

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Parazitologie



Barbora Dvořáková

## **Charakterizace imunitní odpovědi hostitele proti slinám flebotomů**

### **Host immune response to sand fly saliva**

Diplomová práce

Vedoucí práce:  
RNDr. Iva Kolářová Ph.D

Praha, 2024

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci vypracovala samostatně a uvedla jsem veškeré zdroje, které jsem použila při jejím zpracování. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 1.8.2024

Barbora Dvořáková

## **Poděkování**

Poděkování v této práci patří v první řadě RNDr. Ivě Kolářové, Ph.D. za možnost, kterou mi dala, zpracovat pod jejím pečlivým vedením diplomový projekt. Děkuji za její laskavý a ochotný přístup a konstruktivní zpětnou vazbu. Chtěla bych také velmi poděkovat Mgr. Kristýně Jelínkové za její velkorysou spolupráci a podnětný vhled do problematiky, který mi v celém průběhu zpracovávání práce poskytovala. Závěrem bych chtěla poděkovat prof. Petru Volfovi za možnost začlenit se do práce v jeho laboratoři.

## **Abstrakt**

Diplomová práce se zabývala imunitní odpovědí BALB/c myši v kontextu protektivního efektu na rozvoj leishmaniózy. Ten je založen na předinfekční imunizaci a závislý na buněčné odpovědi. Práce ukázala, že převažující leukocytární populací, která do tkáně migruje v reakci na sání, jsou eozinofily. Následuje populace monocytů/makrofágů, které ovšem neexprimují znaky spojené s prozánětlivou imunitní odpovědí, marker CD38 a iNOS. Populace neutrofilů, kterou se diplomová práce také zabývala, dosahovala v infiltrátu v testovaných časech vůbec nejmenších absolutních počtů ze studovaných populací a také její procentní nárůst byl oproti kontrole nejmenší. Poznatek práce o masivní infiltraci eozinofilů u imunizované myši zrodil otázky týkající se role těchto buněk v protekci před rozvojem leishmaniózy. Na tuto otázku práce neodpověděla, nicméně poskytla podnět pro její budoucí řešení. Diplomová práce se dále zabývala rolí různě intenzivní imunizace na již vyvíjející se lézi u myši, které byly před infekcí vystaveny sání flebotomů k navození protektivního efektu. Bylo demonstrováno, že protektivní efekt může být zvrácen protistojně působící imunitní reakcí během infekce a že následné poinfekční sání může mít pozitivní ale i negativní vliv na průběh léze, v závislosti na etablované imunitní odpovědi u hostitele. Poslední část práce se zabývala potenciálním využitím splenocytů z dlouhodobě imunizovaných myši pro produkci specifických protilátek. Výťažnost tohoto systému se nicméně ukázala nízká a pro další praktické využití nepoužitelná.

## **Klíčová slova**

protektivní efekt, *Phlebotomus duboscqi*, eozinofily, *Leishmania major*, Th1/Th2 imunitní odpověď

## **Abstract**

The main topic studied in this diploma thesis was the immune response of mice in the context of the protective effect on *Leishmania* infection outcomes. This kind of protection is dependent on pre-exposure to sand fly saliva, which induces a cellular immune response. The thesis highlights the dominance of eosinophils as the main leukocytes infiltrating tissue in response to sand fly saliva. The second most predominant population was monocytes/macrophages, but no inflammatory markers, CD38 and iNOS, were associated with them. Neutrophils, as a part of the cellular infiltrate, represent the smallest population at studied time points, and the magnitude of their response to sand fly saliva was the slightest compared to the other studied populations. The outcomes of this thesis raised new questions concerning the role of these leukocytes in the protective effect. Although these questions were not answered, they provided inspiration for the follow-up studies. The diploma thesis also dealt with the effect of different immunization scenarios on the course of ongoing *Leishmania* infection in mice sensitized with sand fly saliva. As demonstrated, the protective effect can be bypassed, probably due to a strong antagonistic immune response at the time of infection. Additionally, the effect of sand fly saliva on ongoing infection is not clear-cut and rather depends on the established immune response of the host. The last part of this diploma thesis addressed the possible use of splenocytes from long-term immunized mice for antibody production. However, the yield of this system was low, and thus it does not appear to be a reliable model for studies about antibody production.

## **Key words**

protective effect, *Phlebotomus duboscqi*, eosinophils, *Leishmania major*, Th1/Th2 immune response

## Obsah

1 Úvod .....	9
2 Literární přehled .....	10
2.1 Flebotomové .....	10
2.2 Leishmaniózy .....	10
2.3 Th1/Th2 paradigma v kontextu imunologických markerů a zvířecích modelů .....	11
2.4 Sliny flebotomů jako koktejl bioaktivních molekul.....	12
2.4.1 Antihemostatické a imunomodulační účinky slin .....	12
2.4.2 Imunogenní působení slin .....	13
2.4.2.1 DTH v místě sání .....	13
2.4.2.2 Systémová odpověď .....	16
2.5 Role slin a slinných proteinů v přenosu leishmaniózy.....	17
3 Metodika.....	21
3.1 Zvířata.....	21
3.1.1 Myši.....	21
3.1.2 <i>Phlebotomus duboscqi</i> .....	21
3.2 <i>In vitro</i> produkce protilátek v kultuře splenocytů.....	22
3.2.1 Design experimentu .....	22
3.2.2 Typ buněk .....	22
3.2.3 Příprava kultury .....	22
3.3 Imunitní odpověď u imunizované myši.....	23
3.3.1 Design experimentu .....	23
3.3.2 Proces imunizace .....	23
3.3.3 Vzorky tkání .....	25
3.3.3.1 Krev .....	25
3.3.3.2 Ušní boltce .....	25
3.3.4 Histologie .....	25
3.3.4.1 Příprava vzorků.....	25
3.3.4.2 Barvení Hematoxylin-Eozinem .....	26
3.3.4.3 Imunofluorescence .....	27
3.3.5 Průtoková cytometrie .....	28
3.3.5.1 Izolace buněk z ucha.....	28
3.3.5.2 Příprava vzorku.....	28
3.3.5.3 Gatovací strategie.....	30

3.3.6 Detekce protilátek .....	32
3.3.6.1 ELISA a-SGH protilátek IgG/IgG1/IgG2a .....	32
3.3.6.3 ELISA IgE .....	32
3.4 Imunitní odpověď u imunizované myši v kontextu leishmaniové infekce .....	33
3.4.1 Design experimentu .....	34
3.4.2 Infekční inokulum.....	34
3.4.3 Detekce a-SGH protilátek .....	34
3.4.4 Příprava kultury .....	35
3.4.4.1 Antigeny SLA, SGH .....	35
3.4.5 Detekce cytokinů .....	35
3.5 Statistická analýza.....	36
4 Výsledky.....	40
4.1 <i>In vitro</i> produkce protilátek v kultuře splenocytů.....	40
4.2 Imunitní odpověď u imunizované myši.....	42
4.2.1 Buněčná odpověď měřená průtokovou cytometrií .....	42
4.2.1.1 Celkové množství izolovaných buněk z uší.....	42
4.2.1.2 Zastoupení jednotlivých buněčných subpopulací v čase D2 a D7.....	44
4.2.2 Histologická analýza .....	52
4.2.3 Hladina protilátek v séru/plazmě.....	58
4.2.3.1 a-SGH IgG/IgG1/IgG2a .....	58
4.2.3.2 Celkové IgE .....	60
4.3 Imunitní odpověď u imunizované myši v kontextu leishmaniové infekce .....	62
4.3.1. Hladina a-SGH protilátek v séru/plazmě .....	62
4.3.2 Detekce cytokinů .....	67
4.3.3 Velikost lézí v kontextu měřených parametrů.....	71
5 Diskuze.....	73
6 Závěr .....	86
7 Seznam literatury .....	87
8 Příloha .....	100

## Seznam zkratek

a-dub	protilátky proti slinám flebotoma <i>Phlebotomus duboscqi</i>
a-lon	protilátky proti slinám flebotoma <i>Lutzomyia longipalpis</i>
a-SGH	protilátky proti slinnému homogenátu
(p)Ab	(primární) protilátka
ADP	adenosindifosfát
AMP	adenosinmonofosfát
a-SGH	protilátky proti slinnému homogenátu
ATP	adenosintrifosfát
BSA	angl. <i>bovine serum albumin</i> , hovězí sérový albumin
CL	kožní leishmanióza
(mo-)DC	(od monocytu odvozená) dendritická buňka
DTH	angl. <i>delayed type hypersensitivity</i> , reakce pozdní přecitlivělosti
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EOS	eozinofil
ELISA	angl. <i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
FBS	fetal-bovinní sérum
FMO kontrola	angl. <i>fluorescence minus one</i> , kontrola bez jedné fluorochromu
FSC	angl. <i>forward scatter</i>
H-E	hematoxylin-eosin
IF	imunofluorescence
IFN $\gamma$	interferon $\gamma$
IgE/G/G1/G2a	imunoglobulin E/G/G1/G2a
IL-1 $\beta$ /4/5/10	interleukin - 1 $\beta$ /4/5/10
iNOS	inducibilní NO syntetáza
<i>L.</i>	<i>Lutzomyia</i>
<i>Le.</i>	<i>Leishmania</i>
ML	mukokutánní leishmanióza
Mo/M $\Phi$	monocyt/makrofág
MPO	myeloperoxidáza
NEUT	neutrofil
OBP	angl. <i>odorant binding proteins</i> , skupina slinných proteinů flebotoma
<i>P.</i>	<i>Phlebotomus</i>
PBMC	angl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i> , mononukleární leukocyty periferní krve
PBS	fosfátový pufr
PC	přítoková cytometrie
PGE2	prostaglandin E2
PRR	angl. <i>pattern recognition receptor</i> , skupina receptorů vrozené imunity
SGH	angl. <i>salivary gland homogenate</i> , slinný homogenát
SLA	solubilní leishmaniový antigen
SM	světelná mikroskopie
SS kontrola	angl. <i>single-stained</i> , kontrola o jednom fluorochromu
SSC	angl. <i>side scatter</i>

TGFβ	angl. <i>transforming growth factor</i> β, protizánětlivý cytokin
TLR	angl. <i>toll-like receptor</i> , jeden z druhů PRR
TNFα	angl. <i>tumor necrosis factor</i> α, faktor nádorové nekrózy α
TRM	angl. <i>tissue resident macrophage</i> , tkáňový makrofág
VL	viscerální leishmanióza
WBC	angl. <i>white blood cell</i> , leukocyt
YRP	angl. <i>yellow-related protein</i> , skupina slinných proteinů flebotoma



# 1 Úvod

Flebotomové jsou v humánní medicíně významným krevsajícím hmyzem. Jedná se o vektory různých lidských patogenů, včetně leishmanií, původců spektra onemocněních, jehož nejčastější kožní forma se ročně projeví u zhruba miliónu lidí žijících v tropických a subtropických oblastech. Sliny flebotomů mají potentní imunomodulační a imunogenní vlastnosti a vlivně tím formují průběh leishmaniových infekcí. Konkrétní podoba takového vlivu může být zcela protikladná a je odvozená od stupně imunizace hostitele vůči slinným komponentám. Tento dvousečný meč je představován protektivním a posilujícím (angl. enhancing) efektem slin, které reprezentují dva protikladné fenomény ve vztahu k rozvoji leishmaniových lézí. Posilující efekt reprezentuje zhoršený průběh leishmaniových lézí a rozvíjí se v případě, kdy na počátku infekce jsou v infekčním inokulu přítomné sliny, narozdíl od uměle navozených infekcí, kdy se infikují do hostitele pouze samotná infekční stadia leishmanií. Na druhé straně stojí protektivní efekt, který je spjat s mírnějším průběhem infekce a rozvíjí se u imunizovaného hostitele, který je před infekcí vystaven neinfekčnímu sání flebotoma či jinou formou antigenním molekulám slin (např. rekombinantním proteinům). Enhancing efekt je odvozen od potlačení obranných mechanismů hostitele vlivem imunomodulačního působení slin. Naopak, protektivní efekt je spojen s DTH reakcí v reakci na slinné antigeny, která nepříznivě ovlivňuje i přítomné parazity. Obecně je protektivní efekt spojován s přítomností mononukleárních buněk v místě infekce a produkcí  $IFN\gamma$  jak v místě infekce, tak v sekundárních lymfatických orgánech.

Imunogenní působení slin je reflektováno i na systémové úrovni v tvorbě protilátek. I ty se mohou v jistých případech podílet na protektivním efektu slin, především ovšem slouží jako užitečný nástroj pro monitorování expozice flebotomům a s tím spojené riziko infekce leishmaniózou.

Cílem této diplomové práce bylo

1. otestovat možné využití dlouhodobě imunizovaných myší pro *in vitro* testy produkce protilátek
2. popsat imunitní odpověď myši, která se podílí na protektivním efektu slin
3. popsat imunitní odpověď myši v kontextu infekce *Le. major* a různých imunizačních schémat

## 2 Literární přehled

### 2.1 Flebotomové

Flebotomové (podčeleď Phlebotominae) jsou skupinou krevsajících hmyzu patřící do řádu Diptera. Jedná se o teplomilný hmyz s přeměnou dokonalou zahrnující čtyři larvální stádia a kuklu vyvíjející se v půdě. Svým výskytem jsou flebotomové vázány na teplé oblasti tropů a subtropů s výjimkou některých pacifických ostrovů. Krev sají pouze dospělé samice, a to především za soumraku a v nočních hodinách. S relevancí pro humánní medicínu se zástupci této skupiny hmyzu řadí ke dvěma významným rodům, *Phlebotomus*, kde zástupce lze nalézt v oblastech Starého světa, a *Lutzomyia*, se zástupci ve Světě novém. Jedná se o živočichy s nemalým významem pro humánní medicínu, a to především pro svou roli vektorů různorodé skupiny patogenů. Mezi ty se řadí především prvoci rodu *Leishmania*, dále nemálo arbovirů a v Centrální a Jižní Americe také bakterie *Bartonella bacilliformis* (Cecílio et al., 2022; Ready, 2013).

V diplomové práci byl jako modelový organismus využit *Phlebotomus P. duboscqi*. Tento druh se vyskytuje v subsaharské Africe a na Blízkém Východě a je prokázaným přenašečem *Leishmania major* (Anderson et al., 2011). Jedná se o druh běžně sající na lidech (Beach et al., 1984), ale nevyhýbající se i jiným savcům jako například hlodavcům, kteří představují rezervoár *Le. major* a tak i významný zdroj pro lidské infekce (Dedet et al., 1979).

### 2.2 Leishmaniózy

Leishmaniózy jsou skupinou různě se manifestujících onemocnění, které spojuje jednobuněčný parazit z rodu *Leishmania* jako infekční agens a vektor z řad zástupců podčeledi Phlebotominae. Leishmanie je intracelulární parazit, který se do hostitele dostává v infekční formě metacyklického promastigota. V hostitelských buňkách, typicky makrofázích, se následně přeměňuje na formu amastigota s typicky kulovitým tvarem buňky a velmi krátkým bičíkem, v této formě se posléze množí. Cyklus se uzavírá po sání vektora na infikovaném hostiteli, kdy ve střevě flebotoma dochází k přeměně na podlouhlá stádia s dlouhým bičíkem, pomnožení a vzniku infekčních stádií schopných přenosu na obratlovčího hostitele (Mann et al., 2021).

Nejčastější klinickou formou je kožní leishmanióza (angl. cutaneous leishmaniasis, CL) projevující se ve většině případů vředy na kůži, které po vyhojení zanechávají jizvu. Další formou je leishmanióza mukokutánní (ML), kterou doprovází napadení sliznic a chrupavek vedoucí až k fatální destrukci těchto tkání. Nejzávažnější formou je viscerální leishmanióza (VL), při které parazit napadá vnitřní orgány jako slezinu, játra či kostní dřeň. Pacienti s viscerální leishmaniózou trpí horečkou, ztrátou váhy, hepatosplenomegalií, anémií a leukopenií a neléčení nakonec umírají (WHO, 2023). Konkrétní forma onemocnění je dána jednak druhem patogenu, tak i imunitním nastavením infikovaného jedince (Meira and Gedamu, 2019). Část infikovaných jedinců ovšem neprojevuje žádné

příznaky ani jedné z forem nemoci a v takových případech se hovoří o asymptomatických infekcích (Ibarra-Meneses et al., 2022).

Všechny popsané formy nemoci spojuje nedostupnost efektivní, bezpečné léčby a absence účinné ochrany ve formě humánní vakcíny (Ponte-Sucre et al., 2017). Přes veškerý výzkum v této oblasti se ročně nakazí až 1,2 miliónu lidí CL a do 100 tisíce lidí VL (CDC, 2020). Hrozí i opakované relapsy nemoci v případě imunokompromitovaných pacientů. Imunita po vyléčení totiž není sterilní a v těle jedince zůstává reziduální množství parazitů schopných opakovaného rozpuštění infekce. V neposlední řadě představuje stále rostoucí riziko rozšiřování habitatu přenašečů v souvislosti se změnou klimatu, která znamená, že s možností nákazy leishmaniózou se setkávají i hostitelé v doposud bezpečných, vyšších zeměpisných šířkách (Montaner-Angoiti and Llobat, 2023).

## 2.3 Th1/Th2 paradigma v kontextu imunologických markerů a zvířecích modelů

Následující kapitola pojednává o imunitním paradigmatu, ke kterému se budou odkazovat jak obecné části navazující literární rešerše, tak i experimentální část diplomové práce. Úkolem této kapitoly není suplovat informace v učebnicích imunologie, ale odpovědět na otázku, proč se reakce na sání flebotoma a s tím i blízce sprážené leishmaniové infekce studují s ohledem na dané cytokiny a efektorové imunitní mechanismy.

Th1/Th2 paradigma se zrodilo koncem 80. let minulého století, kdy byly definovány dvě populace CD4<sup>+</sup> T lymfocytů na základě produkce odlišného souboru cytokinů (Mosmann et al., 1986). Tento koncept představuje dva odlišné efektorové přístupy kontroly infekcí, a přestože je toto polarizované rozložení sil značně zjednodušené, používá se pro definování typu imunitní odpovědi v infekčních onemocněních i dnes. Za tímto účelem se využívá jako markerů cytokinových profilů a odvozených efektorových imunitních mechanismů hrající roli v studovaných imunitních procesech.

Th1 imunitní odpověď je popisována jako prozánětlivá a charakterizována cytokiny IFN $\gamma$ , IL-12 a IL-18. Th2 imunitní odpověď je oproti ní definována jako protizánětlivá, doprovázená cytokiny IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 a IL-25 (Zhu and Paul, 2008). Vlivem daného cytokinového prostředí dochází k polarizaci i klíčových efektorových buněk pro boj s infekcí, makrofágů. U těch se popisují klasicky aktivované makrofágy M1 a alternativně aktivované M2. Stejně jako v případě výše popsaných CD4<sup>+</sup> T lymfocytů i v případě makrofágů je vydělení na dva fenotypy zjednodušený konstrukt popisující extrémní jinak kontinuálního spektra (Muraille et al., 2014). M1 makrofágy diferencují vlivem IFN $\gamma$  a produkují prozánětlivé cytokiny TNF $\alpha$ , IL-6 a IL-12. Prototypickým markerem pro vydělení M1 makrofágů je indukibilní NO syntetáza (iNOS) produkující NO jako klíčovou mikrobicidní molekulu. Oproti tomu, M2 makrofágy produkují jen velmi nízké hladiny IL-12 a iNOS a polarizují v přítomnosti

protizánětlivých IL-4, IL-13, imunokomplexů nebo IL-10. Charakterizované jsou přítomností arginázy, která s iNOS kompetuje o společný substrát, kterým je arginin (Rath et al., 2014).

Toto představené schéma je dobře použitelné pro studium imunitních odpovědí v leishmaniových infekcích, kde je zásadní ustanovení správné buněčné imunitní odpovědi. Prozánětlivá imunitní odpověď tak jak byla definována výše (iNOS, IFN $\gamma$ , IL-12) je obecně spojována s kontrolovanou infekcí vedoucí k vyléčení. V opozici k ní stojí protizánětlivá imunitní odpověď doprovázená tvorbou protilátek, která definuje nekontrolovanou infekci a nekontrolované množení parazita (Meira and Gedamu, 2019). Na základě odlišné Th1/Th2 imunitní odpovědi vůči infekci způsobené *Le. major* lze definovat i dva nejpoužívanější myši modely. Myši kmene BALB/c jsou k infekci citlivé a rozvíjejí nekontrolovanou kožní lézi spojenou s Th2 imunitní odpovědí. Vedle toho myši kmene C57BL/6 jsou rezistentní a na infekci odpovídají rozvojem Th1 odpovědi spojené s vyléčením. Pro infekce jinými kmeny leishmanií způsobující jiné formy nemoci neplatí toto obecné pravidlo o citlivosti a odolnosti BALB/c a C57BL/6 a vhodnější je proto využití jiných modelů (Loría-Cervera and Andrade-Narváez, 2014). Ke studiu VL se např. využívá křečků nebo psů a pro podobnost s lidským imunitním systémem se využívá primátů v čele s makaky (Loría-Cervera and Andrade-Narváez, 2014).

## 2.4 Sliny flebotomů jako koktejl bioaktivních molekul

Slinné žlázy flebotomů představují zdroj rozmanitého souboru biologicky aktivních molekul. Tento koktejl umožňuje krevsajícím samicím, která jím disponuje, relativně pohodlný přísun potravy a to díky vícero různým mechanismům.

### 2.4.1 Antihemostatické a imunomodulační účinky slin

Antihemostatickými účinky disponují ty slinné faktory, které negativně ovlivňují obranné mechanismy hostitele zahrnující agregaci trombocytů, koagulaci a vasokonstrikci (Lestinova et al., 2017). Těch je ve slinách flebotomů celá plejáda. Jedním z nich, prakticky uniformně zastoupeným enzymem ve slinách krevsajícího hmyzu, je apyráza, která štěpí ATP a ADP a tím inhibuje agregaci destiček (Anderson et al., 2006; Hostomská et al., 2009; Kato et al., 2006; J. G. Valenzuela et al., 2001). Další v řadě jsou zástupci proteinů označovaných jako *odorant binding proteins* (OBP), kteří působí jako kompetitivní antagonisté koagulačních faktorů inhibující tím srážení krve (Alvarenga et al., 2013). Do koagulační kaskády zasahuje i protein Lufaxin ze slin *L. longipalis* vázající faktor Xa. Inhibuje tak jednak srážení krve, vedle toho nicméně působí i protizánětlivě, protože molekula je známá svým přímým prozánětlivým působením na endoteliální buňky, leukocyty i myocyty (Collin et al., 2012). Vyvazováním zánětlivých leukotrienů působí protizánětlivě i výše zmíněné OBP (Jablonka et al., 2019). Víceero slinných složek působí v místě sání také vasodilatačně. Mezi takovými molekulami patří proteiny z rodiny *Yellow-related proteins* (YRP), které váží v místě sání biogenní aminy a tím působí vasodilatačně a antiagregačně (Anderson et al., 2006; Rohoušová et al., 2012; Sima et al., 2016; Xu et al., 2011). Vasodilatačními

vlastnostmi disponuje také protein Maxadilan přítomný ve slinách novosvětské *L. longipalpis* (Lerner et al., 1991) nebo neproteinové nukleotidové molekuly AMP a adenosin vyskytující se u rodu *Phlebotomus* (Collis, 1989; Ribeiro et al., 1999). Dalšími slinnými molekulami s enzymatickou aktivitou jsou hyaluronidáza, která štěpí složky extracelulární matrix, a endonukleázy štěpící hostitelskou DNA (Charlab et al., 1999; Lestinova et al., 2017), kam patří i Lundep vyskytující se ve slinách *L. longipalpis*. Svou DNázovou aktivitou působí protisrážlivě a protizánětlivě, výrazně se ovšem podílí i na etablování leishmaniové infekce (Chagas et al., 2014).

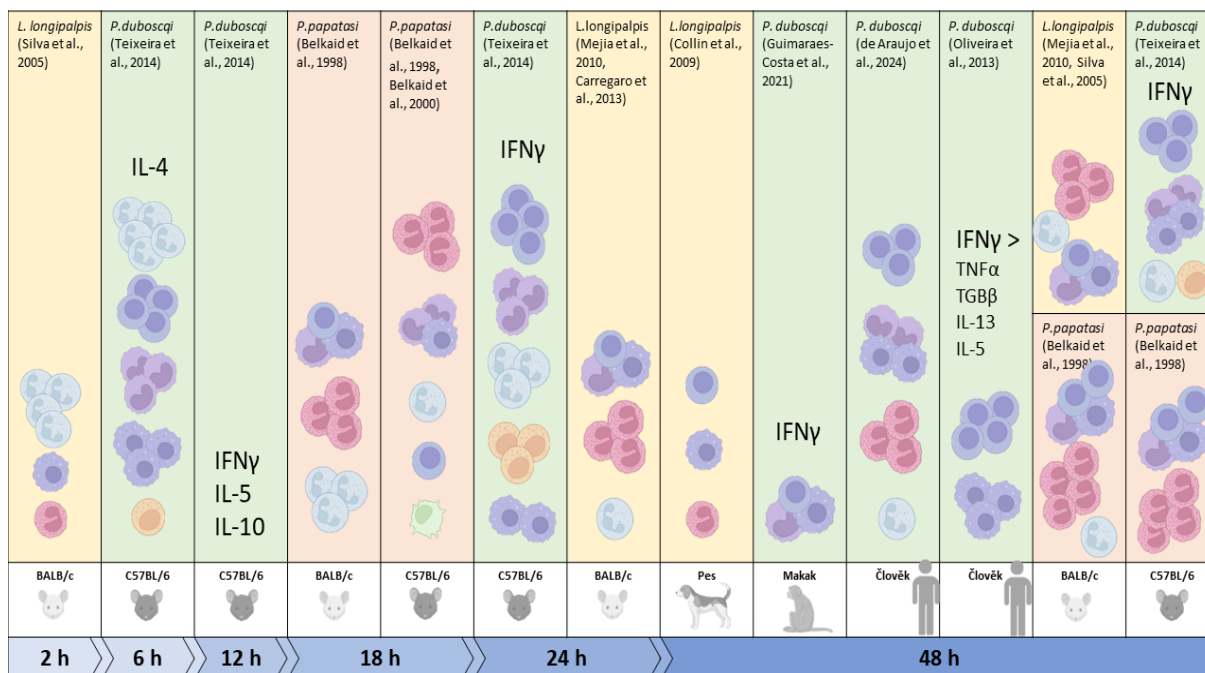
Příklady Lufaxinu, OBP a Lundep uvedené v odstavci výše dokládají, že vedle antihemostatických účinků působí sliny i imunomodulačně. Jedná se o chemotaktické působení na různé leukocyty a ovlivnění jejich funkcí. Mezi leukocyty atrahované přítomností slin patří monocyty, makrofágy (Anjili et al., 1995; Teixeira et al., 2005) a neutrofilny (Guimaraes-Costa et al., 2021; Martin-Martin et al., 2018; Peters et al., 2008). Makrofágy jsou vlivem slin *P. papatasi* méně vnímavé k IFN $\gamma$  a inhibuje se u nich produkce NO (Hall and Titus, 1995). Sliny *L. longipalpis* zase působí na infiltrující se neutrofilny proapoptoticky a zvyšují u nich produkci protizánětlivého PGE2 (Prates et al., 2011). Ovlivněna je i sekrece cytokinů. U lidských i myších monocytů a makrofágů snižuje Maxadilan sekreci prozánětlivých cytokinů (IFN $\gamma$ , IL-12, TNF) a naopak zvyšuje produkci cytokinů asociovaných s Th2 imunitní odpovědí (IL-6, IL-10, TGF $\beta$ ) (Brodie et al., 2007; Rogers and Titus, 2003). Maxadilan ovlivňuje obdobným způsobem i produkci cytokinů u dendritických buněk a T lymfocytů (Qureshi et al., 1996; Wheat et al., 2008). Podobně, adenosin přítomný ve slinách *P. papatasi* snižuje sekreci Th1 cytokinů u lidských monocytů (Rogers and Titus, 2003), v myším modelu potlačuje produkci TNF $\alpha$ , IL-12 a NO a naopak indukuje produkci IL-10 (Katz et al., 2000). Pod vlivem slin také dochází k pozmeněným expresím kostimulačních molekul CD80, CD86 a MHC II na povrchu antigen prezentujících buněk (APC), které jsou nezbytné pro aktivaci adaptivní imunitní odpovědi (Costa et al., 2004). Výčet bioaktivních molekul dokládá, že jednotlivé složky slin flebotomů jsou co se týče efektorových mechanismů často zastupitelné a jejich pole působnosti je mnohokrát širší, zasahující jak do antihemostatických mechanismů hostitele, tak i do mechanismů imunitních.

## 2.4.2 Imunogenní působení slin

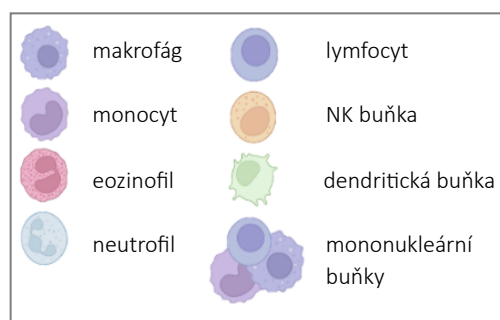
Komponenty slin mají imunogenní vlastnosti a opakované vystavení slinám flebotomů proto indukuje tvorbu specifické imunity, která je dána přítomností protilátek a buněčnou imunitou.

### 2.4.2.1 DTH v místě sání

Opakovaným vystavením hostitele slinám flebotomů se proměňuje složení buněčného infiltrátu, který dočasně osidluje místo sání (Carregaro et al., 2013). Mění se tak tvář imunitní odpovědi, která je v případě naivních myší dána pouze imunomodulačním působením slin, tak jak je popsáno v textu výše. Tato specifická buněčná odpověď je spojována s DTH reakcí (z angl. delayed-type hypersensitivity) (Belkaid et al., 2000; Oliveira et al., 2013) a je charakterizována svou závislostí na T lymfocytech



**Schéma 1:** Vyobrazení buněčné odpovědi v místě sání v čase od 2 do 48 hodin. Znárodněny jsou buněčné infiltráty po sání tří druhů flebotomů, vzájemně odlišené barevným pozadím. Reakce na sání *L. longipalpis* je podbarvena žlutě, *P. duboscqi* zeleně a *P. papatasi* oranžově. Ke každé reakci je přiřazena informace o modelu, na kterém byla studie provedena. Jedná se o dva kmeny myši (BALB/c, C57BL/6), psa, makaka a člověka. Legenda určující jednotlivé buněčné populace leukocytů je pod schématem. Podíl jednotlivých populací na celkové skladbě je pouze orientační a vyjádřený v počtu zobrazených buněk. Odkazuje se vždy jen ke konkrétní studii, nelze proto srovnávat jednotlivé studie co do počtu buněk mezi sebou. U některých studií autoři měřili i produkci cytokinů, ve schématu je proto zobrazena i tato informace vztahující se vždy k danému času a modelu.



(Belkaid et al., 2000) a opožděnou infiltraci na místo reakce, kde nejvyšších koncentrací dosahují leukocyty v čase 48 hodin od sání (Belkaid et al., 1998; Teixeira et al., 2014). Efekt imunizace na proměnu leukocytárního infiltrátu byl studován na různých modelech hostitel-vektor, a proto jsou jednotlivé poznatky následujícího odstavce uváděny i s ohledem na tento nezanedbatelný kontext (schéma 1).

K pronikání leukocytů na místo sání dochází prakticky okamžitě po expozici vektorovi. U imunizovaných **BALB/c** myši vystavených opakovanému sání *L. longipalpis* bylo již **2 hodiny** od sání možné detekovat buněčný infiltrát tvořený především neutrofily, v menší míře také makrofágy a eozinofily (Silva et al., 2005). Podobně, v čase **18 hodin** po sání *P. papatasi* byl infiltrát u těchto myši tvořen především mononukleárními fagocyty, eozinofily a neutrofily (Belkaid et al., 1998). Naopak, Carregaro et al. (2013) ukázal, že vlivem několikanásobného sání *L. longipalpis* dochází u BALB/c myši v čase **24 hodin** od posledního sání k redukci počtu infiltrujících se makrofágů, CD4<sup>+</sup> T lymfocytů, ale i neutrofilů, a naopak vzrůstá počet CD8<sup>+</sup> lymfocytů. Později, v čase **48 hodin**, byl infiltrát po sání stejného flebotoma (*L. longipalpis*) tvořen především mononukleárními fagocyty a eozinofily (Mejia et

al., 2010; Silva et al., 2005). Naopak, oproti infiltrátům analyzovaných v ranějších časech se neutrofilů v místě sání po dvou dnech vyskytovaly ve srovnání s jinými leukocyty minimálně (Mejia et al., 2010; Silva et al., 2005).

Při studiu imunizovaných **C57BL/6** myší docházelo ke zvýšené produkci cytokinu IL-4 už **6 hodin** od sání *P. duboscqi*, která byla po dalších 6 hodinách následovaná nárůstem exprese IFN $\gamma$ , iNOS, IL-5 a IL-10 (Teixeira et al., 2014). Stejně docházelo k nárůstu produkce IFN $\gamma$  spolu s IL-12 i v případě imunizace sáním *P. papatasi* a to už dříve, již 6 hodin od poslední expozice (Kamhawi et al., 2000). V čase **18 hodin** od sání *P. papatasi* byl infiltrát u imunizovaných C57BL/6 myší tvořen především CD4<sup>+</sup> T lymfocyty, eozinofily a mononukleární fagocyty (Belkaid et al., 1998, Belkaid et al., 2000). Po sání infikovaného *P. duboscqi* byla imunitní odpověď měřená v čase **48 hodin** od sání u imunizovaných C57BL/6 myší charakterizována zvýšenými počty CD4<sup>+</sup> lymfocytů produkujících IFN $\gamma$ , monocytů a makrofágů, v menší míře ovšem i neutrofilů a NK buňkami (Teixeira et al., 2014). Nicméně, jak bylo uvedeno, Teixeira et al. (2014) analyzovali buněčný infiltrát po sání infikovaného vektora a za takových podmínek se imunitní reakce může lišit. Eozinofily v této studii analyzovány nebyly. Naopak, masivní výskyt eozinofilů spolu s mononukleárními buňkami a absencí neutrofilů byl potvrzen v tom samém čase v reakci na sání *P. papatasi* (Belkaid et al., 1998). Obdobně jako v případě BALB/c myší, i u C57BL/6 platí tendence k poklesu počtu neutrofilů, která jde proti celkovému počtu leukocytů narůstajícímu až do času 48 hodin od sání (Belkaid et al., 1998, Teixeira et al., 2014).

U **psů** byla DTH reakce analyzována v odpovědi na sání *P. papatasi* a to sice v čase **18 hodin** po sání (Collin et al., 2009). I v případě této studie byly mezi infiltrovanými leukocyty masivně zastoupeny hlavně lymfocyty, makrofágy a eozinofily. Tato reakce byla současně doprovázena produkcí smíšeného souboru Th1/Th2 cytokinů zahrnující IFN $\gamma$ , IL-12, IL-4 a TGF $\beta$  (Collin et al., 2009).

U **lidí** byla imunitní odpověď na sání analyzována v případě *P. duboscqi*, v čase **48 hodin** po sání. Buněčný infiltrát u jedinců z endemických oblastí Mali byl tvořen především T lymfocyty a makrofágy, jejichž přítomnost byla doprovázena nárůstem produkce IFN $\gamma$  a dále i nízkou expresí cytokinů TNF, TGF $\beta$ , IL-13 a IL-5 (Oliveira et al., 2013). K obdobným závěrům dospěla i studie, kdy byli dobrovolníci vystaveni opakovanému experimentálnímu sání *P. duboscqi* a v čase 48 hodin od sání byly histologicky analyzovány vzorky v místě DTH (de Araujo et al., 2024). Zajímavé je, že zatímco u lidí, kteří byli imunizováni půl roku před posledním sáním byl buněčný infiltrát tvořen především lymfocyty a makrofágy/mononukleárními buňkami obdobně jako u lidí z endemických oblastí Mali (Oliveira et al., 2013), u těch dobrovolníků, kteří byli vystaveni imunizačnímu sání pouhé dva měsíce před posledním sáním byly v infiltrátu zastoupeny i eozinofily/mastocyty a neutrofilů (de Araujo et al., 2024).

Co se týče adaptivní imunitní odpovědi hostitele na sání flebotoma, předchozí odstavce tvoří mozaiku současného poznání. Informace jsou poskládány ze studií prováděných na různých hostitelích, s použitím různých vektorů a analyzovaných v rozdílných časech. Jednotlivým prvkem ve všech zmíněných studiích jsou mononukleární leukocyty – lymfocyty, makrofágy a monocyty – ať už je autoři

ve svých závěrech rozlišují nebo nikoli. S ostatními buněčnými populacemi je situace složitější, neutrofilů se v infiltrátu spíše vyskytují, napříč studiemi nicméně platí trend, že jejich počty jsou nejvyšší po sání a s postupem času klesají. Na rozdíl právě od zmíněných mononukleárních leukocytů. Eozinofily se také, nezávisle na hostiteli a přenašeči, vyskytují mezi leukocyty prostupujícími na místo sání, pozornost jim ovšem nevěnují všechny studie. Poznatky týkající se jiných než zmíněných buněčných populací jsou více než kusé a pro demonstraci jsou spolu se zbytkem infiltrátu vyobrazeny na schématu 1.

#### 2.4.2.2 Systémová odpověď

V reakci na sání flebotoma dochází i k ustanovení adaptivní imunity na humorální úrovni. Jedná se o specifické protilátky třídy IgG, jejichž tvorba je spojena se sáním mnoha druhů flebotomů, např. *P. duboscqi* (de Araujo et al., 2024; Rohoušová et al., 2011), *P. argentipes* (Clements et al., 2010), *P. sergenti* (Gholami et al., 2019; Rohoušová et al., 2005), *P. alexandri* (Lakhal-Naouar et al., 2021), *P. papatasi* (Belkaid et al., 1998; Kammoun-Rebai et al., 2017), *L. whitmani* (Gomes et al., 2016), *L. intermedia* (de Moura et al., 2007) nebo *L. longipalpis* (Štáfková et al., 2008; Vinhas et al., 2007). V případě protilátek proti slinám *P. papatasi*, *L. longipalpis* a *L. intermedia* je u myši nejvíce zastoupenou podtřídou IgG1 (de Moura et al., 2007; Silva et al., 2005, 2005; Vlková et al., 2012), která je asociována s navozenou Th2 imunitní odpovědí, zatímco IgG2a odráží odpověď Th1 (Bretscher, 2014). Kromě třídy IgG může docházet i k tvorbě IgE, která je spjata především s časnou hypersenzitivní reakcí (Vinhas et al., 2007), produkce této třídy protilátek ovšem v reakci na sání flebotomů běžná není (Carvalho et al., 2015).

V řadě studií se pro studium systémové odpovědi využívají PBMC (z angl. peripheral blood mononuclear cells) izolované z krve opakovaně exponovaných jedinců, kdy se analyzuje cytokinový profil produkovaný za stimulace slinným homogenátem (SGH). Kultivací takovýchto PBMC s SGH *P. papatasi* dochází k aktivaci CD8<sup>+</sup> T lymfocytů produkujících IL-10 a IL-4 i CD4<sup>+</sup> T lymfocytů produkujících IFN $\gamma$ . Dominuje však zcela Th2 profil a produkci IFN $\gamma$  je možné detekovat až po neutralizaci IL-10 (Abdeladhim et al., 2011). Podobně i SGH *P. alexandri* stimuluje lidské PBMC především k produkci protizánětlivých IL-10 a IL-13, ale dochází i k produkci IFN $\gamma$  a IL-17 (Lakhal-Naouar et al., 2021). Studie, ve kterých byly analyzovány produkce cytokinů PBMC v reakci na SGH *P. duboscqi*, ukázaly ve většině případů na smíšenou imunitní reakci zahrnující jak produkci cytokinů asociovaných s Th1, tak Th2 imunitní odpovědí IFN $\gamma$ , IL-10, IL-17, IL-5, IL-12p40 a IL-13 (de Araujo et al., 2024; Oliveira et al., 2015, 2013). U části jedinců ovšem docházelo i k rozvoji polarizovaných odpovědí, tedy k vysoké produkci IFN $\gamma$  a nízké produkci Th2 cytokinů (IL-13 a IL-5), nebo opačně (Oliveira et al., 2013). Podobně, PBMC z imunizovaných jedinců kultivované spolu s SGH *L. longipalpis* reagovaly produkcí prozánětlivého IFN $\gamma$  a protizánětlivého IL-10 (Vinhas et al., 2007). I PBMC kultivované se slinami flebotoma stejného rodu, *L. intermedia*, produkovaly dominantně IL-10



následovaný IFN $\gamma$  a IL-13 (Carvalho et al., 2015). Produkce těchto cytokinů byla dána činností CD4<sup>+</sup> T lymfocytů, na rozdíl od studie Abdeladhim et al. (2011), která za zdroj produkovaných cytokinů určila především CD8<sup>+</sup> T lymfocyty. Naopak, v případě kultivace PBMC s SGH *P. kandelakii* nebyla zaznamenána žádná produkce měřených cytokinů. Důvodem byla krátká sezóna tohoto flebotoma v oblasti a tedy nedostatečná expozice lidí jeho sání (Oliveira et al., 2020).

Smíšená reakce na slinné antigeny byla měřena i v případě buněk lymfatické uzliny. U leukocytů izolovaných z BALB/c myši imunizovaných SGH *L. whitmani* byla stimulací vyvolána produkce především IL-10 ale také IFN $\gamma$  a IL-4 (Gomes et al., 2016). Na produkci stejného souboru prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů ukázala i studie na buňkách lymfatické uzliny izolované z imunizovaných myši stimulovaných SGH *L. intermedia* (de Moura et al., 2007).

## 2.5 Role slin a slinných proteinů v přenosu leishmaniózy

S ohledem na výše zmíněný výčet imunomodulačních a imunogenních vlastností slin je třeba nastínit i známou skutečnost, že samotný akt přenosu patogenu flebotomem představuje výrazně formující faktor pro rozvoj infekce (Serafim et al., 2021). V souvislosti se slinami se hovoří o takzvaném *enhancing* (posilujícím) efektu, který představuje jev, kdy rozvoj leishmaniové léze je závažnější pokud jsou součástí infekčního inokula právě sliny vektora (Belkaid et al., 1998; Titus and Ribeiro, 1988) nebo dochází k opakované expozici flebotomům na již rozvíjející se lézi (Vojtkova et al., 2021). Naopak, pokud je hostitel před samotnou infekcí vystaven neinfekčnímu sání flebotomy, léze jsou menší, vyvíjejí se pomaleji a obsahují také menší množství parazitů. Tento fenomén se označuje jako *protective* (ochranný) efekt (Gomes et al., 2016; Kamhawi et al., 2000; Lestinova et al., 2015; Rohoušová et al., 2011).

První zmíněný je odrazem chemoatraktorních a imunomodulačních vlastností slin, kdy dochází k infiltrování místa sání množstvím hostitelských buněk a zároveň k jeho polarizaci k Th2 imunitě (Guimaraes-Costa et al., 2021; Peters et al., 2008; Prates et al., 2011). Dochází k inhibici produkce cytokinů asociovaných s Th1 odpovědí (IFN $\gamma$ , IL-12) a iNOS, navyšuje se množství apoptotických buněk a formuje se tak tolerantní prostředí k rozvoji infekce (Mbow et al., 1998; Salei et al., 2017). Za takových podmínek dochází k rozvoji leishmaniové léze i u jinak rezistentního myšního kmene C57BL/6 (Belkaid et al., 1998). Nemusí se ovšem jednat ani o přítomnost kompletního SGH. U C57BL/6 myši bylo prokázáno, že např. pouhá přítomnost endonukleázy Lundep (molekula štěpící NET, neutrofilní extracelulární síť), injikované spolu s *Le. major* vede k významnému zhoršení průběhu infekce (Chagas et al., 2014) a podobně působí i infekční inokulum *Le. major* s rekombinantními YRP (Guimaraes-Costa et al., 2021).

Protektivní efekt je důsledek ustanovené adaptivní imunity vůči slinným proteinům a je závislý především na buněčné imunitě spjaté s DTH a produkcí IFN $\gamma$  (Belkaid et al., 1998; Carregaro et al., 2013; Gomes et al., 2012; Jesus G. Valenzuela et al., 2001), vyloučený ovšem není ani vliv

neutralizačních protilátek vůči slinným enzymům (Chagas et al., 2014; Martin-Martin et al., 2018). Léze u takto imunizovaných myší jsou oproti kontrolám menší, vyvíjejí se pomaleji a mají i menší parazitární nálož (Kamhawi et al., 2000). Protektivní efekt slin potlačující rozvoj lézí byl studován na různých kombinacích zahrnujících rozdílné kmeny leishmanií a různé druhy flebotomů jak z rodu *Phlebotomus*, tak z rodu *Lutzomyia*. Ačkoli ve většině případů autoři studií skutečně prokázali efekt protekce, nejedná se o výlučný výsledek imunizací (Gholami et al., 2019). V některých případech imunizace heterologním ale i homogenním SGH nebyl imunizovaný hostitel ochráněn před následnou infekcí tak jako tomu je v případě protektivního efektu (Thiakaki et al., 2005, Gomes et al., 2008, de Moura et al., 2007). Podrobnější informace k jednotlivým studiím jsou uvedeny v tabulce níže (tab. 1).

**Tab. 1:** Souhrn studií zabývajících se potenciálním protektivním efektem imunizace slin na vývoj leishmaniových infekcí. Zahrnuty jsou informace o druhu využitém k imunizaci, způsobu imunizace (prostřednictvím sání nebo vpichu SGH), použitém zvířecím modelu, způsobu infekce a výsledku, tedy jestli imunizace vedla k protekci (+), nebo nevedla (-). Šedým podbarvením jsou označeny ty výsledky imunizací, kde byl druh využitý k imunizaci odlišný od toho využitého při infekci.

