

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

OBOR: BIOLOGIE 04

**INDUKCE IL-10 A IFN- γ VLIVEM
SGE A SLIN KLÍŠTĚTE
*IXODES RICINUS***

Lukáš VĚTROVEC

Gymnázium Terezy Novákové 2, Brno-Řečkovice

Oktáva A

PODĚKOVÁNÍ

Touto prací bych chtěl poděkovat doc. Janu Kopeckému za odborné vedení a cenné rady, kolektivu Parazitologického ústavu v Českých Budějovicích při AV ČR za ochotnou pomoc při provádění experimentů a doc. Davidu Modrému z Parazitologického ústavu VFU v Brně za poskytnutí odborného posudku.

1. OBSAH

1. Obsah	3
2. Úvod do problematiky	4
3. Cíl práce	7
4. Metodika	7
4.1 Příprava kultury slezinných buněk (splenocytů)	8
4.2 Příprava SGE a získání slin klíšťat	9
4.3 Vlastní analýza	9
5. Vlastní práce	11
5.1 Výsledky měření	11
5.1.1 Měření indukce IFN- γ	11
5.1.2 Měření indukce IL-10	11
5.2 Cytokiny v imunitním systému vliv SAT na ně	12
5.2.1 Charakteristika, význam a působení cytokinů	12
5.2.2 Receptory pro cytokiny	14
5.2.3 Úloha cytokinů v zánětlivé odpovědi	15
5.2.4 IFN- γ a jeho funkce	16
5.2.5 IL-10 a jeho funkce	17
5.2.6 Slinami aktivovaný přenos a jeho faktory	18
6. Závěry	20
7. Použitá literatura	21
8. Grafy naměřených hodnot	22

2. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

Tato práce se zabývá problematikou modulace imunitní odpovědi savčího hostitele výměšky parazitů. Tento jev budeme sledovat na případu sekretů slinných žláz klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) a dvou cytokinů typických pro indukování anebo naopak potlačování zánětlivých změn v tkáních savčích organismů. Jako pokusný materiál byla zvolena tkáňová kultura splenocytů laboratorní myši (*Mus musculus*).

Při přenosu nejrůznějších infekčních agens ať už z řad virů nebo bakterií hematofágními členovci na cílové hostitele se setkáváme s jevy velice podobnými interakcím mezi hostiteli, ektoparazity a různými původci protozoárních nákaz živočichů i člověka. Velmi dobře prostudovaným příkladem takové reakce je životní cyklus původců malárie, výtrusovců rodu *Plasmodium*, kde se ve vztahu jak k přenašeči tak vůči hostiteli lze setkat s celou řadou vzájemných interakcí důležitých pro životní cyklus parazita. Pro parazity se složitým životním cyklem, který do značné míry kopíruje životní cyklus hostitelského druhu, je důležité si efektivními adaptacemi zajistit, aby infikovali co možná největší množství jedinců hostitelského druhu. Narozdíl od neparazitujících organismů se v úspěšnost toho kterého jedince nepočítá pouze počet přeživších potomků schopných dále se rozmnožovat, ale pouze ti z potomků, kteří hostitele úspěšně infikovali, protože parazit jako takový jednoduše nemůže bez vhodného hostitele existovat. Z tohoto důvodu jsou pro život parazitického druhu takové adaptace naprostou nezbytností.

U klíšťat a dalších hematofágních roztočů se setkáváme s něčím podobným jako v případě komárů rodu *Anopheles* a plasmodií. Jde o tzv. slinami aktivovaný přenos, označovaný také zkratkou SAT (z angl. saliva-activated transmission), tento termín byl poprvé použit v souvislosti s přenosem viru Thogoto extraktem slinných žláz klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus*. (Nuttall et Jones, 1991)

SAT zřejmě hraje poměrně klíčovou úlohu při úspěšném přenosu nákaz typu Lymeské borreliózy. Bylo zjištěno, že k manifestaci onemocnění stačí infekce poměrně malým počtem spirochét, řádově přibližně desítkami. Princip SAT pak spočívá v tom, že látky neznámého složení, obsažené ve slinách klíštěte, blokují imunitní odpověď hostitele a tím umožňují buňkám borrelií se v klidu pomnožit a

získat tak náskok před imunitním systémem hostitele. Další rozvoj onemocnění pak probíhá daleko snadněji a rychleji. Bránícímu se organismu jsou tak zásadním způsobem sníženy možnosti efektivní obrany prostřednictvím jeho imunity. Tyto molekuly účastníci se SAT disponují nejrozličnějšími imunomodulačními, protizánětlivými a antihemostatickými účinky a nazýváme je SAT-faktory. Je velmi pravděpodobné, že ač jde o látky prakticky totožného účinku, liší se druh od druhu a jejich přesné složení je jiné u každého jednoho druhu klíštěte (potažmo hematofágního členovce obecně). (Nuttall et Labuda, 2004)

Kromě klíšťat nejrozličnějších rodů, jako *Ixodes*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Amblyomma* atd. byl tento způsob přenosu bakteriálních a virových nákaz zjištěn i u jiných druhů parazitických roztočů a u komárů. Tento způsob přenosu se týká jak bakterióz tak i viróz a dokonce i onemocnění způsobených parazitickými prvky.

