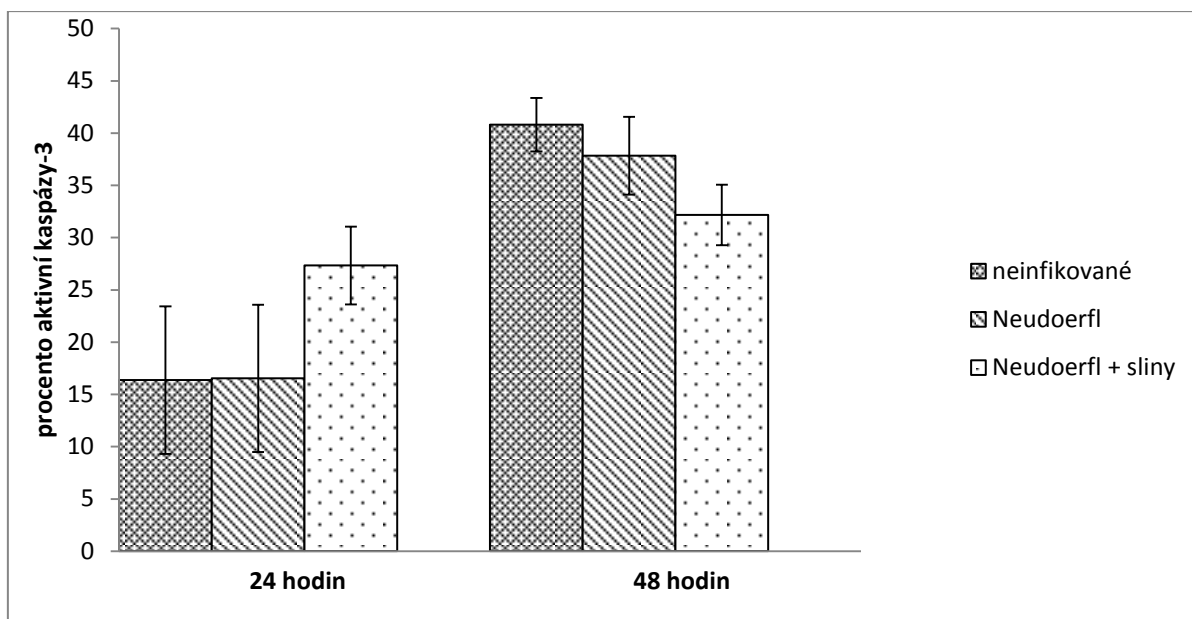
Toto pozorování jsem se pokusila zopakovat. Byl zvolen postup, kdy byly k buňkám nejprve přidány klíštěcí sliny o výsledné koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$. Po dvou hodinách byla k buňkám přidána virová suspenze (Neudoerfl, MOI 1), a ta byla ponechána s buňkami po dobu 24 a 48 hodin, kdy se sbíral supernatant. Elisou poté bylo zkoumáno, zda infikované neutrofily po přidání slin produkují cytokin TNF- α . Ani po opakovaných experimentech se však nepodařilo v neutrofilech TNF- α detekovat.

4.5 ANALÝZA APOPTÓZY VE VIREM INFIKOVANÝCH NEUTROFILECH

Naším cílem bylo změřit apoptózu izolovaných neutrofilů, které byly infikovány virem klíšťové encefalitidy (kmen Neudoerfl, MOI 1). Následně jsme testovali vliv klíštěcích slin.

V experimentu byly buňky inkubovány s virem (kmen Neudoerfl) a slinami bez promytí neadsorbovaného viru (obrázek 5). Apoptóza byla měřena v časových intervalech 24 a 48 hodin po infekci.

Na obrázku č. 5 je znázorněna apoptóza měřená u infikovaných neutrofilů ve dvou časových intervalech.



Obr. 5: Procento apoptotických neutrofilů po 24 hodinové a 48 hodinové inkubaci s TBEV.

Na obrázku č. 5 je vidět, že virus klíšťové encefalitidy po 24 hodinách nijak neovlivnil apoptózu neutrofilů. Procento apoptotických buněk infikovaných virem je srovnatelné s procentem buněk neinfikovaných. Sliny mírně apoptózu iniciovaly, ovšem ne statisticky významně. V časovém intervalu 48 hodin bylo množství apoptotických neinfikovaných neutrofilů vyšší. Nicméně ani zde infekce TBEV nijak jejich počet neovlivnila. U buněk s přidanými klíštěcími slinami bylo pozorováno mírné snížení počtu apoptotických buněk, opět bez statistické významnosti. Experiment byl zopakován s vyšší infekční dávkou (MOI 2). Výsledek byl negativní, bez efektu viru nebo slin na počet apoptotických buněk.

5. DISKUZE

Klíšťová encefalitida je nejzávažnější lidské onemocnění způsobené arboviry v Evropě a v Rusku. Při pozdním odhalení infekce dochází k poruše centrálního nervového systému s projevy nervové obrny, což může mít za následek trvalé potíže, jako příklad zmiňme chronické bolesti hlavy, poruchy spánku, depresi, obrnu svalů v obličeji, obrnu končetin. I z těchto důvodů je v poslední době výzkumu arbovirů a jejich vektorů věnována velká pozornost.