Druh flebotoma	Způsob imunizace	Model	Infekce	Protektce	Citace
<i>L. whitmani</i>	SGH	BALB/c	<i>Le. braziliensis</i> + SGH <i>L. whitmani</i>	+	(Gomes et al., 2016)
<i>L. longipaplis</i>	SGH	křeček	<i>Le. infantum</i> + SGH <i>L. longipaplis</i>	-	(Gomes et al., 2008)
			<i>Le. braziliensis</i> + SGH <i>L. intermedia</i>	+	(Tavares et al., 2011)
			<i>Le. braziliensis</i> + SGH <i>L. longipaplis</i>	+	(Tavares et al., 2011)
		BALB/c	<i>Le. braziliensis</i> + SGH <i>L. longipaplis</i>	+	(Carregaro et al., 2013)
			<i>Le. amazonensis</i> + SGH <i>L. longipaplis</i>	+	(Thiakaki et al., 2005)
		C57BL/6	<i>Le. major</i> + SGH <i>L. longipaplis</i>	+	(Xu et al., 2011)
<i>L. intermedia</i>	SGH	BALB/c	<i>Le. braziliensis</i> + SGH <i>L. intermedia</i>	-	(de Moura et al., 2007)
<i>P. papatasi</i>	Sání	BALB/c	<i>Le. major</i> + SGH <i>P. papatasi</i>	+	(Lestinova et al., 2015)
			<i>Le. major</i> + SGH <i>P. duboscqi</i>	+	(Lestinova et al., 2015)
		BALB/c, C57BL/6	<i>Le. major</i> + infekční sání <i>P. papatasi</i>	+	(Kamhawi et al., 2000)

	SGH	BALB/c, C57BL/6	<i>Le. major</i> + SGH <i>P. papatasi</i>	+	(Belkaid et al., 1998)
		BALB/c	<i>Le. amazonensis</i> + SGH <i>L. longipalpis</i>	-	(Thiakaki et al., 2005)
<i>P. duboscqi</i>	Sání	BALB/c	<i>Le. major</i> + SGH <i>P. duboscqi</i>	+	(Rohoušová et al., 2011)
		C57BL/6	<i>Le. major</i> + infekční sání <i>P. duboscqi</i>	+	(Teixeira et al., 2014)
		<i>Rhesus macaques</i>	<i>Le. major</i> + infekční sání <i>P. duboscqi</i>	+	(Guimaraes-Costa et al., 2021)
<i>P. sergenti</i>	SGH	BALB/c	<i>Le. tropica</i> + SGH <i>P. sergenti</i>	-	(Gholami et al., 2019)
			<i>Le. amazonensis</i> + SGH <i>L. longipalpis</i>	-	(Thiakaki et al., 2005)
<i>P. argentipes</i>	SGH	BALB/c	<i>Le. donovani</i> + SGH <i>P. argentipes</i>	+	(Pushpanjali et al., 2018)

Poznatky o protektivním efektu slin představují potenciální možnost pro vývoj tzv. *transmission blocking* vakcín, tedy vakcín, jejichž efekt je založen na zabránění přenosu patogenu do hostitele. V průběhu řady let se proto různí autoři zabývali a stále zabývají imunogenním potenciálem jednotlivých slinných komponent flebotomů a to i v souvislosti s manifestací leishmaniové léze. V rámci zkoumaných druhů platí, že ne všechny složky slin jsou schopny vyvolat u hostitele adaptivní imunitní odpověď a pokud ano, nemusí být nutně protektivní (Oliveira et al., 2015, 2008; Xu et al., 2011). Hovoří se také o druhové specifitě protekce, kdy imunogenní potenciál proteinu prokázaný na jednom druhu hostitele nebyl prokázán na druhu jiném (Gomes et al., 2008).

V případě rodu *Phlebotomus* se protektivní efekt prokázal po imunizaci proteiny PpSP15<sup>1</sup> druhu *P. papatasi* (Davaranah et al., 2020; Oliveira et al., 2008; Jesus G. Valenzuela et al., 2001), PdSP15 druhu *P. duboscqi* (Oliveira et al., 2015) a obdobného SP15 z druhu *P. argentipes* (Pushpanjali et al., 2018), a to na modelech BALB/c a C57BL/6 myši a také primáta *Rhesus macaques*. Do stejné proteinové rodiny patří i PsSP9 ze slin *P. sergenti*, jehož plazmid ochránil imunizovanou BALB/c myš před závažným rozvojem infekce *Le. tropica* (Gholami et al., 2019).

Co se týče rodu *Lutzomyia*, u druhu *L. longipalpis* byl protektivní efekt vůči rozvoji infekce *Le. major* prokázán v případě imunizace C57BL/6 myši hyaluronidázou LuloHya, endonukleotidázou Lundep (Martin-Martin et al., 2018) a proteinem LJM11 (patřící k YRP) (Gomes et al., 2012; Xu et al., 2011). U psů je protekce vůči infekci *Le. infantum* spjata s proteiny LJL143 (Lufaxin) a LJM17 (patřící

<sup>1</sup> Název proteinu PpSP15 je odvozen od zkratky Pp (druh flebotoma, zde *Phlebotomus papatasi*), SP (z angl. salivary protein) a molekulové velikosti, podle které se protein vyděluje na elektroforéze (~15 kDa), stejným způsobem jsou vyjádřeny i další SP

k YRP) (Collin et al., 2009). Tyto proteiny jsou zároveň i příkladem výše zmíněné druhové specifity protekce, protože jejich použití při imunizování C57BL/6 myši nebylo účinné v ochraně vůči infekci *Le. major* a to i přes to, že LJL143 vyvolával i na tomto modelu specifickou DTH reakci (Xu et al., 2011). Další molekulou, jejíž využití ve vakcinaci u CBA myši vedlo k protekci, je Maxadilan ze slin *L. longipalpis* (Morris et al., 2001). Samotná přítomnost tohoto potentního vasodilátoru v infekčním inokulu vede k výraznému zhoršení průběhu léze *Le. major* u naivních myši, nicméně pokud jím jsou myši imunizovány, jejich léze jsou několikanásobně menší a také se rychleji zhojí. U křečků *Mesocricetus auratus* působila protektivně imunizace DNA plazmidem kódujícím protein LJM19, specifický inhibitor komplementové kaskády také známý jako SALO (z angl. salivary anticomplement of *L. Longipalpis*). Vakcinace v tomto případě vedla u zvířat k ochraně před rozvojem jak VL způsobené *Le. infantum* tak i CL způsobené *Le. braziliensis* (Gomes et al., 2008; Tavares et al., 2011). Protektivní efekt u zvířat byl spojen se zvýšenou produkcí IFN $\gamma$  v lymfatické uzlině, játrech i slezině a DTH reakcí v místě sání s převážným zastoupením mononukleárních leukocytů (Davarpanah et al., 2020; Gomes et al., 2016; Oliveira et al., 2008).

Obecně lze říci, že takto popsané navozené protekce jsou charakteristické vysokým poměrem produkce IFN $\gamma$ /IL-4 v raných stádiích infekce a přítomností mononukleárních fagocytů v místě sání. V pozdějších stádiích infekce pak specifickými CD4<sup>+</sup> T lymfocyty produkujícími IFN $\gamma$  (Gholami et al., 2019; Oliveira et al., 2015, 2008). Na rozdíl od reakce na sání flebotomů, imunitní odpověď na jednotlivé slinné komponenty spojená s protekcí není doprovázena přítomností eozinofilů (Collin et al., 2009; Gholami et al., 2019).

Imunogenní efekt rekombinantních proteinů byl studován i u lidských PBMC. Stejně jako v případě studií na zvířecích modelech i v případě PBMC izolovaných z krve imunizovaných dobrovolníků došlo vlivem proteinu PdSP15 *P. duboscqi* k produkci IFN $\gamma$  (de Araujo et al., 2024). Vysoká produkce IL-10 byla ve stejné studii měřena v reakci na proteiny PduM34 (patřící k rodině proteinů PpSP32-like) a PduM35 (patřící k YRP podobným PpSP42). Naopak, protein PpSP15 ze slin *P. papatasi*, obdobný popsanému PdSP15 *P. duboscqi*, vyvolával u PBMC od imunizovaných jedinců vysokou produkci IL-10 a produkce IFN $\gamma$  byla měřena pouze v případě proteinů PpSP42, PpSP44 a PpSP36 (Tlili et al., 2018). Tyto výsledky demonstrují, že proteiny, které formují imunitní odpověď u zvířecího modelu určitým směrem, nemusí mít stejný imunogenní efekt v případě lidského imunitního systému.

## 3 Metodika

### 3.1 Zvířata

#### 3.1.1 Myši

V experimentech byly využity samice inbredního kmene BALB/c myši, které byly umístěné ve zvěřinci Katedry parazitologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy (PřF UK). Zde byly drženy za stabilních podmínek (teplota vzduchu 20-24 °C, vlhkost vzduchu 40-50 %) v plastových boxech s dostatečným množstvím podestýlky. Permanentně měly k dispozici vodu a standardizované krmivo *ad libitum*. Manipulace se zvířaty probíhala pod dohledem certifikované osoby, RNDr. Ivy Kolářové PhD a experimenty byly schválené etickou komisí PřF UK a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (projekty pokusů č. MSMT- 32011/2020-3, MSMT-11699/2022-2).

Během pokusů zabývající se *in vitro* kultivací (cíl č. 1) bylo zpracováno 6 dlouhodobě stimulovaných myši starých zhruba 1,5 roku. Ty byly využívány po dobu zhruba jednoho roku k sání kolonie druhu *Phlebotomus duboscqi*. Pokus byl proveden v jednom opakování.

V pokusech zabývajících se imunitní odpovědí u imunizovaných myši (cíl č. 2) byly využity jedinci staří přibližně 8 týdnů, ty byly rozděleny do dvou imunizovaných skupin (D2, D7) po 5 zvířatech. Stejný počet myši byl i ve dvou přidružených negativních kontrolách. Celkově tedy 20 myši na jedno opakování pokusu. Pokus byl opakován dvakrát.

V pokusech s kontextem leishmaniové infekce (cíl č. 3) byly myši staré 8 týdnů a rozděleny do 4 skupin po 6 jedincích. Celkově bylo využito 24 myši na jedno opakování pokusu. Ten byl také opakován dvakrát.

#### 3.1.2 *Phlebotomus duboscqi*

Kolonie druhu *Phlebotomus duboscqi* je součástí chovné sbírky laboratoře Biologie hmyzích vektorů na Přírodovědecké fakultě UK. Kolonie *P. duboscqi* pochází ze Senegalu a v laboratoři je držena od roku 1994. Po generace je populace udržována ve stabilních podmínkách zahrnujících definovanou teplotu (25-28 °C), vlhkost (70–95 %), světelný režim (14 hodin světlo : 10 hodin tma) i vhodné krmivo. Všechna larvální stádia (L1-L4) jsou chována v plastových boxech udržující toto stabilní prostředí (viz výše) a krmena rozemletými králíčími exkrementy. Dospělci jsou drženi v sítích natažených na kovových konstrukcích a přetažených igelitem k udržení vlhkosti, jejíž zdrojem je navlhčená vata. Obě pohlaví jsou krmena 50% roztokem cukru a samice jsou navíc za účelem kladení vajec jednou či dvakrát týdně nechány sát na uspaných myších (Volf and Volfova, 2011). Složení anestezie jakož i dalších roztoků uvedených v kapitole Metodika je uvedeno v tab. 8 na konci této kapitoly.

## 3.2 *In vitro* produkce protilátek v kultuře splenocytů

Cílem experimentů bylo zjistit využitelnost dlouhodobě imunizovaných myši pro *in vitro* produkci protilátek v kultuře splenocytů a zmapovat vliv přítomného antigenu v médiu (cíl č. 1).

### 3.2.1 Design experimentu

Pro experiment bylo využito šest dlouhodobě imunizovaných myši z kolonie flebotomů *P. duboscqi*. Ty byly využívány zhruba každých 14 dní po dobu přibližně jednoho roku jako zdroj krve pro samice flebotomů a tím imunizovány. Týden po posledním sání byla myšim odebrána krev (viz kapitola 3.3.3.1) a slezina. Z každé myši byla připravena kultura splenocytů a buňky byly stimulovány pomocí slinného homogenátu (SGH) *P. duboscqi*, heterologním antigenem (SGH *L. longipalpis*) nebo ponechány bez stimulace jako negativní kontrola. Příprava SGH viz kap. 3.3.6.2 a 3.4.4.1. O kulturu bylo pečováno dle textu níže a následně bylo médium spolu se sérem vyšetřeno na přítomnost protilátek metodou ELISA (viz kapitola 3.3.6) pro antigen ve formě jak SGH *P. duboscqi*, tak pro SGH *L. longipalpis*.

### 3.2.2 Typ buněk

Slezina je sekundárním lymfatickým orgánem a jako taková zajišťuje antigenně specifickou imunitní odpověď. Díky své velikosti představuje výborný zdroj různorodých buněk, splenocytů, zahrnujících právě i leukocyty podílející se na produkci protilátek. Splenocyty nebyly pro experimenty nijak sortovány a byla využita jejich heterogenní suspenze.

### 3.2.3 Příprava kultury

Myši byly hluboce uspány a v laminárním boxu jim byla odebrána slezina a přenesena do sterilního kultivačního média (tab. 8). Po celou dobu probíhala práce s tkáněmi a buňkami na ledu a za sterilních podmínek v laminárním boxu. Slezina byla mechanicky homogenizována pomocí plastových homogenizátorů a přefiltrována přes 70 $\mu$ m sítko (Cell Strainer, 70  $\mu$ m, REF: 15-1070, BIOLOGIX) do 50ml plastové zkumavky Falcon. Sítko se kultivačním médiem promylo do falkony a ta se doplnila tímto médiem do 25 ml. Zkumavka se stočila (10 min, 350g, 4°C; Heraeus Megafuge 8R, Thermo Scientific™) a sediment se resuspendoval ve 2 ml kultivačního média. Koncentrace takto připraveného homogenátu se změřila na přístroji Countess (default mode; Invitrogen™ Countess™ 3 Automated Cell Counter) a zásobní roztok se naředil tak, aby jeho koncentrace odpovídala 10<sup>6</sup> buněk na 100  $\mu$ l. Posléze se buňky v objemu 100  $\mu$ l na jamku nanasy na 96 jamkovou destičku (REF: M0812, CELLSTAR® TC, Sigma-Aldrich). Jamky bez přidaného antigenu se doplnily kultivačním médiem do objemu 200  $\mu$ l/jamku. Jamky, kde byly buňky stimulovány jedním či druhým typem SGH se doplnily do 200  $\mu$ l roztokem s koncentrací 0,5 žlázy/100  $\mu$ l. Inkubace probíhala ve 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> atmosféře po dobu 9 dnů. Po třech dnech od začátku kultivace byly všechny jamky doplněny o 50  $\mu$ l kultivačního média. Po uplynutí požadované doby bylo médium odebráno do zkumavek a zamraženo při -20 °C pro následnou analýzu. Kultivační protokol vycházel ze publikovaných studií (Černyšiov et al., 2010; Uthoff and Böldicke, 1993).

### 3.3 Imunitní odpověď u imunizované myši

Cílem experimentu bylo zmapovat buněčnou odpověď v místě sání podílející se na protektivním efektu slin flebotomů ve vztahu k průběhu leishmaniózy (cíl č. 2). Za tímto účelem byly myši imunizovány sáním *P. duboscqi* (jako podmínka vzniku protektivního efektu) a ve dvou různých časových odstupech od posledního sání bylo v místě sání analyzováno zastoupení infiltrovaných leukocytů. Experiment probíhal v širším kontextu souvisejících pokusů zabývajících se načasováním infekce *Le. major* vůči imunizaci slinami *P. duboscqi* (v návaznosti na diplomovou práci Jelínková 2022).

#### 3.3.1 Design experimentu

Imunizované myši byly rozděleny do dvou skupin. Skupina D2 byla usmrcena a cytometricky analyzována dva dny po posledním sání a skupina D7 sedm dní od posledního sání. Obě skupiny imunizovaných myši byly doprovázeny negativní kontrolou, která imunizována nebyla.

Myši byly imunizovány prostřednictvím sání *P. duboscqi* a to tak, že bylo umožněno flebotomům sát pouze na uších (obr. 1), jejichž tkáň byla určena k následné analýze. Imunizační sání proběhlo celkem třikrát s týdenním odstupem mezi jednotlivými expozicemi (schéma 2). Po posledním sání byly myši s ohledem na konkrétní skupinu (D2, D7) usmrceny a následně byl jeden ušní boltec analyzován pomocí cytometrie a druhý ušní boltec byl uložen do fixačního roztoku pro následnou histologickou analýzu. Míra navozené imunizace byla stanovena vyšetřením séra/plazmy metodou ELISA na protilátky se specifitou proti slinným proteinům *P. duboscqi*.

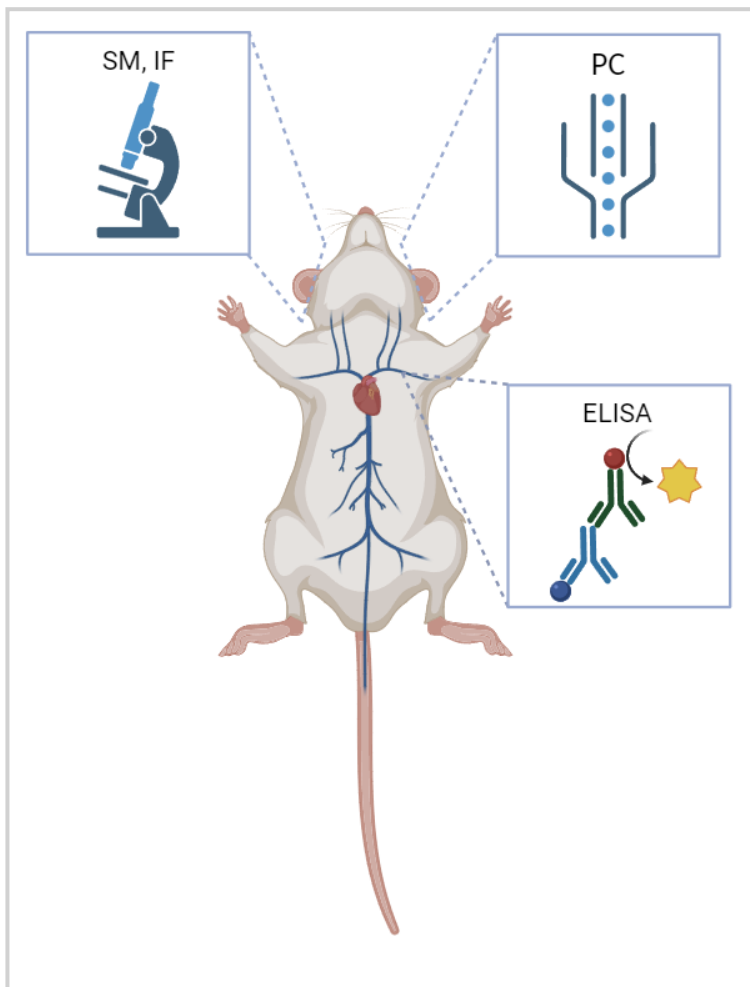
#### 3.3.2 Proces imunizace

Imunizace probíhala prostřednictvím sání 20 neinfikovaných samic *P. duboscqi*. Hmyz byl minimálně 5 dní starý, krmen pouze cukernou směsí. Každá myš byla uspána intraperitoneálně vpravenou anestezií (tab. 8) a vložena do sítě s připraveným množstvím samic. K ochraně před sáním na nežádoucích místech, byla každá myš zabalena do textilie tak, aby zůstaly odhaleny pouze uši (obr. 1). Oči myši byly chráněny před vyschnutím aplikací gelu (RecuGel, Bausch&Lomb). Sítě s myšmi byly ponechány ve standardizovaných podmínkách (teplota 25-26 °C, vlhkost 50 %) po dobu 1 hodiny, během které byly kryty tmavou látkou tak, aby byly flebotomové stimulováni k sání, jako tomu je v přirozeném prostředí. Po uplynutí požadovaného času byly myši ze sítí vyndány a nasátí flebotomové spočítáni.

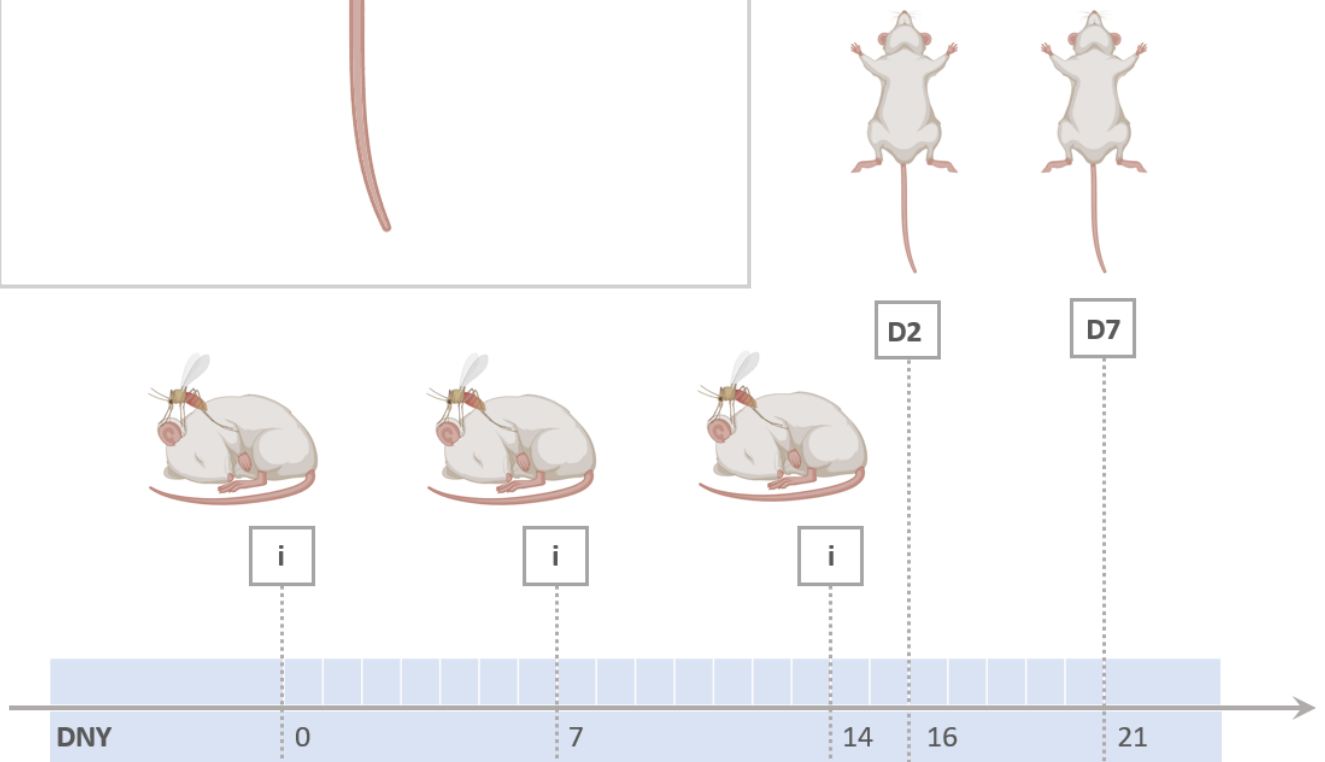
**Obr. 1:** Zakrytá myš při imunizačním sání.



Schéma 2:



Graficky znázorněný experimentální design a imunizační schéma. Na časové ose jsou vyznačeny dny, ve kterých probíhala imunizační sání (i) a následné zpracování tkání v časech dva dny od posledního sání (D2) a sedm dní od posledního sání (D7). Metodické zpracování jednotlivých tkání je vyobrazeno na horním schématu myši. Pravé ucho bylo analyzováno histologicky pomocí světelné mikroskopie (SM) a imunofluorescence (IF). Buňky levého ucha byly měřeny průtokovou cytometrií (PC) a sérum myši bylo ELISA metodou vyšetřeno na přítomnost protilátek. Součástí schématu je tabulka s průměrnými počty nasátých samic  $\pm$  směrodatná odchylka pro jednotlivé imunizace v jednotlivých opakováních, která je umístěna pod časovou osou.



opakování	skupina	1. imunizace	2. imunizace	3. imunizace
1.	D2	18 $\pm$ 2	16 $\pm$ 2	17 $\pm$ 1
	D7	16 $\pm$ 2	17 $\pm$ 2	18 $\pm$ 1
2.	D2	17 $\pm$ 1	18 $\pm$ 1	19 $\pm$ 2
	D7	16 $\pm$ 2	19 $\pm$ 2	19 $\pm$ 2



### 3.3.3 Vzorky tkání

#### 3.3.3.1 Krev

Krev byla myším v průběhu experimentu odebrána na začátku a na konci pokusu. Při prvním odběru, před imunizací, byla myším odebrána krev pomocí heparinizovaných kapilár (BRAND®, REF: 749311) z ocasu. Po stočení kapilár (2000 g, 10 min; Thermo Scientific HERAEUS PICO 17) byla separovaná plazma oddělena do zkumavek a uskladněna. Při ukončování experimentu byla hluboce uspaným myším odebrána tepenná krve z levé podklíčkové cévy a následně stržen vaz. Zkumavky s krví byly po dobu jedné hodiny ponechány k vysrážení séra za pokojové teploty a následně stočeny (2000 g, 10 min; Eppendorf MiniSpin). Sérum i plazma byly zamraženy a uskladněny při teplotě - 20 °C.

#### 3.3.3.2 Ušní boltce

Obě uši byly odebrány po usmrcení myši tak, že byla odstřižena pouze nechlupatá část boltce. Levé ucho bylo zpracováno cytometricky, pravé ucho bylo uloženo do zinkové fixáže (tab. 8) a zpracováno na histologii.

### 3.3.4 Histologie

#### 3.3.4.1 Příprava vzorků

Uši byly odstřiženy a vloženy do zkumavky s 2 ml zinkové fixáže (tab. 8). Následně byly zkumavky umístěny na rotátor (Roto-Mini™ Plus), kde byly ponechány po dobu 1 hodiny (režim Mix, 15 rpm) a následně uskladněny. Po čtyřech dnech byla zinková fixáž vyměněna a vzorky se opět nechaly 1 hodinu na rotátoru. V zinkové fixáži byly vzorky ponechány až do zpracování. Před zaléváním do parafinu se vzorky třikrát promyly v PBS a částečně odvodnily v alkoholové řadě (tab. 2). Uskladněné v 70% ethanolu byly následně vzorky přeneseny na histologické pracoviště ÚMG<sup>2</sup>, kde byly umístěny do histologických kazet (HISTOSETTE, REF: M490-4, Simport, 41 × 28 × 7 mm), zcela odvodněny a prosyceny parafínem v tkáňovém procesoru (HistoCore PEGASUS). Zalévání do parafinových bloků probíhalo na parafínové zalévací lince (Leica HistoCore Arcadia H) a po ztuhnutí vosku byly bloky krájeny na mikrotomu (Microtome Leica RM2255) na řezy o tloušťce 6-8 μm, které byly přeneseny na mikroskopická sklička (Surgipath® X-tra® Microscope Slides, Leica) a do druhého dny ponechány k zafixování na vyhřívané ploténce při teplotě 42 °C.

Pro první opakování byly na histologii zpracovány uši od všech myší všech skupin (4 skupiny; 5 myší/skupina). U druhého opakování byly z časových důvodů na histologii zpracovány uši pouze od dvou myší z každé skupiny.

---

<sup>2</sup> Histologická laboratoř, Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i., <https://www.img.cas.cz/skupina/histologicka-laborator/>

**Tab. 2:** Tabulka shrnující zpracování tkáně pro zalití do parafínu. Veškerá manipulace probíhala za pokojové teploty.

manuálně	zinková fixáž	2×1 hod na rotátoru	uskladnění
	PBS	3×15 min na rotátoru	
	30% etanol	1 hod na rotátoru	
	50% etanol	1 hod na rotátoru	
	70% etanol	1 hod na rotátoru	uskladnění
HistoCore PEGASUS	odvodnění, parafínová infiltrace	přes noc	
Leica HistoCore Arcadia H	zalití do parafínového bloku		

### 3.3.4.2 Barvení Hematoxylin-Eozinem

Barvení řezů Hematoxylinem-Eosinem (H-E) probíhalo dle tab. 3. Před samotným barvením se nejprve procesem deparafinizace preparát zavodnil, následně se nabarvil H-E a nakonec se opětovně odvodnil a zamontoval do solakrylu.

**Tab. 3:** Tabulka shrnující zpracování řezů pro barvení H-E

deparafinizace	xylén	3×5 min
	isopropanol:xylén	1×5 min
	absolutní alkohol	2×5 min
	96% alkohol	1×3 min
	70% alkohol	1×3 min
	dH <sub>2</sub> O	1×3 min
barvení	hematoxylin	6 min
	omytí pod tekoucí vodou	10 sec
	diferenciace v 0,1% HCl	10 sec
	omytí pod tekoucí vodou	10 sec
	eosin	30 sec
	omytí pod tekoucí vodou	30 sec
dehydratace	dH <sub>2</sub> O	1×3 min
	96% alkohol	1×3 min
	absolutní alkohol	2×5 min
	isopropanol:xylén	1×5 min
	xylén	3×5 min
	xylén (čistý)	1×5 min
	montování do solakrylu	

### 3.3.4.3 Imunofluorescence

Řezy pro imunofluorescenční značení byly vybrány na základě pozitivní infiltrace viditelné díky H-E barvení. Barvení řezů pro imunoznačení probíhalo dle tab. 4. Podobně jako v případě H-E došlo nejprve k deparafinizaci a zavodnění. Poté se řezy promyly v 0,1M PBS (tab. 8) a následně byly nechány 1 hodinu v permeabilizačním roztoku (tab. 8). Následovala inkubace s roztokem primárních nekonjugovaných protilátek (pAb). Ty byly ředěny do 0,1% BSA/PBS, pAb proti inducibilní NO syntetáze (rat anti-mouse iNOS) v poměru 1:200 a pAb proti myeloperoxidáze (rabbit anti-mouse MPO) v poměru 1:150 (vše tab. 8). Po noční inkubaci byly řezy opět promyty a po 4 hodiny ponechány inkubovat v roztoku sekundárních protilátek, které byly ředěny do 1% BSA/PBS, sekundární Ab proti iNOS (goat anti-rat IgG Alexa fluor 568) v poměru 1:1000 a sekundární Ab proti MPO (goat anti-rabbit IgG FITC 488) v poměru 1:40 (vše tab. 8). Ke konci se řezy opět promyly a následně zamontovaly do Vectashieldu (Antifade Mounting Medium with DAPI, tab. 8).

**Tab. 4:** Tabulka shrnující zpracování řezů pro imunofluorescenční barvení

deparafinizace	xylén	2×10 min
	isopropanol:xylén	1×10 min
	absolutní alkohol	2×10 min
	96% alkohol	1×10 min
	70% alkohol	1×10 min
	50% alkohol	1×10 min
	dH <sub>2</sub> O	2×5 min
barvení	promytí v 0,1M PBS	3×10 min
	inkubace v permeabilizačním roztoku	1 hodina
	inkubace v primární Ab	přes noc
	promytí v 0,1M PBS	3×10 min
	inkubace v sekundární Ab	4 hodiny
	promytí v 0,1M PBS	3×10 min
	montování do Vectashield	

### 3.3.5 Průtoková cytometrie

#### 3.3.5.1 Izolace buněk z ucha

Nechlupatá část boltce byla odebrána z usmrcených myší. Ucho bylo pomocí pinzet rozděleno na ventrální a dorzální list, které se vložily do připravené zkumavky s 1 ml enzymatické směsi (tab. 8). Před začátkem samotné inkubace se obě půlky ucha rozstříhaly na kousky přibližně o rozměrech 3×3 mm a celá směs se 20× protáhla přes ustřiženou špičku pro objem 1000  $\mu$ l. Takto připravené vzorky se nechaly po dobu 50 minut inkubovat na termobloku (37 °C, 800 otáček; Thermo–Shaker TS-100C, Biosan). V polovině času inkubace a také na konci inkubace se směs opět 20× protáhla přes ustřiženou špičku. Po uplynutí daného času se vzorky přefiltrovaly přes 70 $\mu$ m sítko (Cell Strainer 70  $\mu$ m, SPL, REF: 93070) do 50ml falkony a ke směsi se přidaly 3 ml 3%FBS/PBS s EDTA (tab. 8). Následně se vzorky stočily (10 min, 350g; Heraeus Megafuge 8R, Thermo Scientific™), opět se resuspendovaly ve 4 ml 3%FBS/PBS s EDTA a podruhé stočily (5 min, 350g; Heraeus Megafuge 8R, Thermo Scientific™) a resuspendovaly do objemu 250  $\mu$ l. U takto zpracovaných buněk se změřila jejich koncentrace na přístroji Countess (default mode; Invitrogen™ Countess™ 3 Automated Cell Counter) a následně byly připraveny k barvení. Po celou dobu trvání protokolu byly buňky drženy na ledu.

#### 3.3.5.2 Příprava vzorku

Jednotlivé experimentální vzorky a kontroly byly připraveny do objemu 100  $\mu$ l s výslednou koncentrací 10<sup>6</sup> buněk. Panel připravovaných typů vzorků je uveden v tab. 5. Pro SS kontroly (z angl. single-stained) byly namísto buněk využity kuličky (Beckman Coulter, REF: B22804), jejichž příprava pro měření je odlišná a je dále uvedena v textu níže. Vzorky s buňkami o objemu 50  $\mu$ l, které byly dále barveny protilátkami s fluorochromy (experimentální vzorky a FMO), byly nejprve inkubovány po dobu 15 minut s blokující protilátkou proti Fc receptorům (anti-CD16/32, Thermo Scientific™, REF: 14-0161-85) k zabránění nespecifické vazby. Po uplynutí požadované doby byl k buněčnému homogenátu přidán barvicí roztok protilátek v 3%FBS/PBS s EDTA do celkového objemu 100  $\mu$ l na vzorek. V tab. 6 jsou uvedeny použité protilátky proti jednotlivým markerům, flurochrom, se kterým jsou konjugovány a koncentrace použité pro inkubaci s buněčným homogenátem. Takto připravené vzorky se ponechaly 45 minut inkubovat ve tmě při 7 °C. Následně byly nenavázané protilátky odmyty stočením (5 min, 350g; Heraeus Megafuge 8R, Thermo Scientific™) a resuspendováním ve 100  $\mu$ l 3%FBS/PBS s EDTA. Před samotným měřením byl pro kontrolu viability přidán Hoescht 33258 (tab. 8) v objemu 12,5  $\mu$ l do výsledné koncentrace 1  $\mu$ g/ml. Inkubace s Hoechstem trvala 10 minut, ve tmě a při pokojové teplotě.

K přípravě SS kontrol byla využita souprava s kompenzačními kuličkami zahrnující pozitivní kuličky vázající barvicí protilátku a negativní kuličky, které protilátky neváží. Každá jedna SS kontrola se skládá z jedné kapky pozitivních kuliček a jedné kapky negativních. Tento objem se následně inkuboval s přidanou barvicí protilátkou v koncentraci odpovídající objemu na 10<sup>6</sup> buněk (viz tab. 6). Inkubace proběhla ve tmě po dobu 20 minut, poté byl ke každé SS kontrole přidán 1 ml 3%FBS/PBS s EDTA (tab. 8), zkumavky byly stočeny (6 min, 300 g; Heraeus Megafuge 8R, Thermo Scientific™) a

následně resuspendovány do 600 µl PBS, tím se odmyly nenavázané protilátky podobně jako v případě výše popsaných buněk.

**Tab. 5:** Tabulka shrnující připravované typy vzorků

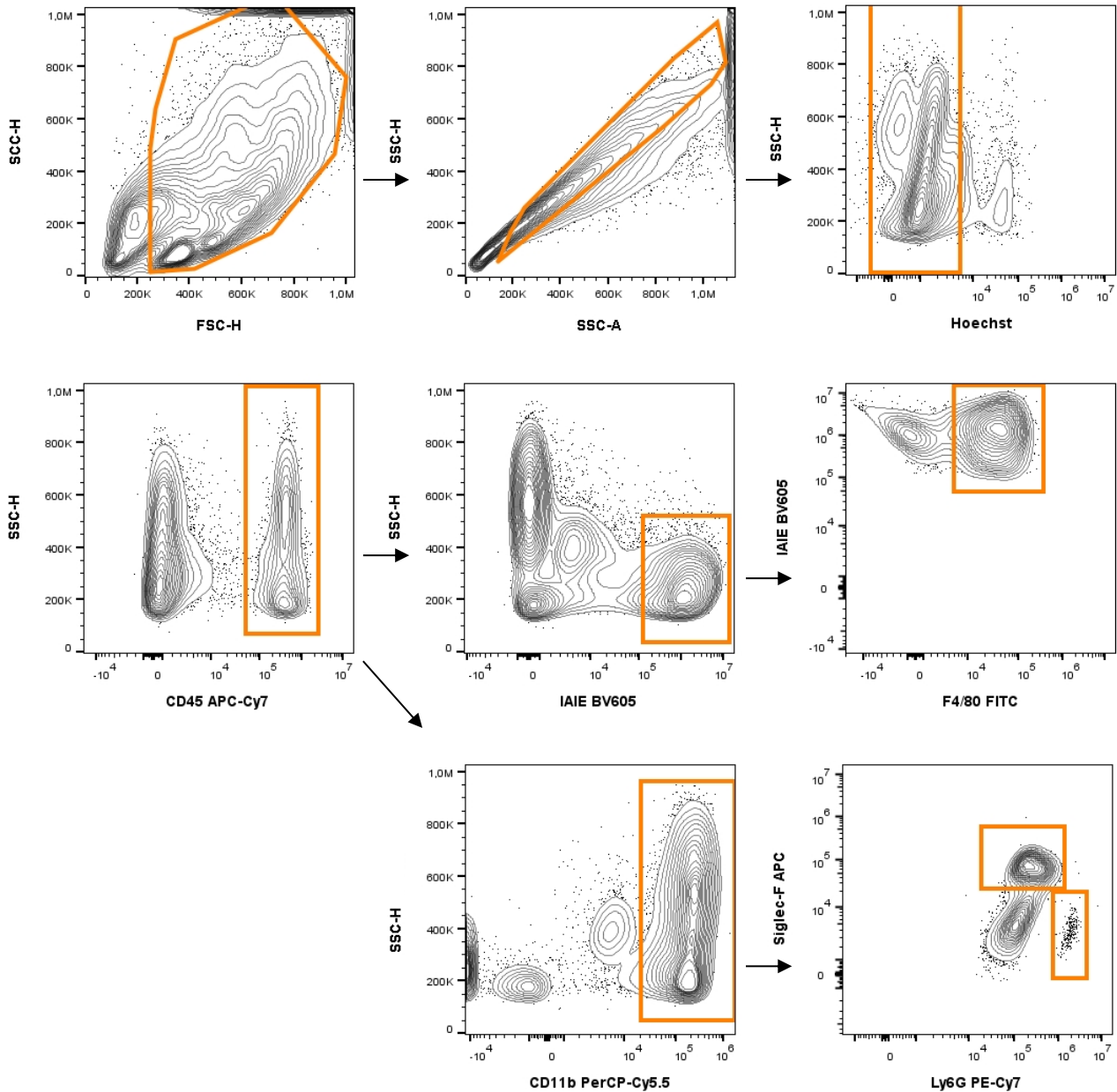
typ vzorku	anti-CD16/32	protilátky s fluorochromy	Hoechst
BLANK	-	-	-
viabilita	-	-	+
FMO (angl. zkratka Fluorescence Minus One) kontroly	+	všechny protilátky krom jedné	+
SS (angl. zkratka single-stained) kontroly	+	jedna protilátka	-
experimentální vzorky	+	kompletní panel protilátek	+

**Tab. 6:** Tabulka shrnující informace k použitým fluorochromům

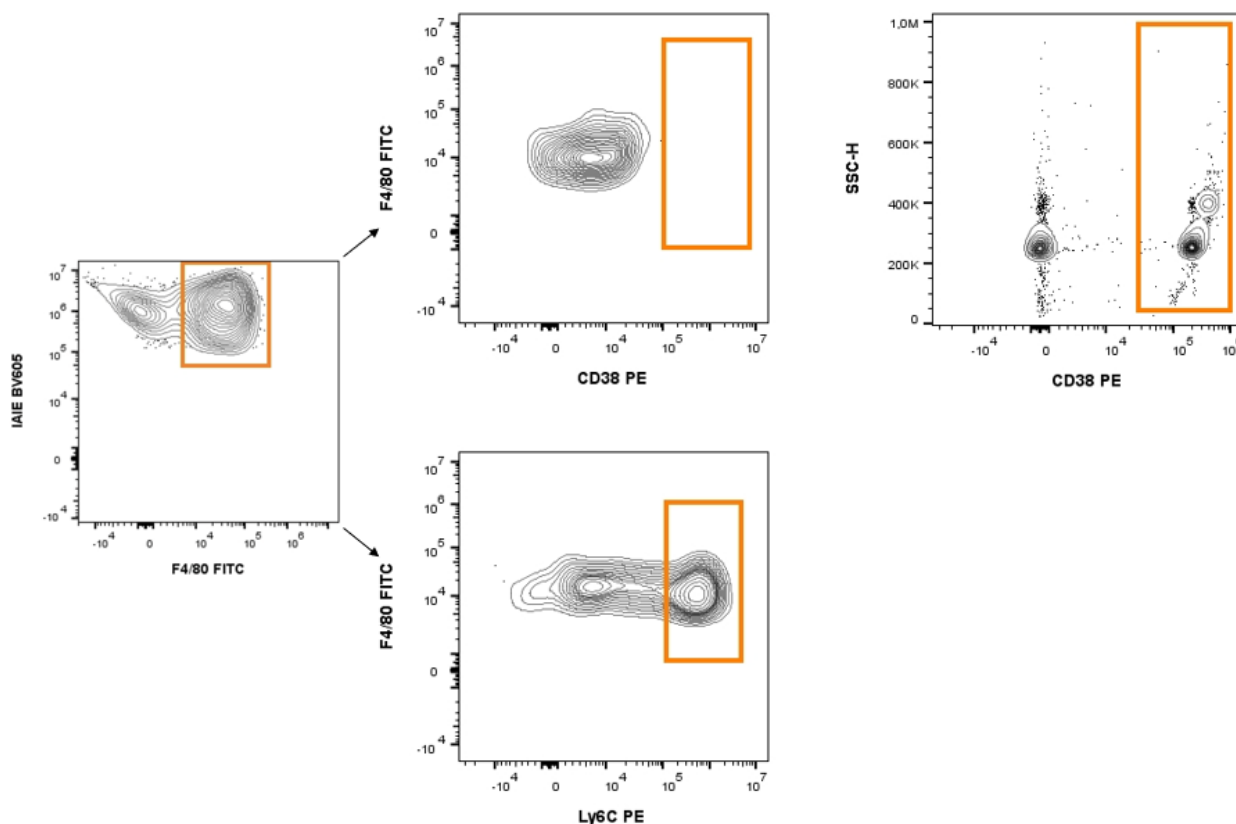
Marker	Fluorochrom	Množství na 10 <sup>6</sup> buněk ve 100 µl		REF, výrobce
		µg	µl	
CD11b	PerCP-Cy5.5	0,25 µg	1,25 µl	101227, Biolegend
Ly6G	PE-Cy7	0,25 µg	1,25 µl	127617, Biolegend
SiglecF	APC	0,25 µg	1,25 µl	155507, Biolegend
F4/80	FITC	1,00 µg	2,00 µl	157310, Biolegend
CD38	PE	0,06 µg	0,30 µl	102707, Biolegend
Ly6C	PE	0,25 µg	1,25 µl	128007, Biolegend
I-A/I-E	Brilliant Violet 605	0,4 µg	2,00 µl	107639, Biolegend
CD45	APC-Cy7	0,25 µg	1,25 µl	103116, Biolegend

### 3.3.5.3 Gatovací strategie

**Schéma 3:** Gatovací strategie pro vybrané leukocyty myeloidní linie. Buňky byly nejprve vyselektovány na základě velikosti (FSC) a granularity (SSC). Dublety a shluky leukocytů byly odfiltrovány srovnáním výšky (SSC-H) a plochy (SSC-A) signálu. Živé buňky byly vybrány na základě negativního barvení pro Hoechst a leukocyty na základě pozitivního barvení na CD45. Z  $CD45^+$  buněk byla vybrána populace pozitivní na MHC II gp (I-A/I-E<sup>+</sup>) a z ní následně buňky pozitivní na F4/80. Paralelně byla z  $CD45^+$  buněk vybrána myeloidní linie leukocytů na základě přítomného CD11b. Z této populace byly vyselektovány buňky pozitivní na SiglecF (SiglecF<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>) a buňky pozitivní na Ly6G (SiglecF<sup>-</sup>Ly6G<sup>+</sup>). Gatovací strategie vychází z publikovaného protokolu (Liu et al., 2020).



**Schéma 4:** Gatovací strategie pro navazující markery CD45<sup>+</sup>IA/IE<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> populace. Ve dvou paralelních měřeních byly buňky značeny pro Ly6C nebo CD38. Marker CD38 nebyl na buňkách exprimován, pro srovnání je proto ve schématu SS kontrola pro příslušný flurochrom.