Faktory SAT jsou molekuly na bázi proteinů jejichž bioaktivní účinek se týká zejména ovlivnění produkce různých molekul, které v hostitelském organismu zodpovídají za mezibuněčnou komunikaci. Tato biochemická individua patří především do rodiny tzv. cytokinů, což jsou látky, které nemusí být produkovány pouze buňkami imunitního systému. Cytokiny byly postupně objevovány od 80. let minulého století. Bylo zjištěno, že tyto molekuly neovlivňují pouze aktivaci, diferenciaci a proliferaci imunokompetentních buněk, ale jejich účinek přesahuje rámec imunitního systému a má vliv na systém endokrinní a nervový. Tyto tři systémy jsou natolik provázané, že díky tomu vytváří systém jediný, který zabezpečuje integritu organismu. Cytokiny je obecné označení zahrnující několik skupin látek. Mohou to být molekuly aktivující T-lymfocyty – pak hovoříme o lymfokinech, jestliže na jejich sekreci reagují monocyty a mikrofyty, pak se jedná o monokiny. Dle původních závěrů většinu těchto imunomediátorů produkovaly leukocyty a další leukocyty na ně reagovaly vzrůstem potažmo potlačěním proliferace, byly tyto molekuly nazvány interleukiny. Poslední skupinou cytokinů jsou mediátory ovlivňující růst a diferenciaci hematopoetických buněk v kostní dřeni, tzv. faktory stimulující kolonie (colony-stimulating factors, CSF). Působení cytokinů může být jak endokrinní, tzn. pouze systémové, ovlivňováním buněk kdekoli v organismu (tzv. imunohormony, např. hormony thymu), tak i parakrinní (u většiny cytokinů), lokální působení týkající se pouze buněk v okolí. Protože imunokompetentní buňky se stěhují z místa na místo, pohybují se také jimi produkované cytokiny a tím se působení cytokinů mění z lokálního na celkové.

Posledním způsobem funkce cytokinů je autokrinní, kdy uvolněný cytokin navodí expresi vlastních receptorů na buňce.

Cytokiny jsou produkovány v průběhu efektorové fáze imunity, specifické i nespecifické. Jejich produkce je krátkodobá s vlastní limitací imunitní odpovědi. Fungují jako mediátory a regulátory imunitních reakcí, nikde se neskladují, nejsou vytvářeny předem a při každé imunitní odpovědi se vytvářejí de novo. Nejsou antigenově specifické a působí ve velmi malých koncentracích. Nepůsobí jen na jeden typ buněk, nýbrž na vícero typů, tzv. pleiotropní účinek. Každý cytokin působí jak způsobem sobě vlastním tak i způsobem, který se může s účinkem druhého cytokinu překrývat (redundantní účinek), může účinek druhého doplňovat (synergické působení), nebo může mít opačný (antagonistický) efekt než jiný cytokin. Cytokiny se dále rozdělují podle účinků do různých skupin, o kterých bude řeč v kapitole vlastní práce.

3. CÍL PRÁCE

Tato práce si stanovuje jednak praktický a jednak teoretický cíl. Tím praktickým bylo popsat pokus týkající se ovlivňování produkce dvou cytokinů, interleukinu-10 (IL-10) a interferonu-gama (IFN- γ) myšimi splenocyty prostřednictvím jednak extraktu ze slinných žláz (SGE) klíšťat a jednak také slinami samotnými. Studovat jejich vliv na produkci těchto molekul splenocyty stimulovanými lipopolysacharidem (LPS) a konkanavalinem A (ConA), výsledky zaznamenat formou grafu, zhodnotit je a shrnout, vyvodit patřičné závěry o případném jejich praktickém dopadu, zde zejména při aplikaci metodiky i na pokus se slinami klíšťat, který je zajímavý tím, že ještě nebyl tímto způsobem prováděn.

Teoretický cíl práce leží v pokrytí tematiky cytokinů jako mediátorů imunitní odpovědi organismu a problematiky slinami aktivovaného přenosu (SAT). Předložit veřejnosti ucelený přehled o podstatě a významu SAT, jak funguje mezibuněčná komunikace při imunitní odpovědi na infekci hematofágními členovci přenášené nákazy, jak tuto odpověď ovlivňuje sám vektor, jaké molekuly jsou jí účastny, jak toho využívají samotná infekční agens ve svůj prospěch a jak využít takto získané poznatky při boji s infekčními onemocněními přenášenými hematofágními členovci v podmínkách přírody střední Evropy.

4. METODIKA

Práce sestávala z několika dílčích kroků, které musely být provedeny předtím, než byla provedena analýza a zhodnocení získaných dat o vlivu SGE potažmo samotných slin klíšťat na produkci cytokinů buňkami sleziny myši (*Mus musculus*).

4.1 Příprava kultury slezinných buněk (splenocytů)

Myši kmene BALB/c, usmrčené zlomením vazů, sterilními nůžkami rozstříhneme kůži na břiše, dalšími sterilními nůžkami pronikneme do dutiny břišní. Musíme dbát na to, aby nůžky neprotrhly stěnu střev, jejich obsah by kontaminoval dutinu břišní a tím by znehodnotil takto získaná data. Slezinu, podlouhlý orgán uložený na pravé straně nad játry, opatrně vyjmeme sterilní pinzetou a položíme je do Petriho misky. Dále již s nimi budeme pracovat ve sterilním boxu.

Pístem stříkačky opatrně protlačíme slezinné buňky přes sítko a propláchnutím kultivačním médiem (RPMI-1640, 10% bovinního fetálního séra, antibiotika) připravíme buněčnou suspenzi. Suspenzi přeneseme Pasteurovou pipetou do centrifugační zkumavky a centrifugujeme 5 minut při 1000 otáčkách za minutu. Poté usazené buňky promyjeme médiem, spočteme v Bürkerově komůrce a rozředíme v médiu tak, aby na každou jamku v panelu na buněčné kultury připadlo do 100 μ l media vždy cca 10⁶ buněk. Podle níže uvedeného schématu (panel je značen) jsme do každé jamky rozmístili příslušný počet buněk ve 100 μ l media a buď k nim přidali stejný objem SGE v koncentraci 80 μ g/ml (resp. sliny, ředěné 20x a 100x) nebo jako kontrolu čisté medium.