Neutrofilní granulocyty jsou nejběžnějším typem bílých krvinek cirkulujících v lidském těle. Některé dřívější experimenty prokázaly přítomnost virové částice uvnitř neutrofilního granulocytu (Labuda, 1993). Proto bylo naším cílem zjistit, zda se virus TBE v těchto krátce žijících buňkách může replikovat, nebo alespoň vyvolá jejich aktivaci, a jakou roli v těchto procesech hrají klíčtější sliny. Neutrofilny byly infikovány kmenem viru klíšťové encefalidity, o různém stupni multiplicity infekce (MOI 1 a MOI 5). Zpočátku jsme se domnívali, že by požadovanou reakci mohl vyvolat již virus s MOI 1. K replikaci viru v neutrofilním granulocytu nedošlo ani v jednom případě. U makrofágů závisí množství vyprodukovaného viru na stupni diferenciaci buněk. Z některých experimentů vyplývá, že čím vyšší stupeň diferenciaci makrofágů, tím menší množství jimi vyprodukovaného viru (Kopecký et al., 1991). Jedním z důvodů, proč se virus v neutrofilech nereplikuje, může tedy být jejich diferenciaci. Kromě charakteru infikovaných buněk je replikace viru závislá na virulenci jednotlivých kmenů. Virulence kmene Neudoerfl je velice nízká. Málo patogenní kmeny TBEV vykazují pomalé pronikání do buněk a také slabou vazbu na krevní buňky, zatímco vysoce virulentní kmeny rychle pronikají do buňky a aktivně se v ní replikují (Krylova et al., 2015). Některé studie dokazují, že na snížení virulence virového kmene má kromě rychlosti pronikání do buněk vliv také samotný virový genom. Mutace v nekódujících sekvencích genomu může způsobit poruchu v replikaci virové RNA a způsobit tím dokonce až atenuaci viru (Wallner et al., 1996). Největší vliv na virulenci viru má s největší pravděpodobností obalový protein E jakožto hlavní strukturální protein flavivirů (Labuda et al., 1993). Co se týče vlivu slin na replikaci virem TBE, bylo prokázáno, že klíčtější sliny zvyšují procento virem infikovaných slezinných dendritických buněk, i když zvýšení replikace viru TBE pozorováno nebylo (Fialová et al., 2010). V tomto kontextu je zajímavý jev označovaný jako SAT neboli slinami asistovaný přenos (saliva-assisted transmission), při kterém je přenos patogenu do těla hostitele zesílen prostřednictvím slin. Patogen pak může v hostitelském organismu snadněji proliferovat pravděpodobně díky oslabení obranných mechanismů hostitele. SAT efekt byl poprvé popsán u Thogoto viru izolovaného z klíštěte

Rhipicephalus appendiculatus (Jones & Nuttall, 1990). Od té doby byl tento jev popsán u celé řady dalších patogenů (například u TBEV nebo u viru Louping ill), které nemusejí být přenášeny pouze z klíštěte, ale z celé řady dalších hematofágních členovců (například komárů) [(Nuttall & Labuda, 2004)]. V našich experimentech nebyla pozorována replikace viru ani v přítomnosti slin. Je pravděpodobné, že neutrofil nebyl permissivní k virové infekci. I když neutrofil není cílovou buňkou pro virus, mohou být důležité pro přenos viru. Například studie Pingena informuje o tom, že zánět vyvolaný neutrofilami napomáhá replikaci a přenosu viru (Bunyamvera a Semliki Forest virus) přenášeného komáry *in vivo*. Bodnutí komárem je charakterizováno otokem a přílivem neutrofilů, které koordinují a lokalizují vrozenou imunitní odpověď, která usnadňuje přístup myeloidních buněk permissivních k virové infekci. Případné vyčerpání neutrofilů potlačuje zánětlivou reakci a omezuje schopnost komára kousnutím podpořit infekční reakci (Pingen et al., 2016).

Neutrofilů kromě jejich fagocytární funkce vykazují i regulační funkci, to znamená, že produkují různé cytokiny. Součástí této práce bylo také testovat aktivaci neutrofilů měřením produkce TNF- α (indukuje apoptózu a uplatňuje se v buňkách zprostředkované imunitě), IL-6 a protivirového IFN- β . I když neutrofil není silným producentem cytokinů, jejich hojné zastoupení může tuto skutečnost kompenzovat.

Produkce IFN- β byla testována po infekci neutrofilů se dvěma virovými kmeny Neudoerfl i Hypr. Produkce IFN- β byla u obou virových kmenů nízká. Při použití Hypr jsme vycházeli z faktu, že tento vykazuje výrazně vyšší virulenci než kmen Neudoerfl, což se projevuje zvýšením produkce cytokinů například v slezinných dendritických buňkách (Fialová et al., 2010). Produkce interferonu, i když velice nízká, byla u obou virových kmenů téměř srovnatelná. Navíc, TBEV způsobuje reorganizaci membrán uvnitř imunitních buněk, ve kterých je uložena většina virové dsRNA, která je tak nepřístupná detekci cytoplazmatických receptorů. Tím je zpožděna tvorba antivirového IFN, proto i vysoce virulentní kmen Hypr může indukovat tvorbu interferonu se zpožděním (Overby et al., 2010). Skallová ve své práci pozorovala vliv obou kmenů TBEV (Neudoerflu i Hypru) na dendritické buňky a došla k závěru, že oba kmeny podporují zranění dendritických buněk a taktéž vedou k produkci IFN- β , TNF a IL-6 (Skallová, 2009).

Dalším cílem bylo zjistit, zda infekce neutrofilů virem TBE vede k jejich aktivaci a následné produkci cytokinů, například TNF- α a IL-6. Nejprve jsme analyzovali vzorky z druhého replikačního experimentu a zjistili jsme, že produkce TNF- α neutrofilů infikovaných Neudoerflem (MOI 1) byla zvýšená, a to v obou časových intervalech. Klíčtělí

sliny produkci TNF- α snížily, i když bez statistické signifikance. Při ověřování tohoto výsledku byly zvoleny dva alternativní postupy, které se však od sebe významně nelišily. Buď byly buňky po odmytí viru promyty, nebo byla virová suspenze ponechána s buňkami po dobu 24 a 48 hodin, kdy se sbíral supernatant. Bohužel ani opakovanými pokusy se nepodařilo TNF- α v neutrofilech detekovat. Fialová ve své studii zkoumala mimo jiné produkci cytokinů dendritickými buňkami infikovanými virem klíšťové encefalitidy. Podařilo se jí prokázat signifikantní produkci TNF- α i IL-6, zatímco produkce cytokinů IL-10 a IL-12p70 nebyla detekovaná (Fialová et al., 2010). Ve virem infikovaných neutrofilech byla testována i produkce cytokinu IL-6. Infekce neutrofilů virem TBE však nevyvolala žádnou indukci interleukinu-6. Je patrné, že k produkci cytokinu v neutrofilech nedochází kvůli absenci replikujícího se viru.