**Tab. 7:** Tabulka shrnující buněčné typy s příslušnou skladbou povrchových markerů využitých v gatovací strategii.

Skladba markerů	Buněčný typ
CD45 <sup>+</sup>	leukocyty (WBC, z angl. <i>white blood cells</i> )
CD45 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup>	myeloidní linie leukocytů (CD11b <sup>+</sup> )
CD45 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> Ly-6G <sup>+</sup>	neutrofilly (NEUT)
CD45 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> SiglecF <sup>+</sup>	eozinofily (EOS)
CD45 <sup>+</sup> IA/IE <sup>+</sup>	antigen prezentující buňky (APC)
CD45 <sup>+</sup> IA/IE <sup>+</sup> F4/80 <sup>+</sup>	monocyty/makrofágy (Mo/MΦ)
CD45 <sup>+</sup> IA/IE <sup>+</sup> F4/80 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup>	M1 makrofágy
CD45 <sup>+</sup> IA/IE <sup>+</sup> F4/80 <sup>+</sup> Ly6C <sup>+</sup>	monocyty

### 3.3.6 Detekce protilátek

#### 3.3.6.1 ELISA a-SGH protilátek IgG/IgG1/IgG2a

Detekce specifických protilátek probíhala metodou ELISA (angl. zkratka enzyme-linked immunosorbent assay) na 96 jamkové mikrotitrační destičce (Thermo Scientific™, REF: 478042). Ta byla předem potáhnutá antigenem inkubací s SGH (viz kapitola 3.3.6.2.) v koutovacím roztoku (tab. 8) v koncentraci přibližně 0,1 žlázy<sup>3</sup> na 100 µl roztoku (11 žlaz na 96 jamkovou destičku). Objem 100 µl představuje pracovní míru jedné jamky, která byla využita při pipetování každého dalšího roztoku (tj. 100 µl roztoku/jamka). Inkubace proběhla přes noc, ve 4 °C. Druhý den byla destička dvakrát promyta v PBS-TWEEN (tab. 8) a povrch jamek byl pro zabránění nespecifické vazby protilátek zablokován inkubací v 6% mléce (tab. 8) v PBS-TWEEN po dobu 1 hodiny ve 37 °C. Následně byla destička třikrát promyta v PBS-TWEEN a poté přidána primární protilátka (sérum či plasma z pokusných myší – viz výše) zředěná v poměru 1:200 v 2% mléku (tab. 8). Inkubace probíhala v 37 °C po dobu 1,5 hodiny. Po skončení inkubace byla destička promyta od nenávaných protilátek, pětkrát v PBS-TWEEN, a následně byl přidán roztok se sekundární protilátkou. V případě celkového IgG (Goat anti Mouse IgG) byla protilátka ředěna v poměru 1:1000 v PBS-TWEEN a inkubace probíhala 45 minut, v případě podtříd IgG bylo ředění 1:1000 u IgG1 (Goat anti Mouse IgG1) a 1:2000 u IgG2a (Goat anti Mouse IgG2a) a inkubace probíhala 2 hodiny. Po uplynutí stanoveného času byla destička šestkrát promyta v PBS-TWEEN a do jamek byl přidán substrátový roztok s OPD a peroxid vodíku (vše tab. 8). Destička s probíhající reakcí byla v ochraně před světlem zakryta alobalem. Po uplynutí přibližně 6 minut byla reakce zastavená přidáním 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Barevný produkt reakce byl stanoven spektrofotometricky na přístroji Tecan InfiniteM200 při vlnové délce 492 nm.

#### 3.3.6.2 SGH

Slinné žlázy byly získány pitvou samic *P. duboscqi* starých 3-5 dní a umístěny do fyziologického roztoku v množství 20 žlaz na 20 µl roztoku. Skladovány byly ve zkumavkách v -20 °C až do použití. SGH pro koutovací roztok byl připraven trojnásobným zmražením v tekutém dusíku a následným rozmražením.

#### 3.3.6.3 ELISA IgE

ELISA celkového IgE probíhala na 96 jamkové mikrotitrační destičce (Thermo Scientific™, REF: 478042), která byla přes noc nechána k pokoutování roztokem anti-IgE (rat anti-mouse IgE) v koutovacím roztoku (tab. 8) v koncentraci 2 µg/ml. Druhý den proběhlo promytí, blokování a opětovné promytí viz kapitola ELISA a-SGH-IgG/IgG1/IgG2a. Séra či plazma byly naředěny v koncentraci 1:50 a nechány na destičce přes noc ve 4 °C. Další den byly jamky promyty a poté byl přidán roztok sekundární protilátky (goat anti mouse IgE:HRP) v poměru 1:200, který byl ponechán k inkubaci po

---

<sup>3</sup> Přibližné množství proteinu v 1 žláze *P. duboscqi* je 0,34 µg (nepublikováno)

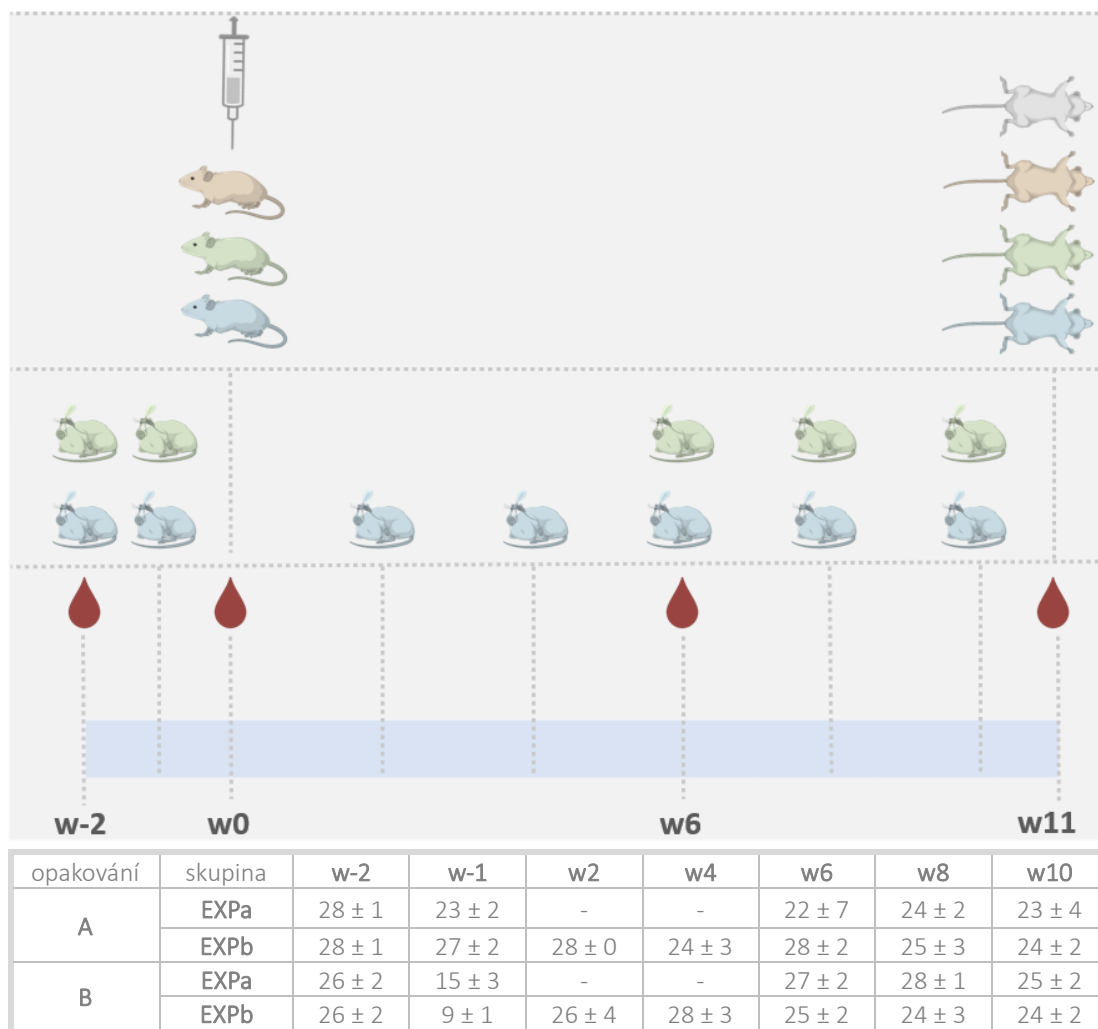


dobu dvou hodin ve 37 °C. Následně protokol probíhal dle výše popsané metody ELISA a-SGH-IgG/IgG1/IgG2a.

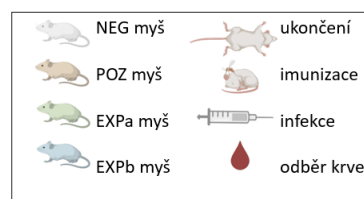
### 3.4 Imunitní odpověď u imunizované myši v kontextu leishmaniové infekce

Cílem experimentu bylo zmapovat imunitní odpověď u infikované myši *Le. major* v kontextu různých imunizačních schémat (cíl č. 3).

Schéma 5:



Graficky znázorněné schéma experimentu popsaného v kapitole 3.4. Horizontálně je umístěna časová osa se šrafovaně vyznačenými týdny (w), ve kterých probíhaly jednotlivé kroky v experimentu tak jak jsou zobrazeny v legendě. Součástí schématu je tabulka s průměrnými počty nasátých samic ± směrodatná odchylka pro jednotlivé imunizace v jednotlivých opakováních, která je umístěna pod časovou osou.



### 3.4.1 Design experimentu

Myši byly rozděleny do čtyř skupin, dvě skupiny myši (EXPa, EXPb) byly infikovány a vystavené sání, jedna skupina (POZ) byla pouze infikována a poslední skupina (NEG) nebyla infikována ani vystavena následnému sání a sloužila jako negativní kontrola. Design experimentu je zobrazen na schématu 5.

V čase w0 byly určené skupiny myši (EXPa, EXPb, POZ) infikovány intradermálně vpraveným infekčním inokulem popsaným níže. U imunizovaných skupin (EXPa, EXPb) infekci předcházelo imunizační sání *P. duboscqi* k navození protektivního efektu se začátkem dva týdny před infekcí (w-2). To proběhlo celkem dvakrát s týdenním intervalem a dle postupu popsaného v kapitole 3.3.2. Skupina EXPb byla následně vystavená sání každý druhý týden od infekce po celou dobu experimentu. Skupina EXPa byla vystavena sání každý druhý týden pouze v druhé polovině trvání experimentu se začátkem v čase w6. Ukončení experimentu pro všechny skupiny proběhlo 11. týden po infekci (v čase w11). Myším byly odebrány uši k analýze pomocí cytometrie a qPCR, jedno ucho z každé skupiny bylo uloženo do zikové fixáže pro následnou histologickou analýzu. Lymfatické uzliny a slezina byly určeny k analýze cytometrií a qPCR, ze sleziny byla připravena kultura splenocytů. Krev byla myším odebrána v časech w-2, w0, w6 a w11 a sérum/plazma bylo vyšetřeno metodou ELISA. Velikost lézí byla měřena každý týden od infekce až do ukončení experimentu a určena jako součet lézí na obou uších, které byly jednotlivě počítány jako plocha elipsy. Součástí této diplomové práce jsou výsledky kultivačních pokusů a ELISA stanovující protilátky se specifitou proti slinným proteinům *P. duboscqi*, které jsou zasazeny do kontextu velikosti lézí v čase w11. Experiment byl proveden ve dvou opakováních.

### 3.4.2 Infekční inokulum

Infekční inokulum bylo připraveno za sterilních podmínek jako směs střev *P. duboscqi* s ~10 denní infekcí *Le. major* LV561 (MHOM/IL/67/LRC-L137 JERICHO II) a SGH *P. duboscqi* ve fyziologickém roztoku. Koncentrace pak odpovídala  $10^3$  *Le. major* (forma metacyklických promastigotů) a 0,5 žlázy v objemu 5  $\mu$ l na ucho. Negativní myši byly injikovány 5  $\mu$ l fyziologického roztoku. Metacyklické promastigoti byly počítány v Bürkerově komůrce, určujícím znakem byl tvar buňky a dlouhý bičík.

*Le. major* LV561 (MHOM/IL/67/LRC-L137 JERICHO II) je součástí kryobanky laboratoře Biologie hmyzích vektorů na Přírodovědecké fakultě UK. Po rozmražení je kultura uchovávána v kultivačním médiu (tab. 8) při 23 °C a každých 5-7 dní projde pasáží. Před použitím je kultura dvakrát stočena (3500 g, 5 min; Eppendorf MiniSpin) a resuspendována ve sterilním fyziologickém roztoku.

### 3.4.3 Detekce a-SGH protilátek

Stanoveny byly protilátky proti slinným antigenům třídy IgG a podtříd IgG1 a IgG2a. Protilátky byly stanoveny metodou ELISA ze séra či plazmy separované z krve odebrané v průběhu experimentu ve čtyřech různých časech – před imunizací (w-2), při infekci (w0), v průběhu experimentu (w6) a na konci

experimentu (w11). V prvních třech odběrech byla myším krev odebrána pomocí heparinizovaných kapilár a při ukončování experimentu z levé podklíčkové cévy. Celý postup odběru krve a následného zpracování na sérum či plazmu je popsán v kapitole 3.3.3, detekce a-SGH protilátek pak v kapitole 3.3.6.

### 3.4.4 Příprava kultury

Kultura splenocytů byla připravena dle kapitoly 3.2.3 do koncentrace  $10^6$  buněk na 50  $\mu$ l. Kultivace probíhala na 24 jamkové destičce (CELLSTAR® TC; REF: 650160) a z každého vzorku byla buněčná suspenze nanášena do tří jamek v objemu 50  $\mu$ l na jamku. Jedna jamka byla ponechána bez stimulace a doplnilo se do ní kultivační médium (tab. 8) do celkového objemu 100  $\mu$ l na jamku. Další jamka byla doplněna o 50  $\mu$ l suspenze solubilního leishmaniového antigenu (SLA) v kultivačním médiu a k poslední jamce byl přidán roztok SGH v kultivačním médiu v objemu 50  $\mu$ l na jamku. Příprava obou přidávaných antigenů je popsána v následující podkapitole. Inkubace probíhala ve 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> atmosféře po dobu 48 hodin. Po uplynutí požadované doby bylo médium odebráno do zkumavek a zamraženo při -20 °C pro následnou analýzu.

#### 3.4.4.1 Antigeny SLA, SGH

K přípravě SLA byl využit kmen *Le. major* LV561 (MHOM/IL/67/LRC-L137 JERICHO II, tzn. stejný jako pro infekční dávku) resuspendovaný ve fyziologickém roztoku v koncentraci  $10^3$  promastigotů na 50  $\mu$ l, který byl přemražen vložení do -80 °C. SGH připravené dle kapitoly 3.3.6 bylo před použitím sterilizované centrifugací (10 300 g, 5 min; Eppendorf MiniSpin) přes filtr (Ultrafree-MC Centrifugal Filter, REF: UFC30GV0S, Merck/Sigma-Aldrich) a naředěné na koncentraci 1 žláza na 50  $\mu$ l. Koncentrace SLA a SGH byly vybrány na základě předchozích pokusů.

#### 3.4.5 Detekce cytokinů

Cytokiny byly měřeny metodou ELISA z kultivačního média splenocytů. Pomocí souprav byly stanoveny cytokiny IFN $\gamma$  (ELISA MAX™ Standard Set Mouse IFN- $\gamma$ ; Biolegend; REF: 430801), IL-10 (ELISA MAX™ Standard Set Mouse IL-10, Biolegend, REF: 431411) a IL-4 (ELISA MAX™ Standard Set Mouse IL-4; Biolegend; REF: 431101) na 96 jamkové destičce (Immulon™; REF: 95029330). Destička byla potáhnuta primární protilátkou (capture antibody, v dané soupravě) ředěnou v navazovacím roztoku (tab. 8) v množství 100  $\mu$ l na jamku a nechána přes noc ve 4 °C. Druhý den byla čtyřikrát promyta 200  $\mu$ l PBS-Tw (tab. 8) a následně se jamky naplnily 200  $\mu$ l 10% FBS/PBS k zablokování nespecifických vazeb. Destička se nechala při pokojové teplotě na třepačce po dobu 1 hodiny, poté se destička opět promyla čtyřikrát 200  $\mu$ l PBS-Tw a následně byly na destičku v objemu 50  $\mu$ l nanášena kultivační média a standarty (v dané soupravě). Takto připravená destička byla

ponechána 2 hodiny na třepačce a poté přes noc při 4 °C. Následující den byla destička čtyřikrát promyta 200 µl PBS-Tw, poté se jamky naplnily 100 µl sekundární protilátky (detection antibody, v dané soupravě) a destička byla ponechána 1 hodinu při pokojové teplotě na třepačce. Po uplynutí požadované doby byla destička čtyřikrát promyta 200 µl PBS-Tw a následně byl v objemu 100 µl na jamku přidán příslušný konjugát ředěný v 10% FBS/PBS. Destička byla ponechána 30 minut při pokojové teplotě na třepačce a poté pětkrát promyta PBS-Tw. Do promytých jamek destičky byl přidán substrátový roztok (3, 3',5',5'-Tetramethylbenzidine Liquid Substrate; Sigma-Aldrich; REF: T4444-100ML) v objemu 100 µl na jamku a následně se reakce nechala vyvíjet 30 minut ve tmě při pokojové teplotě. Po uplynutí stanovené doby byla reakce zastavena přidáním 100 µl 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> do každé jamky. Barevný produkt reakce byl stanoven spektrofotometricky na přístroji Tecan InfiniteM200 při vlnové délce 450 nm.

### 3.5 Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena pomocí programovacího jazyka R (verze R-4.3.2) v softwaru Rstudio (verze 2023.09.1+494). Pro cytometrická data byl nejprve použit test Kolmogorov-Smirnov k otestování normality rozložení dat. Následná analýza cytometrických data byla provedena pomocí neparametrického testu Kruskal-Wallis a navazujícího Dunn testu (metoda Benjamini-Hochberg). Naměřené hodnoty z cytometrické analýzy byly pro statistickou analýzu sjednoceny přepočítáním na 10000 nebo 5000 naměřených živých buněk (uvedeno u výsledků jednotlivých pokusů).

Pro vyhodnocení hladiny protilátek byla statistická významnost počítána parametrickými párovými t testy mezi jednotlivými časy v rámci jedné skupiny a nepárovými t testy mezi jednotlivými skupinami. Pro vyhodnocení kultivačních byla experimentů byl využit parametrický nepárový t test. Normalita dat hladin protilátek i kultivací byla otestována pomocí Shapiro-Wilk testu.

Korelační analýzy byly provedeny neparametrickým testem, Spearmanovou metodou.

**Tab. 8:** Tabulka shrnující použité roztoky a chemikálie

<b>roztok/chemikálie</b>	<b>detaily</b>
anestezie	2% ketamine (Rarketan; Vétoquinol); 0,5% xylazine (Rometar; Bioveta) ve fyziologickém roztoku; Ketamine 62,5 mg/kg a xylazine 25 mg/kg
kultivační roztok pro <i>Le .major</i>	M199 médium (Sigma) s 10% FBS (fetal-bovinní sérum, REF: 10270106, Gibco™), 1% amikacin (Bristol-Myers Squibb), 1% BME vitamíny (Sigma), 0.5% sterilní moč
<b>protilátková ELISA</b>	
10× koncentrované PBS	80 g NaCl (REF: 30093-APO, Lachner) 2 g KCl (REF: 684764, Penta) 15,3 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O (REF: 30061-APO, Lachner) 2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (REF: 684613, Penta) do 1000 ml
1× koncentrované PBS s Tween (PBS-Tw)	10xkoncentrované PBS s dH <sub>2</sub> O ředěné v poměru 1:9 0,5 ml Tween (TWEEN® 20; REF: P1379-500ml, Merck/Sigma-Aldrich) do 1000 ml; pH = 7,5 (pomocí NaOH)
30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	REF: 95321-100ML, Fluka
antigen	SGH: c=40 ng proteinu/100 ul roztoku rat anti-mouse IgE (REF: 553413, BD Biosciences) v koncentraci 2 ug/ml
blokovací roztok (6% mléko)	3,6 g sušeného mléka (REF: 170-6404, Bio-Rad) do 60 ml PBS-Tw
konjugáty	celkové IgG: Goat anti Mouse IgG, STAR120, Bio-Rad - ředěno 1:1000 v PBS-Tw IgG1: Goat anti Mouse IgG1, STAR132, Bio-Rad - ředěno 1:1000 v PBS-Tw IgG2a: Goat anti Mouse IgG2a, STAR133, Bio-Rad - ředěno 1:2000 v PBS-Tw IgE: Goat anti mouse IgE:HRP, STAR110P, Serotec - ředěno 1:200 v PBS-Tw
navazovací roztok (20 mM karbonát-bikarbonát)	0,53 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (REF: 30217-APO, Lachner) 0,42 g NaHCO <sub>3</sub> (REF: 30067-APO, Lachner) do 500 ml dH <sub>2</sub> O; pH = 9.5
ředící roztok na séra (2% mléko)	6% mléko s dH <sub>2</sub> O v poměru 1:2
substrátový roztok (McIllein fosfát-citrát)	20 ml pufru pro substrátový roztok (viz níže) 10 mg OPD (o-Phenylenediamine dihydrochloride, REF: P8287-100TAB, Merck/Sigma-Aldrich) 20 ul 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (přidáno těsně před použitím)
pufr pro substrátový roztok	0.11M hydrogenfosforečnan sodný: 3,97 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *12H <sub>2</sub> O (REF: 30061-APO, Lachner) do 100 ml dH <sub>2</sub> O 0,5M kys. citrónová: 10,5 g C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> (REF: 10019-APO, Lachner) do 100 ml dH <sub>2</sub> O titrace fosforečnanu citrátem na pH = 5,5 (zhruba v poměru 9:1)
10% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	90 ml dH <sub>2</sub> O 10 ml 96% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (REF: 10055-A96, Lachner)
<b>cytokinová ELISA</b>	
navazovací roztok	8,4 g NaHCO <sub>3</sub> (REF: 30067-APO, Lachner) 3,56 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (REF: 30217-APO, Lachner) do 1000 ml dH <sub>2</sub> O pH = 9.5 pro IL-10 navazovací roztok = PBS (viz níže)

PBS-Tw	8 g NaCl (REF: 30093-APO, Lachner) 1,16 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (CAS: 7558-79-4, Penta) 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (REF: 684613, Penta) 0,2 g KCl (REF: 684764, Penta) do 1000 ml dH <sub>2</sub> O pH = 7,4 + 0,05% Tween (TWEEN® 20; REF: P1379-500ml, Merck/Sigma-Aldrich)
10% FBS/PBS	20 ml inaktivovaného FBS (REF: 10270106, Gibco™) 180 ml PBS bez Tween
primární protilátka	60 µl zás. roztoku do navazovacího roztoku
sekundární protilátka	60 µl zás. roztoku do 10% FBS-PBS
konjugát	12 µl zás. roztoku Avidin-HRP do 10% FBS-PBS
<b>CYTOMETRIE</b>	
10xkoncentrované PBS	viz protilátková ELISA
3%FBS/PBS s EDTA	500 ml sterilního 1xPBS (viz ELISA) 15 ml inaktivovaného FBS (fetal-bovinní sérum, REF: 10270106, Gibco™) 2 ml 0,5M EDTA
0,5M EDTA	93,06 g EDTA (REF: E9884-500G, Merck/Sigma-Aldrich) do 500ml dH <sub>2</sub> O
Enzymatická směs (připraveno těsně před použitím)	na 1 ucho 1 ml směsi, tzn.: 100 µl zás. roztoku dispázy 100 µl zás. roztoku kolagenázy 4 µl zás. roztoku DNázy 0,796 ml RPMI-1640 (REF: R5886-500ML, Merck/Sigma- Aldrich)
Dispáza	5 g lyofilizovaného enzymu (REF: 17105041, Gibco™, LOT: 2445992) do 500 ml PBS (viz ELISA) - c = 10 mg/ml; uskladněno při – 20 °C
Kolagenáza	100 mg lyofilizovaného enzymu (REF: C5138-100MG, Merck/Sigma-Aldrich, LOT: 0000145686) do 10 ml RPMI- 1640 (REF: R5886-500ML, Merck/Sigma-Aldrich) - c = 10 mg/ml; uskladněno při – 20 °C
DNáza	100 mg lyofilizovaného enzymu (REF: DN25-100MG, Merck/Sigma-Aldrich, LOT: SLCJ6659) do 5ml pufru pro Dnázu + 5 ml glycerolu (REF: 30217-APO, Merck/Sigma- Aldrich) - c = 10 mg/ml; uskladněno při – 20 °C
pufr pro DNázu	2 mg MgCl <sub>2</sub> (Penta) 24 mg Tris (Trisma base, REF: T1503-1KG, Merck/Sigma- Aldrich) v 10 ml dH <sub>2</sub> O; pH = 7,5
Hoechst 33258	REF: H3569, Invitrogen™
<b>HISTOLOGIE</b>	
0,1% HCl	286 ul 35% HCl (REF: 7647-01-0, Penta) 99,714 dH <sub>2</sub> O
96% etanol	REF: 64-17-5, VWR
Absolutní etanol	REF: 64-17-5, Sigma-Aldrich
H&E barvicí souprava	REF: 9194.2, Carl Roth
Isopropylalkohol	REF: 603-117-00-0, Penta
Solakryl	směs kopolymeru butylmetakrylátu s metylmetakrylátem v xylenu, Mach chemikálie s.r.o.
Xylen	REF: 1330-20-7, směs izomerů, Lachner
10x Zinková fixáž	REF: 552658, BD Biosciences Před použitím ředěno s dH <sub>2</sub> O v poměru 1:10

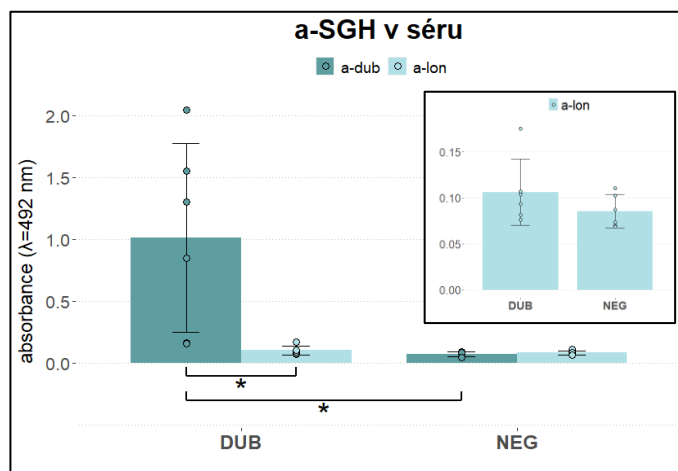
0,1M PBS	4,25 g NaCl (REF: 30093-APO, Lachner) 1,95 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O (CAS: 13472-35-0, Penta) 5,35 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (CAS: 7558-79-4, Penta) do 500 ml dH <sub>2</sub> O
Permeabilizační roztok (0,1% BSA, 0,5% TRITON X-100)	50 ml 0,1M PBS 0,05 g BSA (REF: A7906, Sigma-Aldrich) Triton X-100 (T-9284, Sigma)
Primární protilátky v 0,1% BSA/PBS	rat anti-mouse iNOS: REF: 14-5920-82, LOT: 2771014, Thermo Fisher Scientific ředěno 1:200 rabbit anti-mouse MPO: REF: PA5-16672, LOT: ZA4174611A, Thermo Fisher Scientific ředěno 1:150
Sekundární protilátky v 1% BSA/PBS	goat anti-rat IgG Alexa fluor 568: REF:ab175476, LOT: GR138236-1, Abcam ředěno 1:1000 goat anti-rabbit IgG FITC 488: REF:F0382-1ML, LOT: 251040, Merck/Sigma-Aldrich ředěno 1:40
Vectashield	Vectashield HardSet, Antifade Mounting Medium with DAPI, REF: H-1200-10, LOT: ZK1228, Vector Laboratories
<b>KULTIVACE</b>	
Kultivační médium (50 ml)	5ml FBS (REF: 10270106, Gibco™) – c <sub>p</sub> = 10 % 500 ul směsi L-glutaminu s penicilinem a streptomycinem (Sigma G6784) – c <sub>p</sub> = 1 % 50 ul 2-merkptoethanolu (Sigma M3148) – c <sub>p</sub> = 0,1 % do 45 ml RMPI-1640 (REF: R5886-500ML, Merck/Sigma-Aldrich)

## 4 Výsledky

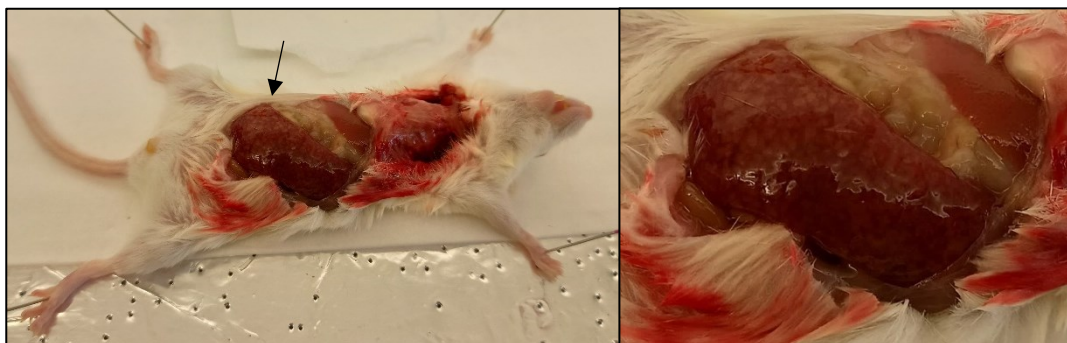
### 4.1 *In vitro* produkce protilátek v kultuře splenocytů

Cílem těchto experimentů (cíl č. 1) bylo otestovat možnost produkce protilátek v *in vitro* systému splenocytů z dlouhodobě imunizovaných myší z kolonie flebotomů *P. duboscqi*. Kultury byly inkubovány za tří různých podmínek - v přítomnosti jednoho ze dvou různých antigenů, SGH *P. duboscqi* (dub) nebo SGH *L. longipalis* (lon) nebo bez antigenu (neg). Metodou ELISA byly změřeny v kultivačním médiu protilátky proti SGH *P. duboscqi* a proti SGH *L. longipalis*. Změřeny byly také odpovídající protilátky v séru myší (obr. 2) a potvrdilo se, že většina myší měla zvýšené hladiny protilátek proti SGH *P. duboscqi* (a-dub). Jak ovšem zobrazuje obr. 3, sleziny izolované z těchto myší byly značně patologicky pozměněné. Na obr. 4 jsou zobrazeny výsledné hodnoty a-dub, kdy se imunizace myší na produkci protilátek promítla v případě kultivací bez antigenu (neg) a s heterologním antigenem (lon). Nicméně, hladiny protilátek byly nízké a jak je vidět na zobrazené odchylce, produkce mezi jednotlivými kulturami se velmi lišily a u některých kultur hladina protilátek navýšena nebyla. V případě kultivace s homologním antigenem (dub) produkce protilátek překvapivě zvýšena nebyla.

**Obr. 2:** Grafické znázornění průměrné hladiny a-dub a a-lon protilátek v séru imunizovaných myší využitých pro kultivační pokusy. \* představuje rozdíl, kde  $p < 0,05$ .

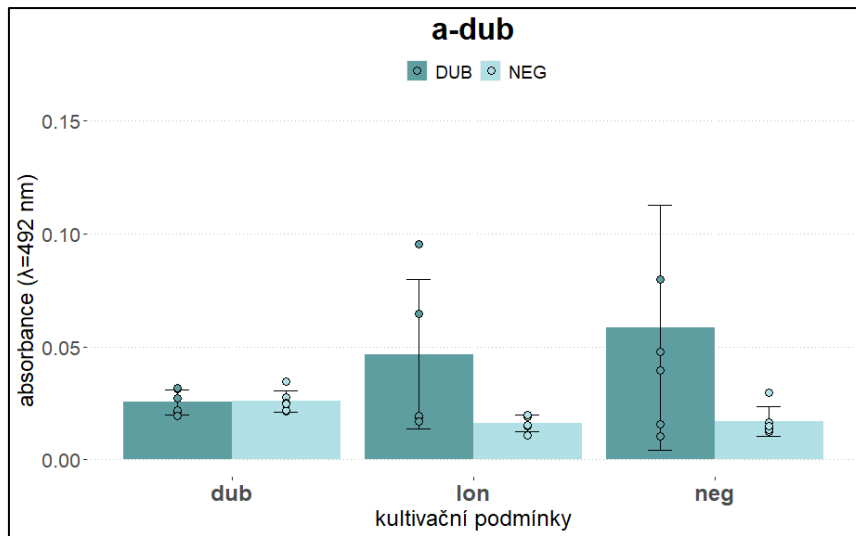


**Obr. 3:** Reprezentativní fotografie patologicky změněné sleziny (označená šipkou). Detail je vpravo.



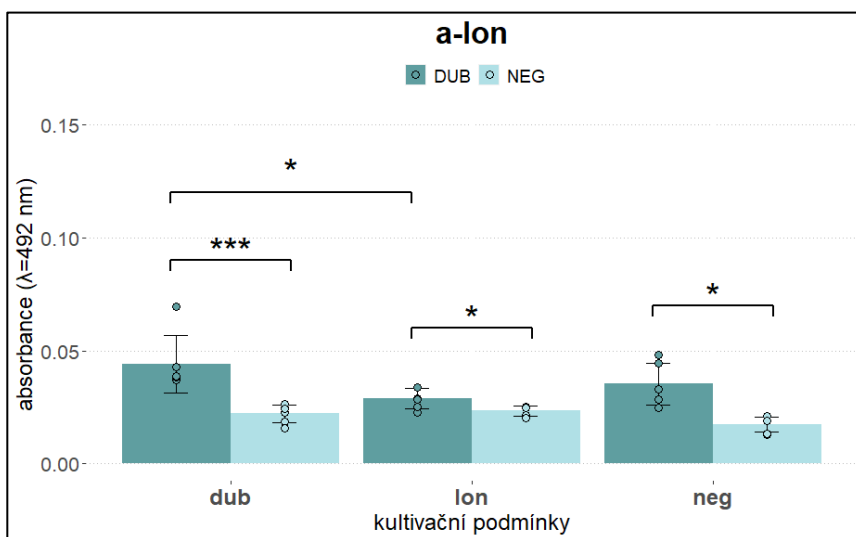


**Obr. 4:** Grafické znázornění průměrné hladiny a-dub protilátek v kultuře splenocytů. Tmavě jsou zobrazeny hodnoty pro imunizované myši (DUB), světle pro kontrolní myši (NEG). Dvojice představují jednotlivé kultivační podmínky – v přítomnosti homologního antigenu (dub), v přítomnosti heterologního antigenu (lon) a bez přidaného antigenu (neg).



Druhý graf (obr. 5) zobrazuje hodnoty protilátek proti SGH *L. longipalis* (a-lon). Zvýšené hladiny protilátek se signifikantním rozdílem u kultur z imunizovaných myši byly změřeny v případě všech tří kultivačních podmínek (dub, lon, neg), nicméně produkce těchto protilátek byla slabá. Nejvyšší rozdíl mezi kulturami z imunizovaných a kontrolních myši byl změřen v případě kultivace s homologním antigenem (dub). Signifikantní rozdíl v produkci protilátek byl přítomný i mezi stimulací s homologním (dub) a heterologním antigenem (lon).

**Obr. 5:** Grafické znázornění průměrné hladiny a-lon protilátek v kultuře splenocytů. Tmavě jsou zobrazeny hodnoty pro imunizované myši (DUB), světle pro kontrolní myši (NEG). Dvojice představují jednotlivé kultivační podmínky – v přítomnosti homologního antigenu (dub), v přítomnosti heterologního antigenu (lon) a bez přidaného antigenu (neg). \* představuje rozdíl, kde  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



## 4.2 Imunitní odpověď u imunizované myši

Cílem těchto experimentů (cíl č. 2) bylo popsat v odpovídajících časech imunitní odpověď myši proti slinám *P. duboscqi* zaměřenou na vybrané populace leukocytů v místě sání a na specifické hladiny protilátek vůči slinným antigenům. Myši byly imunizovány v pravidelných intervalech, tak jak bylo popsáno v kapitole 3.3.2 (schéma 2) a následná analýza probíhala ve dvou časových oknech, dva dny od posledního sání (D2) a sedm dní od posledního sání (D7). Experiment probíhal ve dvou opakováních, ve kterých byly myši rozděleny do čtyř skupin ( $n = 5$ /skupina/opakování): D2\_POZ (imunizovaná skupina analyzovaná v čase D2), D2\_NEG (negativní kontrola analyzovaná v čase D2), D7\_POZ (imunizovaná skupina analyzovaná v čase D2), D7\_NEG (negativní kontrola analyzovaná v čase D7). Buněčná odpověď byla měřena cytometricky a dokumentována na histologických preparátech. Specifická protilátková odpověď byla měřena v třídě IgG a podtřídách IgG1 a IgG2a a bylo změřeno i celkové IgE.

### 4.2.1 Buněčná odpověď měřená průtokovou cytometrií

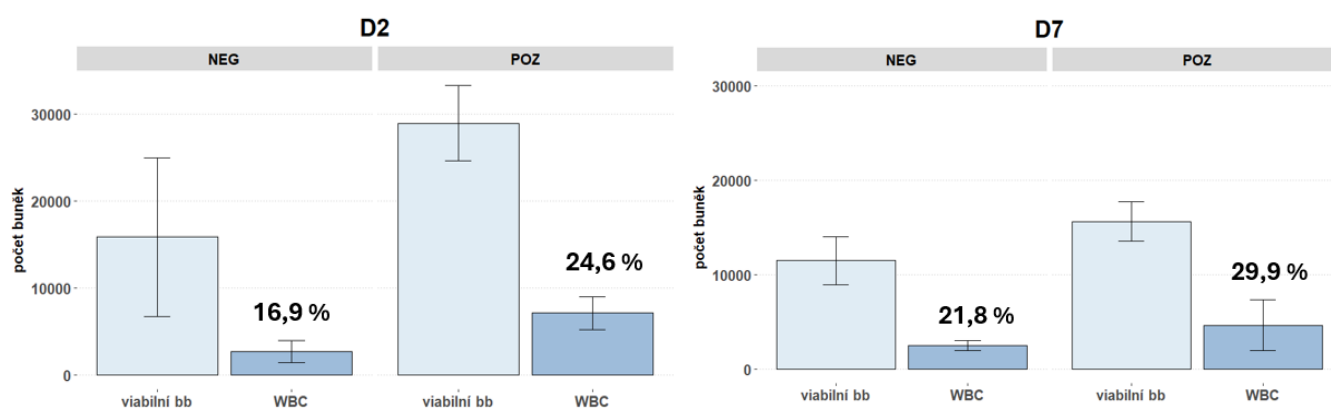
Izolace buněk z ucha probíhala dle protokolu popsaného v kapitole 3.3.5. Z každého ucha bylo připraveno 100  $\mu$ l jednobuněčné suspenze, která se změřila celá (limit na počet událostí k zaznamenání nebyl pro měření určující). Z vyizolovaných leukocytů ( $CD45^+$ ) byly vybrány APC ( $IA/IE^+$ ) a z těch následně populace Mo/M $\Phi$  ( $F4/80^+$ ), ze které byla vydělena populace monocytů ( $Ly6C^+$ ). Populace Mo/M $\Phi$  ( $F4/80^+$ ) byla také analyzována na přítomnost CD38, který byl využit na selekci M1 makrofágů, nicméně celá populace byla na tento marker negativní ( $CD38^-$ ). Paralelně s vydělením APC byly z leukocytů vybrány buňky příslušící myeloidní linii ( $CD11b^+$ ), ze kterých byly vybrány neutrofilily ( $Ly6G^+$ ) a eozinofily ( $SiglecF^+$ ). Kompletní skladba markerů na jednotlivých buněčných populacích je uvedena v kapitole 3.3.5 (tab. 7).

#### 4.2.1.1 Celkové množství izolovaných buněk z uší

Výtěžnost **prvního opakování** je zobrazena na obr. 6, celkové počty izolovaných buněk pro jednotlivé skupiny jsou uvedeny v tab. 9. V rámci D2 představovaly WBC 16,9 % z živých buněk získaných z uší negativních kontrol, pro imunizované myši to bylo 24,6 % WBC z živých buněk. Populace WBC z imunizované skupiny myši (D2\_POZ) tak tvořila 145,6 % negativní populace (D2\_NEG) a tedy nárůst o 45,6 %. Pro D7 tvořily WBC u kontrolních uší (D7\_NEG) 21,8 % z živých buněk, u imunizovaných (D7\_POZ) pak 29,9 % z živých buněk. Populace WBC z imunizované skupiny myši (D7\_POZ) tak představovala 137,2 % negativní populace (D7\_NEG), tj. nárůst o 37,2 %. V analýze byla ponechána i jedna myš (ID = B6) patřící k D7\_POZ, která svými hodnotami několikanásobně převyšovala průměr skupiny. V grafu (obr. 6) není zobrazeno, že pokud se tato myš z analýzy vyloučí, pak populace WBC v rámci D7\_POZ tvoří pouze 22,8 % z živých buněk a tato pozitivní populace tak představuje pouze 104,6 % té negativní (ve srovnání s výše uvedenými 137,2 %). Bohužel, výtěžnost **druhého opakování**

byla podstatně rozdílná (obr. 7, tab. 10) a pro následné analýzy proto nebylo možné obě opakování sloučit dohromady. V čase D2 se vyzolovalo až 4× méně buněk ve druhém opakování oproti prvnímu a podíl leukocytů byl ještě menší. Na obr. 7 je zobrazeno, že populace WBC u kontrolní myši (D2\_NEG) zastupovala pouze 5,1 % celkově vyzolovaných živých buněk. U imunizovaných myší (D2\_POZ) se jednalo o 13,9 % z živých buněk, což představuje nárůst o 172,5 % oproti příslušné negativní kontrole. V čase D7 pak výtěžky byly 5,1 % WBC z živých buněk u kontrol (D7\_NEG) a 5,5 % WBC z živých buněk u imunizovaných myší (D7\_POZ), což tvoří 107,8 % kontrolní skupiny a tedy nárůst o 7,8 %.

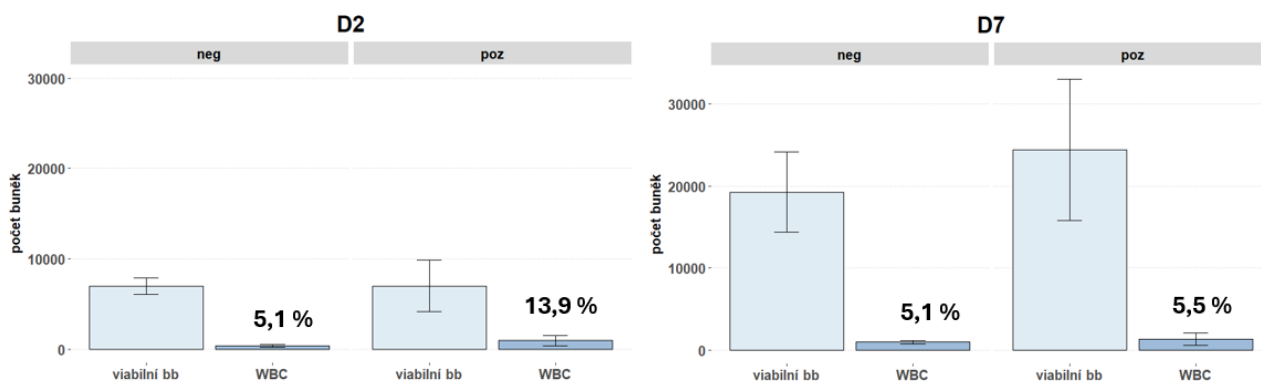
**Obr. 6:** Grafické zobrazení průměrného počtu živých buněk a leukocytů v rámci **prvního opakování**. Příslušnost k jednotlivým skupinám je uvedena nad grafy. Světle modré sloupce představují živé buňky, tmavě modré zastupují množství WBC. Procentuální vyjádření nad sloupci odpovídá podílu, který představuje populace WBC z celkového množství živých buněk.



**Tab. 9:** Tabulka vyjadřující průměrný počet buněk v jednotlivých populacích ± směrodatná odchylka pro **první opakování**, data jsou vizualizovaná na obr. 6.

	D2		D7	
	NEG	POZ	NEG	POZ
viabilní buňky	15871 ± 9115	28960 ± 4359	11473 ± 2525	15633 ± 2058
WBC	2684 ± 1264	7129 ± 1889	2485 ± 530	4653 ± 2689

**Obr. 7:** Grafické zobrazení průměrného počtu živých buněk a leukocytů v rámci **druhého opakování**. Popis grafů odpovídá tomu uvedenému k obr. 6.



**Tab. 10:** Tabulka vyjadřující průměrný počet buněk v jednotlivých populacích ± směrodatná odchylka pro druhé opakování, data jsou vizualizovaná na obr. 7.

