

## Interakce klíště–hostitel

### II. Obranné reakce hostitele

**Jak už bylo zmíněno v první části (Živa 2007, 6: 247–249), sání klíšťat je dlouhodobý proces, při němž je hostitel neustále vystaven antigenům (molekulám) klíštěte obsažených jak ve slinách, tak na sacím ústrojí. Během této doby se rozvíjí hemostatická a imunitní odpověď hostitele, který se brání nejen ztrátě krve, ale i jeho tělu cizím – klíštěcím – molekulám. U přirozených hostitelů, kteří se s klíšťaty setkávají nepřetržitě během života, je imunitní reakce na sání klíšťat malá. Naopak u arteficiálních hostitelů, jako je člověk, laboratorní zvířata či jiní náhodní hostitelé, je imunitní reakce spojená se sáním velmi bouřlivá. Klíště má ovšem v záloze mnoho mechanismů, jak tyto imunitní reakce obejít či zmírnit.**

Hostitel reaguje v místě průniku klíštěte do kůže imunitní reakcí, která zahrnuje nespecifickou i specifickou složku.

Nespecifická odpověď má povahu zánětu, který se rozvíjí velmi rychle a účastní se při něm makrofágy a přirození zabijáci (Natural Killer – NK buňky), bílé krvinky (granulocyty – především basofily a neutrofilny), žírné buňky a jejich produkty, komplement (soubor sérových proteinů, které se kaskádovitě aktivují) a tzv. proteiny akutní fáze zánětu. Aktivované složky komplementu i jiné faktory (prostaglandiny, leukotrieny) hrají úlohu chemotaktických látek, které do místa klíštěcího vpichu přitahují další prozáněťové buňky. Určité složky komplementu také aktivují žírné buňky a některé typy bílých krvinek, které pak uvolňují histamin a další farmakologické látky. Právě ty jsou odpovědné za svědění a bolest v místě přisátí klíštěte. Také snižují produkci slin u klíštěte a omezují tak jeho nasátí. Navíc u hostitele vyvolávají uvolnění látek zvyšujících propustnost cévních stěn (cévní permeabilitu), takže z krevního oběhu prostupují do místa zánětu další buněčné typy a proteiny krevní plazmy. Dochází k lokálnímu otoku.

Obranné účinky mají složky komplementu tvořící komplex proteinů atakujících buněčné membrány a perforin, které přímo poškozují buňky sacího ústrojí klíštěte. Odolnost hostitele k infekci přenášené klíštětem zvyšují tzv. proteiny akutní fáze zánětu, jejichž produkce v játrech vzrůstá působením faktorů stimulujících proteosyntézu (např. signálních molekul – cytokinů IL-1, IL-6 a TNF- $\alpha$ ). Optimalizují také hojení poškozené tkáně hostitele.

Specifická imunitní odpověď se ustavuje teprve po dlouhodobém nebo opakovaném sání parazita. Sliny klíštěte vylučované do okolí vpichu jsou fagocytovány dendritickými buňkami kůže, které pak migrují do nejbližších lymfatických uzlin. Antigeny klíštěcích slin zde stimulují diferenciaci a vyzrání imunokompetentních buněk, které končí produkcí specifických protilátek a vznikem tzv. paměťových buněk. Dojde-li později k další interakci klíštěcích antigenů s imunitním systémem hostitele, rozvíjí se tzv. sekundární imunitní reakce, při níž jsou protilátky produkovány v kratší době a v daleko větším množství.

Opakované sání klíštěte může vyvolat u hostitele reakci, která se označuje jako kožní basofilní hypersenzitivní reakce (tzv. DTH reakce – Delayed Type Hypersensitivity). Je to v podstatě specifický obranný zánět tentokrát zprostředkovaný hlavně buňkami – basofily. Faktory uvolňované buňkami účastnicími se reakce pozdní přecitlivělosti zabraňují klíštěti v dostatečném nasátí, což se projevuje nízkou produkcí vajíček a tedy sníženou schopností rozmnožování. V některých případech může klíště i uhynout. Tento typ obranné reakce je účinnější než tvorba specifických protilátek.