Dalším bodem této práce bylo prozkoumat vliv TBEV a klíštěcích slin na apoptózu neutrofilů. Je důležité poznamenat, že účinek patogenních organismů na neutrofile v experimentálních modelech závisí na mnohých proměnných, jako je multiplicita infekce (MOI), použitý patogenní kmen, doba trvání expozice a čistota buněk. To vše může ovlivnit délku života neutrofilu. Bylo prokázáno, že vysoká MOI podněcuje u neutrofilů apoptózu, zatímco nízká MOI iniciuje u neutrofilů oddálení apoptózy. Tato skutečnost byla prokázána zejména u bakterií (například u chlamydií nebo stafylokoků) [(van Zandbergen et al., 2004; Anwar et al., 2009)], ale byla zkoumána i u virů (virus chřipky) [(Elbim et al., 2009)] nebo i u hub (*Aspergillus fumigatus*) [(Ocana et al., 2008)]. Apoptóza neutrofilů při virových infekcích může buď velmi zlepšit, nebo naopak zhoršit schopnost hostitele rozeznat infekci a adekvátně na ni reagovat. Existují virová onemocnění, například infekce HRSV, která inhibují apoptózu neutrofilů, a naopak takové infekce, jako například onemocnění virem HIV nebo chřipkou typu A, které apoptózu neutrofilů výrazně podněcují (Elbim et al., 2009).

Práce Plekhové ukázala, že virus TBE indukuje apoptózu v neutrofilech (Plekhová, 2012). V této práci jsme také otestovali vliv TBEV a klíštěcích slin na apoptózu neutrofilních granulocytů. Z výsledků vyplývá, že virus TBE apoptózu neovlivnil a ani sliny neměly na apoptózu žádný vliv. Některé enzymy, které klíštěcí sliny obsahují, indukují změny v morfologii endoteliálních buněk a indukují apoptózu degradací integrinu $\alpha 5\beta 1$ (Yu et al., 2003). Proteolytická degradace integrinů může vést k disfunkci tohoto receptoru na buněčném povrchu, což je událost úzce spojená právě s apoptózou. Klíštěcí sliny indukují apoptózu MVEC, o čemž svědčí „odkrytí“ fosfátydílserinu na buněčné membráně a typické morfologické změny jádra vyznačující se kondenzací a fragmentací (Brassard et al., 1999;

Francischetti et al., 2005). Fialová ve své práci prokázala, že infekce TBEV indukovala v dendritických buňkách apoptózu a klíštěcí sliny signifikantně snížily počet apoptotických buněk. Je možné, že klíštěcí sliny mohou usnadnit šíření TBEV, a to tím, že indukují delší přežití infikovaných dendritických buněk, což může výrazně zvýšit šance pro přenos TBEV mezi infikovanými a neinfikovanými klíšťaty, které sousadí na téže hostiteli (Fialová et al., 2010). Myslíme si, že indukce apoptózy ani ovlivnění procenta apoptotických buněk u neutrofilů nebylo pozorováno buď z důvodu nereplikujícího se viru nebo nesprávně zvoleného času na měření aktivní kaspázy-3. Tento předpoklad však nelze porovnat s jinými výsledky, neboť na toto téma nebyla dosud publikována žádná práce.

6. ZÁVĚR

- Replikace viru klíšťové encefalitidy v neutrofilních granulocytech nebyla prokázána.
- Klíštěcí sliny nepodpořily replikaci viru v neutrofilech.
- Produkce TNF- α , IL-6 a IFN- β virem infikovanými neutrofilů nebyla prokázána
- Infekce virem klíšťové encefalitidy ani klíštěcí sliny neovlivňují míru apoptózy u neutrofilů.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

TBE	klíšťová encefalitida (angl. tick-borne encephalitis)
TBEV	virus klíšťové encefalitidy (angl. tick-borne encephalitis virus)
T _H 1	subpopulace pomocných lymfocytů typ 1 (angl. T helper cells 1)
T _H 2	subpopulace pomocných lymfocytů typ 2 (angl. T helper cells 2)
Arboviry	viry přenášené členovci (angl. arthropod-borne virus)
C protein	kapsidový protein (angl. capsid protein)
E protein	obalový protein (angl. envelope protein)
prM/M protein	prekurzor membránového proteinu/ membránový protein (angl. membrane protein)
NK buňky	přírození zabíječi (angl. natural-killer cells)
LAK buňky	lymfokiny aktivovaní zabíječi (angl. lymphokine activity killer cells)
TIBOLA	klíšťová lymfadenopatie (angl. tick-borne lymphadenopathy)
tHFR	histamin uvolňující faktor
TAP	klíštěcí antikoagulační peptid (angl. tick anticoagulant peptide)
IRS-2	inzulinový receptorový substrát 2 (angl. insulin receptor substrate 2)
Ir – CPI	inhibitor koagulační fáze u klíštěte <i>Ixodes ricinus</i> (angl. coagulation contact phase inhibitor)
MCP – 1	monocyte chemoattractant protein-1
IL-6/ IL-10	interleukin 6/ interleukin 10
-ss RNA	jednořetězcová RNA negativní polarity
+ss RNA	jednořetězcová RNA pozitivní polarity