PANEL:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Kontrola		Kontrola +		Kontrola							
B	čistá		LPS		+							
C					ConA							
D	SGE čisté		SGE + LPS		SGE +							
E					ConA							
F												
G												
H												

Po dvou hodinách inkubace v termostatu při 37°C a 5% koncentraci CO₂ byly přidány stimulatory buněčného růstu LPS v konečné koncentraci 2 µg/ml a ConA v konečné koncentraci 5 µg/ml. Vzorky byly pro budoucí testování odebírány vždy ze tří jamek po 24 a 48 hodinách inkubace. (viz schéma: každá skupina má dva sloupce, první sloupec jsou vzorky po 24 a druhý po 48 hodinách). Po odběru vzorků media pro stanovení cytokinů byla v každé jamce hodnocena životnost splenocytů barvením 0,5% roztokem trypanové modři.

4.2 Příprava SGE a slin klíšťat

SGE (salivary gland extract) je přírodní extrakt získaný ze slinných žláz klíštěte (*Ixodes ricinus*) vypreparovaných pod mikroskopem. Takto získané slinné žlázy byly homogenizovány ultrazvukem a po rozředění v médiu na koncentraci 80µg/ml připraveny k použití. Do každé k tomu určené jamky se přidává po 50 µl SGE. Sliny získáme z klíšťat následovně: Nejprve přilepíme klíšťata oboustranně lepící páskou na podložní skla a pak jim nasadíme tenkou kapiláru vždy na hypostom a jednu pedipalpu. Kapiláru fixujeme plastelínou. Klíšťata pokapeme 5% roztokem pilokarpinu v etanolu, který u nich vyvolá slinění. Takto připravená klíšťata uzavřeme do vlhké komůrky a necháme asi dvě hodiny slinit. Za příznivých okolností lze z jednoho klíštěte získat až 10 µl slin. Získané sliny ředíme dle potřeby 20x až 100x v kultivačním médiu.

4.3 Vlastní analýza

Nejdůležitějším a klíčovým momentem celého experimentu byla analýza vzorků imunoenzymatickou metodou (ELISA). Nejprve byla na oba panely (jeden pro IL-10 a jeden pro IFN-γ) navázána purifikovaná protilátka proti danému cytokinu naředěná vždy do koncentrace 4 µl/ml v příslušném pufru (100 µl/jamku). Byly používány uhličitanové pufrы pro IL-10 o pH 6 a pro IFN-γ o pH 9,6. Následující den po

inkubaci panelů ve vlhké komůrce při 4 °C byla nejprve vyhotovena kalibrační křivka, podle které lze vypočítat příslušné koncentrace cytokinů ve vzorcích. Panel zpočátku promyjeme celkem pětkrát a volná vazebná místa na panelu vyblokujeme inkubací s 10% prekolostrálním telecím sérem (PTS) ve fosfáty pufovaném fyziologickém roztoku (PBS). Připravíme ředící řadu cytokinu začínající koncentrací 4 ng/ml (první jamka). Do každé následující jamky přidáme vždy jednou zředěný roztok z jamky předchozí. (tj. 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 a 0 ng/ml pro kontrolu). Pozn.: jamky na panelu pro analýzu metodou ELISA odpovídaly svým rozmístěním panelu s kulturou splenocytů. Přibyl pouze jeden sloupec s kalibrační křivkou. Poté se do ostatních jamek nakapaly odebrané vzorky (100 µl/jamku), mezitím uchované na -75 °C. Panely byly poté vloženy přes noc do vlhké komůrky do chladničky (4 °C), aby se cytokin ze vzorku mohl navázat na protilátku. Poté byly panely opět promyty puftrem, obsahujícím 0,05% Tween 20 v PBS, tentokrát čtyřikrát. Byla přidána biotinylovaná protilátka (2 µg/ml, 100 µl/jamku) proti danému cytokinu a inkubována v jamkách 45 minut při laboratorní teplotě. Po promytí bylo do každé jamky přidáno 100 µl komplexu streptavidin-peroxidáza v ředění 1:1000 a panel byl inkubován 30 min. při laboratorní teplotě. Po jeho navázání byly panely třikrát promyty a byl přidán substrát pro enzym – peroxid vodíku s ortofenylendiaminem. Při enzymatickém štěpení H₂O₂ se uvolňuje kyslík, který oxiduje bezbarvou redukovanou formu barviva na jasně žlutou formu oxidovanou. Intenzita žlutého zabarvení, která se potom měří spektrofotometrem je přímo úměrná koncentraci cytokinu ve vzorku, protože enzymatická reakce může proběhnout vždy právě jen tam, kde se enzym v komplexu se streptavidinem naváže na biotinylovanou protilátku (nenavázaný se promytím odplaví). Výsledky byly vyhodnoceny a sestaveny do grafu v počítači.

5. VLASTNÍ PRÁCE

V úvodu jsme se seznámili s cytokiny a SAT jakožto s pojmy, které nám pomohou pochopit podstatu jevů probíhajících na molekulární úrovni při interakcích mezi vektory nález, jejich infekčními původci a hostiteli. Pochopení těchto procesů a objevení konkrétních aktivních látek do nich zapojených by mohlo přispět k vytvoření vakcín a vytvoření nových léčebných postupů proti nejrůznějším takto přenášeným chorobám.