	D2		D7	
	NEG	POZ	NEG	POZ
viabilní buňky	8146 ± 898	7022 ± 2531	19274 ± 4376	24431 ± 7717
WBC	416 ± 134	974 ± 525	988 ± 195	1341 ± 668

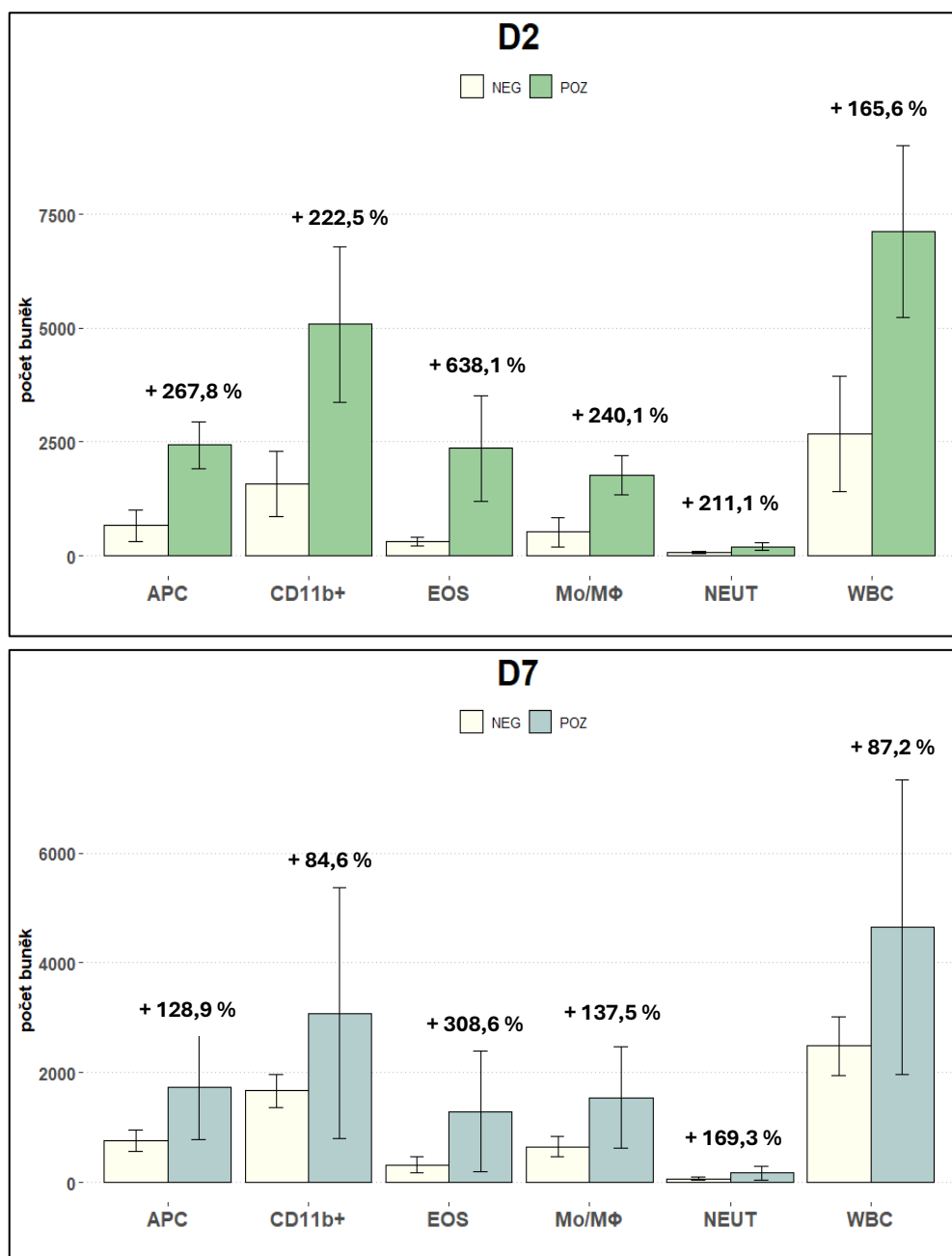
#### 4.2.1.2 Zastoupení jednotlivých buněčných subpopulací v čase D2 a D7

Odlišná výtěžnost buněk v rámci jednotlivých opakování se promítla i do leukocytárních populací. V čase **D2** u obou opakování nicméně platilo, že eozinofily představovaly populaci s nejvyšším nárůstem mezi kontrolní a imunizovanou skupinou (NEG×POZ). V druhém opakování se jednalo o nárůst o 300 % (obr. 9), v prvním opakování to bylo 638,1 % (obr. 8). U obou opakování byl také změřen celkově malý počet infiltrovaných neutrofilů včetně malého rozdílu mezi skupinami (NEG×POZ), v prvním opakování se jednalo o 211,1 % (obr. 8), v druhém o 194,4 % (obr. 9). Největší rozdíl mezi opakováními reprezentovala populace APC a z nich selektované Mo/MΦ. Z tab. 11 a tab. 12 vyplývá, že rozdíl v množství buněk u nadřazené populace APC byl mezi imunizovanou skupinou D2\_POZ prvního a druhého opakování více jak dvacetinásobný. Také rozdíly mezi kontrolní a imunizovanou (NEG×POZ) skupinou byly zcela odlišné, u prvního opakování byly nárůsty o 267,8 % u APC a o 240,1 % u Mo/MΦ, zatímco pro druhé opakování to pro stejné populace byly nárůsty pouze o 106,3 % u APC a 140 % u Mo/MΦ.

Podobně jako v čase D2, i v **D7** jsou zřejmé rozdíly mezi opakováními. Konsenzuálně nicméně klesají rozdíly mezi kontrolní a imunizovanou skupinou (NEG×POZ), což reflektuje ustupující infiltraci do místa sání. Podobně také platí trend, že nejvýraznější rozdíl mezi kontrolní a imunizovanou skupinou reprezentují eozinofily s nárůsty o 308,6 % u prvního opakování (obr. 8) a 150,5 % u druhého opakování (obr. 9). Zároveň je nicméně i u této populace nejzřetelnější pokles oproti situaci v čase D2.

Ke zhodnocení statistické významnosti rozdílů mezi kontrolní a imunizovanou skupinou byla data v rámci každého opakování transformována přepočítáním na nejnižší vyizolované množství živých buněk – pro první opakování se jednalo o 10000 živých buněk, u druhého opakování 5000 živých buněk. Srovnaly se tak v rámci každého opakování případné rozdíly dané pouze odlišnou izolací. V **prvním opakování** byly signifikantní rozdíly mezi NEG a POZ v čase **D2** (obr. 10) u WBC ( $p = 0,0360$ ), CD11b<sup>+</sup> ( $p = 0,0163$ ), APC ( $p = 0,0049$ ), Mo/MΦ ( $p = 0,0323$ ) a u eozinofilů ( $p = 0,0163$ ), v čase **D7** (obr. 11) byl statisticky významný rozdíl mezi NEG a POZ pouze u populací eozinofilů ( $p = 0,0244$ ). V **druhém opakování** byly signifikantní rozdíly v čase **D2** (obr. 12) u WBC ( $p = 0,0479$ ), CD11b<sup>+</sup> ( $p = 0,0302$ ) a Mo/MΦ ( $p = 0,0277$ ), v čase **D7** žádné statisticky významné rozdíly nebyly (obr. 13).

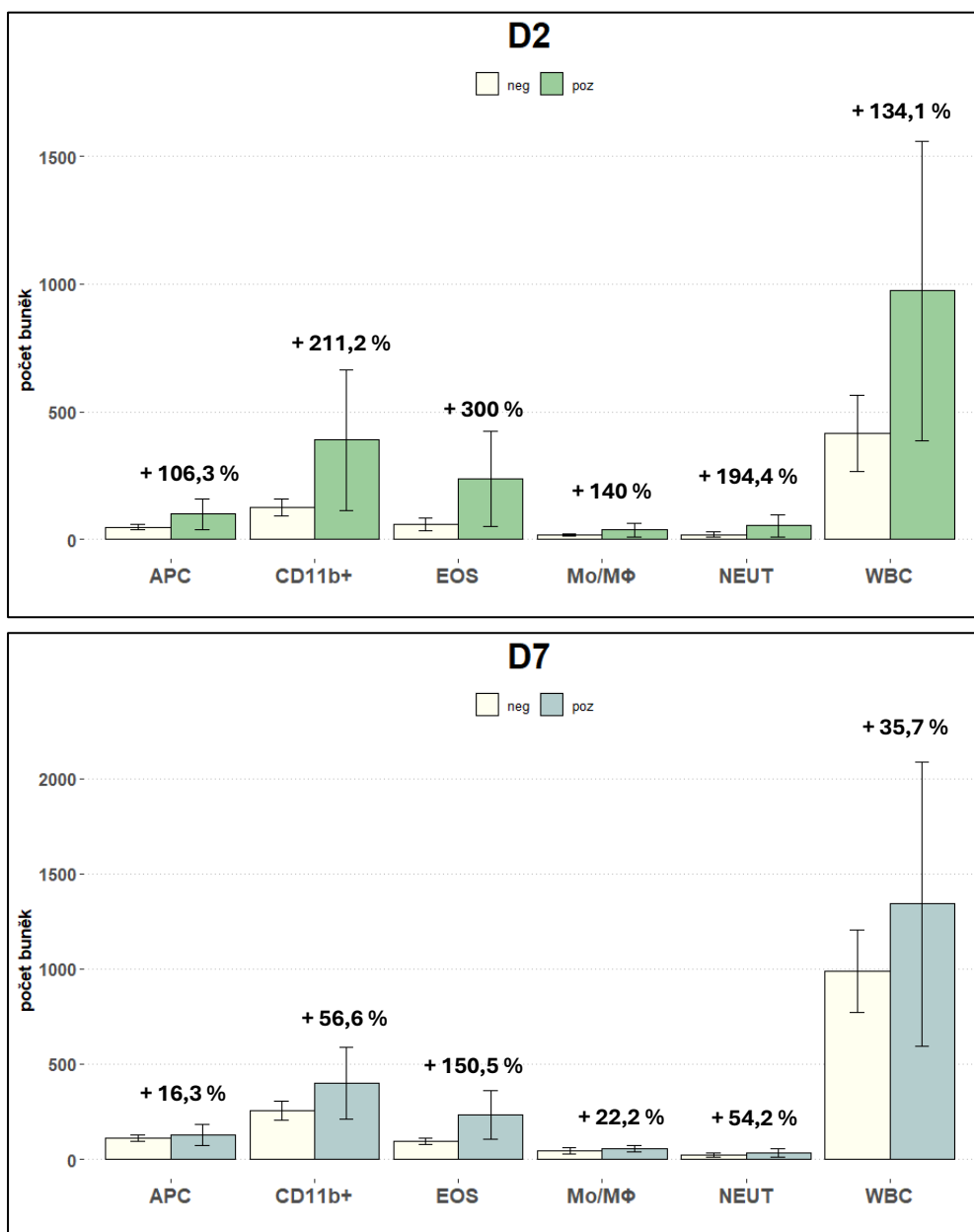
**Obr. 8:** Grafické znázornění průměrných počtů v jednotlivých buněčných subpopulacích v **prvním opakování**. Nad každou subpopulací je procentuální vyjádření nárůstu mezi kontrolní (NEG) a imunizovanou (POZ) skupinou.



**Tab. 11:** Tabulka vyjadřující průměrný celkový počet buněk v jednotlivých populacích ± směrodatná odchylka pro **první opakování**, data jsou vizualizovaná na obr. 8.

	D2		D7	
	NEG	POZ	NEG	POZ
APC	661 ± 350	2431 ± 511	760 ± 199	1740 ± 953
CD11b+	1575 ± 715	5080 ± 1714	1670 ± 301	3082 ± 2287
EOS	320 ± 95	2362 ± 1159	315 ± 149	1287 ± 1100
Mo/MΦ	519 ± 326	1765 ± 423	651 ± 188	1546 ± 920
NEUT	63 ± 25	196 ± 80	62 ± 27	167 ± 120

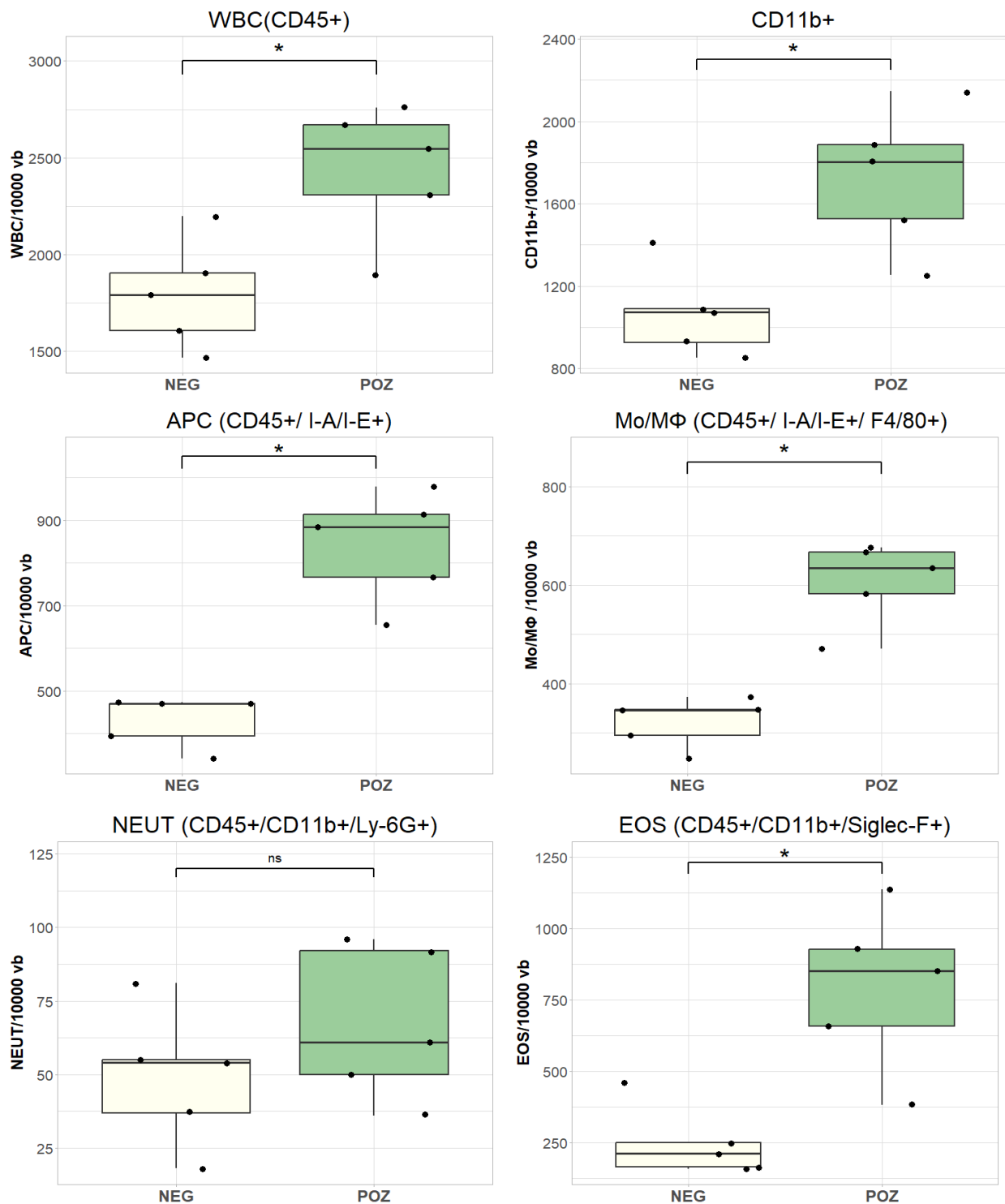
**Obr. 9:** Grafické znázornění průměrných počtů v jednotlivých buněčných subpopulacích ve **druhém opakování**. Na každou subpopulaci je procentuální vyjádření nárůstu mezi kontrolní (neg) a imunizovanou (poz) skupinou.



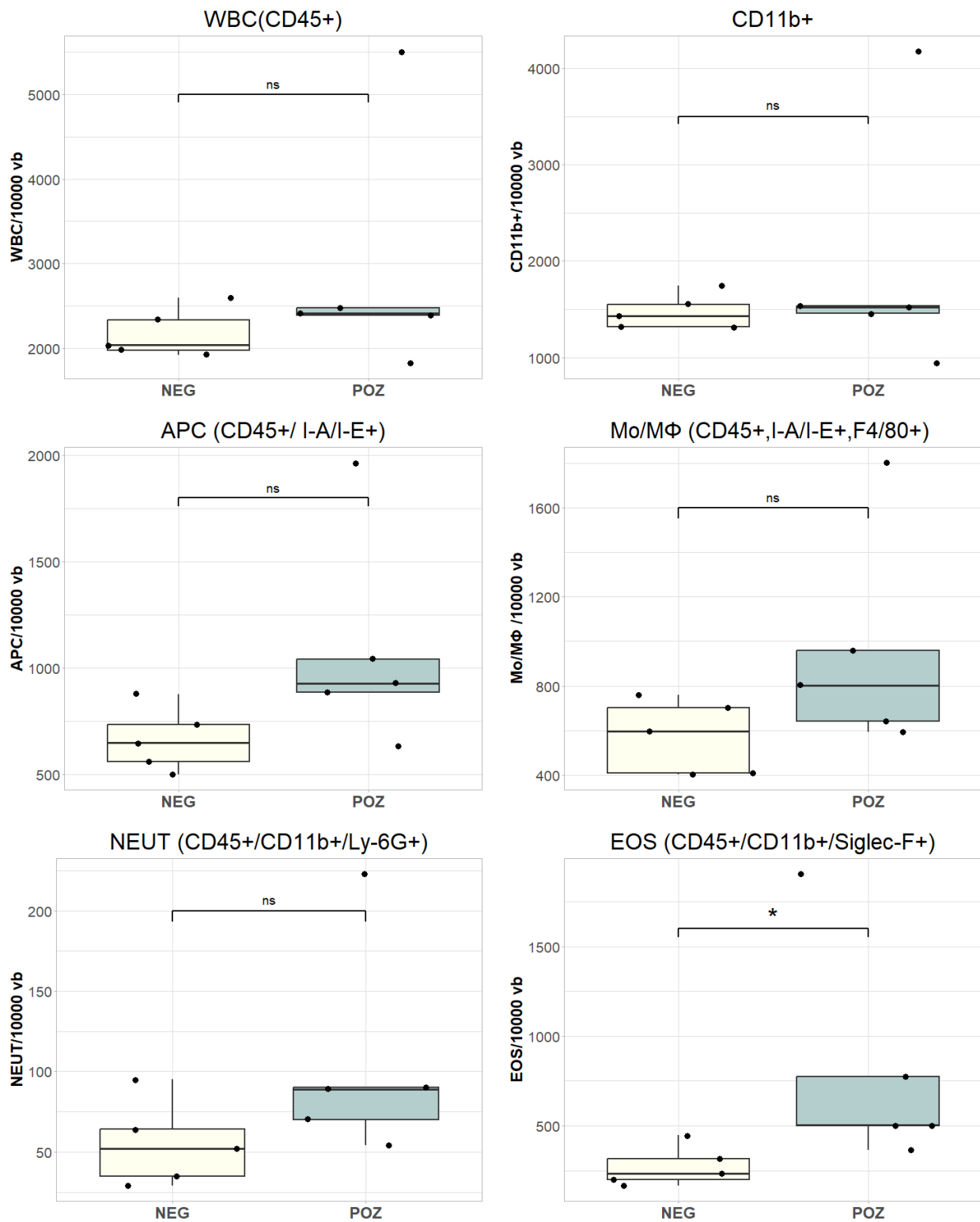
**Tab. 12:** Tabulka vyjadřující průměrný počet buněk v jednotlivých populacích ± směrodatná odchylka pro **druhé opakování**, data jsou vizualizovaná na obr. 9.

	D2		D7	
	NEG	POZ	NEG	POZ
APC	48 ± 9	99 ± 42	112 ± 12	130 ± 45
CD11b	125 ± 29	389 ± 247	256 ± 44	401 ± 168
EOS	59 ± 23	236 ± 167	93 ± 15	233 ± 112
NEUT	18 ± 9	53 ± 39	24 ± 7	37 ± 18
Mo/ MΦ	15 ± 4	36 ± 23	45 ± 17	55 ± 16

**Obr. 10:** Grafické znázornění statistické analýzy mezi kontrolní a imunizovanou skupinou v čase **D2 u prvního opakování**. Celkové počty buněk v jednotlivých populacích jsou přepočítány na 10000 viabilních buněk (vb) ve vzorku. Hvězdička (\*) označuje signifikantní rozdíly, kde  $p < 0,05$ . Nesignifikantní rozdíly (ns) jsou vyznačeny také.

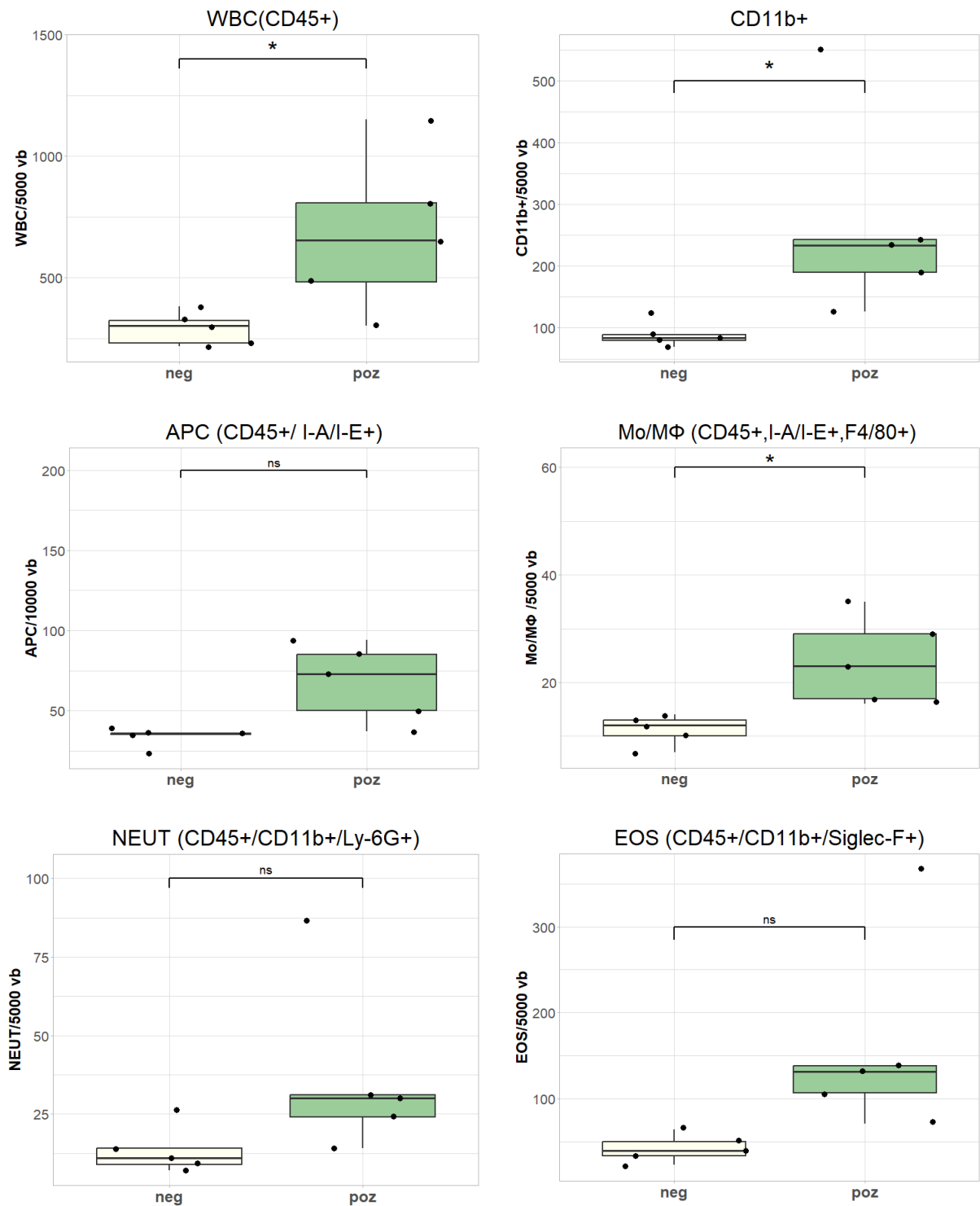


**Obr. 11:** Grafické znázornění statistické analýzy mezi kontrolní a imunizovanou skupinou v čase **D7 u prvního opakování**. Celkové počty buněk v jednotlivých populacích jsou přepočítány na 10000 viabilních buněk (vb) ve vzorku. Hvězdička (\*) označuje signifikantní rozdíly, kde  $p < 0,05$ . Nesignifikantní rozdíly (ns) jsou vyznačeny také.

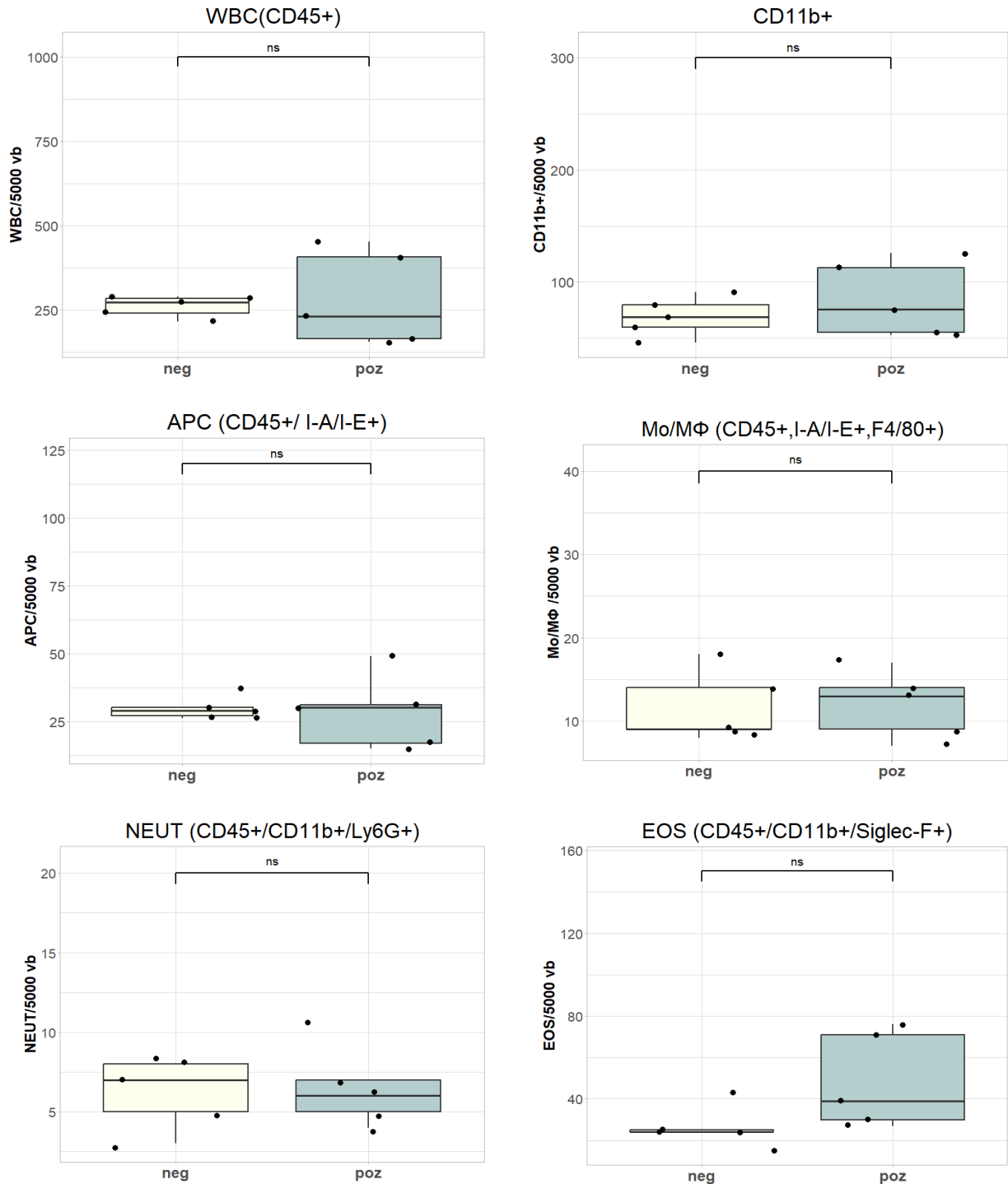




**Obr. 12:** Grafické znázornění statistické analýzy mezi kontrolní a imunizovanou skupinou v čase **D2 u druhého opakování**. Celkové počty buněk v jednotlivých populacích jsou přepočítány na 5000 viabilních buněk (vb) ve vzorku. Hvězdička (\*) označuje signifikantní rozdíly, kde  $p < 0,05$ . Nesignifikantní rozdíly (ns) jsou vyznačeny také.

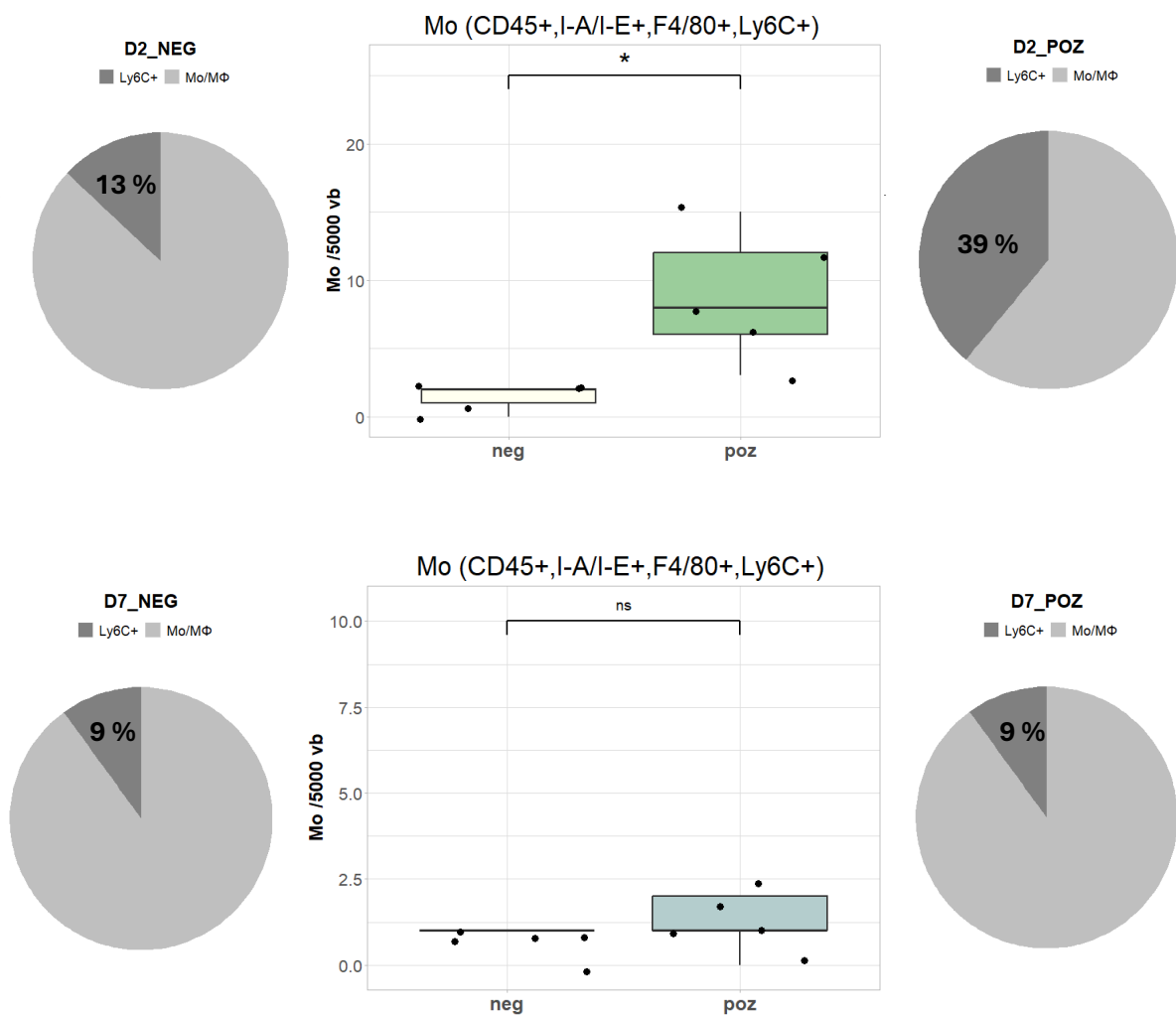


**Obr. 13:** Grafické znázornění statistické analýzy mezi kontrolní a imunizovanou skupinou v čase **D7 u druhého opakování**. Celkové počty buněk v jednotlivých populacích jsou přepočítány na 5000 viabilních buněk (vb) ve vzorku. Hvězdička (\*) označuje signifikantní rozdíly, kde  $p < 0,05$ . Nesignifikantní rozdíly (ns) jsou vyznačeny také.



U druhého opakování byla změřena i exprese monocytárního markeru Ly6C v populaci Mo/MΦ. Ly6C+ monocyty byly v infiltrátu signifikantně ( $p=0,0206$ ) zvýšené v čase D2, v čase D7 se jejich počty oproti negativní kontrole nelišily (obr. 14). V čase D2 u pozitivní skupiny exprimovalo marker Ly6C 39 % Mo/MΦ populace oproti 13 % negativní populace. V čase D7 byly v obou skupinách monocyty zastoupeny 9 % z mateřské populace. Expresí markeru CD38 v populaci Mo/MΦ, která byla také v rámci druhého opakování měřena, nebyla detekována v žádném čase u pozitivní ani negativní skupiny.

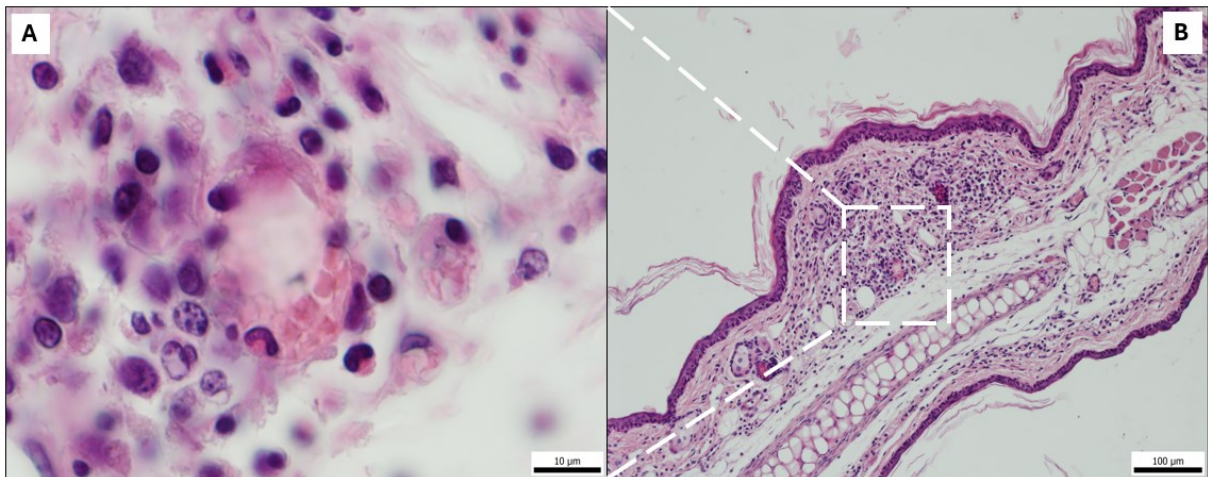
**Obr. 14:** Grafické znázornění statistické analýzy Ly6C+ monocytů mezi kontrolní a imunizovanou skupinou v čase **D2 a D7 u druhého opakování**. Celkové počty buněk v jednotlivých populacích jsou přepočítány na 5000 živých buněk ve vzorku. Hvězdička (\*) označuje signifikantní rozdíl, kde  $p < 0,05$ , nesignifikantní rozdíl (ns) je vyznačen také. Čas D2 je zobrazen v prvním řádku (zeleně), ve spodním řádku (světle modře) je čas D7.



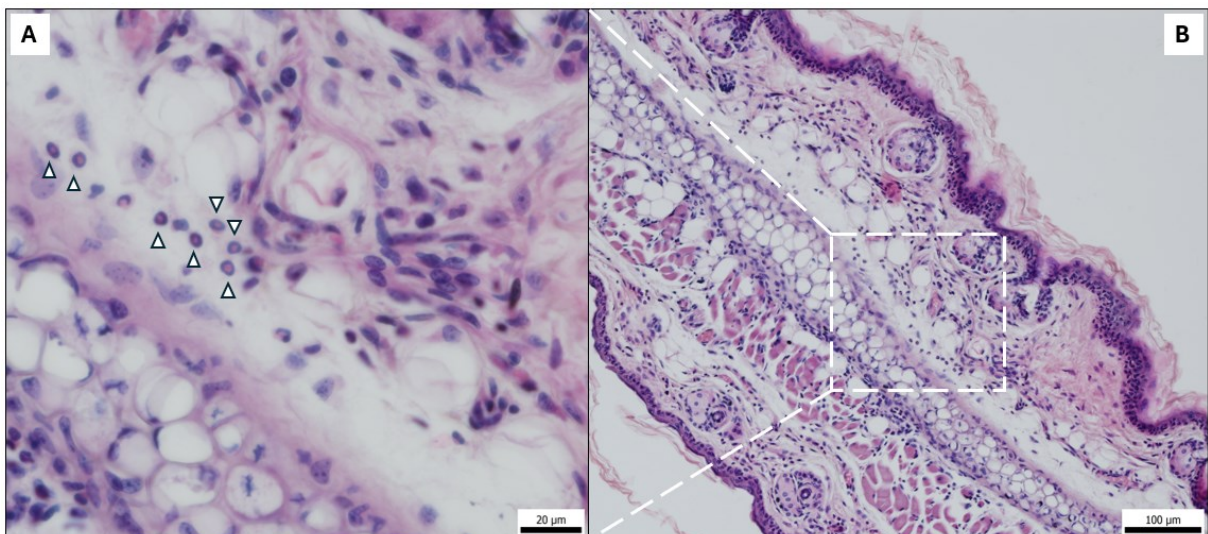
### 4.2.2 Histologická analýza

Odpověď imunitního systému u imunizovaných myší byla demonstrována na histologických preparátech. Z každé myši bylo jedno ucho zalito do parafínu a následně rozkrájeno na jednotlivé řezy, které byly paralelně barveny H-E a značeny imunofluorescenčně. Vybrané reprezentativní fotografie řezů obarvených H-E z jednotlivých skupin pro obě opakování jsou seskupeny na obr. 17. Na histologických preparátech byla ukázána relativně nižší četnost infiltrovaných leukocytů na řezech D7 oproti D2 a stejně tak jejich vyšší četnost oproti negativním skupinám. Charakteristickým rysem, jak v čase D2, tak v čase D7, bylo vysoké zastoupení eozinofilů mezi jinak mononukleárními, infiltrovanými leukocyty (obr. 18-21). Na obr. 15 je zobrazen detail ucha v čase D2 zobrazující leukocyty pronikající z kapiláry do místa sání. Na obr. 16 jsou zobrazeny tzv. ring-shaped leukocyty, které jsou přítomné v myších zánětlivých infiltrátech a představují granulocyty a jejich prekurzory.

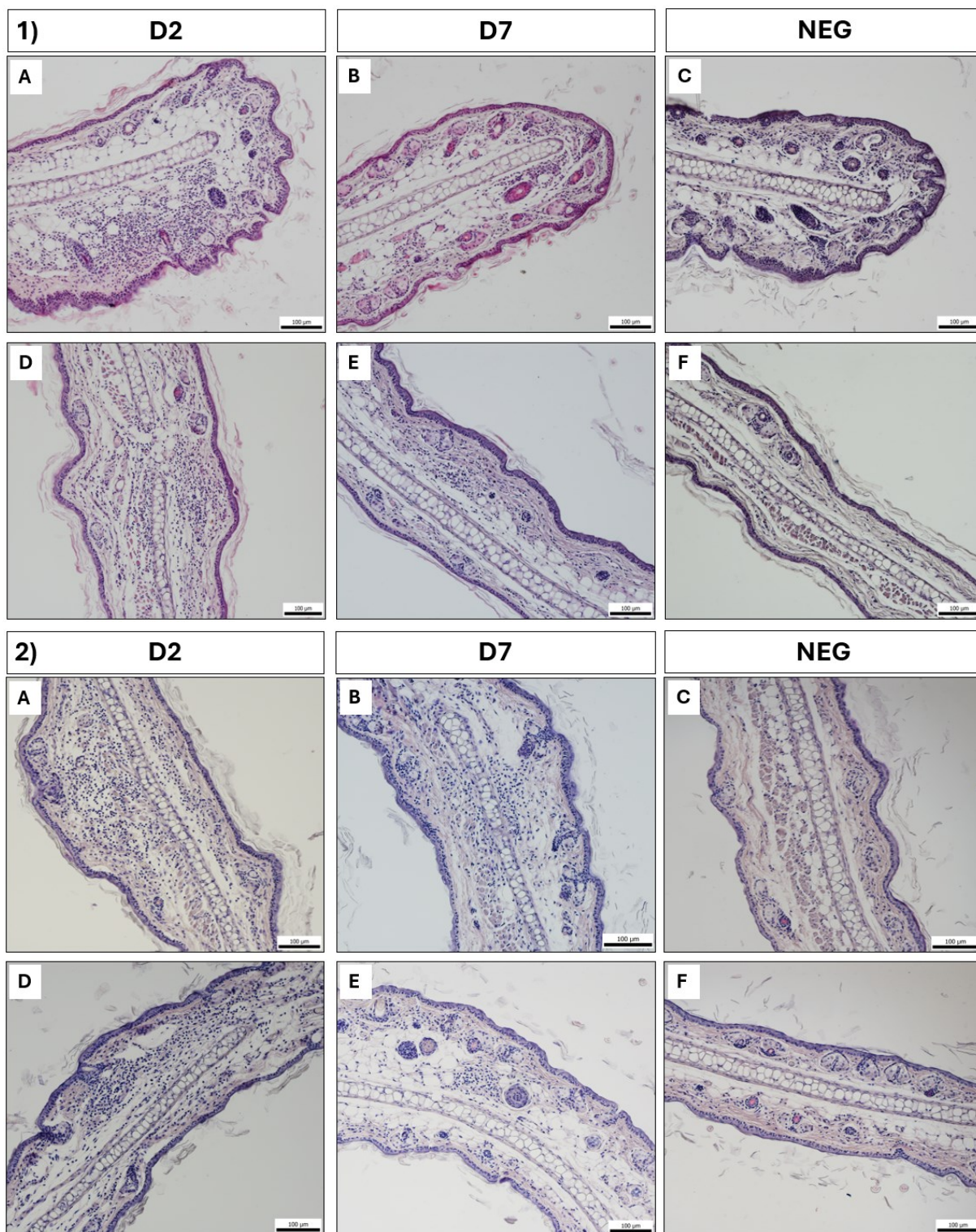
**Obr. 15:** Leukocyty vystupující z kapiláry v místě sání flebotoma. Vpravo (B) je řez uchem v čase D2 s masivním leukocytárním infiltrátem. Vlevo (A) je zobrazen detail na kapiláru, ze které se na místo infiltrují leukocyty. Měřítka odpovídají 100  $\mu\text{m}$  (B) a 10  $\mu\text{m}$  (A).



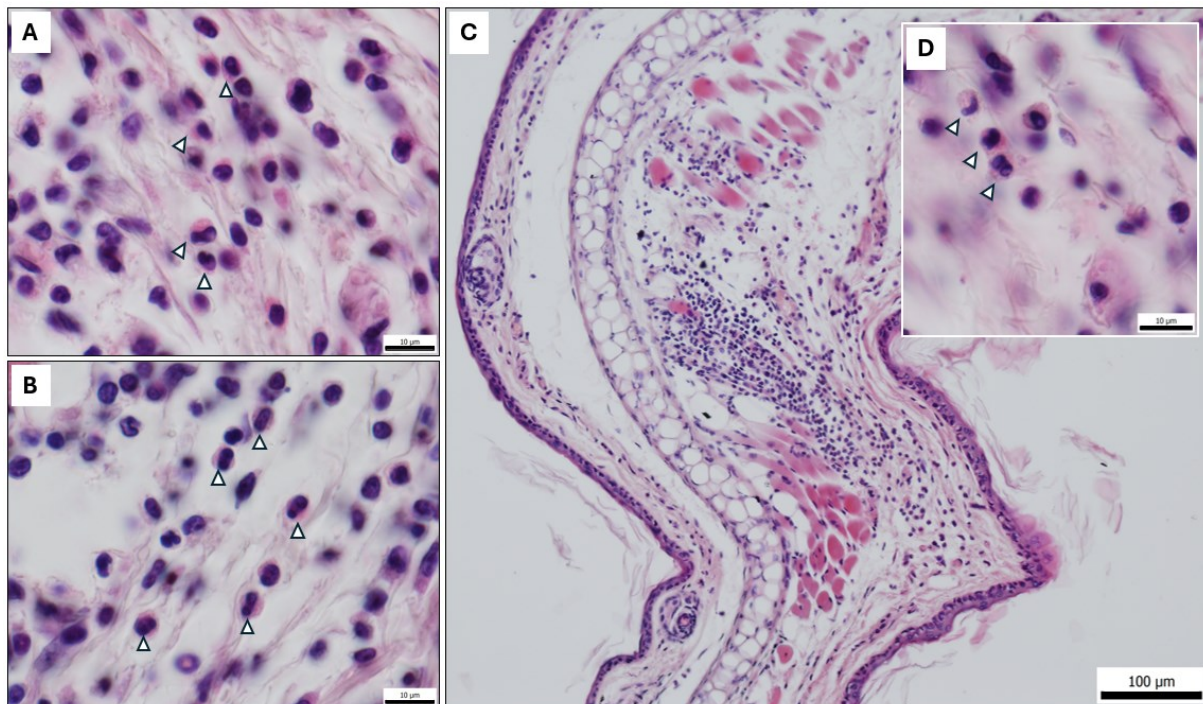
**Obr. 16:** Přítomnost tzv. ring-shaped leukocytů s typickým kruhovým jádrem. Vpravo (B) je řez imunizovaným uchem v čase D7. Vlevo (A) je zobrazen detail na přítomné leukocyty s kruhovým jádrem (označené trojúhelníkem). Měřítka odpovídají 100  $\mu\text{m}$  (B) a 20  $\mu\text{m}$  (A).



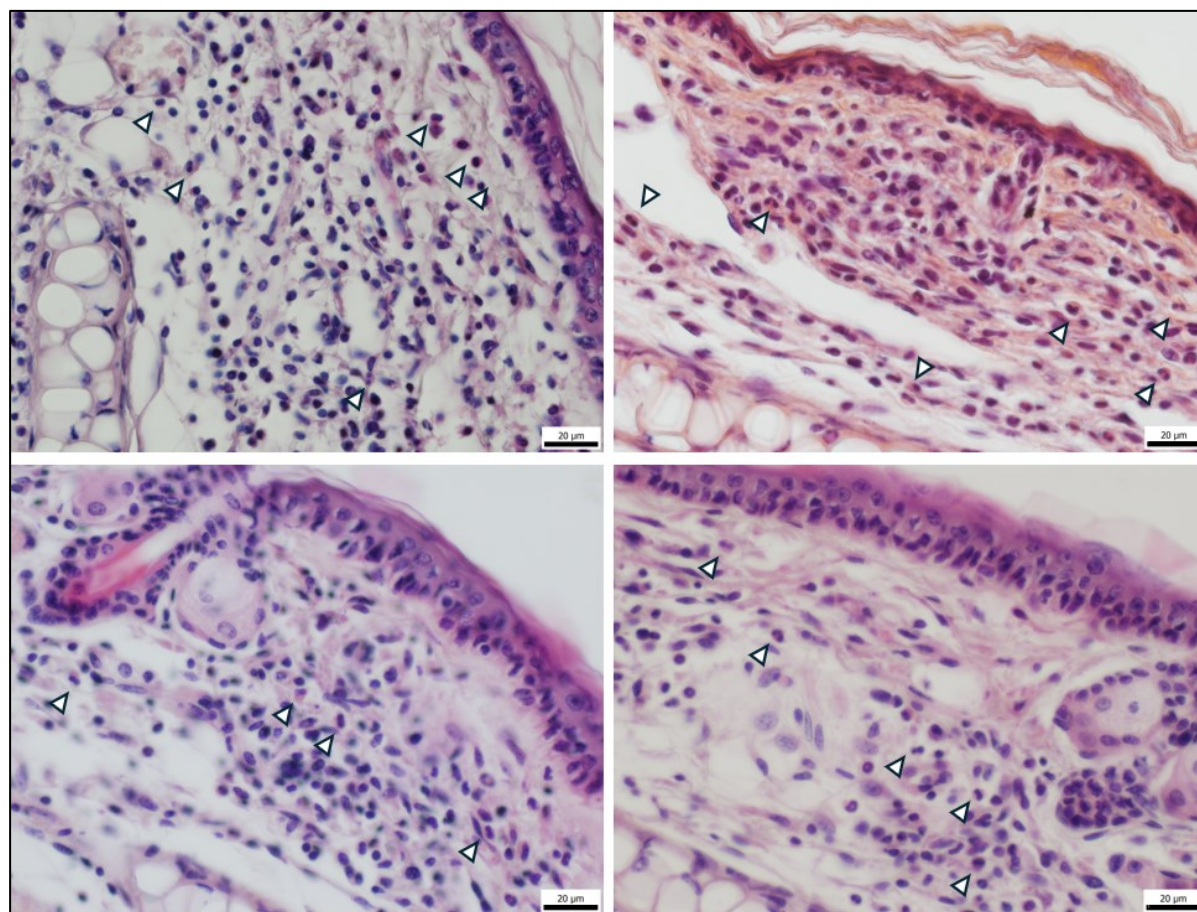
**Obr. 17:** Imunitní odpověď v místě sání na řezech barvených H-E pro skupiny imunizovaných D2 myši (A,D), imunizovaných D7 myši (B, E) a kontrolních myši (C, F). Jedná se o reprezentativní výběr fotografií v rámci prvního opakování (1; horní panel) a druhého opakování (2; spodní panel). Fotografie kontrolních myši (NEG) byly vybrány ze skupin D2\_NEG a D7\_NEG. Měřítka na každé fotografii představuje 100  $\mu$ m.