MHC	hlavní histokompatibilní komplex (angl. major histocompatibility complex)
CXCR4	C-X-C chemokinový receptor typ 4 (někdy též fusin)
CXCR2	C-X-C chemokinový receptor typ 2
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
MIP-2	macrophage inflammatory protein-2

8. SEZNAM LITERATURY

- **AMULIC, B., CAZALET, C., HAYES, G. L., METZLER, K. D., ZYCHLINSKY, A.** Neutrophil function: from mechanism to disease. *Annu. Rev. Immunol.*, 2012, **30**: 459-489.
- **ANDERSON, J. M., VALENZUELA, J. G.** Tick saliva: from pharmacology and biochemistry to transcriptome analysis and functional genomics. *Ticks: biology, disease and control*, 2008: 92-107.
- **ANWAR, S., PRINCE, L. R., FOSTER, S. J., WHYTE, M. K. B., SABROE, I.** The rise and rise of *Staphylococcus aureus*: laughing in the face of granulocytes. *Clinical & Experimental Immunology*, 2009, **157**(2): 216-224.
- **BEAUFAYS, J., ADAM, B., MENTEN - DEDOYART, C., FIEVEZ, L., GROSJEAN, A.** Ir-LBP, an *Ixodes ricinus* tick salivary LTB4-binding lipocalin, interferes with host neutrophil function. *PloS One*, 2008, **3**: e3987.
- **BEDFORD, G. A. H.** *Nuttalliella namaqua*, a New Genus and Species of Tick. *Parasitology*, 1931, **23**(02): 230-232.
- **BIANCHI, M., HAKKIM, A., BRINKMANN, V., SILER, U., SEGER, R. A., ZYCHLINSKY, A., REICHENBACH, J.** Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood*, 2009, **114**: 2619-2622.
- **BORREGAARD, N., SORENSEN, O. E., THEILGAARD-MONCH, K.** Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.*, 2007, **28**: 340-345.
- **BOURNAZOU, I., POUND, J. D., DUFFIN, R., BOURNAZOS, S., MELVILLE, L. A., BROWN, S. B., GREGORY, C. D.** Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin. *J. Clin. Invest.*, 2009, **119**: 20–32.
- **BRADFORD, M. M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**: 248-254.

- **BRAKE, D. K., PÈREZ DE LEON, A. A.** Immunoregulation of bovine macrophages by factors in the salivary glands of *Rhipicephalus microplus*. *Parasit Vectors*, 2012, **5**: 38.
- **BRASSARD, D. L., MAXWELL, E., MALKOWSKI, M.** Integrin alpha(v)beta(3)-mediated activation of apoptosis. *Exp. Cell Re.*, 1999, **251**(1): 33-45.
- **BRINKMANN, V., REICHARD, U., GOOSMANN, C., FAULER, B., UHLEMANN, Y., WEISS, D. S., ZYCHLINSKY, A.** Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 2004, **303**: 1532-1535.
- **BUCKLEY, C. D., GILROY, D. W., SERHAN, C. N.** The resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2013, **13**: 59–66.
- **BURKE, D. S., MONATH, T. P.** Flaviviruses. *Fields virology*, 2001, **1**: 1043-1125.
- **BURNS, A. R., BOWDEN, R. A., MACDONELL, S. D., WALKER, D. C., ODEBUNMI, T. O., DONNACHIE, E. M., SMITH, C. W.** Analysis of tight junctions during neutrophil transendothelial migration. *J. Cell Sci.*, 2000, **113**: 45–57.
- **CARMAN, C. V., SPRINGER, T. A.** Trans-cellular migration: cell-cell contacts get intimate. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2008, **20**: 533–540.
- **CASSATELLA, M. A.** Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv. Immunol.*, 1999, **73**: 369-509.
- **COLLOTA, F., RE, F., POLENTARUTTI, N., SOZZANI, S., MANTOVANI, A.** Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood.*, 1992, **80**: 2012-2020.

- **COONS L. B., ALBERTI G.** The Acari Ticks. *Chelicerate Arthropoda.*, 1999: 267-514.
- **CUBER, P., ANDREASSEN, A., VAINIO, K., ASMAN, M., DUDMAN, S., SZILMAN, P., SZILMAN, E., OTTESEN, P., ÅNESTAD, G.** Risk of exposure to ticks (*Ixodidae*) and the prevalence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in ticks in Southern Poland. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2015, **6**(3): 356-363.
- **DECREM, Y., RATH, G., BLASIOLI, V., CAUCHIE, P., ROBERT, S.** Ir-CPI, a coagulation contact phase inhibitor from the tick *Ixodes ricinus*, inhibits thrombus formation without impairing hemostasis. *The Journal of Experimental Medicine*, 2009, **206**: 2381-2395.
- **DE MADRID, A. T., PORTERFIELD, J. S.** A simple micro-culture method for the study of group B arboviruses. *Bulletin of the World Health Organization*, 1969, **40**: 113.
- **DONOSO-MANTKE, O., KARAN, L. S., RŮŽEK, D.** Tick-borne Encephalitis virus: s general overview. *Flavivirus Encephalitis*, 2011: 133-148
- **EASH, K. J., GREENBAUM, A. M., GOPALAN, M. P., LINK, D. C.** CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J. Clin. Invest.*, 2010, **120**: 2423–2431.
- **ELBIM, C., KATSIKIS, P. D., ESTAQUIER, J.** Neutrophil apoptosis during viral infections. *Open Virol. J.*, 2009; **3**: 52–59.
- **EREMEEVA, M. E., OLIVEIRA, MORIARITY, A. J., ROBINSON, J. B., TOKAREVICH, N. K., ANTYUKOVA, L. P., PYANYH, V. A., EMELJANOVA, O. M., IGNATJEVA, V. N.** Detection and Identification of Bacterial Agents in *Ixodes persulcatus* Schulze Ticks from the North Western Region of Russia. *Vector*, 2007, **7**(3): 426.