5.1 Výsledky měření

Tato kapitola popisuje konkrétní výsledky a zjištění, ke kterým jsme došli v průběhu našich měření. Pokus byl prováděn v období od 10. do 24. VIII. 2005.

5.1.1 Vliv SGE na indukci IFN- γ

Prováděno bylo jedno měření, při němž se prokázalo, že SGE obecně snižuje sekreci IFN- γ jak v prostředí bez stimulace tak i v prostředí stimulovaném. Nejvýraznější je pokles produkce IFN- γ v kultuře stimulované LPS. V kontrole a při použití ConA není tento jev tak výrazný, i když se také projevuje. SGE výrazněji potlačuje sekreci IFN- γ kulturami splenocytů 48 hodin starými, výrazněji než je tomu u kultur starých pouze 24 hodin. (viz graf č. 1)

5.1.2 Vliv SGE na indukci IL-10

Prováděna zde byla celkem dvě měření. V obou byla prokázána schopnost SGE zvyšovat produkci IL-10, i když v prvním měření při stimulaci IL-10 byl zaznamenán rovněž pokles. Naproti tomu v druhém měření i v případě LPS stimulace SGE působí na produkci IL-10 pozitivně, podporuje ji. Co se týče případu indukce IL-10 ve

vzorcích s ConA stimulací a v kontrole, zde je nárůst produkce IL-10 po přidání SGE ještě výraznější. Při druhém měření kontrola bez stimulace a bez přidání SGE neprodukovala dokonce žádná měřitelná množství tohoto cytokinu. Zde SGE způsobil dokonce několikanásobný nárůst množství IL-10. (viz graf č. 2)

Vliv slin se ve své podstatě neliší od vlivu SGE. Bohužel se nepodařilo získat dostatečné množství slin z klíšťat a tak bylo provedeno pouze jedno měření, a sice v podmínkách 24 hodin staré kultury stimulované pomocí LPS. Dosaženo bylo efektu pozitivní indukce, i když ne v takové míře jako při použití SGE. Zřejmě je to dáno faktem, že slin bylo získáno méně než potřebné množství, které tedy obsahovalo méně aktivních látek než SGE (viz graf č. 3)

5.2 Cytokiny v imunitním systému a vliv SAT na ně

V této části se podrobněji seznámíme s podstatou cytokinů a jejich místem v imunitním systému a s cestami, jakými hematofágní členovci působí na jejich sekreci a tím i na buněčnou komunikaci při imunitní odpovědi hostitele.

5.2.1 Charakteristika, působení a význam cytokinů

Odhalení cest produkce, exprese a inhibice mediátorů imunitní odpovědi nám mimo jiné může pomoci najít vhodnou terapii jinak velmi těžko léčitelných zánětlivých procesů vzdorujících konvenční léčbě antibiotiky, může poskytnout nové možnosti pro potlačování jak přehnaných imunitních odpovědí (např. alergické stavy), tak pro posílení přirozené obranyschopnosti pacientů trpících imunodeficiencemi různého typu. Též jejich využití v boji proti nádorovým onemocněním se jeví slibným.

Právě nádorové buňky sekreují množství cytokinů. Tak byly získány homogenní populace buněk, jež je vyměšují ve větší míře než kultury lymfoidních buněk. Dále byla potvrzena existence specifických buněčných linií, závisajících ve svém růstu na některém z cytokinů. Odhalení funkcí jednotlivých zástupců cytokinů vedlo k závěru, že jsou často popisovány různé funkce téhož faktoru. To si vyžádalo zavedení

důsledné nomenklatury, kde byla celá řada cytokinů označena jako interleukiny (IL), pro zdůraznění jejich nenahraditelné funkce při komunikaci mezi leukocyty.

Problémem ve využití imunomodulátorů v medicínské praxi však zůstává především fakt, že organismus pro mezibuněčnou komunikaci syntetizuje jen velmi malé množství těchto látek, takže je prakticky nemožné je standardními metodami biochemické purifikace z buněk extrahovat. Navíc doba jejich působení je mimořádně krátká. Velký počet těchto imunoaktivních molekul byl proto charakterizován až díky poznání způsobu jejich syntézy buňkami a genů, zodpovídajících za jejich expresi, s využitím moderních metod genového inženýrství. Následující tabulka představuje stručný přehled základních mediátorů a regulátorů imunitní odpovědi.

Cytokin	M_r	Zdroje	Cíle působení	účinek
Interferony I. typu (α, β)	18000	Monocyty Makrofágy Fibroblasty Další buňky	Všechny buňky NK-buňky	Antivirový účinek Proliferační účinek Zvýš. exprese MHC-I Aktivace
IL-15	13000	Monocyty Makrofágy Další buňky	NK-buňky T-lymfocyty	Proliferace
IL-12	35000	Monocyty Makrofágy Dendritické buňky	NK-buňky T-lymfocyty	Syntéza IFN- γ Diferenciace T _H -lymfocytů
TNF	17000	Monocyty Makrofágy T-lymfocyty	Neutrofily Endotelové buňky Hypothalamus Játra	Aktivace (zánět) Aktivace (zánět, koagulace) Horečka Proteiny akutní fáze
IL-1	17000	Monocyty Makrofágy Další buňky	Svaly, tuk Endotelové buňky Hypotalamus	Katabolismus Aktivace (zánět, koagulace) Horečka

			Játra	Proteiny akutní fáze
IL-6	26000	Monocyty Makrofágy Endotelové buňky T-lymfocyty	Svaly, tuk B-lymfocyty Játra Thymocyty	Katabolismus Růst Proteiny akutní fáze Kostimulace
Chemokiny	8000-10000	Monocyty Endotelové buňky Fibroblasty T-lymfocyty Trombocyty	Leukocyty	Chemotaxe Adheze Aktivace
IL10	20000	Monocyty T-lymfocyty Keratinocyty	Monocyty Makrofágy B-lymfocyty	Inhibice Inhibice Aktivace

5.2.2 Receptory pro cytokiny

Jedná se o transmembránové proteiny o dvou funkčně odlišných doménách:

- a) extracelulární, která zabezpečuje vazbu na cytokin
- b) cytoplazmaické, která zodpovídá za zahájení intracelulárních signalizačních procesů.