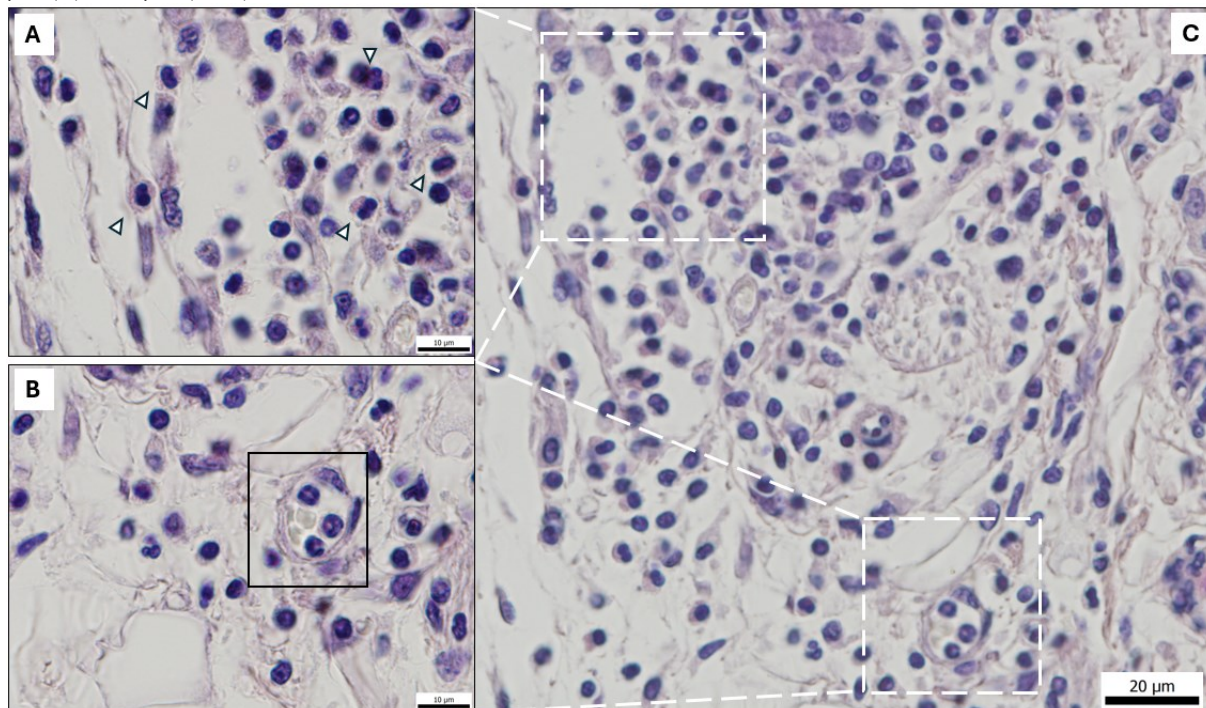
**Obr. 18:** Infiltrované eozinofily v imunizovaném uchu v čase **D2**. Řez uchem s leukocytárním infiltrátem (C) a detaily vyobrazující jednotlivé eozinofily (A, B, D; označené trojúhelníkem) s typickým tvarem segmentovaného jádra a růžovou cytoplasmou danou obarvenými eosinofilními granulami. Měřítka odpovídá 100  $\mu\text{m}$  (C) a 10  $\mu\text{m}$  (A, B, D).



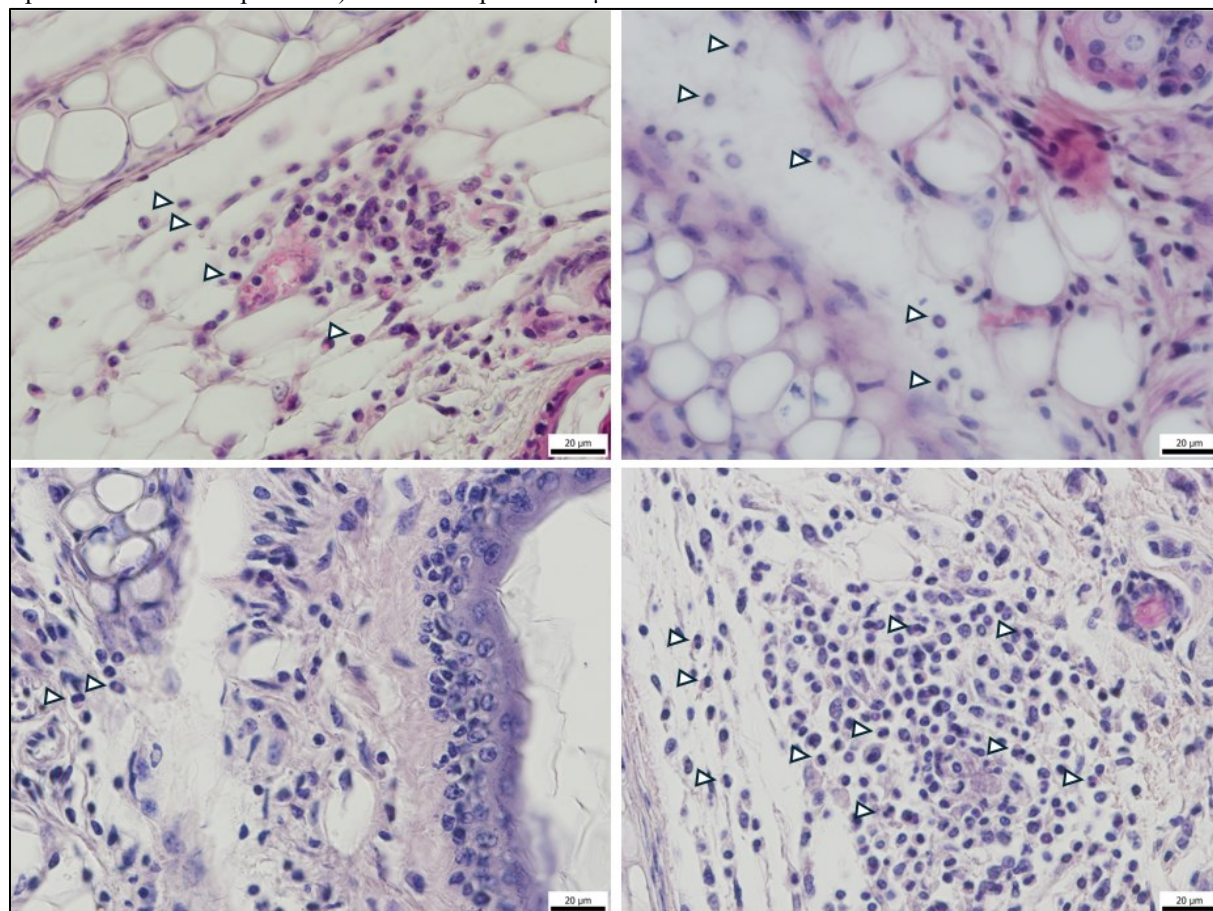
**Obr. 19:** Příklady infiltrovaných eozinofilů (označených trojúhelníky) na různých řezech v čase **D2** (výběr z prvního a druhého opakování). Měřítka odpovídá 20  $\mu\text{m}$ .



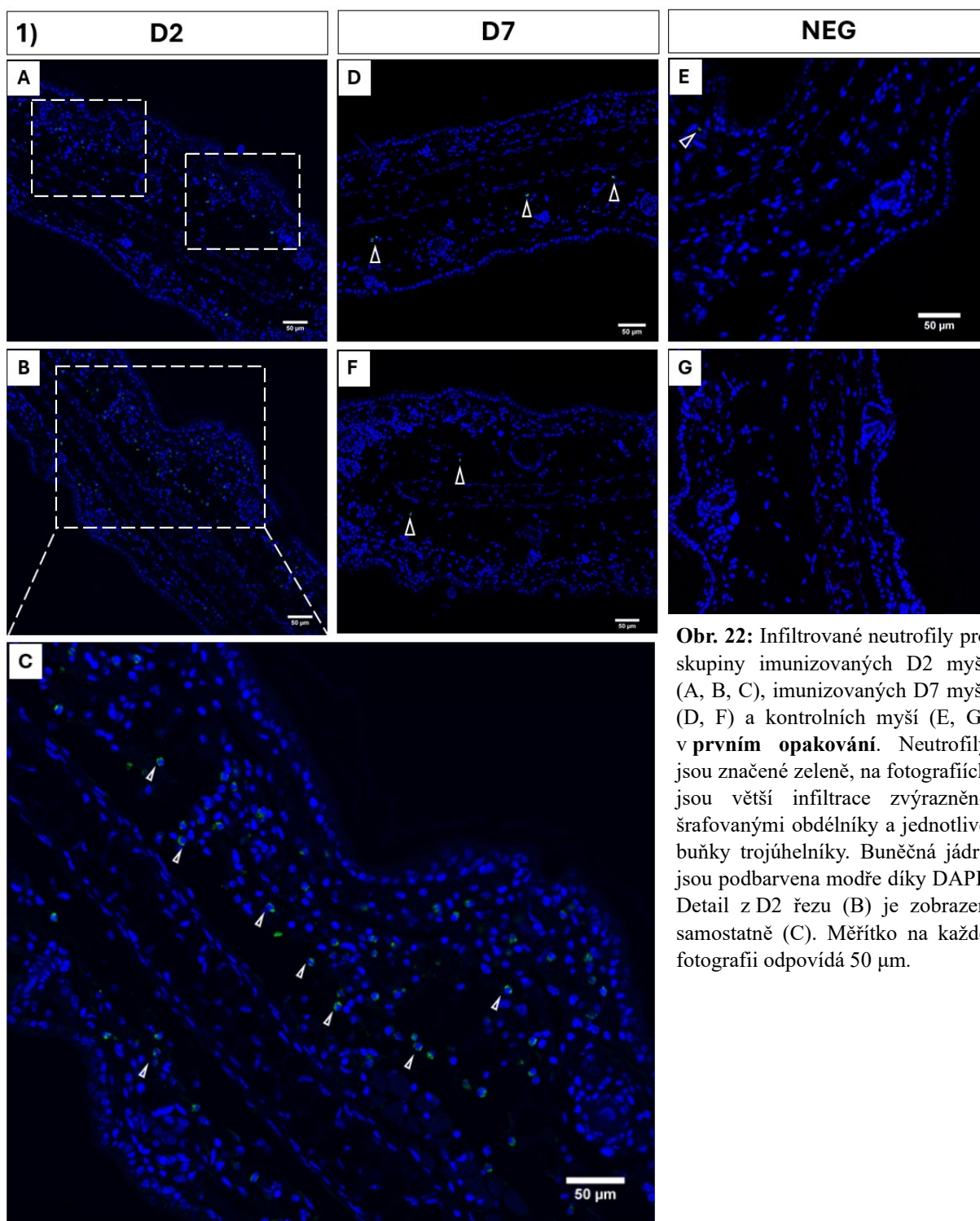
**Obr. 20:** Infiltrované eozinofily v imunizovaném uchu v čase **D7**. Vpravo je zobrazen řez uchem s leukocytárním infiltrátem (C) s vyznačenými detaily samostatně vyobrazenými vlevo (A, B). Označeny jsou infiltrované eozinofily (označené trojúhelníkem) a detail na cévu s leukocyty (B, v černém obdélníku). Měřítko odpovídá 20  $\mu\text{m}$  (C) a 10  $\mu\text{m}$  (A, B).



**Obr. 21:** Příklady infiltrovaných eozinofilů (označených trojúhelníky) na různých řezech v čase **D7** (výběr z prvního a druhého opakování). Měřítko odpovídá 20  $\mu\text{m}$ .



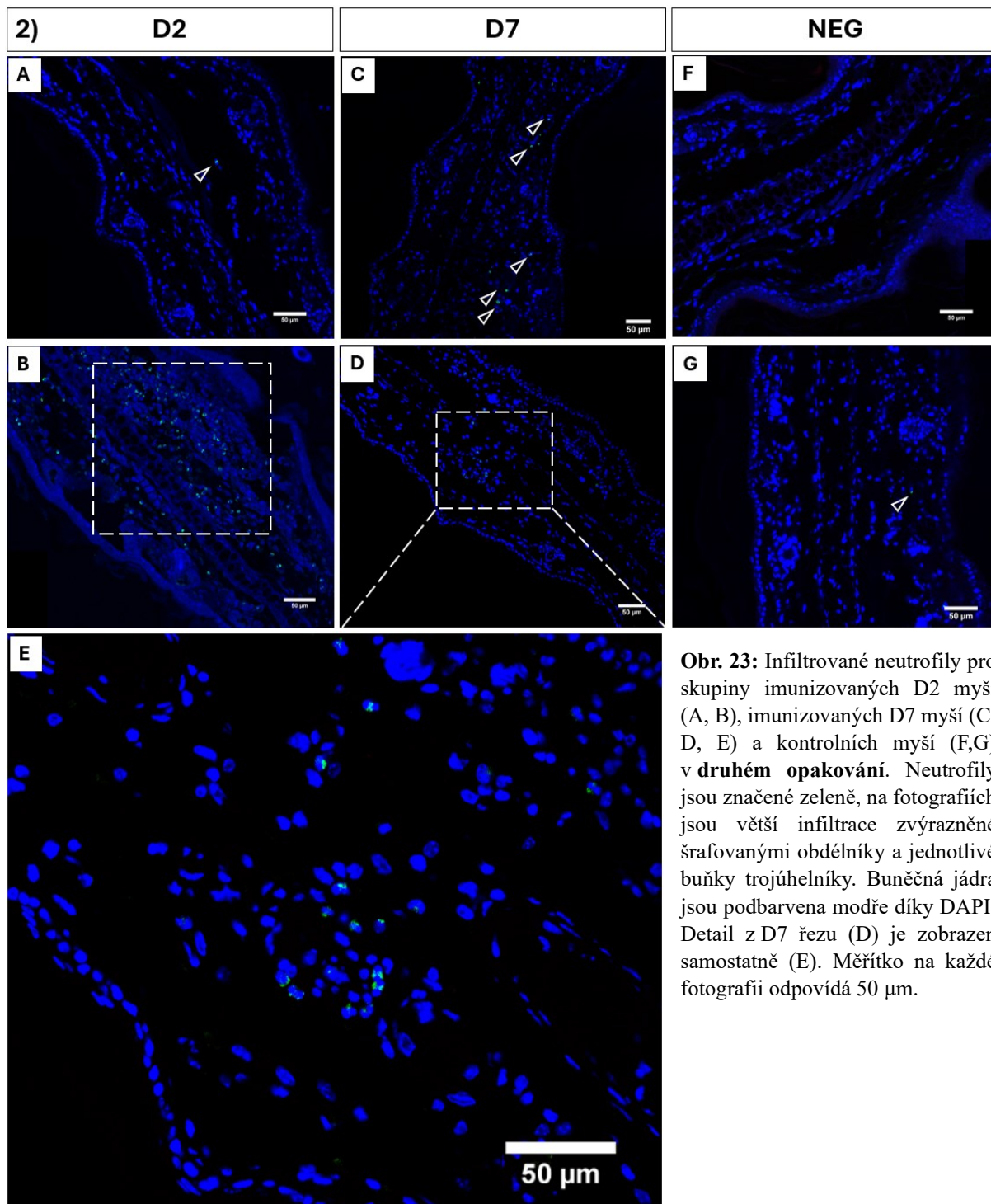
Fluorescenčně byly řezy barevny na přítomnost myeloperoxidázy (MPO), enzymu typicky přítomného v neutrofilech, a inducibilní NO syntetázy (iNOS), jejíž exprese je markerem M1 makrofágů. Jak je demonstrováno na obr. 22, zatímco MPO<sup>+</sup> buňky (viditelné v zeleném kanálu díky barvení FITC 488) na řezech přítomné byly, s nejvyšší relativní četností v čase D2 a nejnižší na negativních kontrolách, iNOS (v případě exprese viditelná v červeném kanálu díky Alexa fluor 568) nebyla detekována ani na jednom analyzovaném řezu bez ohledu na čas. Vzhledem k pozitivní kontrole na řezech infikovaných uší s přítomnými parazity, kde iNOS barvitelná byla, se jedná o skutečnou absenci této molekuly na D2



**Obr. 22:** Infiltrované neutrofilie pro skupiny imunizovaných D2 myší (A, B, C), imunizovaných D7 myší (D, F) a kontrolních myší (E, G) v **prvním opakování**. Neutrofilie jsou značené zeleně, na fotografiích jsou větší infiltrace zvýrazněné šrafovanými obdélníky a jednotlivé buňky trojúhelníky. Buněčná jádra jsou podbarvena modře díky DAPI. Detail z D2 řezu (B) je zobrazen samostatně (C). Měřítka na každé fotografii odpovídá 50 μm.



a D7 řezech a ne o falešně negativní výsledek. Fotografie pozitivní kontroly je umístěna v příloze diplomové práce.



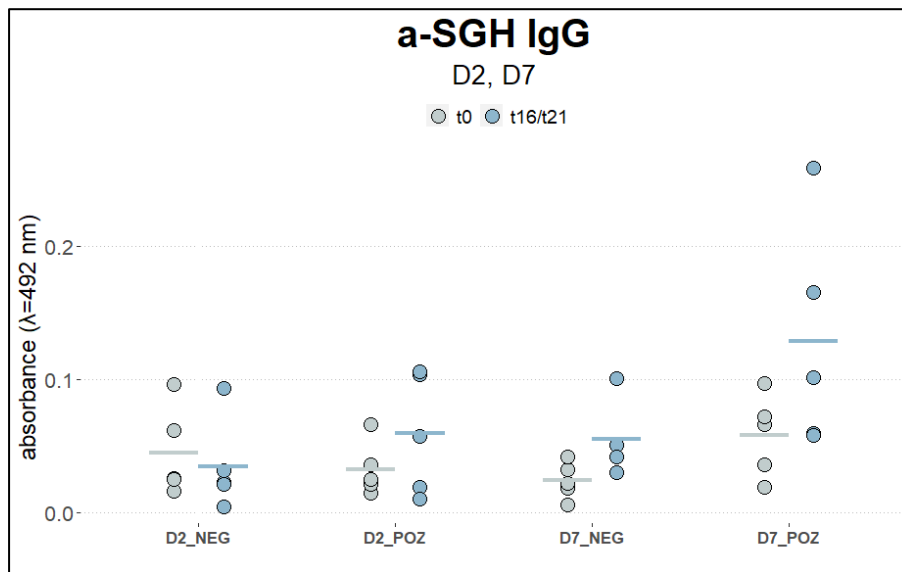
**Obr. 23:** Infiltrované neutrofilů pro skupiny imunizovaných D2 myší (A, B), imunizovaných D7 myší (C, D, E) a kontrolních myší (F,G) v **druhém opakování**. Neutrofilů jsou značeny zeleně, na fotografiích jsou větší infiltrace zvýrazněny šrafovanými obdélníky a jednotlivé buňky trojúhelníky. Buněčná jádra jsou podbarvena modře díky DAPI. Detail z D7 řezu (D) je zobrazen samostatně (E). Měřítka na každé fotografii odpovídá 50  $\mu\text{m}$ .

### 4.2.3 Hladina protilátek v séru/plazmě

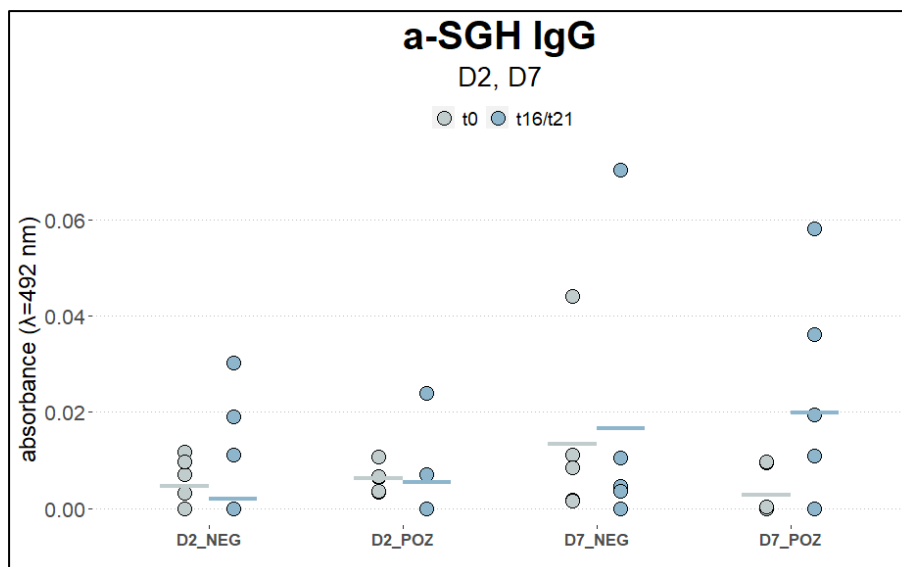
#### 4.2.3.1 a-SGH IgG/IgG1/IgG2a

Hladina specifických IgG protilátek v séru proti slinným antigenům *P. duboscqi* byla měřena metodou ELISA (obr. 24-25). Srovnávány byly rozdíly mezi hladinou protilátek v čase před imunizací (t0) a při ukončování experimentu (t16/21). V žádném případě nebyl rozdíl mezi měřenými skupinami signifikantní, nicméně, u obou opakování byl v případě času t21 pro skupiny D7\_POZ zaznamenán trend

**Obr. 24:** Grafické znázornění sérové hladiny a-SGH IgG protilátek pro **první opakování**. Šedě jsou zobrazena jednotlivá měření u sér před začátkem imunizací (t0), modře jsou značena měření při ukončování pokusu (t16 pro D2, t21 pro D7). Horizontálně jsou značeny průměry pro jednotlivé skupiny. Hodnota pozitivní kontroly pro t0 = 1,88 a pro t16/21 = 2,47. Pozitivní kontrolou bylo sérum myši s prokazanými protilátkami.

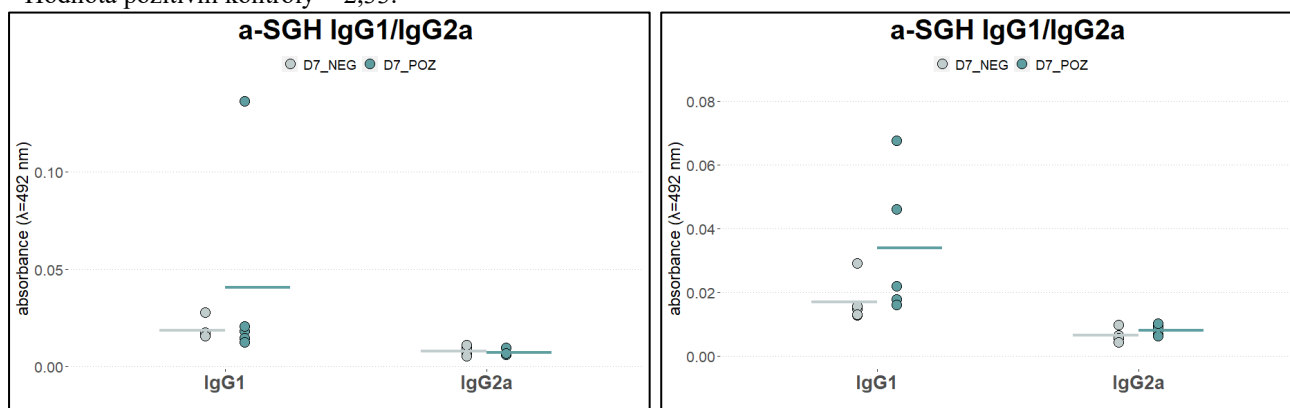


**Obr. 25:** Grafické znázornění sérové hladiny a-SGH IgG protilátek pro **druhé opakování**. Značení je popsáno u obr. 24. Hodnota pozitivní kontroly pro t0 = 1,88, pro t16/21 = 2,47. Pozitivní kontrolou bylo sérum myši s prokazanými protilátkami.



v nárůstu hladiny protilátek pro některé vzorky. Z tohoto důvodu byly proto změřeny hladiny podtříd IgG1 a IgG2a pouze u postimunizačních sér skupiny D7\_POZ (obr. 26) a přestože žádné srovnávané dvojice se signifikantně nelišily, trendem byly vyšší hladiny IgG1. Ani v jednom případě nebyla u postimunizačních sér změřena zvýšená hladina IgG2a.

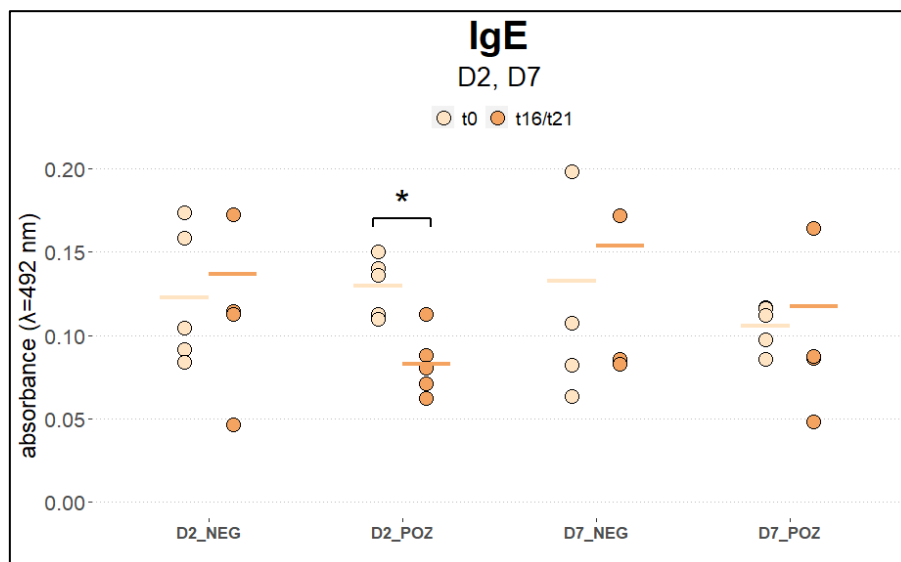
**Obr. 26:** Grafické znázornění sérové hladiny a-SGH IgG1/IgG2a protilátek u D7 skupin v čase t21. Šedě jsou zobrazena jednotlivá měření pro negativní myši, modře jsou značena měření pozitivních myši. Graf vlevo zobrazuje první opakování, vpravo je druhé opakování. Horizontálně jsou značeny průměry pro jednotlivé skupiny. Hodnota pozitivní kontroly = 2,33.



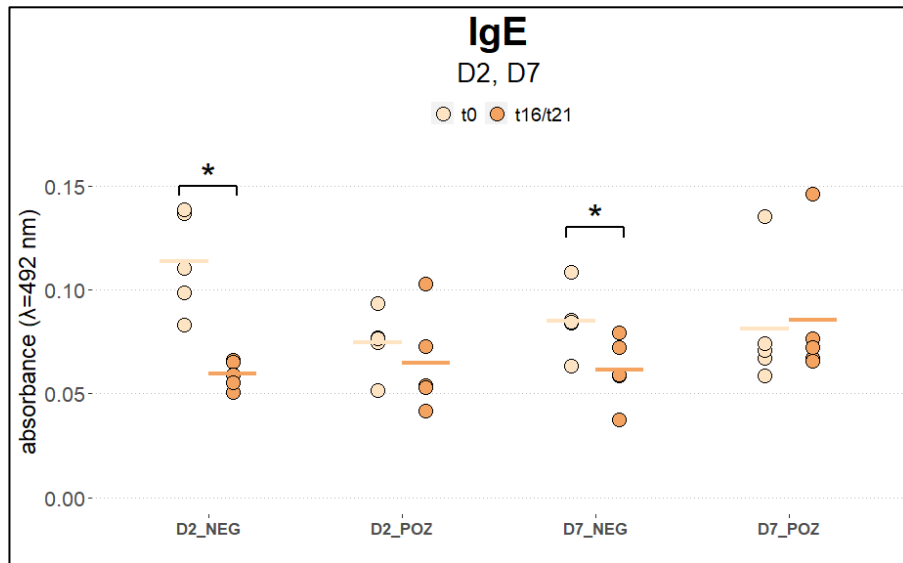
#### 4.2.3.2 Celkové IgE

Cytometrická analýza i histologické řezy poukázaly na výrazné zastoupení eozinofilů v buněčném infiltrátu, proto byla změřena i celková hladina IgE v séru. Na obr. 27-28 je zobrazeno, že v hladinách těchto protilátek mezi opakováními není jednotný trend. Zatímco v prvním opakování byl signifikantní ( $p=0,003$ ) rozdíl mezi  $t_0$  a  $t_{16}$  u D2\_POZ, ve druhém opakování byl signifikantní pokles v hladině protilátek u obou negativních skupin (D2\_NEG  $p=0,004$ ; D7\_NEG  $p=0,035$ ). Také neplatí, že by měly imunizované skupiny oproti negativním vyšší hladiny IgE v séru, nicméně při srovnání hladin IgE a počtu eozinofilů z obou opakování byla pozorována mírná pozitivní korelace ( $r = 0,51$ ;  $p < 0,05$ ) mezi těmito parametry (obr. 29).

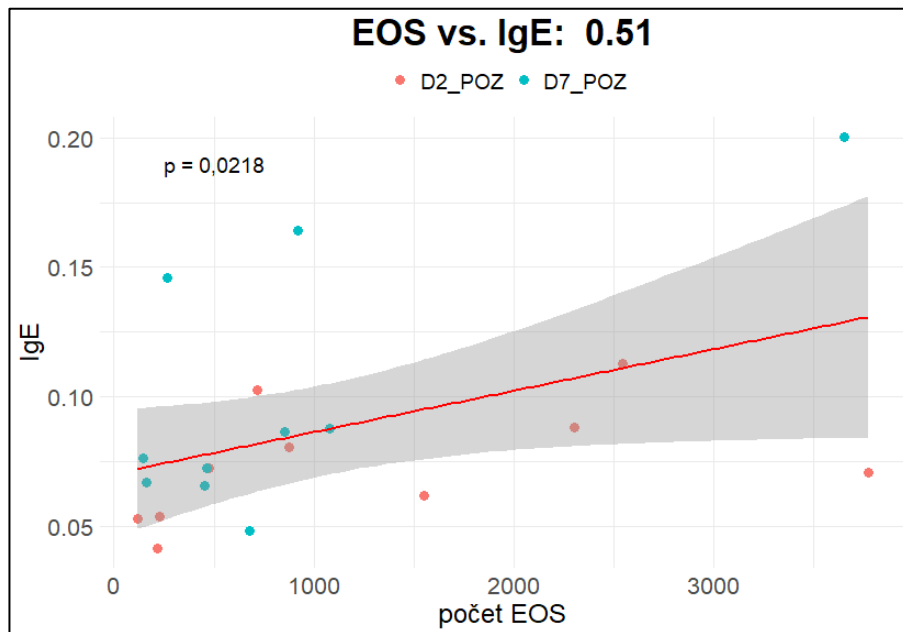
**Obr. 27:** Grafické znázornění sérové hladiny celkového IgE pro **první opakování**. Světle jsou zobrazena jednotlivá měření u sér před začátkem imunizací ( $t_0$ ), tmavě jsou značena měření při ukončování pokusu ( $t_{16}$  pro D2,  $t_{21}$  pro D7). Horizontálně jsou značeny průměry pro jednotlivé skupiny. Označeny (\*) jsou signifikantní rozdíly mezi odběrovými časy ( $p < 0,05$ ). Hodnota pozitivní kontroly = 0,86.



**Obr. 28:** Grafické znázornění sérové hladiny celkového IgE pro **druhé opakování**. Značení je popsáno u obr. 27.



**Obr. 29:** Grafické znázornění korelační analýzy mezi počtem eozinofilů u **imunizovaných** skupin (EOS) a hladinou IgE pro obě opakování. Barevně jsou odlišené jednotlivé skupiny; modře skupina D7\_POZ a oranžově skupina D2\_POZ.



## 4.3 Imunitní odpověď u imunizované myši v kontextu leishmaniové infekce

Cílem této části diplomové práce (cíl č. 3) byla analýza imunitní odpovědi infikované myši *Le. major* v kontextu různých imunizačních schémat. Myši byly v rámci experimentu rozděleny do čtyř skupin. Dvě skupiny byly imunizovány za účelem navození protektivního efektu a následně byly ve dvou odlišných schématech vystaveny sání po čas probíhající infekce – skupiny EXPa, EXPb. Jedna skupina myší byla pouze infikována – skupina POZ – a poslední skupina nebyla infikována ani vystavena sání – skupina NEG. Každá skupina byla tvořena 6 jedinci, v rámci prvního opakování ovšem došlo k úmrtí dvou myší, jedné ze skupiny EXPb a druhé ze skupiny EXPa, a v rámci druhého opakování došlo k úmrtí jedné myši ze skupiny EXPb.

### 4.3.1. Hladina a-SGH protilátek v séru/plazmě

Hladina specifických **IgG** protilátek v séru/plazmě proti slinným antigenům *P. duboscqi* byla měřena metodou ELISA. Srovnávány byly rozdíly mezi hladinou protilátek v různých časech odběru po dobu trvání experimentu (w-2, w0, w6, w11) a rozdíly v jednotlivých časech mezi skupinami. Výsledky pro první **opakování A** jsou zobrazeny na obr. 30. V rámci tohoto opakování byly signifikantně zvýšené hladiny protilátek naměřeny u imunizovaných skupin EXPa ( $p = 0,014$ ), EXPb ( $p = 0,004$ ) a POZ ( $p = 0,007$ ) skupiny při srovnání času před imunizací (w-2) a při ukončování experimentu (w11). U skupiny EXPb byl tento nárůst výraznější a hladina protilátek signifikantně ( $p = 0,034$ ) narostla oproti předchozímu odběru už v čase w6 oproti skupině EXPa, kde k signifikantnímu ( $p = 0,013$ ) nárůstu oproti předchozímu odběru došlo až v čase w11. U skupiny POZ byl signifikantní ( $p = 0,001$ ) nárůst v hladině specifických protilátek (mimo zmíněný rozdíl mezi časy w-2 a w11) i v čase w6, kde hladina specifických protilátek narostla oproti času w0, dále se ovšem už tvorba protilátek signifikantně nezvyšovala. Výraznější nárůst protilátek u skupiny EXPb byl reflektován i při srovnání s negativní kontrolou, kdy rozdíl mezi těmito skupinami byl signifikantní ( $p = 0,026$ ) už v čase w6. V čase w11 bylo naměřeno signifikantní zvýšení hladiny protilátek oproti negativní kontrole jak pro skupinu EXPb ( $p = 0,0006$ ), tak pro skupinu EXPa ( $p = 0,0016$ ), nicméně pro prvně zmíněnou byl tento rozdíl výraznější. Statisticky významný rozdíl v tvorbě protilátek ovšem mezi imunizovanými skupinami nebyl.

Výsledky pro druhé **opakování B** jsou zobrazeny na obr. 31. I pro toto opakování byly signifikantně zvýšené hladiny protilátek naměřeny u imunizovaných skupin EXPa ( $p = 0,005$ ), EXPb ( $p = 0,015$ ) při srovnání času před imunizací (w-2) a při ukončování experimentu (w11), nárůst ovšem nebyl tak výrazný jako v případě prvního opakování. Stejně jako v případě prvního opakování došlo i u POZ skupiny k signifikantnímu ( $p = 0,034$ ) nárůstu hladiny protilátek po čas trvání experimentu, nicméně na rozdíl od prvního opakování nedošlo po infekci ke skokovému signifikantnímu vzrůstu

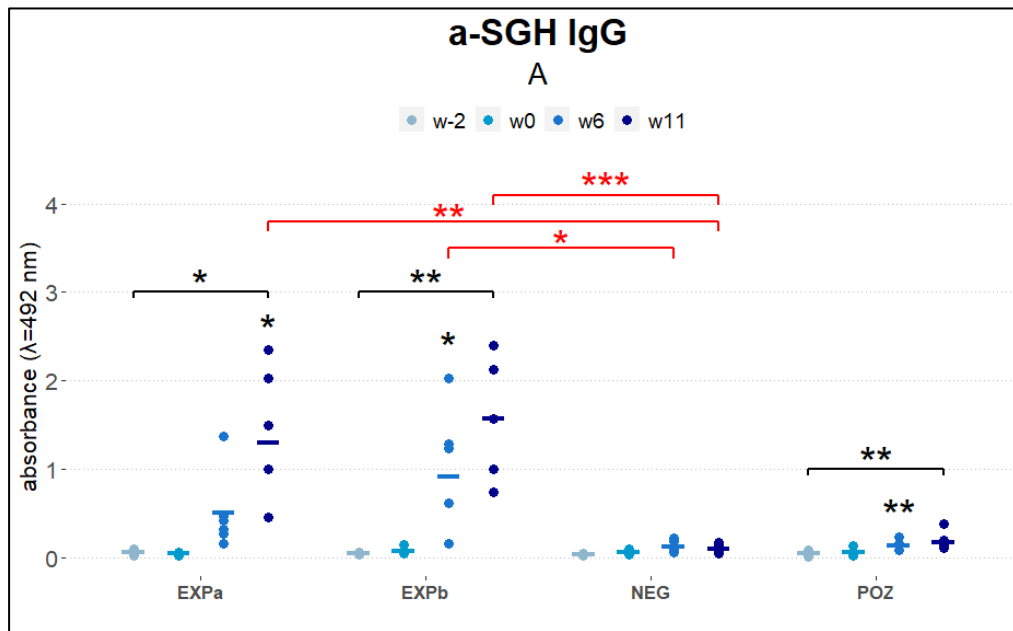
protilátek a jejich zvýšená tvorba se projevila až při srovnání času před imunizací (w-2) a při ukončování experimentu (w11). Na rozdíl od opakování A byl ovšem u tohoto opakování výraznější nárůst protilátek u skupiny EXPa a to přesto, že druhá skupina EXPb byla imunizována častěji. V čase w11 byl pak signifikantní rozdíl oproti negativní kontrole u obou exponovaných skupin (EXPa  $p = 0,001$ ; EXPb  $p = 0,01$ ) a stejně jako u prvního opakování nebyl přítomen statisticky významný rozdíl mezi těmito skupinami v žádném času odběru.

Výrazný rozdíl mezi opakováními byl i v případě specifických protilátek podtřídy **IgG1**. Výsledky pro první **opakování A** (obr. 32) se podobaly výsledkům pro specifické IgG. U imunizovaných skupin EXPa a EXPb byl signifikantní (EXPa  $p = 0,027$ ; EXPb  $p = 0,01$ ) nárůst hladiny protilátek mezi časy před imunizací (w-2) a při ukončování experimentu (w11). Protilátky této podtřídy ovšem narůstaly s výraznějšími rozdíly. U skupiny EXPa signifikantně protilátky vzrostly jak v čase w6 ( $p = 0,019$ ) tak v časech w11 ( $p = 0,047$ ) oproti předcházejícímu měření a u skupiny EXPb narostly protilátky skokově ( $p = 0,007$ ) v čase w6. Oproti IgG, byl signifikantní rozdíl mezi negativní kontrolou a oběma imunizovanými skupinami přítomen již v čase w6 (EXPa  $p = 0,004$ ; EXPb  $p = 0,001$ ) a přetrvával i v čase w11 (EXPa  $p = 0,004$ ; EXPb  $p = 0,003$ ). U POZ skupiny došlo k signifikantnímu ( $p = 0,024$ ) nárůstu hladiny IgG1 v čase w6 a i celkovému, statisticky ( $p = 0,021$ ) významnému, zvýšení tvorby protilátek této podtřídy po čas celého experimentu, což také zrcadlí situaci specifického IgG.

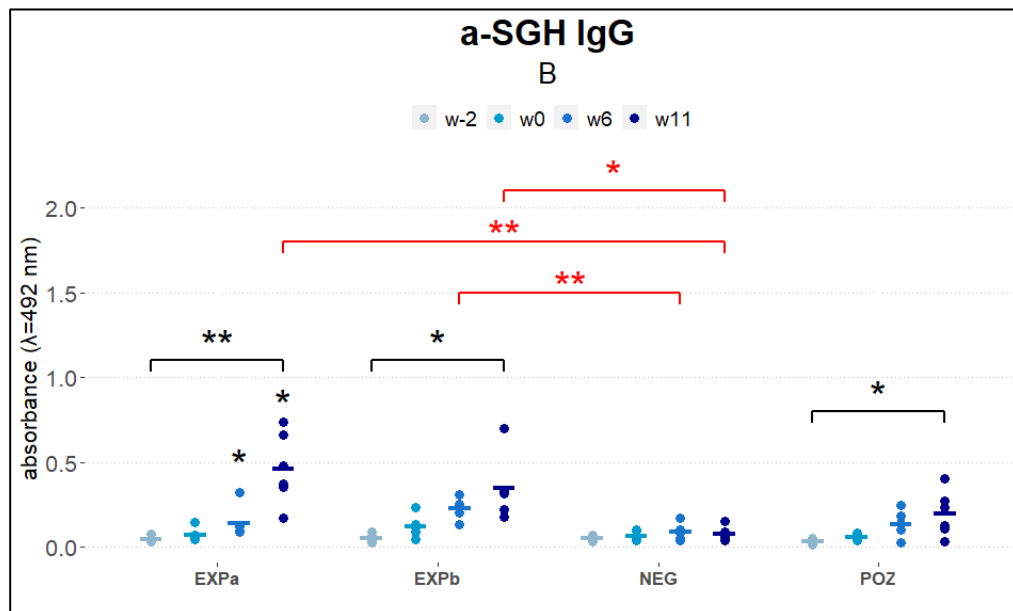
Oproti tomu v rámci druhého **opakování B** (obr. 33) signifikantní nárůsty mezi časy před imunizací (w-2) a při ukončování experimentu (w11) v rámci skupin naměřeny nebyly, přestože trend (EXPa  $p = 0,016$ ; EXPb  $p = 0,073$ ) v nárůstu těchto protilátek oproti negativní kontrole pro čas w11 pozorovatelný byl. Stejně jako v případě IgG byl u tohoto opakování výraznější nárůst protilátek u skupiny EXPa, kde byl přítomen statisticky ( $p = 0,035$ ) významný rozdíl už v čase w6.

Hladiny specifických protilátek podtřídy IgG2a nebyly zvýšené ani u jedné experimentální skupiny nehledě na čas odběru a opakování. Výsledky pro tyto podtřídy jsou zobrazeny na obr. 34 a 35.

**Obr. 30:** Grafické znázornění hladiny a-SGH IgG protilátek v prvním **opakování A** u jednotlivých skupin (EXPa, EXPb, POZ, NEG). Barevně jsou odlišena měření v jednotlivých časech (w-2, w0, w6, w11). \* představuje signifikantní rozdíl, kde  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; černě jsou značeny signifikantní rozdíl v rámci skupin, červeně rozdíl mezi skupinami. Hvězdičky nad jednotlivými sloupci označují signifikantní nárůst protilátek oproti předchozímu času měření.

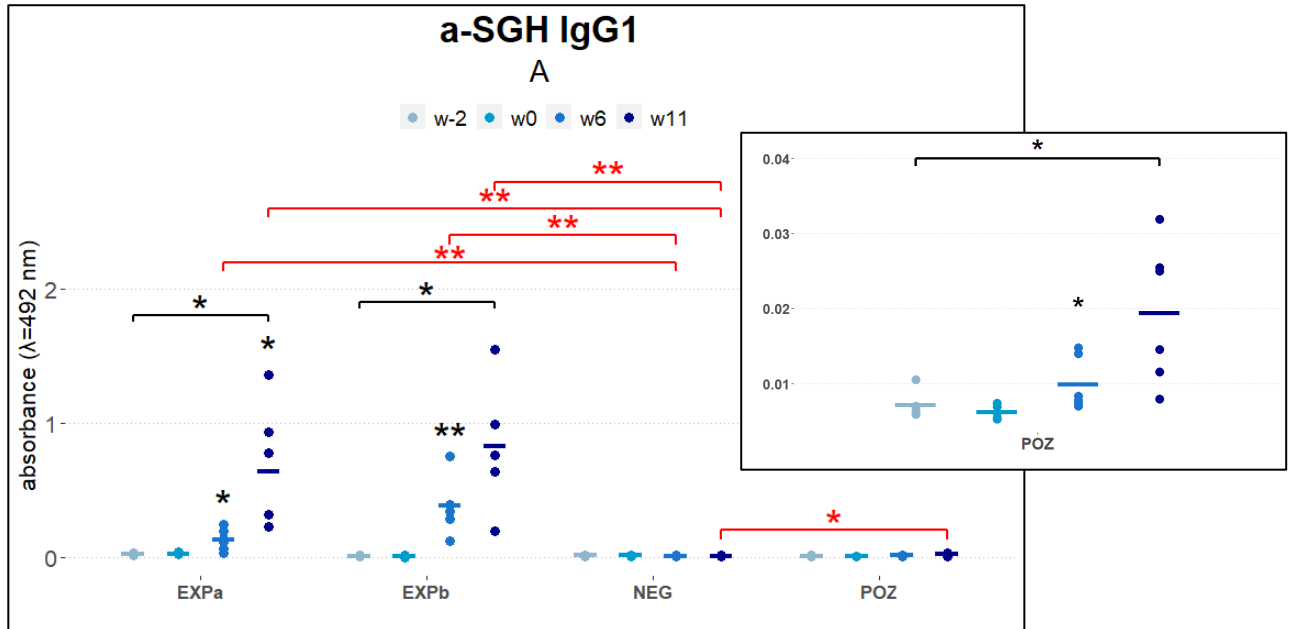


**Obr. 31:** Grafické znázornění hladiny a-SGH IgG protilátek v druhém **opakování B** u jednotlivých skupin (EXPa, EXPb, POZ, NEG). Barevně jsou odlišena měření v jednotlivých časech (w-2, w0, w6, w11). \* představuje signifikantní rozdíl, kde  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ; černě jsou značeny signifikantní rozdíl v rámci skupin, červeně rozdíl mezi skupinami. Hvězdičky nad jednotlivými sloupci označují signifikantní nárůst protilátek oproti předchozímu času měření.