- **ESTRADA-PEÑA, A., MANGOLD, A. J., NAVA, S., VENZAL, I. M., LABRUNA, M., GUGLIELMONE, A. A.** A review of the systematics of the tick family *Argasidae* (Ixodida). *Acarologia*, 2010, **50**(3): 317.
- **FIALOVÁ, A., CIMBUREK, Z., IEZZI, G., KOPECKÝ, J.** Ixodes ricinus tick saliva modulates tick-borne encephalitis virus infection of dendritic cells. *Microbes and Infection*, 2010, **12**(7): 580-585.
- **FERGUSON, J. J., ZAQQA, M.** Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists: current concepts and future directions. *Drugs*, 1999, **58**: 965–982.
- **FRANCISCHETTI, I. M. B., VALENZUELA, J. G., ANDERSEN, J. F., MATHER, T. N., RIBEIRO, J. M. C.** Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary glands of the tick, *Ixodes scapularis* : identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood*, 2002, **99**: 3602–3612.
- **FRANCISCHETTI, I. M. B., MATHER, T. N., RIBEIRO, J. M. C.** Cloning of a salivary gland metalloprotease and characterization of gelatinase and fibrin(ogen)lytic activities in the saliva of the Lyme disease tick vector *Ixodes scapularis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, **305**: 869–875.
- **FRANCISCHETTI, I. M., MATHER, T. N., RIBEIRO, J. M.** Tick saliva is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Thrombosis and haemostasis*, 2005, **94**(1): 167.
- **FRANCISCHETTI, I. M. B., SA´-NUNES, A., MANS, B. J., SANTOS, I. M., RIBEIRO, J. M. C.** The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in Biosciences*, 2009, **14**: 2051–2088.
- **FRAUENSCHUH, A., POWER, C. A., DÉRUAZ, M., FERREIRA, B. R., SILVA, M.** Molecular cloning and characterization of a highly selective chemokine-

- binding protein from the tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, **282**: 27250-27258.
- **GALLIA, F., RAMPAS, J., HOLLENDER, L.** Laboratory infection caused by tick-borne encephalitis virus. *Čas. Lék.*, 1949, **88**: 224-9.
 - **GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE, B. A.** Kuby immunology, 2000, **2**: 427-429.
 - **GRITSUN, T. S., FROLOVA, T.V., ZHANKOV, A.I., ARMESTO, M., TURNER, S.L., FROLOVA, M.P., POGODINA, V.V., LASHKEVICH, V.A., AND GOULD, E.A.** Characterization of a Siberian virus isolated from a patient with progressive chronic tick-borne encephalitis. *J. Virol.*, 2003a, **77**: 25-36.
 - **GRITSUN, T. S.; NUTTALL, P. A.; GOULD, E. A.** Tick-borne flaviviruses. *Advances in Virus research*, 2003, **61**: 317-371.
 - **GUO, X., BOOTH, C. J., PALEY, M. A., WANG, X., DEPONTE, K., FIKRIG, E., NARASIMHAN, S., MONTGOMERY, R. R.** Inhibition of Neutrophil Function by Two Tick Salivary Proteins. *Infection and Immunity.*, 2009, **77**(6): 2320-2329.
 - **HAJNICKÁ, V., VANČOVÁ - ŠTIBRÁNIOVÁ, I. V., SLOVÁK, M., KOCÁKOVÁ, P., NUTTALL, P. A.** Ixodid tick salivary gland products target host wound healing growth factors. *Int J Parasitol.*, 2011, **41**: 213–223.
 - **HERNANDEZ, P. A., GORLIN, R. J., LUKENS, J. N., TANIUCHI, S., BOHINJEC, J., FRANCOIS, F., DIAZ, G. A.** Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat. Genet.*, 2003, **34**: 70–74.
 - **HOLLIDGE, B. S., GONZÁLEZ-SCARANO, F., SOLDAN, S. S.** Arboviral Encephalitides: Transmission, Emergence, and Pathogenesis. *Journal of Neuroimmune Pharmacology.*, 2010, **5**(3): 428-442.

- **HOLZMANN, H., STIASTNY, K., YORK, H., DORNER, F., KUNZ, C., HEIZ, F. X.** Tick-borne encephalitis virus envelope protein E-specific monoclonal antibodies for the study of low pH-induced conformational changes and immature virions. *Arch. Virol.*, 1995, **140**: 213-221.
- **HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J.** *Základy imunologie*. 3. vydání, Triton, 2005. ISBN 80-7254-686-4.
- **CHAMBERS, T. J., HAHN, C. S., GALLER, R., RICE, C. M.** Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annual Reviews in Microbiology*, 1990, **44**: 649-688.
- **CHMELAŘ, J., OLIVEIRA, C. J., ŘEZÁČOVÁ, P., FRANCISCHETTI, I. M., KOVÁŘOVÁ, Z.** A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation. *Blood*, 2011, **117**: 736-744.
- **CHRISTOPHER, M. J., LIU, F., HILTON, M. J.** Suppression of CXCL12 production by bone marrow osteoblasts is a common and critical pathway for cytokine-induced mobilization. *Blood*, 2009, **114**: 1331–1339.
- **INOKUMA, H., KEMP, D. H., WILLADSEN, P.** Prostaglandin E2 production by the cattle tick (*Boophilus microplus*) into feeding sites and its effect on the response of bovine mononuclear cells to mitogen. *Vet Parasitol.*, 1994, **53**: 293–299.
- **JAEGER, B. N., DONADIEU, J., COGNET, C., BERNAT, C.** Neutrophil depletion impairs natural killer cell maturation, function, and homeostasis. *J Exp Med.*, 2012, **209**(3): 565-580.
- **JÄÄSKELÄINEN, A. E., TONTERI, E., SIRONEN, T., PAKARINEN, L., VAHERI, A., VAPALAHTI, O.** European Subtype Tick. *Emerging Infectious Disease*, 2011, **17**(2): 323.
- **JAILLON, S., GALDIERO, M. R., DEL PRETE, D., CASSATELLA, A., GARLANDA, A., MANTOVANI, A.** Neutrophils in innate and adaptive immunity. *Seminars in Immunopathology*. 2013, **35**(4): 377-394.