Tyto receptory lze rozdělit do pěti skupin:

1. např. receptor pro IL-1. Tyto proteiny patří do velké imunoglobulinové rodiny.
2. tzv. rodina cytokinových receptorů I. třídy (např. receptory pro IL-6, IL-12, IL-15). Mají stejný typ extracelulární domény, kde se opakuje v primární struktuře stejný aminokyselinový motiv, sekvence trp-ser-x-trp-ser, kde x je libovolná další aminokyselina
3. tzv. rodina cytokinových receptorů II. třídy. Ta je nejdůležitější z hlediska našeho experimentu, neboť sem patří receptory pro interferony a IL-10

4. např. receptory pro TNF
5. receptory chemokinů, význačný rys jejich struktury je, že transmembránový α -helikální řetězec prochází přes membránu sedmkrát.

5.2.3 Úloha cytokinů zánětlivé odpovědi

Cytokiny zprostředkovávají komunikaci mezi jednotlivými buněčnými subpopulacemi také při reakci organismu na poškození tkáně nebo na infekci. Jde o sérii nespecifických jevů známou jako odpověď akutní fáze. Zánětlivé buňky adherují na epitel okolních cév a pronikají do tkáně právě pod vlivem cytokinů. To vede k migraci lymfocytů, monocytů, žírných buněk, neutrofilů, eosinofilů a basofilů na postižené místo a následné likvidaci antigenu. Dále dochází k odpovědi systemické, zahrnující vývoj horečky, která inhibuje růst patogenů a zvyšuje imunitní odpověď. Též vzrůstá sekrece některých hormonů (ACTH, hydrokortizon). Zvyšuje se počet leukocytů v krvi.

V začátku akutní fáze jsou aktivovány tkáňové makrofágy a uvolněny tři synergicky působící cytokiny: $\text{TNF}\alpha$, IL-1 a IL-6. Tyto indukují množství lokálních i systémových změn jako změna propustnosti cév, zvýšení exprese adhezivních molekul na cévních endotelech ($\text{TNF}\alpha$ a IL-1), $\text{TNF}\alpha$ a IL-1 také působí na makrofágy a indukují tvorbu IL-8, který zodpovídá za zvýšení adheze neutrofilů k endoteliálním buňkám a zároveň působí jako jejich chemotaktický faktor. $\text{IFN}\gamma$ chemotakticky přitahuje makrofágy a spolu s TNF aktivují makrofágy a neutrofilily. Zvýšená teplota je vyvolána společným účinkem IL-1, TNF a IL-6. Sekrece faktorů stimulujících kolonie je spuštěna působením TNF, který tu působí na makrofágy a endoteliální buňky. Syntéza těchto tří cytokinů je indukována stimuly charakteru virového, endotoxinem, ale také i cytokiny samotnými. $\text{TNF}\alpha$ a IL-1 svou expresi indukují vzájemně, anebo také mohou být spouštěcími mechanismy exprese IL-6.

5.2.4 IFN- γ a jeho funkce

Jedná se o homodimerický glykoprotein s M_r 21 000 – 24 000, produkováný hlavně T_H1 -lymfocyty, $CD8^+$ -T-lymfocyty a NK-buňkami. Vzniká stimulací lymfocytů antigeny a jeho syntéza je zvyšována IL-2, IL-12 a IL-18.

Jeho receptor je složen ze dvou řetězců, α a β . Za vazbu cytokinu zodpovídá α -řetězec, zatímco za přenos signálu řetězec β . Receptor pro IFN- γ je odlišný od receptorů pro IFN- α a IFN- β , také přenos signálu zabezpečují zcela jiné proteiny. IFN- γ se vyznačuje velmi výraznými imunomodulačními účinky, především má vliv na funkci makrofágů, T-lymfocytů a NK-buněk. Snad nejviditelnější je právě jeho účinek na makrofágy, IFN- γ podporuje syntézu lysozomových enzymů (hydroláz, esteráz a neutrálních proteáz), čímž zvyšuje jejich baktericidní a tumoricidní aktivitu. Jeho působením se také zvyšuje schopnost makrofágů reagovat na IgG, pohlcovat a degradovat imunokomplexy. Zvyšuje rovněž expresi MHC molekul první i druhé třídy (IFN- α a IFN- β zvyšují expresi pouze třídy MHC I.), díky čemuž se podstatně zlepšuje schopnost makrofágů prezentovat antigeny. IFN- γ také zvyšuje sekreci monokinů, zejména IL-1 a TNF.

IFN- γ působí výrazně také na NK-buňky – zvyšuje expresi adhezivních molekul a membránovou fluiditu a tím zesiluje vazbu mezi efektorovou (NK) buňkou a terčovou buňkou. Působením IFN- γ také vzrůstá metabolická aktivita NK-buněk a jejich produkce cytotoxických molekul. IFN- γ aktivuje i neutrofilů, i když poněkud méně než TNF nebo lymfotoxin, zvyšuje jejich metabolickou aktivitu, produkci kyslíkových radikálů a také zintenzivňuje jejich schopnost ničit cizí struktury.