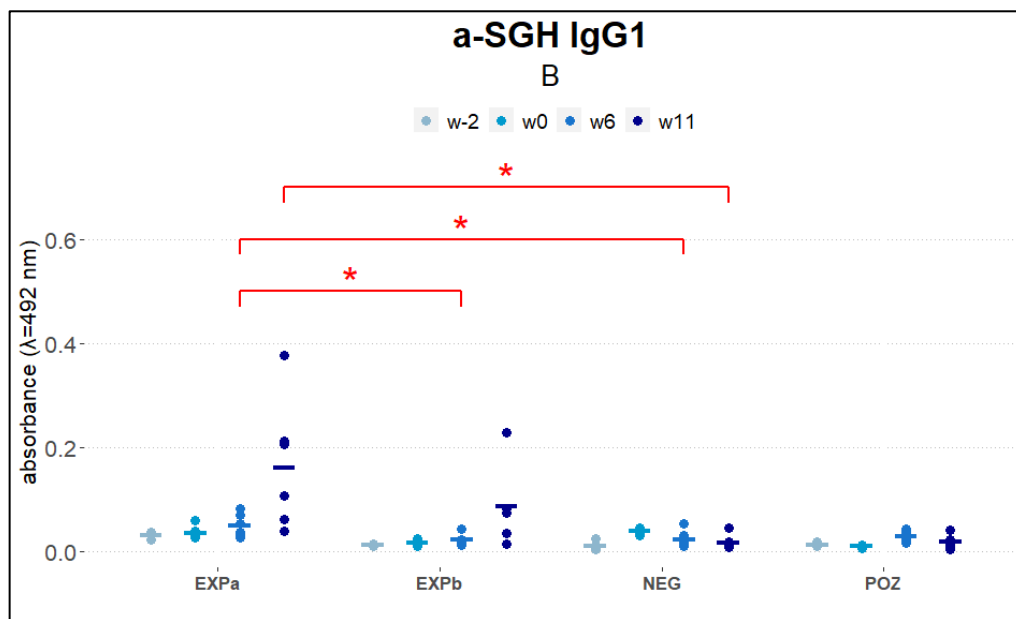




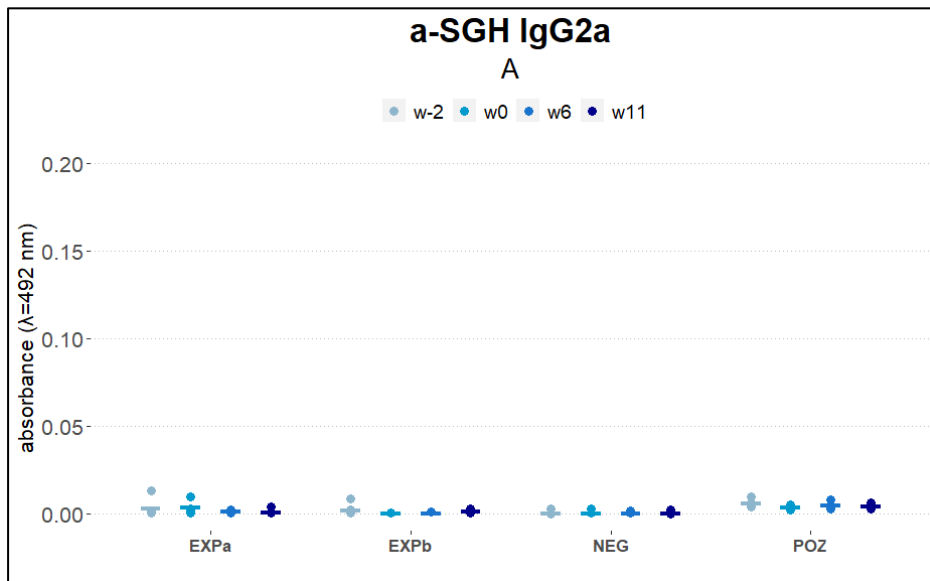
**Obr. 32:** Grafické znázornění hladiny a-SGH IgG1 protilátek v prvním **opakování A** u jednotlivých skupin (EXPa, EXPb, POZ, NEG). Barevně jsou odlišena měření v jednotlivých časech (w-2, w0, w6, w11). \* představuje signifikantní rozdíl, kde  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ; černě jsou značeny signifikantní rozdíl v rámci skupin, červeně rozdíly mezi skupinami. Samostatně je v grafu umístěno grafické znázornění vývoje protilátek v POZ skupině příslušného opakování. Hvězdičky nad jednotlivými sloupci označují signifikantní nárůst protilátek oproti předchozímu času měření.



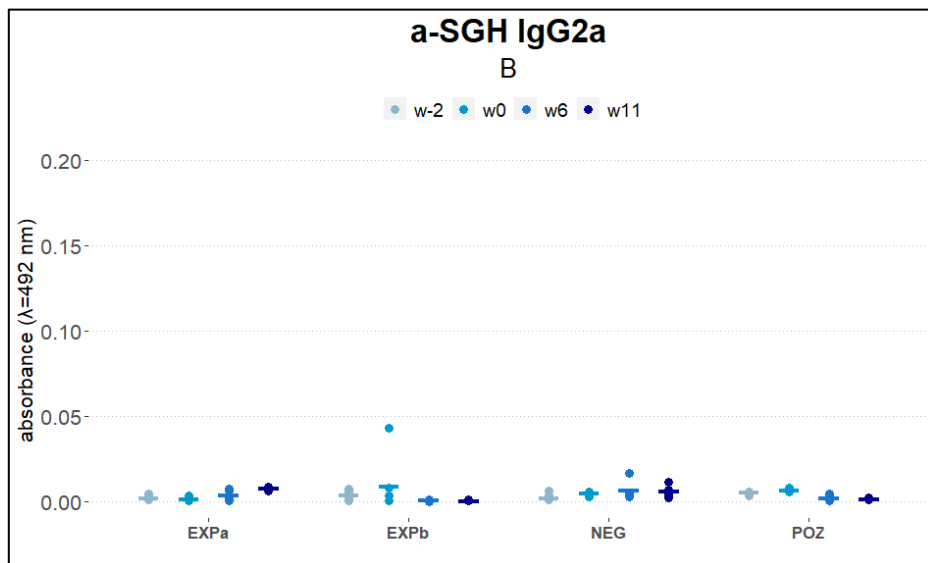
**Obr. 33:** Grafické znázornění hladiny a-SGH IgG1 protilátek v druhém **opakování B** u jednotlivých skupin (EXPa, EXPb, POZ, NEG). Barevně jsou odlišena měření v jednotlivých časech (w-2, w0, w6, w11). \* představuje signifikantní rozdíl, kde  $p < 0,05$ .



**Obr. 34:** Grafické znázornění hladiny a-SGH IgG2a protilátek v prvním **opakování A** u jednotlivých skupin (EXPa, EXPb, POZ, NEG). Barevně jsou odlišena měření v jednotlivých časech (w-2, w0, w6, w11).



**Obr. 35:** Grafické znázornění hladiny a-SGH IgG2a protilátek v druhém **opakování B** u jednotlivých skupin (EXPa, EXPb, POZ, NEG). Barevně jsou odlišena měření v jednotlivých časech (w-2, w0, w6, w11).



### 4.3.2 Detekce cytokinů

Systémová odpověď myši byla měřena na základě produkce cytokinů v kultuře splenocytů. Analyzována byla přítomnost cytokinů IFN $\gamma$ , IL-4 a IL-10, které byla měřeny metodou ELISA. Kultury byly inkubovány po dobu 48 hodin za třech různých podmínek – v přítomnosti SGH *P. duboscqi* (dub), v přítomnosti SLA (leish) nebo úplně bez antigenu (neg). Stejně jako v případě výše popsaných rozdílných hladin protilátek mezi opakováními, i v případě cytokinů byly výsledky pro jednotlivá opakování odlišné. Hladiny produkovaného IFN $\gamma$  (obr. 36, 37) se v prvním **opakování A** signifikantně nelišily ani v rámci skupin, tedy za různých kultivačních podmínek, ani mezi jednotlivými skupinami. Naopak, v druhém **opakování B** se hladiny produkovaného IFN $\gamma$  mezi skupinami lišily. Nejvyšší hladiny IFN $\gamma$  byly změřeny u skupiny EXPb následované skupinou EXPa a poté negativní kontrolou. Nejnižší hladiny IFN $\gamma$  byly produkovány v případě POZ skupiny a to se signifikantním rozdílem vůči exponovaným skupinám v případě kultivace bez přidaného antigenu (POZ  $\times$  EXPb  $p = 0,0002$ ; POZ  $\times$  EXPa  $p = 0,02$ ) a s přidaným SGH (POZ  $\times$  EXPb  $p = 0,001$ ). Odlišné kultivační podmínky (obr. 36) neměly statisticky významný vliv na množství produkovaného IFN $\gamma$  v rámci jednotlivých skupin.

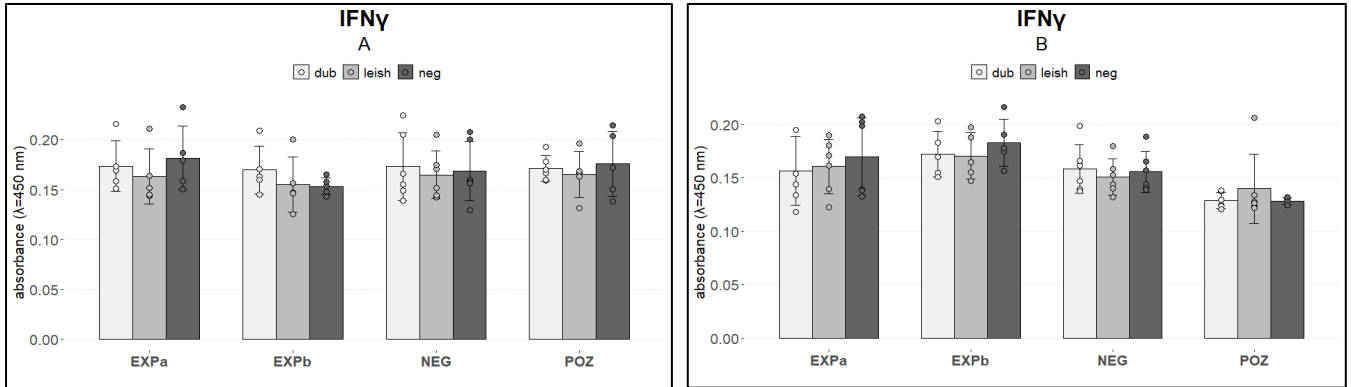
**IL-4** byl v případě prvního **opakování A** nejsilněji produkován v kulturách EXPb skupiny (EXPb  $\times$  NEG  $p < 0,0001$  pro neg kultury) následované skupinou EXPa (EXPa  $\times$  NEG  $p = 0,01$  pro neg kultury), dále skupinou POZ (POZ  $\times$  NEG  $p = 0,012$  pro neg kultury) a nejnižší produkce tohoto cytokinu byla změřena v případě negativní kontroly (obr. 39). Na rozdíl od výše zmíněného IFN $\gamma$  se do produkce IL-4 promítly odlišné kultivační podmínky (obr. 38) a to zejména v případě kultivace s SGH, která signifikantně oproti kulturám bez antigenu (neg) navýšila hladiny tohoto cytokinu v případě obou imunizovaných skupin (EXPa  $p = 0,004$ ; EXPb  $p < 0,0001$ ) a s trendem i v případě POZ skupiny. Druhé **opakování B** bylo co do produkce IL-4 téměř invertované k prvnímu. Skupina EXPb, která produkovala IL-4 nejsilněji v případě prvního opakování, ho u druhého opakování produkovala naopak v průměru signifikantně nejméně (EXPb  $\times$  POZ  $p = 0,03$  pro neg kultury) (obr. 39). Dále s produkcí následovala skupina EXPa, poté skupina POZ a nejvíce ho produkovala negativní kontrola. Rozdílné kultivační podmínky se do produkce IL-4 v případě druhého opakování nepromítly (obr. 38).

Produkce **IL-10** měla podobný vzorec jako produkce IFN $\gamma$ . U prvního **opakování A** nebyly v hladinách IL-10 žádné signifikantní rozdíly mezi skupinami, došlo ovšem k signifikantnímu ( $p = 0,004$ ) nárůstu produkce tohoto cytokinu vlivem přítomného SGH v kultuře u skupiny EXPa (obr. 40). Naopak, u druhého **opakování B** se produkce mezi skupinami lišila. Nejnižší produkce byla změřena v případě skupiny EXPb, nejvyšší v případě POZ skupiny (POZ  $\times$  EXPb  $p = 0,04$  pro neg kultury) (obr. 41). Odlišné kultivační podmínky se na produkci IL-10 ve druhém opakování nepromítly (obr. 40).

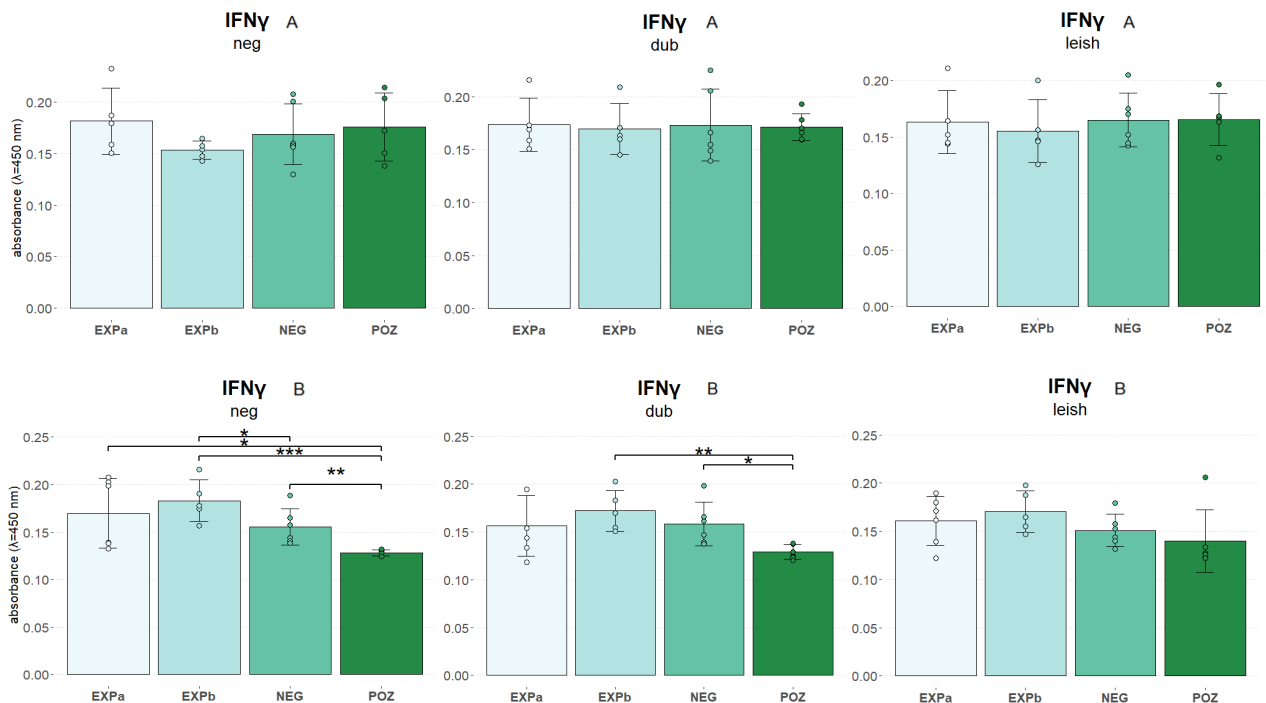
Obecně lze říci, že do produkce cytokinů byla více reflektována příslušnost k jednotlivým experimentálním skupinám (EXPa, EXPb, POZ, NEG), nežli odlišné kultivační podmínky. Ty se

výrazněji promítly do produkce pouze u prvního opakování A v případě IL-4 a IL-10 v případě přidaného SGH (dub) a to pouze u skupin, které byly imunizovány (EXPa, EXPb).

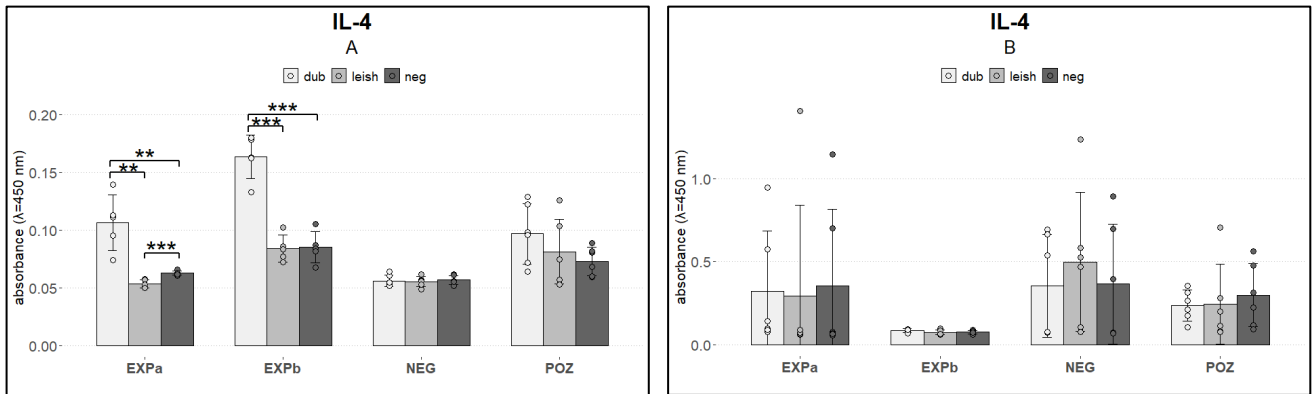
**Obr. 36:** Grafické znázornění hladiny IFN $\gamma$  v **prvním opakování** (A, vlevo) a **druhém opakování** (B, vpravo) u jednotlivých experimentálních skupin (EXPa, EXPb, POZ, NEG). Barevně jsou odlišeny různé kultivační podmínky (dub, leish, neg).



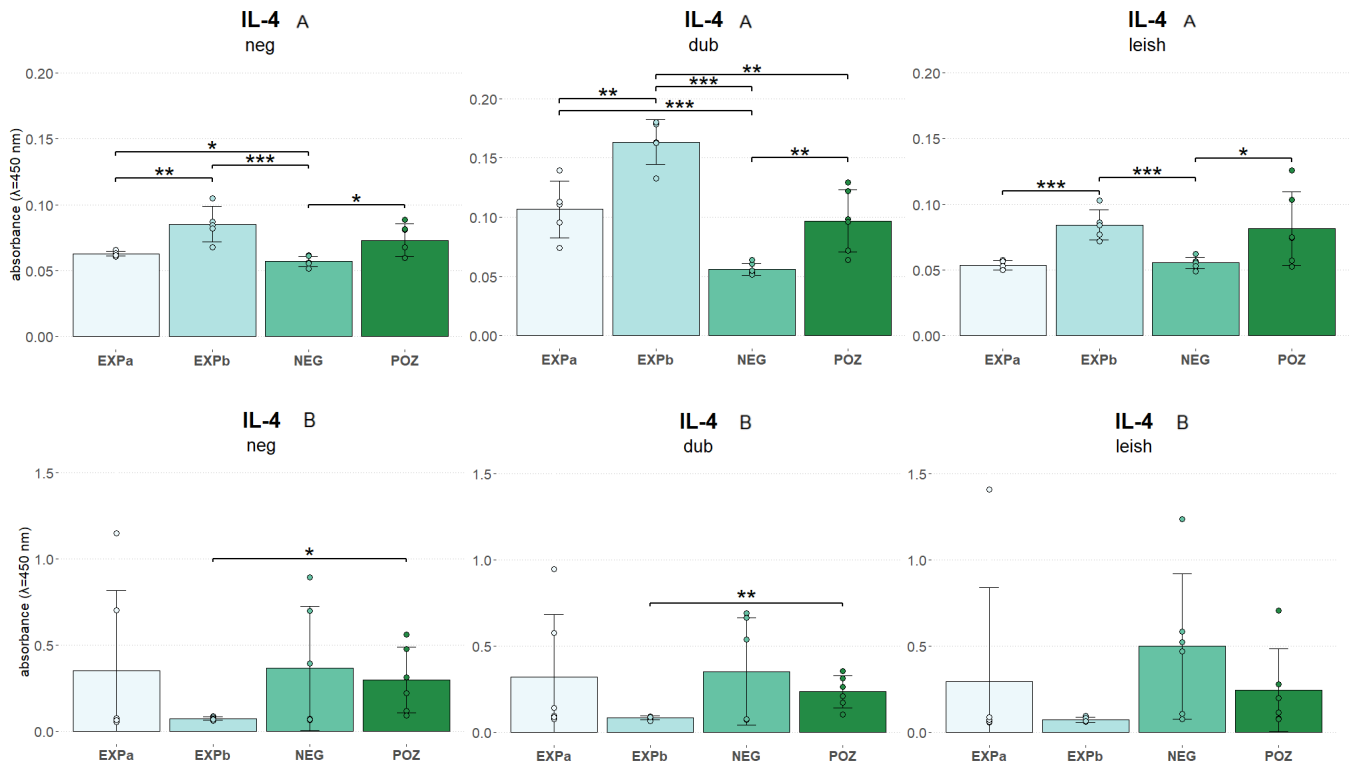
**Obr. 37:** Grafické znázornění hladiny IFN $\gamma$  v **prvním opakování** (A, horní řada) a **druhém opakování** (B, spodní řada) pro jednotlivé kultivační podmínky (dub, leish, neg). \* představuje signifikantní rozdíl, kde  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



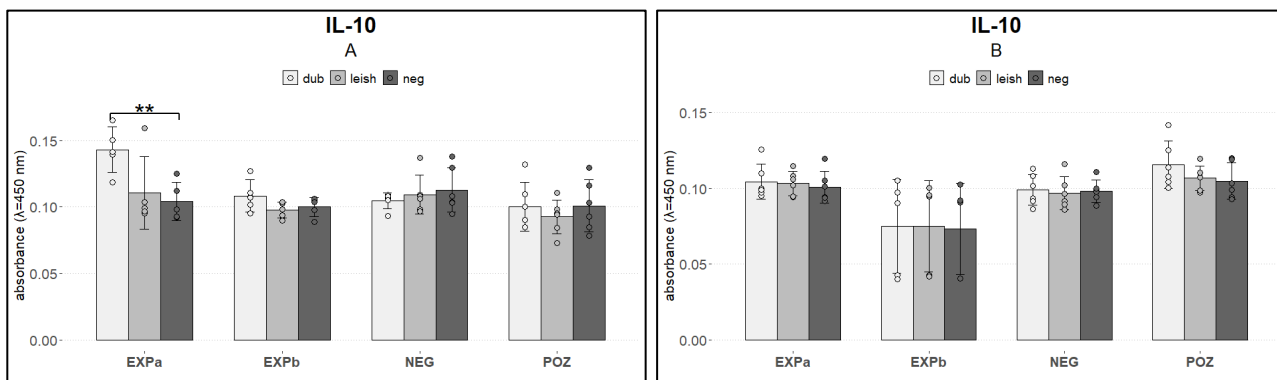
**Obr. 38:** Grafické znázornění hladiny IL-4 v **prvním opakování** (A, vlevo) a **druhém opakování** (B, vpravo) u jednotlivých experimentálních skupin (EXPa, EXPb, POZ, NEG). Barevně jsou odlišeny různé kultivační podmínky (dub, leish, neg). \*\* představuje signifikantní rozdíl, kde  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



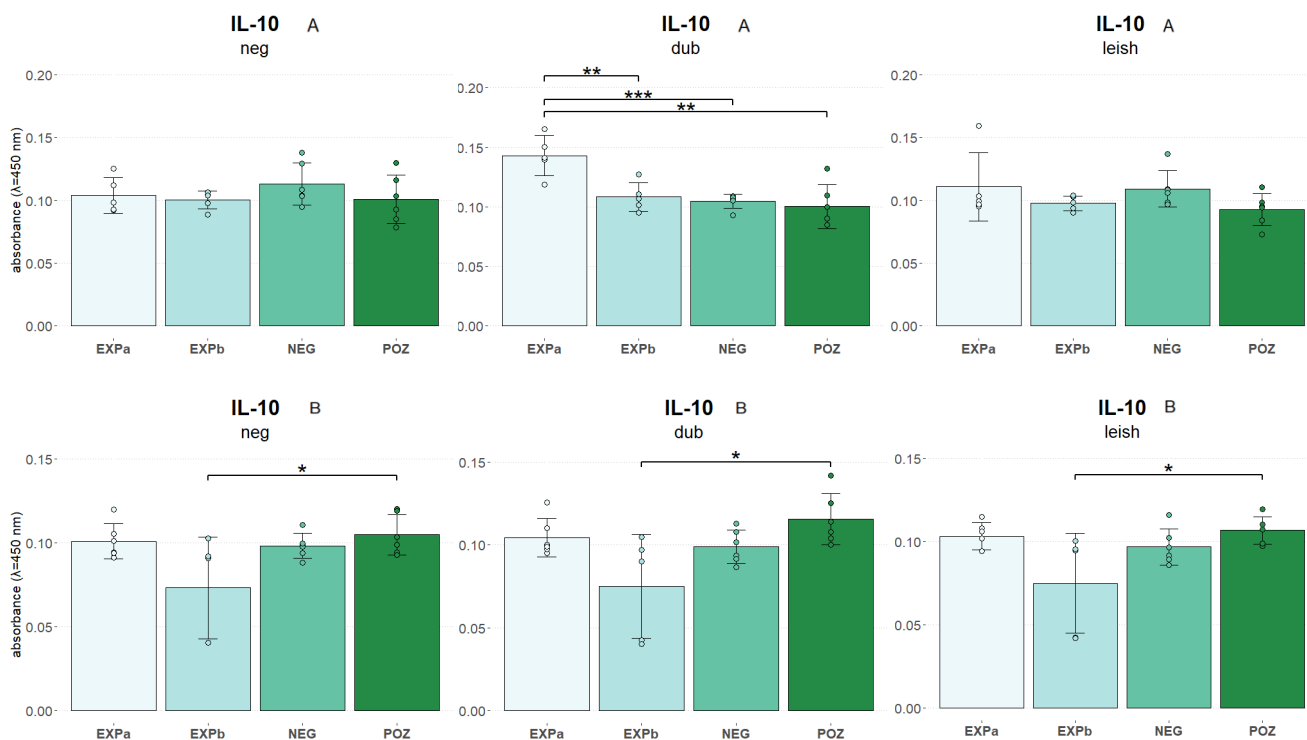
**Obr. 39:** Grafické znázornění hladiny IL-4 v **prvním opakování** (A, horní řada) a **druhém opakování** (B, spodní řada) pro jednotlivé kultivační podmínky (dub, leish, neg). \* představuje signifikantní rozdíl, kde  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Obr. 40:** Grafické znázornění hladiny IL-10 v **prvním opakování** (A, vlevo) a **druhém opakování** (B, vpravo) u jednotlivých experimentálních skupin (EXPa, EXPb, POZ, NEG). Barevně jsou odlišeny různé kultivační podmínky (dub, leish, neg). \*\* představuje signifikantní rozdíl  $p < 0,01$ .



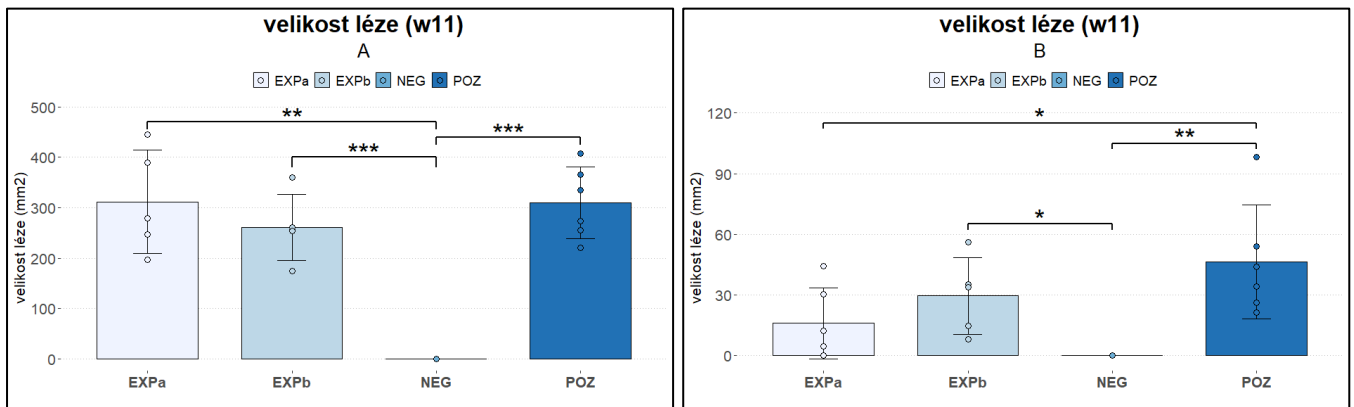
**Obr. 41:** Grafické znázornění hladiny IL-10 v **prvním opakování** (A, horní řada) a **druhém opakování** (B, spodní řada) pro jednotlivé kultivační podmínky (dub, leish, neg). \* představuje signifikantní rozdíl, kde  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



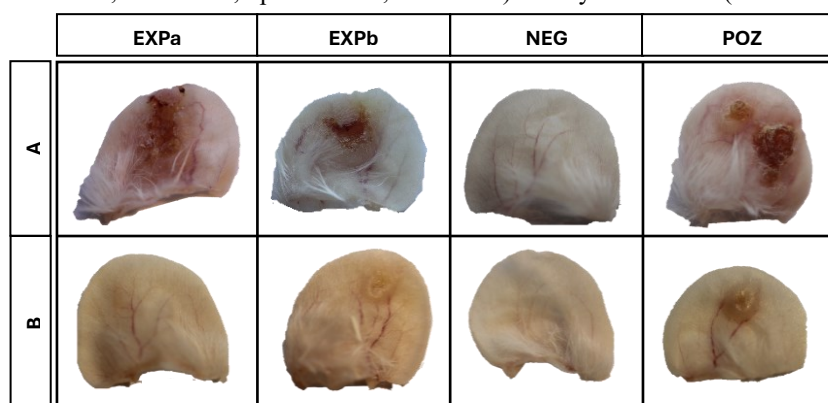
### 4.3.3 Velikost lézí v kontextu měřených parametrů

Vývoj lézí, podobně jako v případě souvisejících výsledků popsanych v předchozích kapitolách, byl mezi opakováními značně odlišný. V případě **opakování A** (obr. 42) došlo k rozvoji lézí s výraznou patologií, které se všechny signifikantně (EXPa  $p = 0,002$ ; EXPb  $p = 0,0009$ ; POZ  $p < 0,0001$ ) lišily od negativní kontroly, nesignifikantně nejmenší léze byly rozvinuty v případě nejvíce exponované skupiny EXPb. Protektivní efekt předchozí imunizace se u tohoto opakování neprojevil. V případě **opakování B** (obr. 42) byl průběh lézí jiný. U obou exponovaných skupin se projevil protektivní efekt, u skupiny EXPa signifikantně ( $p = 0,049$ ) oproti skupině POZ. Skupina EXPa byla také jediná, kde nebyl oproti negativní kontrole signifikantní rozdíl. Na obr. 43 je koláž reprezentativních fotografií kožních lézí každé skupiny v obou opakováních.

**Obr. 42:** Grafické znázornění velikostí lézí v čase w11 v **prvním opakování** (A, nalevo) a **druhém opakování** (B, napravo). \* představuje signifikantní rozdíl, kde  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .



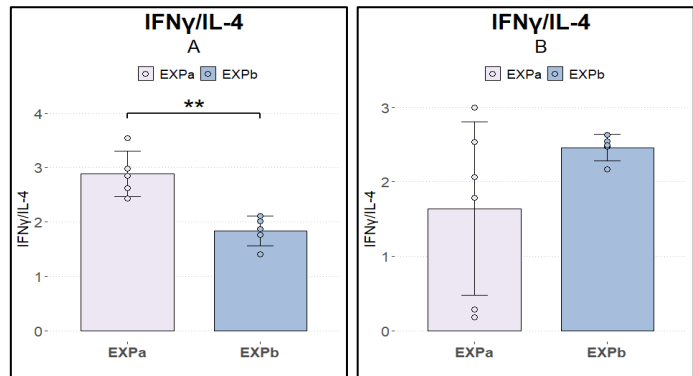
**Obr. 43:** Reprezentativní fotografie pro všechny experimentální skupiny (EXPa, EXPb, NEG, POZ) v obou opakováních (opakování A, horní řada; opakování B, dolní řada) v 11. týdnu infekce (v čase w11).



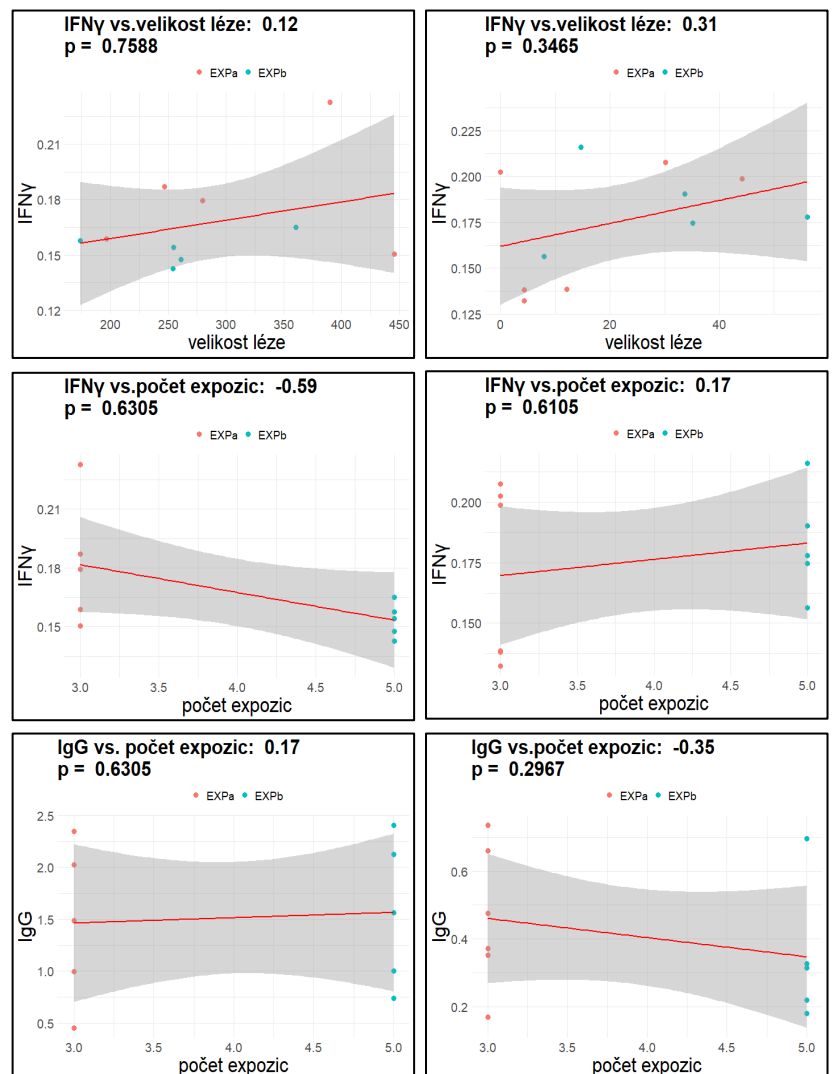
Zajímavý byl sice nesignifikantní, ale i tak **odlišný trend mezi různě exponovanými skupinami u jednotlivých opakování** (obr. 44, 45). Zatímco v případě **opakování A** měla nejmenší léze nejvíce exponovaná skupina EXPb, u **opakování B** to bylo naopak. Nesignifikantně, nicméně přesto s opačnými trendy reagovala opakování i v případě jiných parametrů (obr. 45). Hladiny IFN $\gamma$  u **opakování A** negativně korelovaly s počtem expozií (EXPa  $\times$  EXPb), naopak u **opakování B** hladiny tohoto cytokinu s počtem expozií korelovaly pozitivně. Opačný, ač opět nesignifikantní, byl trend mezi

počtem expozičních a hladinou protilátek, který navazuje na výsledky protilátek zobrazených na obr. 30 a 31. Z těchto grafů vyplývalo, že hladiny IgG nerostou úměrně počtu expozičních. Na obr. 45 je vidět, že trend je přesně opačný oproti situaci pro IFN $\gamma$  vs. počet expozičních, tedy u **opakování A** byla tendence k růstu IgG s počtem expozičních a naopak u **opakování B** byl trend k poklesu IgG s počtem expozičních. Pro obě opakování nicméně společně platilo, že větší léze (přestože rozdíl nebyl signifikantní) z exponovaných skupin daného opakování byla rozvinuta u té skupiny, u níž byly změřeny vyšší hladiny IFN $\gamma$  (obr. 45), respektive vyšší poměr IFN $\gamma$ /IL-4 (obr. 44).

**Obr. 44:** Grafické znázornění poměru IFN $\gamma$ /IL-4 u exponovaných skupin EXPa a EXPb v **prvním opakování** (A, nalevo) a **druhém opakování** (B, napravo). \*\* představuje signifikantní rozdíl, kde  $p < 0,01$ .



**Obr. 45:** Grafické znázornění korelačních analýz mezi vybranými parametry u exponovaných skupin v **prvním opakování** (A, sloupec nalevo) a **druhém opakování** (B, sloupec napravo). Hodnota korelačního koeficientu je za dvojtečkou u popisu jednotlivého grafu, p-hodnota je na řádce pod ní. Barevně jsou odlišeny hodnoty pro skupinu EXPa (oranžově) a EXPb (modře).





## 5 Diskuze

Různé formy imunitní reakce vůči slinám flebotomů už poměrně dlouho skýtají potenciál praktického využití (Lestinova et al., 2017). Humorální imunita je spojena především s mírou expozice flebotomům a využívá se jako její marker. Buněčná imunita je spojena s protekcí vůči leishmaniové infekci nicméně v této rovině se zatím jedná pouze o teoretické využití. Tato diplomová práce se zabývala ve třech různých cílech a třech různých systémech obojím.

**Prvním cílem** diplomové práce bylo zjistit využitelnost dlouhodobě imunizovaných myši pro případné *ex vivo/in vitro* experimenty zaměřené na produkci protilátek se specifitou vůči slinám flebotomů. Tyto myši jsou v laboratoři Biologie hmyzích vektorů využívány jako zdroj krve pro samice flebotomů, přičemž myši jsou vystaveny sání vždy jen jednomu druhu flebotomů. K sání dochází zhruba jednou za 14 dní po dobu přibližně jednoho roku, přičemž se myši poté již dále nevyužívají. Navíc odběr vnitřních orgánů z usmrcených myši nepodléhá legislativní zátěži v podobě schváleného projektu pokusů. Testovali jsme tedy slezinu jako možný zdroj buněk pro produkci protilátek a využili jsme možnosti sledovat specifitu těchto protilátek vůči danému druhu flebotoma. V kulturách splenocytů z imunizovaných myši sice došlo k produkci specifických protilátek, nicméně ne u všech a to navzdory potvrzené přítomnosti v séru. Průměrně nejsilnější produkce a-dub byla v případě kultur bez přidaného antigenu. Paradoxně, v kulturách s přidaným homologním antigenem SGH *P. duboscqi* nebyla změřena žádná přítomnost produkovaných protilátek, což ovšem může být způsobeno i jejich vyvázáním na přítomný antigen. Zajímavé bylo, že ELISA detekující přítomnost a-lon v kultuře splenocytů ukázala i na produkci těchto protilátek, a to i přestože se myši s tímto antigenem nikdy neseťkaly a v séru nebyla jejich přítomnost detekována. Jedná se tak pravděpodobně o nespecifickou reakci mezi SGH *L. longipalpis* s blíže neurčenými protilátkami produkovanými v kultuře. Signifikantně nejnižší produkce těchto protilátek byla změřena v případě kultivace s nehomologním antigenem (SGH *L. longipalpis*, lon), což by mohlo ukazovat na obecně inhibiční vliv slin tohoto druhu flebotoma na buňky imunitního systému (Mbow et al., 1998; Rohoušová et al., 2005). K vyladění metody produkce protilátek v kultuře imunizovaných myši a otestování jiné koncentrace homologního antigenu bohužel nedošlo vzhledem ke špatnému stavu myši po odstavení z kolonie. I z tohoto důvodu nevyzpytatelné dostupnosti použitelného modelu a také z důvodu výrazných patologických změn na slezině, které také mohly být příčinou nedostatečné produkce protilátek v kultuře, se dlouhodobě imunizované myši nejeví jako vhodný experimentální model pro *ex vivo* studie tohoto typu.

**Druhý cíl** diplomové práce se zabýval imunitní reakcí u imunizované myši, která je spojena s protekcí vůči infekci *Le. major*. Práce se zabývala leukocytárním složením v uchu imunizované myši a hladinou specifických protilátek proti slinným antigenům *P. duboscqi*. K porovnání byly zvoleny dva rozdílné časy a to sice dva dny od posledního sání (D2) a sedm dní od posledního sání (D7), což navazuje

na diplomovou práci Kristýny Jelínkové, která prokázala že tyto rozdílné časy infikování mají signifikantní vliv na následný průběh infekce (Jelínková, 2022). Prvně zmíněný čas D2 byl zvolen s ohledem na očekávanou přítomnost DTH reakce, která je dávana za příčinu protektivního efektu a je makroskopicky charakterizována otokem, mikroskopicky pak přítomností výrazného infiltrátu buněk od sání zahrnující především mononukleární fagocyty a lymfocyty (Belkaid et al., 2000; Oliveira et al., 2013). S postupem času má intenzita imunitní reakce tendenci klesat, což reflektuje zvolený čas D7. To podpořila i tato diplomová práce, kdy při analýze průtokovou cytometrií sice rozdíly mezi exponovanými a kontrolními myši v čase D7 přítomny byly, nicméně klesly pod hranici signifikance. Také na histologických preparátech byl v čase D7 pozorován výrazně menší infiltrát oproti dřívějšímu času. Naopak, v čase D2 byly u imunizovaných myší signifikantně navýšeny počty většiny leukocytů, které byly v experimentech měřeny, vyjímaje neutrofilů. Celá populace CD11b<sup>+</sup> myeloidních buněk byla v čase D2 zvýšena až více jak 3× oproti negativním kontrolám. Vlivem sání byly nejvíce zvýšené eozinofily (až více jako 7×) následované populací Mo/MΦ (až 3,4×), která také z většiny pokrývala přítomné APC (jejich počet byl zvýšen až 3,6×). Populace neutrofilů sice byla vlivem sání navýšena, oproti předchozím populacím byl ale rozdíl nejnižší (až 3× oproti negativní kontrole), nebyl signifikantní a celkový počet těchto buněk byl mnohonásobně menší oproti ostatním populacím, v případě eozinofilů až více jako 10× v čase D2. V čase D7 byl zachován podobný vzorec zastoupených leukocytů v infiltrátu, kdy největší rozdíl oproti kontrolám byl zaznamenán u eozinofilů (až 4×). Celkově byl ovšem počet v kůži přítomných CD45<sup>+</sup> leukocytů navýšen oproti negativní kontrole pouze 1,8× oproti 2,6× v čase D2.

Experiment byl opakován dvakrát, přičemž největší diskrepance byla v celkovém počtu vyizolovaných buněk v druhém opakování a ve velikosti Mo/MΦ populace. Příčinou tohoto nesouladu by s největší pravděpodobností mohla být chyba v postupu izolace. Součástí enzymatické směsi pro izolaci buněk jsou dispáza a kolagenáza štěpící tkáň a DNáza, která štěpí volně přítomnou DNA, díky které se k sobě izolované buňky přichycují (Reichard and Asosingh, 2019). Důležitou součástí izolačního procesu je také EDTA, která je přidávána do promývacího roztoku, váže dvojmocné kationty a tím jednak inhibuje nežádoucí činnost trávicích enzymů, jednak zabraňuje buňkám ve shlukování a vyvazuje je z mezibuněčných interakcí v tkáních (Reichard and Asosingh, 2019). Nechtěné vynechání některé z těchto složek při procesu izolace, či jejich nižší koncentrace než je dána protokolem, by mohla být příčinou nízké výtěžnosti izolovaných buněk v druhém opakování. Tuto teorii podporuje i fakt, že v případě druhého opakování byl při analýze měření průtokovou cytometrií problémem především menší počet singletů, tedy samostatně se vyskytujících buněk (v grafech nezobrazeno), a že populací leukocytů s největším rozdílem mezi opakováními byly Mo/MΦ buňky, které za běžných podmínek přirozeně adherují, čemuž právě zmíněná EDTA zabraňuje (Reichard and Asosingh, 2019). Navíc, na histologických preparátech nebyl na příkladových řezech pozorován rozdíl ve velikosti infiltrátu mezi prvním a druhým opakováním experimentu, tak aby odrazil odpovídající výsledky z cytometrie.