#### Imunomodulační látky slinných žláz klíštěte

Všichni ektoparaziti se vyznačují určitou schopností potlačovat obrannou reakci hostitele. V 80. letech 20. stol. se prokázalo, že extrakty slinných žláz klíšťat ovlivňují produkci imunoregulačních cytokinů, expresi povrchových antigenů, diferenciaci a funkci imunokompetentních buněk. V současné době se výzkum soustřeďuje na izolaci a identifikaci faktorů obsažených v klíštěcích slinách, které mají supresivní účinky na T i B lymfocyty, anebo které usnadňují přenos infekce z klíštěte na hostitele.

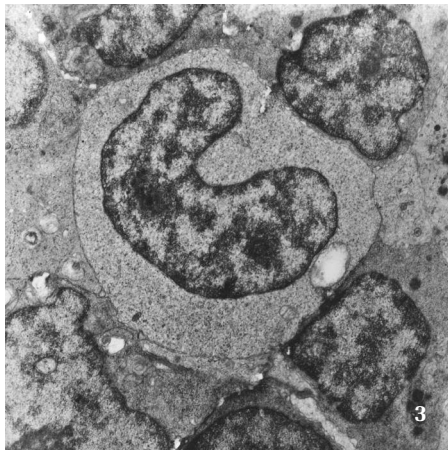
#### Ovlivnění T buněčné složky imunity

Prvním faktorem inhibujícím imunitní odpověď hostitele, který byl molekulárně charakterizován, byl protein Da-p36 izolovaný z klíštěte *Dermacentor andersoni*. Da-p36 potlačoval dělení mitogenem (látkou vyvolávající mitotické buněčné dělení) stimulovaných T lymfocytů. Látky s podobnými účinky byly objeveny také u jiných druhů klíšťat. Některé z nich inhibují produkci regulačních cytokinů, které diferenciaci a proliferaci T lymfocytů usměrňují. Tak např. specifický faktor BP (Binding Protein – vázací protein), který se nachází ve slinách klíštěte *Ixodes scapularis*, vytváří s cytokinem IL-2 komplex a tím blokuje jeho regulační funkci. Jiný protein ze slin tohoto klíštěte zvaný Salp 15 inhibuje také tvorbu IL-2, ale na odlišném principu: Salp 15 se váže na buněčnou povrchovou molekulu CD4+ T lymfocytů. Tato molekula spolu s T buněčným receptorem je odpovědná za rozpoznávání antigenu a funguje v přenosu této informace do buňky. Vazba inhibitoru (= Salp 15) má za následek potlačení tvorby produkce IL-2, což se opět projevuje snížením proliferace T lymfocytů. Ve slinách tohoto druhu klíštěte byly identifikovány ještě další faktory, které potlačují tvorbu regulačního cytokinu IFN- $\alpha$ , produkci obranné molekuly oxidu dusnatého v makrofázích a chemotaktickou aktivitu neutrofilů indukovanou interleukinem IL-8. Produkce dalších cytokinů IL-8, IL-4 a IL-10 byla rovněž ovlivněna nejen extrakty ze slinných žláz klíštěte obecného (*I. ricinus*), ale i z klíšťat *Dermacentor reticulatus* a *Amblyomma variegatum*.

1 Snímek klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) ze skenovacího elektronového mikroskopu

2 Detail sacího ústrojí – hypostomu klíštěte obecného. Snímky F. Weydy, pokud není uvedeno jinak





3 Imunitní buňky lymfocyty v elektro- novém mikroskopu. Zvětšeno 12 000x. Foto I. Trebichavský

### Ovlivnění B buněčné složky imunity

Ve slinách klíšťat se nacházejí rovněž látky, které potlačují proliferaci B lymfocytů produkujících specifické protilátky. Ze slin klíštěte obecného byl izolován protein BIP, který po přidání k B lymfocytům inhiboval jejich dělení vyvolané mitogenem nebo boreliovými povrchovými proteiny OspA a OspC. Ve slinách klíštěte *Hyalomma asiaticum asiaticum* byl nalezen protein BIF rovněž inhibující proliferaci B lymfocytů, podobné účinky mají i slinné extrakty klíšťat *Hyalomma anatolicum* a *H. bipinnosa*.