IFN- γ aktivuje i cévní endotelové buňky, usnadňuje adhezi lymfocytů k cévní stěně a tím podporuje jejich penetranci do prostředí mimo cévy.

IFN- γ má vliv na alergické reakce. Ačkoliv blokuje IL-4 při indukci protilátek IgE, zároveň zvyšuje uvolňování histaminu z bazofilů. Tak se vysvětluje schopnost IFN- γ vyvolávat alergické astmatické reakce.

IFN- γ je někdy využíván k terapii některých virových onemocnění jako jsou některé typy chronických hepatitid, *herpes zoster*, *herpes simplex* nebo *varicela*. Tato léčba je však zatížena mnohými vedlejšími účinky, jako je horečka, třes,

zimnice, bolesti hlavy a svalů, nausea, únava a nechutenství, při delším podávání úbytek leukocytů, poruchy funkce jater a nervového systému.

5.2.5 IL-10 a jeho funkce

IL-10 je dimerizující polypeptid (v extracelulárních prostorech se vyskytuje jako homodimer), svojí terciární strukturou velmi podobný IFN- γ .

Jeho receptor je složen ze dvou řetězců, α a β . Za vazbu molekuly IL-10 zodpovídá α -řetězec, β -řetězec zodpovídá za přenos signálu. IL-10R β -řetězec je stejný i pro cytokin IL-20 a jeho chybění může přispívat ke vzniku Crohnovy choroby a splenomegalie. α -řetězec je receptor vysoké afinity, patřící do rodiny cytokinových receptorů druhé třídy. IL-10 produkují zejména monocyty a makrofágy, T- a B-lymfocyty a keratinocyty. Výborným induktorem syntézy IL-10 je právě LPS, je však zajímavé, že produkce IL-10 je pozdějším projevem stimulace buněk imunitního systému. Včasná odpověď na LPS se projevuje zvýšením hladiny TNF, IL-1 a IL-12. Tato prozánětlivá odpověď se manifestuje přibližně do půl hodiny po aplikaci LPS. Poté přichází období sekrece antagonistů receptoru pro IL-1 a až posléze, ve třetí fázi dochází k nárůstu syntézy IL-10 (6 až 8 hodin po aplikaci) (Nuttal et Labuda, 2004). IL-10 je tak logicky přirozeným kontrolním faktorem zabraňujícím přehnané odpovědi organismu na zánětlivé cytokiny.

Jeho biologická funkce má hlavní těžiště v tom, že inhibuje produkci zánětlivých cytokinů jako IL-1, IL-6 a TNF, jejich inhibitorů, některých chemokinů (např. IL-8), IFN- γ a IL-12, čímž snižuje aktivaci NK-buněk. IL-10 inhibuje také syntézu IL-2 a IL-5, snižujíc tak expanzi T-lymfocytů. Potlačuje expresi MHC-molekul II. třídy, kostimulačních a adhezivních molekul a tak značně omezuje schopnost makrofágů prezentovat antigen.

IL-10 není pouze čistě antiinflamační a inhibiční cytokin, některé jeho funkce zvyšují imunitní odpověď organismu, zejména stimulací a diferenciací B-lymfocytů. Indukuje syntézu určitých tříd protilátek (IgG1 a IgG3) a stimuluje produkci IL-15, čímž napomáhá expanzi B-lymfocytů. Působí chemotakticky na CD8⁺-T-lymfocyty a podporuje fagocytózu neutrofilů.

Zajímavá je skutečnost, že protein BCRF1 viru Epstein-Barrové je z 84% homologní s IL-10. Tento protein se tvoří v infikovaných buňkách v produkční fázi virové infekce. BCRF1 tak může poskytnout viru selektivní výhodu inhibicí produkce IFN- γ a tím tlumí intenzivní antivirovou odpověď. Dále také inhibuje produkci molekul TAP-1 a tím zabraňuje cytotoxickým T-lymfocytům v prezentaci svých peptidů. Tím, že současně podporuje proliferaci B-lymfocytů zabezpečuje další cílové buňky, které může napadnout a dále se šířit.

Inhibiční a antiinflamační působení IL-10 se začíná využívat také terapeuticky při zánětlivých onemocněních tlustého střeva, Crohnově chorobě, revmatu, roztroušené skleróze nebo lupence.

5.2.6 Slinami aktivovaný přenos a jeho faktory

Bylo zjištěno, že pro vyvolání infekce a následnou manifestaci onemocnění stačí pouze velmi malý počet infekčních agens přenesených do organismu. Při zhodnocování domněnky, že zde musí do hry vstupovat i organismus vektora nebo alespoň jím produkované látky došlo k objevu interakcí mezi molekulami obsaženými ve slinách vektora (hematofágního členovce, zde klíštěte), infekčním agens (jedno jestli bakteriálního, virového nebo protozoárního charakteru) a imunitním systémem hostitele. Jinými slovy, že imunitní odpověď hostitele na infekci přenesenou vektorem musí být nějakými aktivními mechanismy ze strany vektora modulována a toho může případný patogen využít pro svůj prospěch, tím, že se v době oslabení imunity hostitele pomnoží a získá tak nad ní náskok. Tento jev posléze získal označení slinami aktivovaný přenos infekce, neboli SAT (z angl. saliva activated transmission).