Výše popsané imunologické mikroklima poodhalené průtokovou cytometrií představuje potenciálně chráněné ucho před závažným rozvojem leishmaniové léze. Nejméně zastoupenou populací leukocytů v tomto infiltrátu byly neutrofilů. Jejich přítomnost byla prokázána i na histologických řezech barvených na přítomnost MPO, která je typicky s neutrofilů spojována, ačkoliv se může vyskytovat i v populaci Mo/MΦ, která je diskutována níže (Aratani, 2018; Gurski and Dittel, 2022). Neutrofilů reprezentují jednu z nejskloňovanějších leukocytárních populací v souvislosti s leishmaniovou infekcí a vstupují na místo sání jako první infiltrující se buňky (již 2 hodiny po infekci) (Peters et al., 2008). Představují pro parazita tolerantní hostitelský systém a jejich přítomnost je minimálně u BALB/c myši asociována s horším průběhem infekce a naopak, jejich deplece vede k signifikantní redukci přeživších leishmanií (Charmoy et al., 2010; Peters et al., 2008; Romano et al., 2017). Je známo, že sliny flebotomů působí na neutrofilů chemoatraktivně a jejich přítomnost v místě infekčního sání se podílí na mozaice faktorů formující *enhancing* efekt (Guimaraes-Costa et al., 2021; Peters and Sacks, 2009). Infikované neutrofilů se krom tolerantní koexistence s parazitem podílí na raném etablování infekce i produkcí chemokinů MCP-1 a MIP-1β, které do místa lákají makrofágy a monocyty, klíčové hostitelské buňky leishmanií, ve kterých dochází k množení parazita (Prates et al., 2011; van Zandbergen et al., 2004). Na nemalou roli neutrofilů v raném etablování infekce poukázala i studie zabývající se infekcí C57BL/6 myši promastigoty *L. major* prostřednictvím infekčního sání *P. duboscqi* (Chaves et al., 2020). Neutrofilů tvořily jednu z nejvíce nakažených populací leukocytů v prvních 24 hodinách infekce. Prvenství ve studii (Chaves et al., 2020) ovšem držely v tkáni přítomné makrofágy (angl. dermal tissue resident macrophages, TRM), které byly vůbec nejvíce infikovanou buněčnou populací a jejich deplece či narušení schopnosti fagocytózy výrazně potlačilo rozvoj infekce.

Studie Chaves et al., (2020) také ukázala, že výrazný podíl mezi hostitelskými buňkami *L. major* byl držen i monocyty a dendritickými buňkami odvozenými od monocytů (monocytes-derived dendritic cells, mo-DC). Na zásadní roli monocytů a od monocytů odvozených fagocytů upozornila i jiná studie, kde autoři pracovali s myšmi deficientními na IFNγ (Carneiro et al., 2020). U těchto modifikovaných myší, s takto navozenou Th2 imunitou, sice došlo v pozdějších fázích infekce k silnější progresi nemoci doprovázené většími lézemi a větší parazitární náloží, nicméně v časných projevech byl efekt opačný. Vlivem chybějícího IFNγ došlo v raných stádiích infekce ke snížení počtu infiltrujících se monocytů do místa infekce a následně i k menšímu počtu infikovaných fagocytů, které od monocytů byly odvozeny, tedy makrofágů a dendritických buněk (Carneiro et al., 2020). Monocyty spolu s IFNγ jsou dle studie pro rané ustanovení infekce určující. To podporují i závěry dalších studií, kde monocyty a makrofágy jako vnímavé hostitelské buňky převzali leishmanie v pozdějších fázích infekce od infikovaných neutrofilů (Carregaro et al., 2013; Peters et al., 2008; Romano et al., 2017). Romano et al. (2017) nicméně ukázali, že monocyty jsou pro leishmanie nekonfliktním spojencem především v primární infekci, kdy se s parazity setkávají v nematurovaném stavu. V případě opakované infekce už monocyty podstupují maturaci, kterou doprovází i exprese iNOS a produkce NO. Takovéto monocyty již přítomné parazity efektivně likvidují (Romano et al., 2017). iNOS je spojena s mikrobicidní aktivitou

makrofágů/monocytů a exprimuje se vlivem působení IFN $\gamma$  (Allman et al., 2015; Bogdan, 2020; Panaro et al., 1999). Produktem iNOS je NO, klíčová efektorová molekula v boji s leishmaniovou infekcí. Nízká tkáňová exprese je spojená s hlubší patologií infekce (Allman et al., 2015; Vellozo et al., 2017) a v případě aplikace inhibitorů iNOS dochází k potlačení likvidace parazita (Liew et al., 1990). V diplomové práci bylo zastoupení CD11b+F4/80+Ly6C+ monocytů analyzováno v druhém opakování experimentu, kdy se ukázalo, že v čase D2 u imunizované skupiny představují 39 % CD11b+F4/80+ buněk oproti 13 % v případě kontrolní skupiny. Dochází tedy k signifikantnímu infiltrování těchto buněk do místa sání. V čase D7 byl nicméně počet těchto buněk srovnatelný s negativní kontrolou. Imunohistochemické značení iNOS neprokázalo její tkáňovou expresi, což ve vztahu k monocytům ukazuje spíše na nematurovaný status těchto buněk. Neexprimovaná iNOS na řezech z imunizovaných myší je v souladu s faktem, že sliny flebotomů napříč druhy mají obecnou tendenci expresi tohoto enzymu potlačovat (Demarta-Gatsi and Mécheri, 2021). S odkazem na výše zmíněnou roli nematurovaných monocytů jako klíčových hostitelských buněk leishmanií je také na místě zmínit, že Jelínková ve své práci (2022) prokázala, že infekce v čase D2 vede k signifikantně horšímu průběhu léze ve srovnání s infekcí v čase D7 – tedy v čase, ve kterém se v místě sání podle výsledků této práce nevyskytuje zvýšené množství CD11b+F4/80+Ly6C+ monocytů. Ačkoliv na histologických preparátech nebyla pozorována přítomná iNOS, byla zaznamenána přítomnost buněk pozitivních na druhý analyzovaný enzym, MPO. MPO+ buňky mohou být jednak neutrofilů, které jí exprimují především a jsou diskutovány výše, může se ale jednat i o F4/80+Ly6C+ monocyty, ve kterých se MPO vyskytuje také (Aratani, 2018; Gurski and Dittel, 2022). V souladu s cytometrickými výsledky neutrofilů a CD11b+F4/80+Ly6C+ monocytů i MPO+ buňky byly na histologických řezech přítomny především v čase D2.

Další, k monocytům blízkou populací leukocytů, kterou se diplomová práce zabývala byly makrofágy. Ty mají při studiu leishmaniových infekcí opodstatněně výsostnou roli. Ve vztahu k parazitovi totiž reprezentují dvousečný meč, jehož efekt se odvíjí od jejich imunologického fenotypu (Tomiotto-Pellissier et al., 2018). Vlivem protizánětlivých cytokinů jako především IL-4, IL-13, TGF $\beta$  nebo IL-10 vznikají M2 makrofágy, které jsou pro parazita koncovou hostitelskou buňkou a umožňují bujení infekce. Protipól představují M1 makrofágy, které vznikají pod vlivem prozánětlivých cytokinů jako IFN $\gamma$  nebo TNF $\alpha$  a jsou klíčové pro efektivní likvidaci parazita (Bogdan, 2020; Lee et al., 2018; Muraille et al., 2014). Paradigma M1/M2 makrofágů je úzce svázané s Th1/Th2 paradigmatickým a co se týče především kožní leishmaniózy působené *Le. major*, dobře vysvětluje otázku rezistence a citlivosti k infekci. Ve studii Lee et al. (2018) autoři prokázali, že kmen *Le. major* Seidman, který je spojen s nehojící se kožní leishmaniózou se preferenčně vyskytuje v tkáňových makrofázích s M2 fenotypem. Pokud došlo k selektivní depleci těchto vnímavých hostitelských buněk, myši byly schopné bojovat s infekcí stejně jako v případě běžného kmene *Le. major*. M2 fenotyp makrofágů byl také příčinou signifikantně zhoršené patologie doprovázející infekci *Le. major* u mutantních myší postrádajících TACI receptor, který je klíčový v humorální imunitě, což vedlo k preferenčnímu protizánětlivému fenotypu

makrofágů (Allman et al., 2015). Tyto myši měly výrazně redukovanou expresi iNOS v nakažené tkáni a jejich schopnost boje s infekcí byla obnovena až s dodáním makrofágů z nemutantních jedinců, která byla doprovázena i nárůstem IFN $\gamma$ + T lymfocytů (Allman et al., 2015). Vellozo et al. (2017) porovnávali fenotyp makrofágů z BALB/c a C57BL/6 myši pod vlivem infekce *Le. major* nebo *Le. braziliensis*. Ukázali, že rezistence C57BL/6 myši k infekci *Le. major* je spojena s úspěšnou maturací nezralých makrofágů na makrofágy s M1 fenotypem spojenou s expresí iNOS a produkcí NO. Vedle toho infekce *Le. braziliensis* vedla k diferenciaci M1 makrofágů u obou myších kmenů, přestože u BALB/c slaběji, což i odpovídá skutečnosti, že infekci *Le. braziliensis* jsou BALB/c myši schopné regulovat na rozdíl od infekce *Le. major* (Rocha et al., 2007).

V diplomové práci byl imunologický status F4/80+ Mo/M $\Phi$  analyzován průtokovou cytometrií na základě exprese CD38 markeru a nespecificky k těmto buňkám i imunohistochemicky na základě tkáňové přítomnosti iNOS. CD38 je povrchový glykoprotein přítomný na různých imunitních buňkách, který byl relativně recentně navržen jako nový možný marker M1 makrofágů (Glaría and Valledor, 2020; Li et al., 2022). Exprese CD38 je spjata s přítomností prozánětlivých cytokinů (Amici et al., 2018; Musso et al., 2001) a obranou vůči patogenům. Příkladem jsou CD38 deficientní myši, které jsou citlivější k infekci *Listeria monocytogenes* (Lischke et al., 2013) nebo splenocyty z CD38 deficientních myši, které při infekci *Mycobacterium avium* produkují menší množství IFN $\gamma$  a tato skutečnost se odráží i v omezené schopnosti likvidace tohoto intracelulárního patogenu (Viegas et al., 2007). Jablonski et al., (2015) navíc prokázali, že se exprese CD38 na povrchu myších monocytů/makrofágů zvyšuje stimulací LPS a že se výskyt tohoto markeru překrývá s expresí iNOS. Navzdory očekávání, diplomová práce neprokázala přítomnost ani CD38+ F4/80+ Mo/M $\Phi$  ani, jak bylo zmíněno již výše, exprimovanou iNOS, což nepodporuje přítomnost prozánětlivě laděných makrofágů v imunizovaném uchu, tedy těch které jsou spojené s protekcí proti leishmanii (Allman et al., 2015; Rocha et al., 2007).

Jak již bylo popsáno výše, ze sledovaných populací leukocytů, kterými se diplomová práce zabývala, na sání nejsilněji reagovaly eozinofily. Na ty bylo dříve nahlíženo především jako na zprostředkovatele jistých efektorových funkcí spojených s mikrobicidními proteiny jejich cytoplasmatických granulí, které doprovázejí alergické reakce a infekce helminty (Shamri et al., 2011). Funkční záběr těchto buněk je však širší, mimo přímou likvidační úlohu působí eozinofily i imunomodulačně, jedná se o APC, syntetizují řadu cytokinů, chemokinů a růstových hormonů a také se jejich působením aktivují další buňky imunitního systému (Shamri et al., 2011; Spencer and Weller, 2010). Eozinofily na místo sání ve větší míře pronikají až s opakovanými imunizacemi. Na to poukázala např. studie zabývající se buněčným infiltrátem v reakci na sání *L. longipalpis* (Mejia et al., 2010). Ta demonstrovala, že zatímco u jedné sání myši představují dominantní buněčnou populaci neutrofilů, v případě opakovaně imunizovaných myši se jedná o eozinofily a mononukleární buňky. To bylo potvrzeno i na histologických řezech uší v rámci diplomové práce, kdy eozinofily tvořily spolu s mononukleárními buňkami dominantní populaci leukocytů jak v čase D2, tak v čase D7. Na poměrně masivní reakci eozinofilů na opakované sání flebotomů upozornila už nejedna studie týkající se např.

druhů *P. papatasi* (Belkaid et al., 2000, 1998), *L. longipalpis* (Collin et al., 2009; Mejia et al., 2010) nebo *P. duboscqi* (de Araujo et al., 2024). Eozinofily jsou tak významnou součástí infiltrátu leukocytů korelujícího s manifestací protektivního efektu, paradoxně je ovšem studium jejich role zastíněno pozorností směřující spíše k makrofágům a neutrofilům. Eozinofily jsou nicméně schopny likvidace leishmanií *in vitro* (Oliveira et al., 1997; Pearson et al., 1987; Pimenta et al., 1987) ovšem jejich role v rozvoji leishmaniózy je stále kontroverzní (Rodríguez and Wilson, 2014). Při studii infekce *Le. amazonensis* na IL-5 transgenních myších C3H/HeN/TgN u nichž 50% leukocytů periferní krve představují eozinofily autoři zjistili, že tyto myši mají oproti kontrolám mírnější průběh infekce (Watanabe et al., 2004). Zajímavě také u těchto nakažených mutantů nezhoršovalo vývoj nemoci denní podávání IL-4, které u kontrolního kmene signifikantně prohlubovalo patologii spojenou s infekcí. Příznivý vliv eozinofilů autoři podpořili i na studii provedené na BALB/c myších, kterým byl před infekcí injikován plazmid kódující IL-5, cytokin s přední rolí v diferenciaci a migraci eozinofilů (Nagata et al., 2020; Spencer and Weller, 2010). Zvýšená produkce tohoto cytokinu vedla u myši k potlačení růstu léze, tedy k efektu, kterého nebyly schopny docílit plazmidy kódující IL-4 a IFN $\gamma$  (Watanabe et al., 2004). Přítomnost eozinofilů v místě infekce byla pozitivně korelována s mírnějším průběhem léze v případě psů nakažených *Le. infantum* (Menezes-Souza et al., 2012), C3H.He myši nakažených *Le. amazonensis* (de Oliveira Cardoso et al., 2010) a mutantního myšního kmene deficitního na *toll-like* receptory 2, které byly infikované *Le. amazonensis* (Guerra et al., 2010). Tyto myši měly oproti kontrolním C57BL/6 myším celkově menší zánětlivý infiltrát, který se ovšem skládal převážně z eozinofilů tvořících organizované granulomy a infekci doprovázenou neulcerujícími lézemi a signifikantně nižší parazitární náloží (Guerra et al., 2010). Ve studii Almeida et al. (2024), kde byly *Le. amazonensis* infikovány BALB/c myši a myši kmene  $\Delta$ dbl-GATA1 postrádající eozinofily, sice autoři neprokázali jakýkoli vliv těchto leukocytů na vývoj infekce v raných týdnech od nákazy, nicméně v pozdějších stádiích došlo u mutantních myši bez eozinofilů k rozvoji sekundárních lézí na končetinách, nose, uších a ocasu a tyto myši měly také od 9. týdne nákazy vyšší parazitární náloží. Naopak, k negativnímu vlivu eozinofilů na vývoj infekce *Le. major* dospěli ve studii pracující s mutantními kmeny myši s různě omezenou produkcí IL-4 (Lee et al., 2020). V této studii autoři prokázali, že eozinofily a jejich produkce IL-4/IL-10 byly klíčovými faktory udržující TRM v protizánětlivém M2 fenotypu. U mutantních myši, které postrádaly tyto imunitní hráče nebo u myši postrádajících IL-5 či ošetřené protilátkami proti eozinofilům (anti-SiglecF) bylo místo infekce *Le. major* charakterizováno redukováným počtem protizánětlivě laděných TRM a infiltrované větším množstvím zánětlivých mo-DC a CD4 $^{+}$  T lymfocytů, což bylo spojeno i s mírnějšími projevy lézí (Lee et al., 2020).

Eozinofily jako leukocyty jsou spojené především s Th2 imunitní odpovědí, která je obecně vnímána jako ne příliš účinná proti intracelulárním parazitům. I když jak bylo nastíněno výše, každé dogma má své limity. Eozinofily byly napříč studiemi etablovány za popravčí leishmanií prostřednictvím NO (Oliveira et al., 1997), peroxidu vodíku (Watanabe et al., 2004), superoxidového aniontu (Pearson et al., 1987), obsahu svých granulí (Abengózar et al., 2022; Salaiza-Suazo et al., 2024)

a eozinofilních extracelulárních sítí (Salaiza-Suazo et al., 2024). Carneiro et al. (2020) navíc poukázali na paradox, že přestože Th2 imunitní odpověď je v kontextu vyvíjející se léze nepříznivá, tak pro rané etablování infekce je nepříznivá stejně tak. V důsledku nastolené Th2 imunitní odpovědi totiž nedochází k vycestovávání klíčových hostitelských buněk leishmanií, monocytů a makrofágů. Protektivní efekt by tak ve svých počátcích nemusel být nutně navázán na navození rezistentního hostitelského prostředí s M1 makrofágy jako leukocyty hrajícími prim. Namísto toho by se mohlo jednat o kombinaci likvidace leishmanií prostřednictvím přítomných efektorových buněk v podobě hojně zastoupených eozinofilů a současnou modulaci primárně příznivého hostitelského prostředí v podobě omezení dostupnosti vhodných hostitelských buněk. Později zmíněné podporuje i např. studie Carregaro et al. (2013), kde sledovali vliv trojnásobného sání na proměnu buněčného infiltrátu v místě sání *L. longipalpis* u myši s později rozvinutým protektivním efektem vůči infekci *Le. braziliensis*. Autoři se nezabývali potenciálně přítomnými eozinofily, nicméně zaznamenali signifikantní pokles neutrofilů a makrofágů infiltrující místo opakovaného sání. Za zmínku stojí, že protektivní efekt sání je spojen s krátkodobou expozicí slinám flebotomů. Rohoušová et al. (2011) prokázali, že pokud jsou myši vystaveny sání *P. duboscqi* dlouhodobě, tak následující infekce *Le. major* se rozvíjí standartně, bez efektu protekce. V souladu s tímto fenoménem bylo zjištěno, že eozinofily se u dlouhodobě stimulovaných jedinců v reakci na sání nevyskytují či vyskytují pouze minimálně (Oliveira et al., 2013). Na raný zásah eozinofilů by tak v případě této teorie mohla navázat specifická Th1 imunitní odpověď likvidující přeživší populaci parazitů. Tato Th1/Th2 imunitní spolupráce by mohla být příčinou toho, že protekce navozená rekombinantním proteinem či plazmidem, tedy antigenem specificky vytipovaným k rozvinutí Th1 odpovědi, je nepopíratelně účinná, ale může se projevit později než v případě imunizace kompletním antigenním složením slin (buď prostřednictvím SGH nebo sáním) (Oliveira et al., 2008). Takto specificky navozené protekce totiž nejsou spojeny s přítomností eozinofilů v rámci DTH reakce (Collin et al., 2009) ani nevyvolávají tvorbu IL-5 (Oliveira et al., 2015, Gholami et al., 2019).

Limitující pro závěry týkající se protektivního efektu je to, že tyto myši nebyly vystavené infekčnímu inokulu a popsané imunitní prostředí tak nemusí nutně odpovídat situaci skutečné infekce. Přítomnost leishmanií v inokulu totiž ovlivňuje zánětlivou odpověď, liší se exprese cytokinů i chemokinů (Teixeira et al., 2014). Pro ověření role eozinofilů v protektivním efektu slin by proto bylo třeba validace na infekčním modelu.

Součástí imunizačních experimentů bylo i sledování hladiny specifických IgG protilátek proti slinám (a-SGH IgG). Za dobu trvání experimentu, tedy tří týdnů, nedošlo k signifikantnímu nárůstu produkce a-SGH IgG při srovnání předimunizačních hladin a hladin při ukončení experimentu. Nicméně, především u skupiny D7 byl pozorován trend ve zvýšené produkci a-SGH IgG. U této skupiny proto byly změřeny i podtřídy IgG1 a IgG2a reflektující Th2 a Th1 polarizaci imunitního systému (Bretscher, 2014). Stejně jako v případě a-SGH IgG ani u jednotlivých podtříd nebyl přítomen signifikantní rozdíl mezi imunizovanou a negativní kontrolou ovšem tendence u několika málo jedinců směřovala k produkci IgG1 odrážející Th2 imunitní odpověď. U žádné myši nebyly zvýšené hladiny

protilátek IgG2a. To je v souladu s výsledkem jiné studie, kdy BALB/c myš neprodukovala tuto podtřídou protilátek ani v případě navozené protekce spojené s Th1 imunitou (Menon and Bretscher, 1998). Nezaznamenaný signifikantní nárůst v produkci protilátek odpovídá jiným studiím zabývajících se kinetikou jejich tvorby. Pouhé dvě expozice sání *P. duboscqi* nebyly dostatečné k signifikantně zvýšené produkci a-SGH IgG (Rohoušová et al., 2011), v případě a-SGH *P. papatasi* IgG došlo ke zvýšené tvorbě protilátek až od 4. týdne expozic (Vlkova et al., 2012) a u a-SGH *P. perniciosus* IgG od 5. týdne (Martín-Martín et al., 2015). Nepříliš zvýšené hladiny protilátek proti slinným proteinům také odpovídají tomu, že o protilátkách se neuvažuje jako o efektorovém mechanismu zajišťujícím protekci proti leishmaniím (Lakhal-Naouar et al., 2021; Jesus G. Valenzuela et al., 2001).

V rámci práce bylo měřeno i celkové IgE. Sérové hodnoty IgE se nelišily mezi imunizovanou skupinou a negativní kontrolou ani po skončení imunizací, což ukazuje spíše na nenavození tvorby specifických protilátek vlivem sání flebotomů. K potvrzení by však bylo třeba provést ELISA měření a-SGH IgE. Překvapivě však ve druhém opakování klesly hladiny IgE u obou negativních kontrol. Vysvětlením by mohlo být uchovávání myši druhého opakování pod ochranou sítí zamezující sání komárů, kteří se jinak v prostorách zvěřince občas vyskytují a jejichž sání tvorbu IgE vyvolává (Peng et al., 2004). U obou opakování byla také vidět tendence (jednou se signifikantním rozdílem) k poklesu protilátek v čase D2. To by mohlo být důsledkem slabého vychytávání IgE eozinofily migrujícími do tkáně (Kita and Gleich, 1997). Při srovnání hladiny IgE a množství eozinofilů se ukázala mírná a signifikantní pozitivní korelace mezi těmito dvěma parametry, což by mohlo reflektovat, že množství eozinofilů pronikajících do tkáně se odvíjí od individuální bazální hladiny eozinofilů v krvi jedince s odrazem v celkovém IgE. Nicméně je třeba zdůraznit, že korelace byla slabá a například recentní studie (de Araujo et al., 2024) vztah mezi akutní alergickou reakcí a sérovou hladinou IgE neprokázala. Obecně lze říci, že vztah mezi IgE a eozinofily je stále kontroverzní a plný otázek (Matucci et al., 2018).

**Třetí část** diplomové práce se zabývala imunitní odpovědí myši v kontextu infekce *Le. major* a různých imunizačních schémat. Byly měřeny IgG, IgG1 a IgG2a protilátky proti slinám *P. duboscqi* ve čtyřech různých odběrových časech a cytokiny v kultuře splenocytů, které byly připraveny při ukončování pokusu. Myši byly rozděleny do čtyř skupin – ve dvou skupinách byly myši imunizovány sáním flebotomů před infekcí k navození protektivního efektu a následně s různou mírou exponování flebotomům po čas infekce (3× EXPa, 5× EXPb). Třetí skupina (POZ) byla pouze infikována a poslední skupina (NEG) sloužila jako negativní kontrola. Experimenty proběhly ve dvou opakováních, ovšem lišily se manifestací infekce. U prvního opakování (A) došlo u všech infikovaných skupin (EXPa, EXPb, POZ) k rozvinutí závažných kožních lézí co do velikosti i destrukce tkáně, které se mezi skupinami signifikantně nelišily, průměrně nejmenší léze ale byla u skupiny EXPb. Naopak, u druhého opakování (B) došlo u exponovaných skupin k očekávanému projevu protektivního efektu a léze tak měly méně závažný průběh a byly menší než u kontrolní pozitivní skupiny, u skupiny EXPa signifikantně.



Odpověď objasňující příčinu těchto protistojných výsledků by pravděpodobně mohla ležet ve složení infekčního inokula, které mělo u jednotlivých opakování mírně odlišné složení. Jak bylo popsáno v podkapitole 3.4.2, infekční inokulum se skládalo ze směsi střev *P. duboscqi* s ~10 denní infekcí *Le. major* a SGH *P. duboscqi* ve fyziologickém roztoku. Určujícím faktorem pro finální podobu inokula přitom byl počet metacyklických promastigotů ve střevě, jejichž množství je pro úspěch infekce zásadní (Giraud et al., 2019). Jejich koncentrace odpovídala  $10^3$  buněk na jednu infekční dávku. Počet infikovaných střev, které tedy byly součástí každého infekčního inokula se lišil v závislosti na síle infekce, která se ovšem mezi opakováními lišila. Vzhledem k tomu, že v případě přípravy infekčního inokula pro opakování A byly infekce střev slabé, bylo třeba k dosažení požadované koncentrace metacyklických promastigotů většího počtu střev. Touto cestou se v inokulu navýšilo např. i množství injikovaného mikrobiomu flebotoma. Střevní mikrobiom se řadí mezi faktory udávající ráz průběhu infekce. Vedle něj se k těmto faktorům řadí i zmíněné množství infekčních stádií parazita, sliny flebotoma a produkty leishmanií jako je sekretorní gel promastigotů nebo exosomy či *Leishmania* RNA virus 1 (Giraud et al., 2019, Serafim et al., 2021). Ve studii Dey et al. (2018) autoři prokázali, že střevní mikrobiom flebotoma aktivuje u neutrofilů pronikajících do místa sání NRLP3 inflamazom a produkci cytokinu IL-1 $\beta$ . Tím se významně potencuje infiltrace těchto leukocytů do místa sání a výsledkem této zvýšené neutrofilní reakce je vyšší míra visceralizace *Le. donovani* u infikované BALB/c myši. Rekrutování neutrofilů do místa infekčního sání je obecněji spojováno s horší patologií CL (Guimaraes-Costa et al., 2021). Otázkou vlivu mikroflóry flebotoma na průběh leishmaniové infekce se zabývala i studie Amni et al. (2023). Ti infikovali BALB/c myš *Le. major* spolu s dvěma druhy bakterií přítomnými ve střevní mikroflóře *P. papatasi* - *Enterobacter cloacae* a *Bacillus subtilis*. Také v této studii autoři ukázali, že koinfekce leishmanií spolu s bakteriemi zvýšila infiltraci zánětlivých buněk do místa infekce, která následně vedla k rozvoji závažnějších lézí a potvrdili tak dřívější výsledky (Dey et al., 2018). Studie se ovšem také současně zabývala efektem rozdílné dávky bakterií a infekční inokulum tak měly rozdělené do dvou skupin: inokulum s nízkým množstvím bakterií a inokulum s vysokým množstvím bakterií. Překvapivě a na první pohled v rozporu s výsledky diplomové práce došla studie k závěru, že hůře na tom byla ta skupina myši, která měla dávku bakterií nižší. Nicméně, inokulum o vysokém počtu bakterií ve studii představovalo koncentraci  $10^3$  bakterií na 10  $\mu$ l (inokulovaný objem) a inokulum o nízkém množství bakterií pouze 10 bakterií na 10  $\mu$ l (inokulovaný objem), což neodpovídá hodnotám ani jednoho typu inokula použitého v této diplomové práci. Množství bakterií sice v něm stanoveno nebylo, ale velikost bakteriální populace ve střevě laboratorně chovaného *P. duboscqi* se pohybuje průměrně mezi  $10^5$ - $10^6$  buněk (Monteiro et al., 2017), přičemž na přípravu jednoho infekčního inokula pro opakování B bylo třeba přibližně 1 střeva, u opakování A to bylo dvojnásob. Závěrem studie Amni et al. (2023) ovšem zůstává, že dávka bakterií v infekčním inokulu ovlivňuje uchycení a vývoj infekce.

Velikost dávky je také jeden z faktorů určující, zda bude imunitní reakce převažovat na stranu Th1 nebo spíše směrem k Th2, což je jinak multifaktoriální záležitost zahrnující např. typy *pattern recognition receptors* (PRR), které jsou aktivovány, typ patogenu či cytokinové prostředí (Ung et al.,

2023). Tímto paradigmatem dávkou určené Th1/Th2 polarizace se zabývali různí autoři v posledních dekádách (Billeskov et al., 2018). Bretscher ve svém pojednání z roku 2014 popisuje tuto teorii a ukazuje, že obecně nižší dávka antigenu vede k pomalému rozvoji buněčné odpovědi doprovázené DTH reakcí a nízkou hladinou protilátek, střední dávka nejprve k rychlému navození DTH, které je následně vystřídáno humorální odpovědí a nakonec vysoká dávka vede k sotva detekovatelné DTH a masivní protilátkové odpovědi (Bretscher, 2014).

V případě modelu BALB/c myš – *Le. major* je citlivost k infekci spojená s přirozeně navozenou Th2 imunitní odpovědí a rezistence naopak s Th1 imunitní odpovědí (Costa-da-Silva et al., 2022; Meira and Gedamu, 2019). Výše popsaný teoretický princip dávkou určené Th1/Th2 polarizace se mimo jiné projevil i u studií infekce *Le. major* u BALB/c myši. Menon a Bretscher (1998) ve své studii pozorovali, že pokud tento citlivý kmen nakazí malými dávkami parazita, infekce je regulována vlivem vysokého, systémově produkovaného poměru IFN $\gamma$ /IL-4 doprovázející Th1 reakci. Zároveň nedochází k produkci protilátek. A platilo to i naopak, pokud rezistentní kmen CBA nakazili vysokými dávkami, u myši se rozvinula neprotektivní Th2 imunitní odpověď (Menon and Bretscher, 1998). V diplomové práci byly měřeny cytokiny IL-4, vlajkový cytokin Th2 imunitní odpovědi, IL-10, imunoregulační cytokin a IFN $\gamma$ , který je markerem navození Th1 imunitní odpovědi (Maspi et al., 2016). Cytokiny produkované kulturami na konci experimentu tak reflektovaly systémovou imunitní odpověď promítající se do charakteru manifestovaných lézí 11. týden po infekci (v čase w11).

Opakování A, kde byly rozvinuté výrazně patologické léze, bylo charakterizováno nezvýšenými hladinami IFN $\gamma$ , nesignifikantně ale přesto nejnižší byla produkovaná hladina tohoto cytokinu u skupiny EXPb. Nebyly zvýšené hladiny ani IL-10, což pravděpodobně odráží neregulovanou imunitní reakci v případě tohoto opakování (Maspi et al., 2016). Naopak hladiny cytokinu IL-4 byly u infikovaných skupin oproti negativní kontrole signifikantně navýšeny a to nejsilněji opět v případě skupiny EXPb. Celkově tak cytokinový profil ukazuje na dominantní Th2 imunitní odpověď u všech infikovaných skupin. Paradoxně byla tato reakce nejsilněji rozvinuta u nejvíce exponované skupiny EXPb, u stejné skupiny, která měla léze průměrně nejmenší. V opozici k opakování A bylo druhé opakování B, kde vlivem navození protektivního efektu došlo u exponovaných skupin k rozvoji regulovaných lézí - jak bylo v literatuře už několikrát popsáno (Belkaid et al., 1998; Kamhawi et al., 2000; Oliveira et al., 2015). Tato protekce byla spojena se zvýšenou produkcí IFN $\gamma$  u těchto skupin a sníženou produkcí IL-4. Produkce IL-4 i IL-10 byla nejnižší v případě nejvíce exponované skupiny EXPb, která měla zároveň i nejsilnější produkci IFN $\gamma$ . Cytokinový profil v případě tohoto opakování ukazuje na převažující Th1 imunitní odpověď u exponovaných skupin.

Pokud vezmeme do úvahy, že proces infikování byl možnou proměnnou mezi opakováními, mohl být právě tento akt formujícím faktorem nastavujícím systémovou imunitní reakci, tak jak byla odražena v produkci cytokinů. S odkazem na výsledky studie Dey et al. (2018) tak v případě opakování A mohlo dojít v místě infekce k masivní imunitní odpovědi, která zvrátila předcházející proces imunizace. Přítomnost DTH reakce, i dobře etablované, není bezpodmínečná a její projev může být

inhibován (Lamont et al., 1988). Biedermann et al. (2001) např. na modelu kontaktní dermatitidy u BALB/c myši potlačili DTH reakci podáváním IL-4 nebo dodáním antigenně specifických Th2 lymfocytů. Do jaké míry hrála v případě opakování A roli vysoká dávka mikrobiomu potenciálně směřující dlouhodobou imunitní reakci směrem k Th2 je otázkou, na kterou toto práce nedokáže odpovědět (Bretscher, 2014). Je třeba také dodat, že dalšími proměnnými určujícími charakter infekcí mohla být i např. variabilita v počtu nasátých samic v předimunizačních a postimunizačních cyklech sání.

Zajímavým pozorováním byl opačný vliv poinfekční imunizace na vyvíjející se lézi mezi opakováními. V případě prvního opakování A se jevila příznivě, v případě druhého opakování B spíše kontraproduktivně. Společným prvkem nicméně bylo, že závažnější lézi u obou opakování měla ta z exponovaných skupin, která měla vyšší poměr IFN $\gamma$ /IL-4. Ačkoli je totiž Th1 imunita protektivní, jak bylo ostatně demonstrováno i výsledky této práce, přemíra IFN $\gamma$  je kontraproduktivní a vede ke zvýšené destrukci tkáně (Maspi et al., 2016). U opakování A byl nižší poměr IFN $\gamma$ /IL-4 a s ním i menší rozvinutá léze u skupiny EXPb. Tato skupina byla vystavena poinfekčnímu sání bez prodlevy a pravděpodobně tak došlo ke ztlumení nepříznivé zánětlivé imunitní reakce v místě infekce. Sliny flebotomů jsou obecně spojovány s navozením produkce protizánětlivých cytokinů a jiných mediátorů tlumících imunitní reakci hostitele, na kterém vektor saje (Brodie et al., 2007; Katz et al., 2000; Mbow et al., 1998; Prates et al., 2011). Tuto teorii podporuje i tato práce, kdy kultury splenocytů z imunizovaných myši opakování A reagovaly na SGH *P. duboscqi* signifikantně zvýšenou tvorbou IL-4 a IL-10 zatímco obdobné kultury z opakování B nikoli. Je známo, že SGH *P. duboscqi* systémově zvyšuje produkci IL-10 u BALB/c myši (Carregaro et al., 2008) i u lidí (de Araujo et al., 2024; Oliveira et al., 2013). Naopak, produkce IL-4 byla zvýšena vlivem stimulace s SGH *P. papatasi* u lidských PBMC (Abdeladhim et al., 2011), ale už ne vlivem SGH *P. duboscqi* (Oliveira et al., 2015, 2013). Vlivem sání *P. papatasi* i *P. duboscqi* se u BALB/c myši zvyšuje lokální produkce IL-4 (Belkaid et al., 1998; Teixeira et al., 2014), ale myši splenocyty na přítomný SGH *P. papatasi* v kultuře zvýšenou tvorbou tohoto cytokinu nereagují (Rohoušová et al., 2005). Reference týkající se reakce myších splenocytů na SGH *P. duboscqi* ovšem při sepisování této diskuze nebyly dostupné.

V případě opakování B byl nižší poměr IFN $\gamma$ /IL-4 a menší rozvinutá léze u skupiny EXPa, která byla vystavena dalšímu sání flebotomů až s odstupem 5 týdnů po infekci, na rozdíl od skupiny EXPb. U této skupiny EXPb došlo vlivem dalšího sání pravděpodobně k posílení navozené DTH reakce spojené s Th1 imunitní odpovědí a tvorbou IFN $\gamma$ , což působilo kontraproduktivně buď z důvodu již zmíněné posílené imunitní reakce odražené v poškození tkáně (Maspi et al., 2016), nebo vlivem zvýšené hladiny tohoto cytokinu mohlo dojít k nacistování většího množství potenciálně hostitelských buněk do místa sání (Carneiro et al., 2020). K odpovědi na tuto otázku by bylo třeba stanovit parazitární nálože v uchu myši v čase w11, kterážto informace nebyla v době sepisování této práce ještě k dispozici. Negativní dopady sání na vyvíjející se lézi byly už však prokázány i v jiné práci (Vojtkova et al., 2021).

Poslední zatím nediskutovanou částí cíle 3 zůstávají výsledky humorální imunity. I do těch byly promítnuty odlišné vnější projevy infekce *Le. major* mezi opakováními. U opakování A došlo k výraznému signifikantnímu nárůstu protilátek u obou exponovaných skupin (EXPa, EXPb) a v menší míře i u POZ skupiny. U EXPb skupiny byl signifikantní nárůst v produkci protilátek oproti skupině EXPa změřen dříve, už v čase w6. Dřívější nárůst hladiny protilátek může reflektovat větší počet imunizačních sání a vyšší dostupnost antigenu u skupiny EXPb, ale i silněji navozenou Th2 imunitní odpověď, která je s tvorbou protilátek úzce spojena (Bretscher, 2014; Cyster and Allen, 2019). Nicméně, mezi exponovanými skupinami nebyl v žádném čase měření statisticky významný rozdíl, tedy větší počet sání se výrazněji nepromítl do celkové produkce protilátek. Ke statisticky významnému nárůstu produkce IgG došlo i v případě POZ skupiny se skokovým nárůstem v čase w6, tedy v prvním odběru od infekce a prvním měření po styku myši s antigenem. U opakování B byl vzorec nárůstu protilátek podobný s tím rozdílem, že jejich hladiny dosahovaly třetinových hodnot opakování A a o něco silnější produkce protilátek byla změřena v případě exponovaných skupin u skupiny EXPa. Rozdíl sice oproti EXPb nebyl signifikantní, ale vyšší průměrná tvorba protilátek u skupiny EXPa, navzdory nižšímu počtu imunizačních sání, by mohla odrážet pro humorální imunitu příznivěji nižší IFN $\gamma$ /IL-4. Ještě výraznější rozdíl mezi opakováními byl v případě podtřídy IgG1, která je markerem Th2 imunitní odpovědi. V případě opakování A došlo k signifikantnímu nárůstu této podtřídy u obou exponovaných skupin podobně jako v případě IgG a i k signifikantnímu navýšení u POZ skupiny. Naopak v případě opakování B se hladiny IgG1 protilátek v rámci jednotlivých skupin po čas trvání experimentu signifikantně nezvýšily, přestože statisticky významný rozdíl mezi negativní skupinou přítomný byl. Poslední měřená podtřída IgG2a, která je markerem Th1 odpovědi, zůstala nezvýšena po celou dobu experimentu u obou opakováních, ovšem hladina této podtřídy se u BALB/c myši nezvyšuje ani s navozením protekce vůči infekci *Le. major* (Menon and Bretscher, 1998).

Vysvětlením těchto diskrepančních hladin je odlišný charakter systémové odpovědi mezi opakováními, jehož markerem byla produkce IgG1 a který byl reflektován cytokinovou produkcí popsanou výše. Nicméně, co do velikosti mohla být protilátková odpověď zvláště u opakování A ovlivněna i přítomnými bakteriemi v infekčním inokulu. Na ty imunitní systém hostitele reaguje stimulací PRR, které rozeznávají konzervované motivy asociované s patogeny a mezi které se řadí i *toll-like receptors* (TLR). TLR jsou nezastupitelnou součástí vrozené imunity a zároveň tvoří spojník s tou adaptivní. Ve studii (Allman et al., 2015), která se zabývala TACI receptory mající významnou roli v tvorbě protilátek ukázali, že mutantní myši deficientní na TACI receptory mají oproti kontrolám signifikantně nižší produkci protilátek, ale i reakci na TLR agonisty. TLR agonisté obecně potencují humorální odpověď a používají se proto jako adjuvancia ve vakcínách, např. monofosforyl lipid A, ligand TLR4 (Pulendran and Ahmed, 2011). Přesný mechanismus není zcela objasněn, ví se ovšem, že jejich stimulace má vliv na B buňky a i jiné APC. Na všech těchto systémech může dojít k efektům, které amplifikují tvorbu protilátek (Billeskov et al., 2018; Cyster and Allen, 2019; Duan et al., 2022). Na produkci protilátek mají ovšem vliv i jiné faktory jako mezibuněčné interakce mezi T a B lymfocyty

(Cyster and Allen, 2019) nebo např. cytokin IL-4, který potencuje tvorbu protilátek a který je ve zvýšené míře také spojen s opakováním A. Vrozená imunita každopádně ovlivňuje sílu, kvalitativní vlastnosti i dlouhodobost protilátkové imunity (Pulendran and Ahmed, 2011).

Výsledky třetího cíle tak ukázaly, že protektivní efekt se manifestuje s imunizovaným hostitelským systémem, jak již bylo několikrát potvrzeno (Belkaid et al., 1998; Kamhawi et al., 2000; Oliveira et al., 2015), a je odvozen od Th1 imunitní odpovědi. Vyšší hladiny IFN $\gamma$  nicméně působí kontraproduktivně. Bylo zároveň demonstrováno, že efekt protektivní předinfekční imunizace může být zvrácen a že následná poinfekční sání nemají jednoznačný dopad na průběh léze, která se odvíjí od konkrétního nastavení imunitní reakce hostitele.

## 6 Závěr

Diplomová práce se zabývala imunitní odpovědí u myši, které byly v různé míře vystavené sání flebotomů a případně infikovány *Le. major*.

Prvním cílem byla kultivace splenocytů izolovaných z dlouhodobě imunizovaných myši za účelem produkce a-SGH protilátek. Myši jsou v laboratoři Biologie hmyzích vektorů využívány dlouhodobě jako hostitelé pro krevsající samice chovaných flebotomů a produkce a-SGH protilátek by tak mohla představovat jejich další potenciální využití po odstavení z kolonie. Bohužel se ukázalo, že se nejedná o vhodný model, především kvůli slabé protilátkové výtěžnosti. Sleziny byly navíc silně patologicky proměněné a myši už příliš staré, takže se experiment nepodařilo zopakovat.

Druhý cíl práce se zabýval imunitní odpovědí u myši, která je spojena s projevem protektivního efektu. Ten se odvíjí od imunizace myši slinnými antigeny indukující tvorbu DTH reakce. Diplomová práce ukázala, že imunizované myši měly buněčný infiltrát spojený se sáním tvořený především eozinofily a mononukleárními buňkami z nichž průtoková cytometrie ukázala na hojně zastoupenou populaci monocytů/makrofágů. Ty tvořily po eozinofilech druhou nejpočetnější populaci, navzdory očekávání ovšem nebyly s monocyty/makrofágy asociovány ani marker CD38 ani iNOS, které jsou spojené s prozánětlivě laděným systémem. Přitom právě iNOS představuje klíčovou leishmanicidní molekulu. Neutrofilů v infiltrátu byly, ale jejich počet byl ve sledovaných časech nejmenší a také na sání reagovaly ze sledovaných populací nejméně. Vzhledem k tomu, že neutrofilů jsou pro leishmanie v počátečních infekce klíčovými hostitelskými buňkami ale zároveň imunitní prostředí není vlivem slin primárně prozánětlivé, mohl by být protektivní efekt částečně odvozen od sníženého počtu vnímavých hostitelských buněk. Svoji hypotetickou roli v protekci by mohly navíc zastávat i zmíněné eozinofily, které jsou schopné parazita likvidovat, ovšem zdroje v literatuře jsou na toto téma limitované. Eozinofily jsou zároveň dle výsledků této práce dominantní populací, se kterou se parazit v imunizovaném hostiteli setkává a je proto třeba věnovat více pozornosti právě roli těchto leukocytů při etablování infekce.

Třetí cíl práce se zabýval rolí imunizace na průběh infekce *Le. major*. Odlišné výsledky dvou opakování tohoto experimentu – promítnuté do míry patologie, produkce cytokinů i produkce protilátek – ukázaly na zásadní vliv podoby infekčního inokula na vývoj infekce a také na možnou inhibici navozeného protektivního efektu. Dopad poinfekčního sání na vyvíjející se lézi se v jednotlivých opakováních odvíjel od charakteru probíhající imunitní reakce. V obou případech nicméně platilo, že horší projev infekce byl spojen s tou exponovanou skupinou, která měla vyšší poměr IFN $\gamma$ /IL-4.

Diplomová práce ukázala na nevhodnost dlouhodobě imunizovaných myši odstavených z kolonie flebotomů jako systému pro produkci specifických protilátek. Práce dále poukázala, že v kontextu protektivního efektu by do budoucna bylo záhodno věnovat větší pozornost jiným než doposud studovaným buňkám, specificky hojně se vyskytujícím eozinofilům reagujícím na sání. V poslední řadě práce upozornila na možnou zvrátitelnost protektivního efektu a také na dvojaký efekt poinfekčního sání na probíhající lézi, který je odvozen od etablované imunitní odpovědi hostitele.