Jeden z mála dalších identifikovaných proteinů odpovědných za imunopresivní účinky klíštěcích slin byl pojmenován IRIS. Rekombinantní konstrukt tohoto proteinu inhiboval proliferaci myších slezinových buněk, snižoval mitogenem stimulovanou tvorbu IFN- $\alpha$  a dalších cytokinů (IL-8, TNF- $\alpha$  a IL-6) v lidských krevních monocitech.

Z těchto nálezů vyplývá, že klíšťata mají ve slinách látky, které oslabují specifickou imunitní odpověď hostitele komplexně. Snižují aktivitu cytotoxických lymfocytů a přírodních zabijáčů (NK), potlačují diferenciaci obranné funkce makrofágů, neutrofilů a dendritických buněk, zeslabují projevy zánětu a reakce pozdní přecitlivělosti a dokonce inhibují expresi molekul hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) třídy II na povrchu buněk prezentujících antigen. V konečném důsledku dochází ke snížení rezistence hostitele ke klíšťatům.

### Ovlivnění faktorů nespecifické imunity hostitele

Bylo už naznačeno, že složky komplementu chemotakticky přitahují aktivované zánětové buňky, které svými produkty poškozují tkáň klíštěte. Od konce 70. let víme, že v průběhu navozené protiklíštěcí rezistence je obranná kaskáda složek komplementu aktivována alternativní cestou. Ukázalo se ale, že klíště *I. scapularis* má ve slinách protein označovaný jako Isac, který inhibuje vznik invadujícího komplexu a anafylatoxinů jednoduše tím, že urychluje rozpojení konvertázy C3 složky komplementu, což se opět projeví celkovým oslabením projevů zánětu. Na alternativní aktivaci komplementu působí i extrakty slinných žláz klíšťat *I. ricinus*, *I. uriae* a *I. hexagonus*. Dá se předpokládat, že se ve slinách klíšťat budou skrývat ještě další látky, které budou kolidovat s aktivací

komplementové dráhy. Dokazuje to nález např. proteinu kalretikulinu ve slinných žlázách *Amblyomma americanum*, který se váže k C1q složce komplementu. Jiné látky produkované klíšťaty mohou také snižovat aktivitu dalších nespecifických mediátorů zánětu. Např. histamin uvolňovaný v průběhu zánětu žírnými buňkami je deaktivován vznikem komplexu histamin-BP, specifický vazebný protein pro histamin byl nalezen ve slinách klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus*. Předpokládá se, že tento mechanismus je přítomen u všech druhů klíšťat. Klíště se také dovede bránit odstranění z pokožky během sání. Bradykinin, který je mimo jiné odpovědný za bolest a svědění během sání klíšťat, je štěpen klíštěcími karboxypeptidázami obsaženými ve slinách. Tím se klíštěti daří snižovat citlivost kůže v místě sání.

### Interakce v klíštěti

Během sání krve se do střeva klíštěte dostávají také protilátky třídy IgG. Přecházejí přes střevní stěnu do tělní dutiny klíštěte (hemocélu), kde jsou navazovány na další specifický faktor BP, a pak jsou ve formě komplexů IgG-BP transportovány zpět do slinných žláz, odkud se opět dostávají do hostitele. Tímto mechanismem se klíště brání před poškozením vnitřních orgánů protilátkami hostitele.

### Mechanismy umožňující přenos patogenů

Látky ve slinách klíšťat, které zeslabují imunitu, přispívají k přenosu patogenních bakterií, virů a protozoálních parazitů na hostitele. V 90. letech 20. stol. se začalo mluvit o tzv. SAT přenosu patogenů (slinami aktivovaný přenos), což není nic jiného, než že patogeny využívají proteiny klíštěcích slin a jejich supresní vliv na imunitu pro průnik do hostitele. Je známo, že v eliminaci bakterie *Borrelia burgdorferi*, která u člověka způsobuje lymfskou boreliózu, hrají významnou úlohu fagocyty. Ukázalo se, že sliny klíštěte *I. scapularis* obsahují faktory, které mají schopnost snižovat fagocytární aktivitu neutrofilů potkání. Látky ve slinách klíštěte *I. ricinus* inhibovaly *in vitro* fagocytózu *B. afzelii* peritoneálními makrofágy myši. Současně snižovaly i produkci superoxidu (velice reaktivní molekula kyslíku) a oxidu dusného, takže makrofágy nebyly schopné efektivně zabít fagocytované bakterie. Byla také pozorována zvýšená bakteriemie, pokud byly borelie injikovány do myši spolu s extrakty slinných žláz klíštěte *I. ricinus*. Rovněž u morčat došlo k vyšší viremii po injekci viru klíšťové encefalitidy spolu se slinnými extrakty, ale současně i ke zvýšenému zpětnému přenosu viru na zdravá klíšťata sající na viremických morčatech.