Při studiích interakcí mezi virem Thogoto a klíštětem *Amblyomma variegatum* bylo zjištěno, že molekuly aktivní při SAT se normálně nevyskytují ve slinných žlázách, že se zde kumulují a vylučují až v průběhu sání, přičemž vrchol jejich sekrece nastává až mezi 5.-8. dnem sání. Faktory SAT zahrnují molekuly různé povahy a rozličného působení. Najdeme zde jak molekuly antihemostatické, které všeobecně při slinami aktivovaném přenosu zřejmě nebudou hrát hlavní roli, i když při výzkumech s klíštětem *Ixodes scapularis* a rickettsií *Anaplasma*

phagocytophilum na nakažených myších prokázaly pozitivní roli drobných krvácení (Borjesson et al., 2002). Zřejmě nadějnějšími budou v tomto ohledu molekuly s vazodilatačním působením, avšak toto působení je u klíšťat připisováno vylučování prostaglandinů a prostacyclinů, pro které však úloha při přenosu infekce doposud nebyla objasněna. (Rajská et al.2002)

Největší význam pro SAT zřejmě mají molekuly přímo působící na imunitní systém hostitele (sem patří látky vážící histamin, imunoglobuliny a právě také cytokiny). Pro klíšťata *Ixodes ricinus* byl jejich účinek demonstrován prostřednictvím SGE jak u nasátých tak u nenasátých jedinců. Ačkoliv u nenasátých samic při přenosu viru klíšťové encefalitidy (TBEV) nebyl SAT efekt významněji zaznamenán (Labuda et al. 1993), stojí za to zhodnocení jeho vlivu při přenosu Lymeské borreliózy. *Borrelia burgdorferi* sensu lato se ve svých různých genospecies liší v přežívání v sérech různých hostitelů. Zatímco *B. garinii* úspěšně přežívá ptačí sérum, je velmi rychle lýzována sérem hlodavčím. U *B. afzelii* je tomu přesně naopak. (Kurtenbach et al. 1998). Některé kmeny *B. garinii* jsou citlivé i na lidské sérum, což je protichůdné zjištění faktu, že *B. garinii* může u člověka vyvolat nervovou formu borreliózy. Nabízí se vysvětlení, nemůže-li *B. garinii* k přežití v lidském organismu dopomoci právě slinami aktivovaný přenos klíštětem.

Při sání klíštěte se navíc mohou z těla hostitele do gastrointestinálního traktu klíštěte a odtud přes střevní stěnu do hemolymfy dostávat IgG protilátky, které mohou být další překážkou v šíření infekce do hostitelského organismu. Vektor však spolu se slinami vylučuje také proteiny vážící IgG protilátky, tzv. IGBP. Jejich výskyt a rozšíření je velký a naznačuje jejich značný význam.

Proteiny SGE vážící cytokiny blokují především cytokiny zodpovídající za manifestaci zánětlivé reakce a tím mohou činit klíšťata významnou vstupní branou zoonóz, i když se působení SGE na jednotlivé cytokiny druh od druhu liší (Hajnická et al., 2004) a jednotlivé molekuly zodpovídající za modulaci hladiny toho kterého cytokinu nejsou doposud identifikovány. (Nuttal et Labuda, 2004).

6. ZÁVĚRY

- Při přípravě kultur splenocytů se buňky dle očekávání lépe rozmnožují, rostou a přežívají při stimulaci LPS a ConA, standardně se pohybuje procento přeživších splenocytů v mediu okolo 60%, při stimulaci výše uvedenými mitogeny vzrůstá až mezi 75 – 85%. Tento vliv je patrný v kulturách 48 hodin starých více než je tomu v kulturách starých pouze 24 hodin. Na přežívání splenocytů v mediu nemají vliv ani sliny ani SGE a to jak v kontrolních, tak i ve stimulovaných vzorcích.
- Inhibice sekrece IFN- γ jakožto cytokinu typického pro manifestaci zánětlivých procesů, a naopak pozitivní stimulace sekrece IL-10 jakožto cytokinu antiinflamačního má za následek oddálení vzniku zánětlivé odpovědi a tlumení přehnané imunitní odpovědi nevýhodné jednak pro vektora a tím spíše pro případné patogeny jím přenášené. Tím může vektor přispívat k přenosu těchto infekčních agens. Se zjištěnými fakty v podstatě koresponduje i práce Toman et al. 2000.