## 7 Seznam literatury

1. Abdeladhim, M., Ben Ahmed, M., Marzouki, S., Belhadj Hmida, N., Boussoffara, T., Belhaj Hamida, N., Ben Salah, A., Louzir, H., 2011. Human cellular immune response to the saliva of *Phlebotomus papatasi* is mediated by IL-10-producing CD8<sup>+</sup> T cells and Th1-polarized CD4<sup>+</sup> lymphocytes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1345. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001345>
2. Abengózar, M.Á., Fernández-Reyes, M., Salazar, V.A., Torrent, M., de la Torre, B.G., Andreu, D., Boix, E., Rivas, L., 2022. Essential Role of Enzymatic Activity in the Leishmanicidal Mechanism of the Eosinophil Cationic Protein (RNase 3). *ACS Infect. Dis.* 8, 1207–1217. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00537>
3. Allman, W.R., Dey, R., Liu, L., Siddiqui, S., Coleman, A.S., Bhattacharya, P., Yano, M., Uslu, K., Takeda, K., Nakhasi, H.L., Akkoyunlu, M., 2015. TACI deficiency leads to alternatively activated macrophage phenotype and susceptibility to *Leishmania* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E4094-4103. <https://doi.org/10.1073/pnas.1421580112>
4. Almeida, G.G., Luehring, T.A.M., Paixão, P.H. de M., Soares, R.P., de Barros, A.L.B., do Monte-Neto, R.L., Tafuri, W.L., Negrão-Corrêa, D.A., Gonçalves, R., 2024. The absence of eosinophils is associated with early metastatic lesions in *Leishmania amazonensis*-infected mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 119, e220242. <https://doi.org/10.1590/0074-02760220242>
5. Alvarenga, P.H., Xu, X., Oliveira, F., Chagas, A.C., Nascimento, C.R., Francischetti, I.M.B., Juliano, M.A., Juliano, L., Scharfstein, J., Valenzuela, J.G., Ribeiro, J.M.C., Andersen, J.F., 2013. Novel Family of Insect Salivary Inhibitors Blocks Contact Pathway Activation by Binding to Polyphosphate, Heparin, and Dextran Sulfate. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 2759–2770. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.302482>
6. Amici, S.A., Young, N.A., Narvaez-Miranda, J., Jablonski, K.A., Arcos, J., Rosas, L., Papenfuss, T.L., Torrelles, J.B., Jarjour, W.N., Guerau-de-Arellano, M., 2018. CD38 Is Robustly Induced in Human Macrophages and Monocytes in Inflammatory Conditions. *Front. Immunol.* 9, 1593. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01593>
7. Amni, F., Maleki-Ravasan, N., Nateghi-Rostami, M., Hadighi, R., Karimian, F., Meamar, A.R., Badirzadeh, A., Parvizi, P., 2023. Co-infection of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) gut bacteria with *Leishmania major* exacerbates the pathological responses of BALB/c mice. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 13, 1115542. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1115542>
8. Anderson, J.M., Oliveira, F., Kamhawi, S., Mans, B.J., Reynoso, D., Seitz, A.E., Lawyer, P., Garfield, M., Pham, M., Valenzuela, J.G., 2006. Comparative salivary gland transcriptomics of sandfly vectors of visceral leishmaniasis. *BMC Genomics* 7, 52. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-52>
9. Anderson, J.M., Samake, S., Jaramillo-Gutierrez, G., Sissoko, I., Coulibaly, C.A., Traoré, B., Soucko, C., Guindo, B., Diarra, D., Fay, M.P., Lawyer, P.G., Doumbia, S., Valenzuela, J.G., Kamhawi, S., 2011. Seasonality and Prevalence of *Leishmania major* Infection in *Phlebotomus duboscqi* Neveu-Lemaire from Two Neighboring Villages in Central Mali. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1139. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001139>
10. Anjili, C.O., Mbatia, P.A., Mwangi, R.W., Githure, J.I., Olobo, J.O., Robert, L.L., Koech, D.K., 1995. The chemotactic effect of *Phlebotomus duboscqi* (Diptera: Psychodidae) salivary gland lysates to murine monocytes. *Acta Trop.* 60, 97–100. [https://doi.org/10.1016/0001-706x\(95\)00112-r](https://doi.org/10.1016/0001-706x(95)00112-r)

11. Aratani, Y., 2018. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch. Biochem. Biophys.* 640, 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.01.004>
12. Beach, R., Kiilu, G., Hendricks, L., Oster, C., Leeuwenburg, J., 1984. Cutaneous leishmaniasis in Kenya: transmission of *Leishmania major* to man by the bite of a naturally infected *Phlebotomus duboscqi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78, 747–751. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(84\)90006-3](https://doi.org/10.1016/0035-9203(84)90006-3)
13. Belkaid, Y., Kamhawi, S., Modi, G., Valenzuela, J., Noben-Trauth, N., Rowton, E., Ribeiro, J., Sacks, D.L., 1998. Development of a Natural Model of Cutaneous Leishmaniasis: Powerful Effects of Vector Saliva and Saliva Preexposure on the Long-Term Outcome of *Leishmania major* Infection in the Mouse Ear Dermis. *J. Exp. Med.* 188, 1941–1953.
14. Belkaid, Y., Valenzuela, J.G., Kamhawi, S., Rowton, E., Sacks, D.L., Ribeiro, J.M.C., 2000. Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: An adaptive response induced by the fly? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6704–6709.
15. Biedermann, T., Mailhammer, R., Mai, A., Sander, C., Ogilvie, A., Brombacher, F., Maier, K., Levine, A.D., Röcken, M., 2001. Reversal of established delayed type hypersensitivity reactions following therapy with IL-4 or antigen-specific Th2 cells. *Eur. J. Immunol.* 31, 1582–1591. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200105\)31:5<1582::AID-IMMU1582>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200105)31:5<1582::AID-IMMU1582>3.0.CO;2-M)
16. Billeskov, R., Beikzadeh, B., Berzofsky, J.A., 2018. The effect of antigen dose on T cell-targeting vaccine outcome. *Hum. Vaccines Immunother.* 15, 407–411. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1527496>
17. Bogdan, C., 2020. Macrophages as host, effector and immunoregulatory cells in leishmaniasis: Impact of tissue micro-environment and metabolism. *Cytokine* 2, 100041. <https://doi.org/10.1016/j.cytok.2020.100041>
18. Bretscher, P.A., 2014. On the Mechanism Determining the Th1/Th2 Phenotype of an Immune Response, and its Pertinence to Strategies for the Prevention, and Treatment, of Certain Infectious Diseases. *Scand. J. Immunol.* 79, 361–376. <https://doi.org/10.1111/sji.12175>
19. Brodie, T.M., Smith, M.C., Morris, R.V., Titus, R.G., 2007. Immunomodulatory Effects of the *Lutzomyia longipalpis* Salivary Gland Protein Maxadilan on Mouse Macrophages. *Infect. Immun.* 75, 2359–2365. <https://doi.org/10.1128/IAI.01812-06>
20. Carneiro, M.B., Lopes, M.E., Hohman, L.S., Romano, A., David, B.A., Kratofil, R., Kubes, P., Workentine, M.L., Campos, A.C., Vieira, L.Q., Peters, N.C., 2020. Th1-Th2 Cross-Regulation Controls Early *Leishmania* Infection in the Skin by Modulating the Size of the Permissive Monocytic Host Cell Reservoir. *Cell Host Microbe* 27, 752-768.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.011>
21. Carregaro, V., Costa, D.L., Brodskyn, C., Barral, A.M., Barral-Netto, M., Cunha, F.Q., Silva, J.S., 2013. Dual effect of *Lutzomyia longipalpis* saliva on *Leishmania braziliensis* infection is mediated by distinct saliva-induced cellular recruitment into BALB/c mice ear. *BMC Microbiol.* 13, 102. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-102>
22. Carregaro, V., Valenzuela, J.G., Cunha, T.M., Verri, W.A., Grespan, R., Matsumura, G., Ribeiro, J.M.C., Elnaïem, D.-E., Silva, J.S., Cunha, F.Q., 2008. Phlebotomine salivas inhibit immune inflammation-induced neutrophil migration via an autocrine DC-derived PGE2/IL-10 sequential pathway. *J. Leukoc. Biol.* 84, 104–114. <https://doi.org/10.1189/jlb.1107797>



23. Carvalho, A.M., Cristal, J.R., Muniz, A.C., Carvalho, L.P., Gomes, R., Miranda, J.C., Barral, A., Carvalho, E.M., de Oliveira, C.I., 2015. Interleukin 10–Dominant Immune Response and Increased Risk of Cutaneous Leishmaniasis After Natural Exposure to *Lutzomyia intermedia* Sand Flies. *J. Infect. Dis.* 212, 157–165. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv020>
24. CDC, 2020. CDC - Leishmaniasis - General Information - Frequently Asked Questions (FAQs) [WWW Document]. URL [https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/gen\\_info/faqs.html](https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/gen_info/faqs.html) (accessed 5.6.24).
25. Cecílio, P., Cordeiro-da-Silva, A., Oliveira, F., 2022. Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with *Leishmania* parasites. *Commun. Biol.* 5, 305. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03240-z>
26. Černyšiov, V., Gerasimčik, N., Mauricas, M., Girkontaitė, I., 2010. Regulation of T-cell-independent and T-cell-dependent antibody production by circadian rhythm and melatonin. *Int. Immunol.* 22, 25–34. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxp109>
27. Chagas, A.C., Oliveira, F., Debrabant, A., Valenzuela, J.G., Ribeiro, J.M.C., Calvo, E., 2014. Lundep, a sand fly salivary endonuclease increases *Leishmania* parasite survival in neutrophils and inhibits XIIa contact activation in human plasma. *PLoS Pathog.* 10, e1003923. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003923>
28. Charlab, R., Valenzuela, J.G., Rowton, E.D., Ribeiro, J.M., 1999. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 15155–15160. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.15155>
29. Charmoy, M., Auderset, F., Allenbach, C., Tacchini-Cottier, F., 2010. The Prominent Role of Neutrophils during the Initial Phase of Infection by *Leishmania* Parasites. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 719361. <https://doi.org/10.1155/2010/719361>
30. Chaves, M.M., Lee, S.H., Kamenyeva, O., Ghosh, K., Peters, N.C., Sacks, D., 2020. The role of dermis resident macrophages and their interaction with neutrophils in the early establishment of *Leishmania major* infection transmitted by sand fly bite. *PLoS Pathog.* 16, e1008674. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008674>
31. Clements, M.F., Gidwani, K., Kumar, R., Hostomska, J., Dinesh, D.S., Kumar, V., Das, P., Müller, I., Hamilton, G., Volfova, V., Boelaert, M., Das, M., Rijal, S., Picado, A., Volf, P., Sundar, S., Davies, C.R., Rogers, M.E., 2010. Measurement of recent exposure to *Phlebotomus argentipes*, the vector of Indian visceral Leishmaniasis, by using human antibody responses to sand fly saliva. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82, 801–807. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0336>
32. Collin, N., Assumpção, T.C.F., Mizurini, D.M., Gilmore, D., Dutra-Oliveira, A., Kotsyfakis, M., Sá-Nunes, A., Teixeira, C., Ribeiro, J.M.C., Monteiro, R.Q., Valenzuela, J.G., Francischetti, I.M.B., 2012. Lufaxin, a Novel Factor Xa Inhibitor from the Salivary Gland of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, Blocks PAR2 Activation and Inhibits Inflammation and Thrombosis in Vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 2185–2198. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.253906>
33. Collin, N., Gomes, R., Teixeira, C., Cheng, L., Laughinghouse, A., Ward, J.M., Elnaiem, D.-E., Fischer, L., Valenzuela, J.G., Kamhawi, S., 2009. Sand Fly Salivary Proteins Induce Strong Cellular Immunity in a Natural Reservoir of Visceral Leishmaniasis with Adverse Consequences for *Leishmania*. *PLOS Pathog.* 5, e1000441. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000441>

34. Collis, M.G., 1989. The vasodilator role of adenosine. *Pharmacol. Ther.* 41, 143–162.  
[https://doi.org/10.1016/0163-7258\(89\)90104-6](https://doi.org/10.1016/0163-7258(89)90104-6)
35. Costa, D.J., Favali, C., Clarêncio, J., Afonso, L., Conceição, V., Miranda, J.C., Titus, R.G., Valenzuela, J., Barral-Netto, M., Barral, A., Brodskyn, C.I., 2004. *Lutzomyia longipalpis* Salivary Gland Homogenate Impairs Cytokine Production and Costimulatory Molecule Expression on Human Monocytes and Dendritic Cells. *Infect. Immun.* 72, 1298–1305.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.72.3.1298-1305.2004>
36. Costa-da-Silva, A.C., Nascimento, D. de O., Ferreira, J.R.M., Guimarães-Pinto, K., Freire-de-Lima, L., Morrot, A., Decote-Ricardo, D., Filardy, A.A., Freire-de-Lima, C.G., 2022. Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. *Trop. Med. Infect. Dis.* 7, 54.  
<https://doi.org/10.3390/tropicalmed7040054>
37. Cyster, J.G., Allen, C.D.C., 2019. B cell responses – Cell interaction dynamics and decisions. *Cell* 177, 524–540. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.016>
38. Davarpanah, E., Seyed, N., Bahrami, F., Rafati, S., Safaralizadeh, R., Taheri, T., 2020. *Lactococcus lactis* expressing sand fly PpSP15 salivary protein confers long-term protection against *Leishmania major* in BALB/c mice. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14, e0007939.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007939>
39. de Araujo, F.F., Abdeladhim, M., Teixeira, C., Hummer, K., Wilkerson, M.D., Ressler, R., Lakhali-Naouar, I., Ellis, M.W., Meneses, C., Nurmukhambetova, S., Gomes, R., Tolbert, W.D., Turiansky, G.W., Pazgier, M., Oliveira, F., Valenzuela, J.G., Kamhawi, S., Aronson, N., 2024. Immune response profiles from humans experimentally exposed to *Phlebotomus duboscqi* bites. *Front. Immunol.* 15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1335307>
40. de Moura, T.R., Oliveira, F., Novais, F.O., Miranda, J.C., Clarêncio, J., Follador, I., Carvalho, E.M., Valenzuela, J.G., Barral-Netto, M., Barral, A., Brodskyn, C., de Oliveira, C.I., 2007. Enhanced *Leishmania braziliensis* infection following pre-exposure to sandfly saliva. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 1, e84. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000084>
41. de Oliveira Cardoso, F., de Souza, C. da S.F., Mendes, V.G., Abreu-Silva, A.L., Costa, S.C.G. da, Calabrese, K. da S., 2010. Immunopathological Studies of *Leishmania amazonensis* Infection in Resistant and in Susceptible Mice. *J. Infect. Dis.* 201, 1933–1940.
42. Dedet, J., Derouin, F., Hubert, B., Schnur, L., Chance, M., 1979. Isolation of *Leishmania major* from *Mastomys erythroleucus* and *Tatera gambiana* in Senegal (West Africa). *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 73, 433–7. <https://doi.org/10.1080/00034983.1979.11687282>
43. Demarta-Gatsi, C., Mécheri, S., 2021. Vector saliva controlled inflammatory response of the host may represent the Achilles heel during pathogen transmission. *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis.* 27, e20200155. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0155>
44. Dey, R., Joshi, A.B., Oliveira, F., Pereira, L., Guimarães-Costa, A.B., Serafim, T.D., de Castro, W., Coutinho-Abreu, I.V., Bhattacharya, P., Townsend, S., Aslan, H., Perkins, A., Karmakar, S., Ismail, N., Karetnick, M., Meneses, C., Duncan, R., Nakhasi, H.L., Valenzuela, J.G., Kamhawi, S., 2018. Gut Microbes Egested during Bites of Infected Sand Flies Augment Severity of Leishmaniasis via Inflammasome-Derived IL-1 $\beta$ . *Cell Host Microbe* 23, 134–143.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.12.002>
45. Duan, T., Du, Y., Xing, C., Wang, H.Y., Wang, R.-F., 2022. Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity. *Front. Immunol.* 13, 812774.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.812774>

46. Gholami, E., Oliveira, F., Taheri, T., Seyed, N., Gharibzadeh, S., Gholami, N., Mizbani, A., Zali, F., Habibzadeh, S., Bakhadj, D.O., Meneses, C., Kamyab-Hesari, K., Sadeghipour, A., Taslimi, Y., khadir, F., Kamhawi, S., Mazlomi, M.A., Valenzuela, J.G., Rafati, S., 2019. DNA plasmid coding for Phlebotomus sergenti salivary protein PsSP9, a member of the SP15 family of proteins, protects against Leishmania tropica. PLoS Negl. Trop. Dis. 13, e0007067. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007067>
47. Giraud, E., Martin, O., Yakob, L., Rogers, M., 2019. Quantifying Leishmania Metacyclic Promastigotes from Individual Sandfly Bites Reveals the Efficiency of Vector Transmission. Commun. Biol. 2, 84. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0323-8>
48. Glaría, E., Valledor, A.F., 2020. Roles of CD38 in the Immune Response to Infection. Cells 9, 228. <https://doi.org/10.3390/cells9010228>
49. Gomes, R., Cavalcanti, K., Teixeira, C., Carvalho, A.M., Mattos, P.S., Cristal, J.R., Muniz, A.C., Miranda, J.C., de Oliveira, C.I., Barral, A., 2016. Immunity to Lutzomyia whitmani Saliva Protects against Experimental Leishmania braziliensis Infection. PLoS Negl. Trop. Dis. 10, e0005078. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005078>
50. Gomes, R., Oliveira, F., Teixeira, C., Meneses, C., Gilmore, D.C., Elnaiem, D.-E., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G., 2012. Immunity to Sand Fly Salivary Protein LJM11 Modulates Host Response to Vector-Transmitted Leishmania Conferring Ulcer-Free Protection. J. Invest. Dermatol. 132, 2735–2743. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.205>
51. Gomes, R., Teixeira, C., Teixeira, M.J., Oliveira, F., Menezes, M.J., Silva, C., de Oliveira, C.I., Miranda, J.C., Elnaiem, D.-E., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G., Brodskyn, C.I., 2008. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. Proc. Natl. Acad. Sci. 105, 7845–7850. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712153105>
52. Guerra, C.S., Silva, R.M.M., Carvalho, L.O.P., Calabrese, K. da S., Bozza, P.T., Côrte-Real, S., 2010. Histopathological analysis of initial cellular response in TLR-2 deficient mice experimentally infected by Leishmania (L.) amazonensis. Int. J. Exp. Pathol. 91, 451–459. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2010.00717.x>
53. Guimaraes-Costa, A.B., Shannon, J.P., Waclawiak, I., Oliveira, J., Meneses, C., de Castro, W., Wen, X., Brzostowski, J., Serafim, T.D., Andersen, J.F., Hickman, H.D., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G., Oliveira, F., 2021. A sand fly salivary protein acts as a neutrophil chemoattractant. Nat. Commun. 12, 3213. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23002-5>
54. Gurski, C.J., Dittel, B.N., 2022. Myeloperoxidase as a Marker to Differentiate Mouse Monocyte/Macrophage Subsets. Int. J. Mol. Sci. 23, 8246. <https://doi.org/10.3390/ijms23158246>
55. Hall, L.R., Titus, R.G., 1995. Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of Leishmania major and nitric oxide production. J. Immunol. Baltim. Md 1950 155, 3501–3506.
56. Hostomská, J., Volfová, V., Mu, J., Garfield, M., Rohoušová, I., Volf, P., Valenzuela, J.G., Jochim, R.C., 2009. Analysis of salivary transcripts and antigens of the sand fly Phlebotomus arabicus. BMC Genomics 10, 282. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-282>
57. Ibarra-Meneses, A.V., Corbeil, A., Wagner, V., Onwuchekwa, C., Fernandez-Prada, C., 2022. Identification of asymptomatic Leishmania infections: a scoping review. Parasit. Vectors 15, 5. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05129-y>

58. Jablonka, W., Kim, I.H., Alvarenga, P.H., Valenzuela, J.G., Ribeiro, J.M.C., Andersen, J.F., 2019. Functional and structural similarities of D7 proteins in the independently-evolved salivary secretions of sand flies and mosquitoes. *Sci. Rep.* 9, 5340. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41848-0>
59. Jablonski, K.A., Amici, S.A., Webb, L.M., Ruiz-Rosado, J. de D., Popovich, P.G., Partida-Sanchez, S., Guerau-de-Arellano, M., 2015. Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. *PLoS ONE* 10, e0145342. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145342>
60. Jelínková, K., 2022. Factors affecting the protective effect provided by sand fly saliva immunization on the outcome of *Leishmania* infection.
61. Kamhawi, S., Belkaid, Y., Modi, G., Rowton, E., Sacks, D., 2000. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290, 1351–1354. <https://doi.org/10.1126/science.290.5495.1351>
62. Kammoun-Rebai, W., Bahi-Jaber, N., Naouar, I., Toumi, A., Salah, A.B., Louzir, H., Meddeb-Garnaoui, A., 2017. Human cellular and humoral immune responses to *Phlebotomus papatasi* salivary gland antigens in endemic areas differing in prevalence of *Leishmania major* infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, e0005905. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005905>
63. Kato, H., Anderson, J.M., Kamhawi, S., Oliveira, F., Lawyer, P.G., Pham, V.M., Sangare, C.S., Samake, S., Sissoko, I., Garfield, M., Sigutova, L., Volf, P., Doumbia, S., Valenzuela, J.G., 2006. High degree of conservancy among secreted salivary gland proteins from two geographically distant *Phlebotomus duboscqi* sandflies populations (Mali and Kenya). *BMC Genomics* 7, 226. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-226>
64. Katz, O., Waitumbi, J.N., Zer, R., Warburg, A., 2000. Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62, 145–150. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2000.62.145>
65. Kita, H., Gleich, G.J., 1997. Eosinophils and IgE Receptors: A Continuing Controversy. *Blood* 89, 3497–3501. <https://doi.org/10.1182/blood.V89.10.3497>
66. Lakhali-Naouar, I., Mukbel, R., DeFraités, R.F., Mody, R.M., Massoud, L.N., Shaw, D., Co, E.M., Sherwood, J.E., Kamhawi, S., Aronson, N.E., 2021. The human immune response to saliva of *Phlebotomus alexandri*, the vector of visceral leishmaniasis in Iraq, and its relationship to sand fly exposure and infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 15, e0009378. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009378>
67. Lamont, A.G., Bruce, M.G., Watret, K.C., Ferguson, A., 1988. Suppression of an established DTH response to ovalbumin in mice by feeding antigen after immunization. *Immunology* 64, 135–139.
68. Lee, S.H., Charmoy, M., Romano, A., Paun, A., Chaves, M.M., Cope, F.O., Ralph, D.A., Sacks, D.L., 2018. Mannose receptor high, M2 dermal macrophages mediate nonhealing *Leishmania major* infection in a Th1 immune environment. *J. Exp. Med.* 215, 357–375. <https://doi.org/10.1084/jem.20171389>
69. Lee, S.H., Chaves, M.M., Kamenyeva, O., Gazzinelli-Guimaraes, P.H., Kang, B., Pessenda, G., Passelli, K., Tacchini-Cottier, F., Kabat, J., Jacobsen, E.A., Nutman, T.B., Sacks, D.L., 2020. M2-like, dermal macrophages are maintained via IL-4/CCL24-mediated cooperative interaction with eosinophils in cutaneous leishmaniasis. *Sci. Immunol.* 5, eaaz4415. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aaz4415>

70. Lerner, E.A., Ribeiro, J.M., Nelson, R.J., Lerner, M.R., 1991. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *J. Biol. Chem.* 266, 11234–11236.
71. Lestina, T., Rohousova, I., Sima, M., de Oliveira, C.I., Volf, P., 2017. Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and *Leishmania*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, e0005600. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005600>
72. Lestina, T., Vlkova, M., Votypka, J., Volf, P., Rohousova, I., 2015. *Phlebotomus papatasi* exposure cross-protects mice against *Leishmania major* co-inoculated with *Phlebotomus duboscqi* salivary gland homogenate. *Acta Trop.* 144, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.01.005>
73. Li, W., Li, Y., Jin, X., Liao, Q., Chen, Z., Peng, H., Zhou, Y., 2022. CD38: A Significant Regulator of Macrophage Function. *Front. Oncol.* 12, 775649. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.775649>
74. Liew, F.Y., Millott, S., Parkinson, C., Palmer, R.M., Moncada, S., 1990. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 144, 4794–4797.
75. Lischke, T., Heesch, K., Schumacher, V., Schneider, M., Haag, F., Koch-Nolte, F., Mittrücker, H.-W., 2013. CD38 Controls the Innate Immune Response against *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 81, 4091–4099. <https://doi.org/10.1128/IAI.00340-13>
76. Liu, Z., Gu, Y., Shin, A., Zhang, S., Ginhoux, F., 2020. Analysis of Myeloid Cells in Mouse Tissues with Flow Cytometry. *STAR Protoc.* 1, 100029. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100029>
77. Loria-Cervera, E.N., Andrade-Narváez, F.J., 2014. ANIMAL MODELS FOR THE STUDY OF LEISHMANIASIS IMMUNOLOGY. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 56, 1–11. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000100001>
78. Mann, S., Frasca, K., Scherrer, S., Henao-Martínez, A.F., Newman, S., Ramanan, P., Suarez, J.A., 2021. A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. *Curr. Trop. Med. Rep.* 8, 121–132. <https://doi.org/10.1007/s40475-021-00232-7>
79. Martin-Martin, I., Chagas, A.C., Guimaraes-Costa, A.B., Amo, L., Oliveira, F., Moore, I.N., DeSouza-Vieira, T.S., Sanchez, E.E., Suntravat, M., Valenzuela, J.G., Ribeiro, J.M.C., Calvo, E., 2018. Immunity to LuloHya and Lundep, the salivary spreading factors from *Lutzomyia longipalpis*, protects against *Leishmania major* infection. *PLoS Pathog.* 14, e1007006. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007006>
80. Martín-Martín, I., Molina, R., Jiménez, M., 2015. Kinetics of Anti-*Phlebotomus perniciosus* Saliva Antibodies in Experimentally Bitten Mice and Rabbits. *PLoS ONE* 10, e0140722. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140722>
81. Maspi, N., Abdoli, A., Ghaffarifar, F., 2016. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. *Pathog. Glob. Health* 110, 247–260. <https://doi.org/10.1080/20477724.2016.1232042>
82. Matucci, A., Vultaggio, A., Maggi, E., Kasujee, I., 2018. Is IgE or eosinophils the key player in allergic asthma pathogenesis? Are we asking the right question? *Respir. Res.* 19, 113. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0813-0>

83. Mbow, M.L., Bleyenbergh, J.A., Hall, L.R., Titus, R.G., 1998. Phlebotomus papatasi sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 161, 5571–5577.
84. Meira, C. dos S., Gedamu, L., 2019. Protective or Detrimental? Understanding the Role of Host Immunity in Leishmaniasis. *Microorganisms* 7. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120695>
85. Mejia, J.S., Toot-Zimmer, A.L., Schultheiss, P.C., Beaty, B.J., Titus, R.G., 2010. BluePort: A Platform to Study the Eosinophilic Response of Mice to the Bite of a Vector of *Leishmania* Parasites, *Lutzomyia longipalpis* Sand Flies. *PLOS ONE* 5, e13546. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013546>
86. Menezes-Souza, D., Guerra-Sá, R., Carneiro, C.M., Vitoriano-Souza, J., Giunchetti, R.C., Teixeira-Carvalho, A., Silveira-Lemos, D., Oliveira, G.C., Corrêa-Oliveira, R., Reis, A.B., 2012. Higher expression of CCL2, CCL4, CCL5, CCL21, and CXCL8 chemokines in the skin associated with parasite density in canine visceral leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1566. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001566>
87. Menon, J.N., Bretscher, P.A., 1998. Parasite dose determines the Th1/Th2 nature of the response to *Leishmania major* independently of infection route and strain of host or parasite. *Eur. J. Immunol.* 28, 4020–4028. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199812\)28:12<4020::AID-IMMU4020>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199812)28:12<4020::AID-IMMU4020>3.0.CO;2-3)
88. Montaner-Angoiti, E., Llobat, L., 2023. Is leishmaniasis the new emerging zoonosis in the world? *Vet. Res. Commun.* 47, 1777–1799. <https://doi.org/10.1007/s11259-023-10171-5>
89. Monteiro, C.C., Inbar, E., Ghosh, K., Merkhofer, R., Lawyer, P., Paun, A., Secundino, N., Lewis, M., Erram, D., Zurek, L., Sacks, D., 2017. The midgut microbiota plays an essential role in sand fly vector competence for *Leishmania major*. *Cell. Microbiol.* 19, 10.1111/cmi.12755. <https://doi.org/10.1111/cmi.12755>
90. Morris, R.V., Shoemaker, C.B., David, J.R., Lanzaro, G.C., Titus, R.G., 2001. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 5226–5230. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.9.5226>
91. Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., Coffman, R.L., 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 136, 2348–2357.
92. Muraille, E., Leo, O., Moser, M., 2014. Th1/Th2 Paradigm Extended: Macrophage Polarization as an Unappreciated Pathogen-Driven Escape Mechanism? *Front. Immunol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00603>
93. Musso, T., Deaglio, S., Franco, L., Calosso, L., Badolato, R., Garbarino, G., Dianzani, U., Malavasi, F., 2001. CD38 expression and functional activities are up-regulated by IFN- $\gamma$  on human monocytes and monocytic cell lines. *J. Leukoc. Biol.* 69, 605–612.
94. Nagata, M., Nakagome, K., Soma, T., 2020. Mechanisms of eosinophilic inflammation. *Asia Pac. Allergy* 10, e14. <https://doi.org/10.5415/apallergy.2020.10.e14>
95. Oliveira, F., Giorgobiani, E., Guimarães-Costa, A.B., Abdeladhim, M., Oristian, J., Tskhvaradze, L., Tsertsvadze, N., Zakalashvili, M., Valenzuela, J.G., Kamhawi, S., 2020. Immunity to vector saliva is compromised by short sand fly seasons in endemic regions with temperate climates. *Sci. Rep.* 10, 7990. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64820-9>

96. Oliveira, F., Lawyer, P.G., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G., 2008. Immunity to distinct sand fly salivary proteins primes the anti-*Leishmania* immune response towards protection or exacerbation of disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2, e226. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000226>
97. Oliveira, F., Rowton, E., Aslan, H., Gomes, R., Castrovinci, P.A., Alvarenga, P.H., Abdeladhim, M., Teixeira, C., Meneses, C., Kleeman, L.T., Guimarães-Costa, A.B., Rowland, T.E., Gilmore, D., Doumbia, S., Reed, S.G., Lawyer, P.G., Andersen, J.F., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G., 2015. A sand fly salivary protein vaccine shows efficacy against vector-transmitted cutaneous leishmaniasis in nonhuman primates. *Sci. Transl. Med.* 7, 290ra90. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa3043>
98. Oliveira, F., Traoré, B., Gomes, R., Faye, O., Gilmore, D.C., Keita, S., Traoré, P., Teixeira, C., Coulibaly, C.A., Samake, S., Meneses, C., Sissoko, I., Fairhurst, R.M., Fay, M.P., Anderson, J.M., Doumbia, S., Kamhawi, S., Valenzuela, J.G., 2013. Delayed-Type Hypersensitivity to Sand Fly Saliva in Humans from a Leishmaniasis-Endemic Area of Mali Is TH1-Mediated and Persists to Midlife. *J. Invest. Dermatol.* 133, 452–459. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.315>
99. Oliveira, S.H., Fonseca, S.G., Romão, P.R., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., 1997. Nitric oxide mediates the microbicidal activity of eosinophils. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92 Suppl 2, 233–235. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761997000800034>
100. Panaro, M.A., Acquafredda, A., Lisi, S., Lofrumento, D.D., Trotta, T., Satalino, R., Saccia, M., Mitolo, V., Brandonisio, O., 1999. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in *Leishmania infantum*-infected human macrophages stimulated with interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 29, 122–127. <https://doi.org/10.1007/s005990050076>
101. Pearson, R.D., Uydess, I.L., Chapman, S.W., Steigbigel, R.T., 1987. Interaction of human eosinophils with *Leishmania donovani*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 81, 735–739. <https://doi.org/10.1080/00034983.1987.11812179>
102. Peng, Z., Beckett, A.N., Engler, R.J., Hoffman, D.R., Ott, N.L., Simons, F.E.R., 2004. Immune responses to mosquito saliva in 14 individuals with acute systemic allergic reactions to mosquito bites. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114, 1189–1194. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.08.014>
103. Peters, N.C., Egen, J.G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., Lawyer, P., Fay, M.P., Germain, R.N., Sacks, D., 2008. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321, 970–974. <https://doi.org/10.1126/science.1159194>
104. Peters, N.C., Sacks, D.L., 2009. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cell. Microbiol.* 11, 1290–1296. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01348.x>
105. Pimenta, P., Vannier-Santos, M., Souza, W., 1987. Fine structure and cytochemistry of the interaction between *Leishmania mexicana amazonensis* and rat neutrophils and eosinophils. *J. Submicrosc. Cytol.* 19, 387–95.
106. Ponte-Sucre, A., Gamarro, F., Dujardin, J.-C., Barrett, M.P., López-Vélez, R., García-Hernández, R., Pountain, A.W., Mwenechanya, R., Papadopoulou, B., 2017. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, e0006052. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>

107. Prates, D.B., Araújo-Santos, T., Luz, N.F., Andrade, B.B., França-Costa, J., Afonso, L., Clarêncio, J., Miranda, J.C., Bozza, P.T., Dosreis, G.A., Brodskyn, C., Barral-Netto, M., Borges, V.M., Barral, A., 2011. *Lutzomyia longipalpis* saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 90, 575–582. <https://doi.org/10.1189/jlb.0211105>
108. Pulendran, B., Ahmed, R., 2011. Immunological mechanisms of vaccination. *Nat. Immunol.* 12, 509–517.
109. Pushpanjali, Ahmed, G., Thakur, A.K., Snehil, Jamal, F., Singh, M.K., Kumar, A., Singh, S.K., Bimal, S., Das, P., Narayan, S., 2018. Exploring new immunological insight on SP15 (~14 kDa) family protein in saliva of Indian sand-fly (*Phlebotomus argentipes*) in experimental visceral leishmaniasis. *Cell. Immunol.* 332, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.07.006>
110. Qureshi, A.A., Asahina, A., Ohnuma, M., Tajima, M., Granstein, R.D., Lerner, E.A., 1996. Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilator peptide from sand fly salivary gland extracts. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54, 665–671. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1996.54.665>
111. Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E.I., Munder, M., 2014. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front. Immunol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00532>
112. Ready, P.D., 2013. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 227–250. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153557>
113. Reichard, A., Asosingh, K., 2019. Best Practices for Preparing a Single Cell Suspension from Solid Tissues for Flow Cytometry. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* 95, 219–226. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23690>
114. Ribeiro, J.M., Katz, O., Pannell, L.K., Waitumbi, J., Warburg, A., 1999. Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP. *J. Exp. Biol.* 202, 1551–1559. <https://doi.org/10.1242/jeb.202.11.1551>
115. Rocha, F.J.S., Schleicher, U., Mattner, J., Alber, G., Bogdan, C., 2007. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. *Infect. Immun.* 75, 3823–3832. <https://doi.org/10.1128/IAI.01335-06>
116. Rodríguez, N.E., Wilson, M.E., 2014. Eosinophils and mast cells in leishmaniasis. *Immunol. Res.* 59, 129–141. <https://doi.org/10.1007/s12026-014-8536-x>
117. Rogers, K.A., Titus, R.G., 2003. Immunomodulatory effects of Maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. *Parasite Immunol.* 25, 127–134. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2003.00623.x>
118. Rohoušová, I., Hostomská, J., Vlková, M., Kobets, T., Lipoldová, M., Volf, P., 2011. The protective effect against *Leishmania* infection conferred by sand fly bites is limited to short-term exposure. *Int. J. Parasitol.* 41, 481–485. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.01.003>
119. Rohousova, I., Ozensoy, S., Ozbel, Y., Volf, P., 2005. Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. *Parasitology* 130, 493–499. <https://doi.org/10.1017/s003118200400681x>



120. Rohoušová, I., Subrahmanyam, S., Volfová, V., Mu, J., Volf, P., Valenzuela, J.G., Jochim, R.C., 2012. Salivary Gland Transcriptomes and Proteomes of *Phlebotomus tobbi* and *Phlebotomus sergenti*, Vectors of Leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1660. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001660>
121. Rohoušová, I., Volf, P., Lipoldová, M., 2005. Modulation of murine cellular immune response and cytokine production by salivary gland lysate of three sand fly species. *Parasite Immunol.* 27, 469–473. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2005.00787.x>
122. Romano, A., Carneiro, M.B.H., Doria, N.A., Roma, E.H., Ribeiro-Gomes, F.L., Inbar, E., Lee, S.H., Mendez, J., Paun, A., Sacks, D.L., Peters, N.C., 2017. Divergent roles for Ly6C+CCR2+CX3CR1+ inflammatory monocytes during primary or secondary infection of the skin with the intra-phagosomal pathogen *Leishmania major*. *PLoS Pathog.* 13, e1006479. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006479>
123. Salaiza-Suazo, N., Porcel-Aranibar, R., Cañeda-Guzmán, I.C., Ruiz-Remigio, A., Zamora-Chimal, J., Delgado-Domínguez, J., Cervantes-Sarabia, R., Carrada-Figueroa, G., Sánchez-Barragán, B., Leal-Ascencio, V.J., Pérez-Torres, A., Rodríguez-Martínez, H.A., Becker, I., 2024. Eosinophils of patients with localized and diffuse cutaneous leishmaniasis: Differential response to *Leishmania mexicana*, with insights into mechanisms of damage inflicted upon the parasites by eosinophils. *PloS One* 19, e0296887. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0296887>
124. Salei, N., Hellberg, L., Köhl, J., Laskay, T., 2017. Enhanced survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes in the presence of apoptotic cells. *PLoS ONE* 12, e0171850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171850>
125. Serafim, T.D., Coutinho-Abreu, I.V., Dey, R., Kissinger, R., Valenzuela, J.G., Oliveira, F., Kamhawi, S., 2021. Leishmaniasis: the act of transmission. *Trends Parasitol.* 37, 976–987. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.07.003>
126. Shamri, R., Xenakis, J.J., Spencer, L.A., 2011. Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell Tissue Res.* 343, 57–83. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1049-6>
127. Silva, F., Gomes, R., Prates, D., Miranda, J.C., Andrade, B., Barral-Netto, M., Barral, A., 2005. Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72, 94–98.
128. Sima, M., Novotny, M., Pravda, L., Sumova, P., Rohousova, I., Volf, P., 2016. The Diversity of Yellow-Related Proteins in Sand Flies (Diptera: Psychodidae). *PLOS ONE* 11, e0166191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166191>
129. Spencer, L.A., Weller, P.F., 2010. Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights. *Immunol. Cell Biol.* 88, 250–256. <https://doi.org/10.1038/icb.2009.115>
130. Štáfková, J., Rohousova, I., Volfova, V., Stanneck, D., Mencke, N., Volf, P., 2008. Kinetics of Canine Antibody Response to Saliva of the Sand Fly *Lutzomyia longipalpis*. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt.* N 8, 443–50. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0214>
131. Tavares, N.M., Silva, R.A., Costa, D.J., Pitombo, M.A., Fukutani, K.F., Miranda, J.C., Valenzuela, J.G., Barral, A., de Oliveira, C.I., Barral-Netto, M., Brodskyn, C., 2011. *Lutzomyia longipalpis* saliva or salivary protein LJM19 protects against *Leishmania braziliensis* and the saliva of its vector, *Lutzomyia intermedia*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1169. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001169>

132. Teixeira, C., Gomes, R., Oliveira, F., Meneses, C., Gilmore, D.C., Elnaiem, D.-E.A., Valenzuela, J.G., Kamhawi, S., 2014. Characterization of the Early Inflammatory Infiltrate at the Feeding Site of Infected Sand Flies in Mice Protected from Vector-Transmitted *Leishmania major* by Exposure to Uninfected Bites. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2781. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002781>
133. Teixeira, C.R., Teixeira, M.J., Gomes, R.B.B., Santos, C.S., Andrade, B.B., Raffaele-Netto, I., Silva, J.S., Guglielmotti, A., Miranda, J.C., Barral, A., Brodskyn, C., Barral-Netto, M., 2005. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. *J. Immunol. Baltim. Md* 175, 8346–8353. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.12.8346>
134. Thiakaki, M., Rohousova, I., Volfova, V., Volf, P., Chang, K.-P., Soteriadou, K., 2005. Sand fly specificity of saliva-mediated protective immunity in *Leishmania amazonensis*-BALB/c mouse model. *Microbes Infect.* 7, 760–766. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.01.013>
135. Titus, R.G., Ribeiro, J.M.C., 1988. Salivary Gland Lysates from the Sand Fly *Lutzomyia longipalpis* Enhance *Leishmania* Infectivity. *Science* 239, 1306–1308. <https://doi.org/10.1126/science.3344436>
136. Tlili, A., Marzouki, S., Chabaane, E., Abdeladhim, M., Kammoun-Rebai, W., Sakkouhi, R., Belhadj Hmida, N., Oliveira, F., Kamhawi, S., Louzir, H., Valenzuela, J.G., Ben Ahmed, M., 2018. *Phlebotomus papatasi* Yellow-Related and Apyrase Salivary Proteins Are Candidates for Vaccination against Human Cutaneous Leishmaniasis. *J. Invest. Dermatol.* 138, 598–606. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.09.043>
137. Tomiotto-Pellissier, F., Bortoleti, B.T. da S., Assolini, J.P., Gonçalves, M.D., Carloto, A.C.M., Miranda-Sapla, M.M., Conchon-Costa, I., Bordignon, J., Pavanelli, W.R., 2018. Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. *Front. Immunol.* 9, 2529. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02529>
138. Ung, T., Rutledge, N.S., Weiss, A.M., Esser-Kahn, A.P., Deak, P., 2023. Cell-targeted vaccines: implications for adaptive immunity. *Front. Immunol.* 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1221008>
139. Uthoff, S., Böldicke, T., 1993. In vitro immunization of mouse spleen cells for the production of monoclonal IgG1 antibodies using an antigen-specific T helper cell clone (D.10.G4.1). *J. Immunol. Methods* 166, 165–175. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(93\)90357-d](https://doi.org/10.1016/0022-1759(93)90357-d)
140. Valenzuela, Jesus G., Belkaid, Y., Garfield, M.K., Mendez, S., Kamhawi, S., Rowton, E.D., Sacks, D.L., Ribeiro, J.M.C., 2001. Toward a Defined Anti-*Leishmania* Vaccine Targeting Vector Antigens. *J. Exp. Med.* 194, 331–342.
141. Valenzuela, J. G., Belkaid, Y., Rowton, E., Ribeiro, J.M., 2001. The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel Cimex family of apyrases. *J. Exp. Biol.* 204, 229–237. <https://doi.org/10.1242/jeb.204.2.229>
142. van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., Laskay, T., 2004. Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages1. *J. Immunol.* 173, 6521–6525. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.11.6521>

143. Vellozo, N.S., Pereira-Marques, S.T., Cabral-Piccin, M.P., Filardy, A.A., Ribeiro-Gomes, F.L., Rigoni, T.S., DosReis, G.A., Lopes, M.F., 2017. All-Trans Retinoic Acid Promotes an M1- to M2-Phenotype Shift and Inhibits Macrophage-Mediated Immunity to *Leishmania major*. *Front. Immunol.* 8, 1560. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01560>
144. Viegas, M.S., do Carmo, A., Silva, T., Seco, F., Serra, V., Lacerda, M., Martins, T.C., 2007. CD38 plays a role in effective containment of mycobacteria within granulomata and polarization of Th1 immune responses against *Mycobacterium avium*. *Microbes Infect.* 9, 847–854. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.03.003>
145. Vinhas, V., Andrade, B.B., Paes, F., Bomura, A., Clarencio, J., Miranda, J.C., Báfica, A., Barral, A., Barral-Netto, M., 2007. Human anti-saliva immune response following experimental exposure to the visceral leishmaniasis vector, *Lutzomyia longipalpis*. *Eur. J. Immunol.* 37, 3111–3121. <https://doi.org/10.1002/eji.200737431>
146. Vlkova, M., Rohousova, I., Hostomska, J., Pohankova, L., Zidkova, L., Drahota, J., Valenzuela, J.G., Volf, P., 2012. Kinetics of Antibody Response in BALB/c and C57BL/6 Mice Bitten by *Phlebotomus papatasi*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1719. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001719>
147. Vojtkova, B., Frynta, D., Spitzova, T., Lestinova, T., Votypka, J., Volf, P., Sadlova, J., 2021. Repeated Sand Fly Bites of Infected BALB/c Mice Enhance the Development of *Leishmania* Lesions. *Front. Trop. Dis.* 2. <https://doi.org/10.3389/fitd.2021.745104>
148. Volf, P., Volfova, V., 2011. Establishment and maintenance of sand fly colonies. *J. Vector Ecol.* 36, S1–S9. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2011.00106.x>
149. Watanabe, Y., Hamaguchi-Tsuru, E., Morimoto, N., Nishio, Y., Yagyu, K.-I., Konishi, Y., Tominaga, M., Miyazaki, J.-I., Furuya, M., Tominaga, A., 2004. IL-5-Induced Eosinophils Suppress the Growth of *Leishmania amazonensis* In Vivo and Kill Promastigotes In Vitro in Response to Either IL-4 or IFN-gamma. *DNA Cell Biol.* 23, 412–418. <https://doi.org/10.1089/1044549041474805>
150. Wheat, W.H., Pauken, K.E., Morris, R.V., Titus, R.G., 2008. *Lutzomyia longipalpis* salivary peptide maxadilan alters murine dendritic cell expression of CD80/86, CCR7 and cytokine secretion and reprograms dendritic cell-mediated cytokine release from cultures containing allogeneic T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 180, 8286–8298.
151. WHO, 2023. Leishmaniasis [WWW Document]. URL <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (accessed 5.6.24).
152. Xu, X., Oliveira, F., Chang, B.W., Collin, N., Gomes, R., Teixeira, C., Reynoso, D., my Pham, V., Elnaiem, D.-E., Kamhawi, S., Ribeiro, J.M.C., Valenzuela, J.G., Andersen, J.F., 2011. Structure and Function of a “Yellow” Protein from Saliva of the Sand Fly *Lutzomyia longipalpis* That Confers Protective Immunity against *Leishmania major* Infection\*. *J. Biol. Chem.* 286, 32383–32393. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.268904>
153. Zhu, J., Paul, W.E., 2008. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112, 1557–1569. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-078154>

## 8 Příloha

Vzhledem k absenci specifického barevní pro iNOS, která byla demonstrována v rámci cíle č. 2, je níže přiložena fotografie řezu uchem myši infikované *Le. major* s detekovanou přítomností enzymu. Jedná se ucho zpracovávané souběžně s tkáněmi, které jsou součástí této diplomové práce. Modře jsou značena jádra barvená DAPI, MPO<sup>+</sup> buňky jsou viditelné v zeleném kanálu díky barvení FITC 488 a iNOS je viditelná v červeném kanálu díky Alexa fluor 568. Fotografie laskavě poskytla Mgr. Kristýna Jelínková.

**Obr. 46:** Fotografie pozitivní kontroly s detekovanou iNOS (červeně). Příklady iNOS<sup>+</sup> buněk jsou vyznačeny šrafovaně. Měřítko odpovídá 50  $\mu\text{m}$ .