- **JONES, L. D., NUTTALL, P. A.** The effect of host resistance to tick infestation on the transmission of Thogoto virus by ticks. *Journal of General Virology*. 1990, **71**(5): 1039-1043.
- **JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J.** *Basic histology text and atlas*. London: McGraw Hill, 2005.
- **KAISER, R., HOLZMANN, H.** Laboratory findings in tick-borne encephalitis: Correlation with clinical outcome. *Infection*, 2000, **28**(2): 78-84.
- **KANG, Y. B., JANG, D. H.** A description with scanning electron microscopy on the tick *Ixodes persulcatus* (Schulze, 1930) male and female specimens. *The Korean Journal of Parasitology*, 1985, **23**(2): 305.
- **KEMP, D. H., STONE, B. F., BINNINGTON, K. C.** Tick attachment and feeding: role of the mouthparts, feeding apparatus, salivary gland secretions, and host response. *Physiology of Ticks*, 1982: 119–168.
- **KENNEDY, A.D., DELEO, F. R.** Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol. Res.*, 2009, **43**: 25–61.
- **KHANNA, N., MATHUR, A., CHATURVEDI, U. C.** Regulation of vascular permeability by macrophage-derived chemotactic factor produced in Japanese encephalitis. *Immunol. Cell. Biol.*, 1994, **72**: 0818-9641.
- **KLOMPEN, J. S. H., OLIVER, J. H.** Systematic relationships in the soft ticks (Acari: Ixodida: Argasidae). *Syst. Entomol.*, 1993a, **18**: 313-331.
- **KOPECKÝ, J., GRUBHOFFER, L., TOMKOVÁ, E.** Interaction of tick/borne encephalitis virus with mouse peritoneal macrophages. The effect of antiviral antibody and lectin. *Acta virologica*, 1991, **35**: 218-225.
- **KOTSYFAKIS, M., SÁ-NUNES, A., FRANCISCHETTI, I. M., MATHER, T. N., ANDERSEN, J. F., RIBEIRO, J. M.** Antiinflammatory and immunosuppressive

- activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, **281**: 26298 - 26307.
- **KOTSYFAKIS, M., KARIM, S., ANDERSEN, J. F., MATHER, T. N., RIBEIRO, J. M.** Selective cysteine protease inhibition contributes to blood-feeding success of the tick *Ixodes scapularis*. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, **282**: 29256 - 29263.
 - **KOTSYFAKIS, M., ANDERSON, J. M., ANDERSEN, J. F., CALVO, E., FRANCISCHETTI, I. M., MATHER, T. N.** Immunity against a „silent“ salivary antigen of the Lyme vector *Ixodes scapularis* impairs its ability to feed. *J Immunol.*, 2008, **181**: 5209-5212.
 - **KOTSYFAKIS, M., SCHWARZ, A., ERHART, J., RIBEIRO J. M. C.** Tissue- and time-dependent transcription in *Ixodes ricinus* salivary glands and midguts when blood feeding on the vertebrate host. *Scientific Reports*, 2015, **5**: 9103-9104.
 - **KOVALEV, S. Y., MUKHACHEVA, T. A.** Tick-borne encephalitis virus subtypes emerged through rapid vector switches rather than gradual evolution. *Ecology and Evolution*, 2014, **4**(22): 4307-4316.
 - **KRBKOVÁ, L.** *Medicina pro praxi*, 2007, **5**: 200-203.
 - **KRYLOVA, N. V., SMOLINA, T. P., LEONOVA, G. N.** Molecular mechanisms of interaction between human immune cells and far Eastern Tick-borne encephalitis virus strains. *Viral Immunology*, 2015, **28**(5): 272-281.
 - **KUANG, D. M., ZHAO, Q., WU, Y., PENG, C., WANG, J., XU, Z., ZHENG, L.** Peritumoral neutrophils link inflammatory response to disease progression by fostering angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol*, 2011, **54**: 948-955.
 - **LABUDA, M., DANIELOVÁ, V., JONES, L. D., NUTTALL, P. A.** Amplification of tick-borne encephalitis virus infection during co-feeding of ticks. *Med Vet Entomol.*, 1993, **7**: 339-342.
 - **LABUDA, M., JONES, L. D., WILLIAMS, T., NUTTALL, P. A.** Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts. *Medical and Veterinary Entomology*, 1993a, **7**: 193-196.