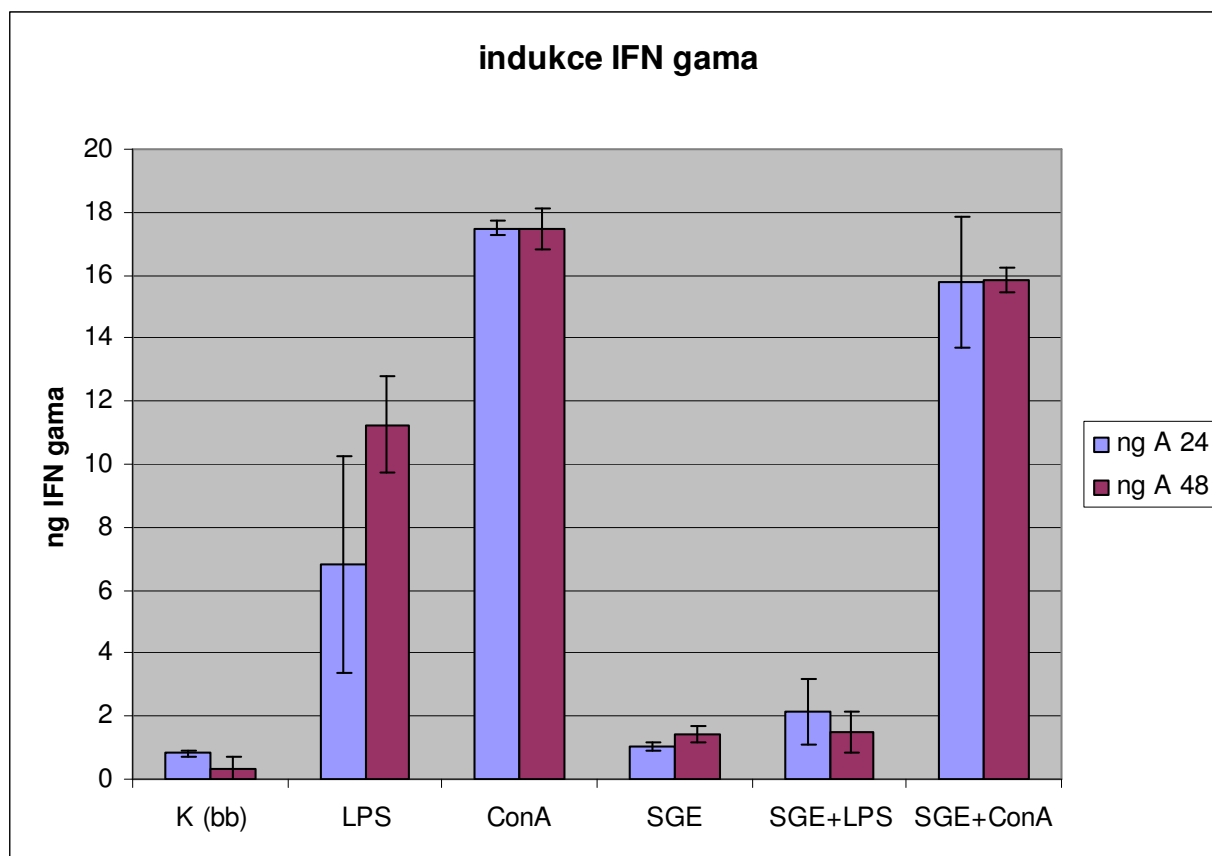
7. POUŽITÁ LITERATURA

Toman M. et al. (2000): Veterinární imunologie, Grada Publishing, 1-416, Praha

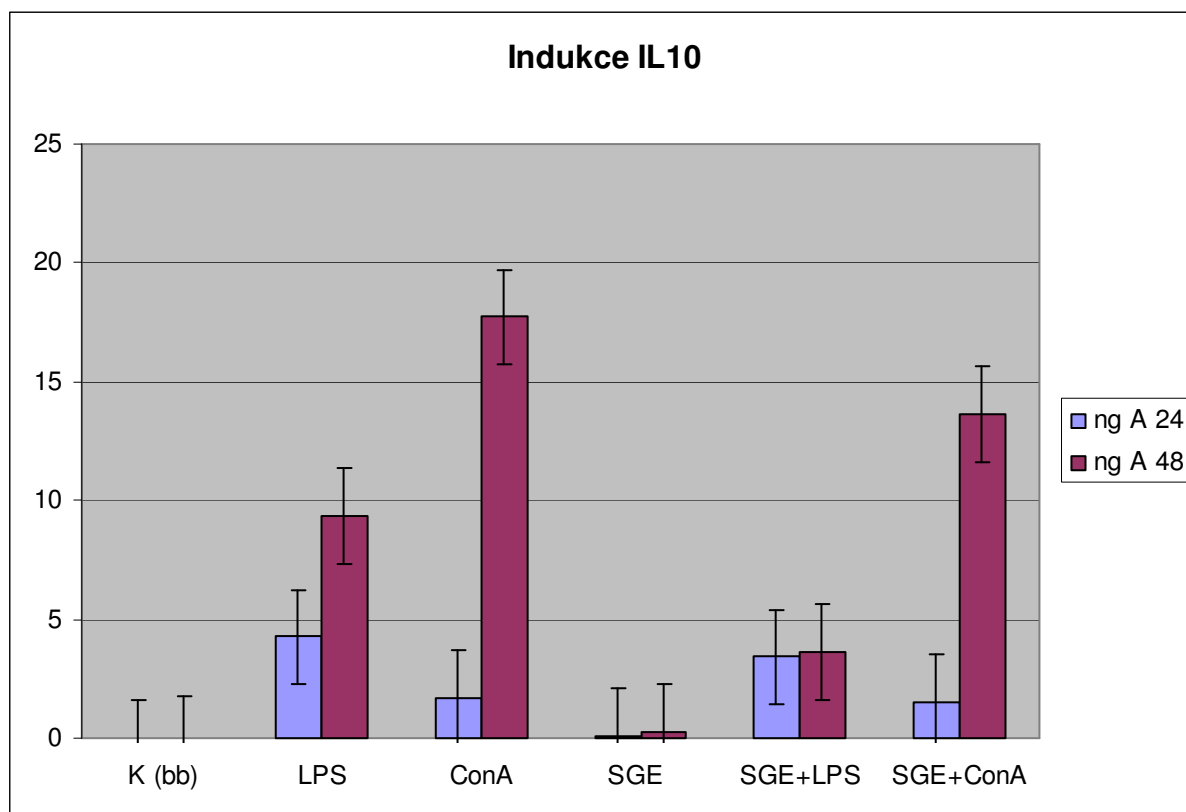
Nuttall P.A. et Labuda M.: Tick-host interactions: saliva-activated transmission, Oxford Un. Publishing, Oxford UK

8. PŘÍLOHY

Graf č. 1: Indukce IFN- γ vlivem SAT (simulovaným pomocí SGE).



Graf č. 2: Indukce IL-10 vlivem SAT, 1. měření (simulováno použitím SGE)



Graf č. 3: Indukce IL-10 2. měření (s výsledky zhodnocení vlivu slin)