Tyto pokusy potvrdily, že přenos patogenů zprostředkovaný slinnými extrakty existuje, ale donedávna nebyl znám žádný protein z klíštěcích slin, který by byl za něj odpovědný. Později se ukázalo, že protein Salp 15, který inhibuje aktivaci T lymfo-

cytů, je navíc bakteriemi *B. burgdorferi* využíván k jejich přenosu do hostitele. Přítomnost *B. burgdorferi* v klíštěti indukuje vyšší expresi Salp 15 ve slinných žlázách. Tato klíštěcí molekula se naváže na důležitý povrchový antigen (OspC) *B. burgdorferi*, což zvyšuje pravděpodobnost přenosu bakterie do hostitele. Blokáda exprese Salp 15 dokázala, že bez tohoto proteinu je značně redukována šance *B. burgdorferi* infikovat hostitele. Objev tohoto proteinu naznačil cestu k vakcinaci proti klíšťatům a jimi přenášeným patogenním mikroorganismům.

### Vývoj vakcín proti klíšťatům

Poznání, že získaná rezistence hostitele na sání klíšťat vede u některých obratlovců také k rezistenci na jimi přenášené nákazy, ukázalo, že není nereálné vyrobit takové protiklíštěcí vakcíny, které by zároveň bránily přenosu infekcí na hostitele.

Prvním a zatím jediným úspěchem bylo vytvoření vakcíny proti klíštěti *Boophilus microplus*, které v tropických a subtropických oblastech působí závažné zdravotní problémy skotu. Dobytek, na němž saje, oslabuje, snižuje jeho produkci mléka a ohrožuje jeho zdravotní stav, protože ho infikuje řadou nebezpečných protozoálních onemocnění, např. babesiózou a anaplazmózou. Proti tomuto druhu klíštěte se podařilo získat účinnou vakcínu na základě imunizace skotu konstruktorem glykoproteinu Bm86 izolovaného ze střev klíštěte. Dnes je už komerčně dostupná a dokonce byl vyroben i novější typ vakcíny – Bm95, který lze používat i k vakcinaci proti jiným druhům klíšťat rodu *Boophilus*.

Aby bylo možné realizovat konstrukci a výrobu úspěšné vakcíny, je třeba u klíšťat nalézt takové proteiny, které jsou dostatečně imunogenní, tzn. vyvolávají u imunizovaných zvířat intenzivní tvorbu specifických protiklíštěcích protilátek. Stalo se zvykem dělit tyto proteiny (tj. antigeny klíštěte) na skryté a na vystavené imunitě hostitele. Skryté antigeny, jako povrchové molekuly střevních buněk nebo hemolymfy klíštěte, se s imunitním systémem hostitele neseťkají. Vakcína obsahující tyto proteiny stimuluje imunitu hostitele k tvorbě protilátek, které působí na klíště až po nasátí, ale přenos patogenních mikroorganismů neovlivní. Do této skupiny patří i výše zmíněný glykoprotein Bm86. Naopak vystavené, exponované antigeny jsou proteiny vylučované slinnými žlázami do okolí sání či antigeny sacího ústrojí klíštěte – hypostomu (obr. 2) – které se do tkáně v místě vpichu zanořuje. Tyto antigeny se dostávají do přímého styku s imunitním systémem hostitele. Pokusy na laboratorních zvířatech ukázaly, že právě na některé z těchto exponovaných antigenů vzniká vysoce účinná imunitní reakce.

V současné době se pozornost konstruktérů vakcín obrací na detailní charakterizaci jednotlivých molekul klíštěcích slin, které vykazují dostatečnou imunogenitu. Je zřejmé, že čím více klíštěcích antigenů spojených s přenosem infekcí bude izolováno a definováno, tím efektivněji bude pokračovat vývoj vakcín proti těmto ektoparazitům i jimi přenášeným infekcím.