- **LABUDA, M., AUSTYN, J. M., ŽUFFOVÁ, E., KOŽUCH, O., FUCHSBERGER, N., LYSÝ, J., NUTTALL, P. A.** Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology*, 1996, **219**: 357-66.
- **LANGHANSOVÁ, H., BOPP, T., SCHMITT, E., KOPECKÝ, J.** Tick saliva increases production of three chemokines including monocyte chemoattractant protein-1, a histamine-releasing cytokine. *Parasite Immunology*, 2015, **37**(2): 92-96.
- **LE, T., VIKAS, B., NEIL, V.** *First Aid for the USMLE Step 1*, 2011, **121**: 20-25.
- **LEWIS, L. A., RADULOVIĆ, Ž. M., KIM, T. K., PORTER, L. M., MULENGA, A.** Identification of 24h *Ixodes scapularis* immunogenic tick saliva proteins. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 2015, **6**(3): 424-434.
- **LEY, K., LAUDANNA, C., CYBULSKY, M. I., NOURSHARGH, S.** Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.*, 2007, **7**: 678–689.
- **LINDENBACH, B. D., RICE, C. M.** Molecular biology of flaviviruses. *Advances in Virus Research*, 2003, **59**: 23-61.
- **LINDQUIST, L., VAPALAHTI, O.** Tick-borne encephalitis. *Lancet*, 2008, **371**: 1861-71.
- **LITVITSKIJ, P. F., SINELNIKOV, T. G.** The innate immunity: mechanisms of realization and pathological syndromes. *Ques. Mod. Pediatrics*, 2009, **8**: 571-616.
- **MANS, B. J.** Evolution of vertebrate hemostatic and inflammatory control mechanisms in blood-feeding arthropods. *Journal of Innate Immunity*, 2010, **3**: 41-51.
- **MANS, B. J., LOUW, A. I., NEITZ, A. W. H.** Savignygrin, a platelet aggregation inhibitor from the soft tick *Ornithodoros savignyi*, presents the RGD integrin recognition motif on the kunitz-BPTI fold. *Journal of Biological Chemistry*, 2002a, **277**: 21371–21378.

- **MANSFIELD, K. L., JOHNSON, N., PHIPPS, L. P., STEPHENSON, J. R., FOOKS, A. R., SOLOMON, T.** Tick-borne encephalitis virus: a review of an emerging zoonosis. *Journal of General Virology*, 2009, **90**(8): 1781.

- **MANTOVANI, A., ALLAVENA, P., SICA, A., BALKWILL, F.** Cancer-related inflammation. *Nature*, 2008, **454**(7203): 436-444.

- **MANTOVANI, A., CASSATELLA, A. M., COSTANTINI, C., JAILLON, S.** Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 2011, **11**(8): 519-531.

- **MARY, J. Y.** Normal human granulopoiesis revisited. II. Bone marrow data. *Bio-med. Pharmacother*, 1985, **39**: 66–77.

- **MOHR, W., WESTERHELLWEG, H., WESSINGHAGE, D.** Polymorphonuclear granulocytes in rheumatic tissue destruction. III. An electron microscopic study of PMNs at the pannus-cartilage junction in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 1981, **40**: 396–399.

- **MURRAY, C. L., RICE, C. M.** Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nat Rev Microbiol*, 2008, **6**: 699-708.

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

- **NUTTALL, P. A., LABUDA, M.** Dynamics of infection in tick vectors and at the tick-host interface. *Adv. Virus Res.*, 2003, **60**: 233-272.

- **NUTTALL, P. A.; LABUDA, M.** Tick–host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology*, 2004, **129**.S1: S177-S189.

- **OCANA, M. G., ASENSI, V., MONTES, A. H., MEANA, A., CELADA, A., VALLE-GARAY, E.** Autoregulation mechanism of human neutrophil apoptosis during bacterial infection. *Mol Immunol*, 2008; **45**: 2087–2096.

- **OVERBY, A. K., POPOV, V. L., NIEDRIG, M.** Tick-borne encephalitis virus delays interferon induction and hides its double-stranded RNA in intracellular membrane vesicles. *J Virology*, 2010, **84**: 8470–8483.
- **PERRETTI, M., D'ACQUISTO, F.** Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2009, **9**: 62–70.
- **PINGEN, M., BRYDEN, S. R., PONDEVILLE, E., SCHNETTLER, E., KOHL, A., MERITS, A., MCKIMMIE, C. S.** Host Inflammatory Response to Mosquito Bites Enhances the Severity of Arbovirus Infection. *Immunity*, 2016, **44**(6): 1455-1469.
- **PLEKHOVA, N. G., SOMOVA, M. L., LYAPUN, N. I.** The Cells of Innate Systems in Tick - Borne Encephalitis. *Flavivirus Encephalitis*, 2010, **1**: 168-194.
- **PLEKHOVA, N. G., SOMOVA, L. M., LYAPUN, I. N., KRYLOVA, N. V., LEONOVA, G. N.** Neutrophil apoptosis induction by tick-borne encephalitis virus. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 2012, 1-4.
- **POOLE, N. M, MAMIDANNA G., SMITH R. A., COONS L. B., COLE J. A.** Prostaglandin E2 in tick saliva regulates macrophage cell migration and cytokine profile. *Parasites*, 2013, **6**(1): 261-262.
- **POSPELOVA - SHTROM, M. V.** On the Argasidae system (with description of two new subfamilies, three new tribes and one new genus). *Meditnskaia Parazitologia*, 1946, **15**: 47-58.
- **POSPELOVA-SHTROM, M. V.** On the system of classification of ticks of the family Argasidae *Can. 1890 — Acarologia*, 1969, **11**: 1-22.
- **POSPÍŠIL, L., JANDÁSEK, L., PEŠEK, J.** Isolation of new strains of tick-borne encephalitis virus. *Lékařské listy*, 1954, **9**: 3 – 5.
- **RENDI - WAGNER, P.** Advances in vaccination against tick-borne encephalitis. *Expert Review of Vaccine*, 2008, **7**(5): 589-96.

- **RIBEIRO, J. C., EVANS, P. M., MACSWAIN, J. L., SAUER, J.** *Amblyomma americanum*: characterization of salivary prostaglandins E₂ and F_{2α} by RP-HPLC/bioassay and gas chromatography-mass spectrometry. *Experimental Parasitology*, 1992, **74**: 112-116.
- **RIBEIRO, J. M., MATHER, T. N.** *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase. *Experimental Parasitology*, 1998, **89**: 213-221.
- **ROBERTSON, S. J., MITZEL, D. N., TAYLOR, R. T., BEST, S. M., BLOOM, M. E.** Tick-borne flaviviruses: dissecting host immune responses and virus countermeasures. *Immunologic Research*, 2009, **43**(1-3): 172-186.
- **RŮŽEK, D., SALÁT, J., SINGH, S. K., KOPECKÝ, J.** Breakdown of the Blood-Brain Barrier During Tick-Borne Encephalitis in Mice Is Not Dependent on CD8⁺ T-cells. *PLoS One*, 2011, **6**(5): e20472.
- **SAUER, J. R., MCSWAIN, J. L., BOWMAN, A. S., ESSENBERG, R. C.** Tick salivary gland physiology. *Annual Review of Entomology*, 1995, **40**: 245-267.
- **SCHNEIDER, B. S., SOONG, L., COFFEY, L. L., STEVENSON, H. L., MCGEE, C. E., HIGGS, S.** *Aedes aegypti* saliva alters leukocyte recruitment and cytokine signaling by antigen-presenting cells during West Nile virus infection. *PLoS One*, 2010, **5**(7): 1932-6203.
- **SCHOELER, G. B., MANWEILER, S. A., WIKEL, S. K.** *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*, 1999, **92**: 239–248.
- **SKALLOVÁ, A.** Interactions among *Ixodes ricinus* tick saliva, murine dendritic cells and the tick-borne encephalitis virus. České Budějovice, 2009. Disertační práce (Ph.D.). Jihočeská univerzita v Českých budějovicích, Parazitologický ústav.
- **SNELGROVE, R. J., JACKSON, P. L., HARDISON, M. T., NOERAGER, B. D., KINLOCH, A., GAGGAR, A., BLALOCK, J. E.** A critical role for LTA4H in limiting chronic pulmonary neutrophilic inflammation. *Science*, 2010, **330**: 90–94.

- **SONENSHINE, D. E.** *Biology of ticks. Vol. I.* Oxford University Press, 1991.
- **SPARMANN, A., BAR-SAGI, D.** Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell*, 2004, **6**: 447–458.
- **SUNDD, P., POSPIESZALSKA, M. K., LEY, K.** Neutrophil rolling at high shear: flattening, catch bond behavior, tethers and slings. *Mol. Immunol*, 2013, **55**: 59–69.
- **SUNDD, P., GUTIERREZ, E., KOLTSOVA, E. K., KUWANO, Y., FUKUDA, S., POSPIESZALSKA, M. K., LEY, K.** ‘Slings’ enable neutrophil rolling at high shear. *Nature*, 2012, **488**: 399–403.
- **SÜSS, J.** Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine*, 2003, **21**: S19-S35.
- **THOMPSON, A. R., ELKS, P. M., MARRIOTT, H. M., EAMSAMARNG, S., HIGGINS, K. R., LEWIS, A., FORMENTI, F.** Hypoxia-inducible factor 2alpha regulates key neutrophil functions in humans, mice, and zebrafish. *Blood*, 2014, **123**: 366–376.
- **TROJAN, S.** *Lékařská fyziologie.* Grada Publishing as, 2003.
- **VALENZUELA, J. G.** Exploring tick saliva: from biochemistry to ‘sialomes’ and functional genomics. *Parasitology*, 2004, **129**.S1: S83-S94.
- **VAN ZANDBERGEN, G., GIEFFERS, J., KOTHE, H., RUPP, J., BOLLINGER, A., AGA, E., SOLBACH, W.** Chlamydia pneumoniae multiply in neutrophil granulocytes and delay their spontaneous apoptosis. *The Journal of Immunology*, 2004, **172**(3): 1768-1776.
- **VENZAL, J. M., ESTRADA - PEÑA, A., MANGOLD, A. J., GONZÁLEZ-ACUÑA, D., GUGLIELMONE, A. A.** *Ornithodoros (Alectrobius) talaje* species group (Acari: Ixodidae: Argasidae): description of *Ornithodoros (Alectrobius) rio-platensis* n. sp. from southern South America. *J. Med. Entomol.*, 2008, **45**: 832-840.

- **VOLF, P., HORÁK, P.** *Paraziti a jejich biologie*. Triton, 2007.
- **WALLNER, G., MANDL, C. W., ECKER, M., HOLZMANN, H., STIASTNY, K., KUNZ, C., HEINZ, F. X.** Characterization and complete genome sequences of high- and low- virulence of tickborne encephalitis. *J Gen Virol* 1996, **77**: 1035 – 1042.
- **WANG, X., COONS, L. B., TAYLOR, D. B., STEVENS, S. E. Jr., GARTNER, T. K.** Variabilin, a novel RGD containing antagonist of glycoprotein IIb-IIIa and platelet aggregation inhibitor from the hard tick *Dermacentor variabilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, **271**: 17785–17790.
- **WANG, J., ARASE, H.** Regulation of immune responses by neutrophils. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2014, **1319**(1): 66-81.
- **WAXMAN, L., SMITH, D. E., ARCURI, K. E., VLASUK, G. P.** Tick anticoagulant peptide is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa. *Science*, 1990, **248**: 593–596.
- **YAMSHCHIKOV, V. F., COMPANS, R. W.** Regulation of the late events in flavivirus protein processing and maturation. *Virology*, 1993, **192**: 38-51.
- **YASUMURA, Y., KAWAKITA, M.** The research for the SV40 by means of tissue culture technique. *Nippon Rinsho*, 1963, **21**(6): 1201–1219.
- **YE, J., ZHU, B., FU, Y. Z., CHEN, H., CAO, S.** Immune evasion strategies of flaviviruses. *Vaccine*, 2013, **31**(3): 461-471.
- **YOUSEFI, S., MIHALACHE, C., KOZLOWSKI, E., SCHMID, I., SIMON, H. U.** Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death & Differentiation*, 2009, **16**(11): 1438-1444.
- **YU, S. P.** Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. *Prog. Neurobiol.*, 2003, **70**(4): 363-386.

- **ZILBER, L. A.** Spring-summer tick-borne encephalitis. *Arkhir Biol Nauk*, 1939, **56**: 255-261.

