



# Vliv slin *Ixodes ricinus* na funkci neutrofilů

## ÚVOD

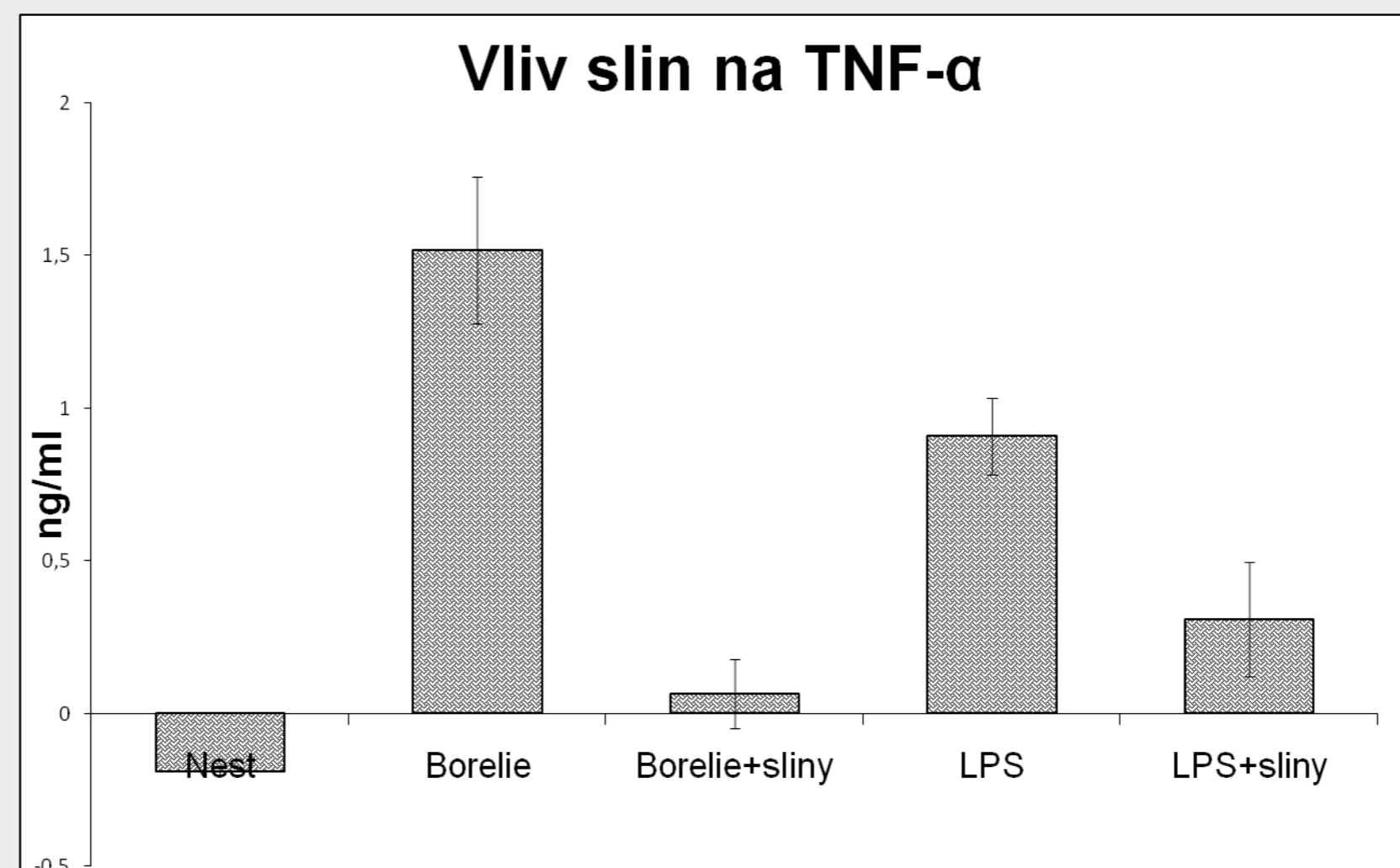
Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) jakožto krev sající ektoparazit, patří k nejvýznamnějším přenašečům lidských patogenů. Sliny klíšťat obsahují celou řadu molekul ovlivňujících srážení krve a potlačujících a měnících imunitní odpověď hostitele, tyto látky tak umožňují samicím úspěšné nasátí krve a pomáhají také přenosu patogenů. Neutrofilové jsou nejhojnějšími buňkami přirozené imunity. Účastní se akutního zánětu a představují tak první obrannou linii v boji s invadujícími patogeny. Cílem projektu bylo zjistit jak sliny z klíštěte *Ixodes ricinus* ovlivňují funkci neutrofilů, zejména pak produkci cytokinu TNF- $\alpha$ , který se podílí na regulaci imunitní odpovědi.

## METODIKA

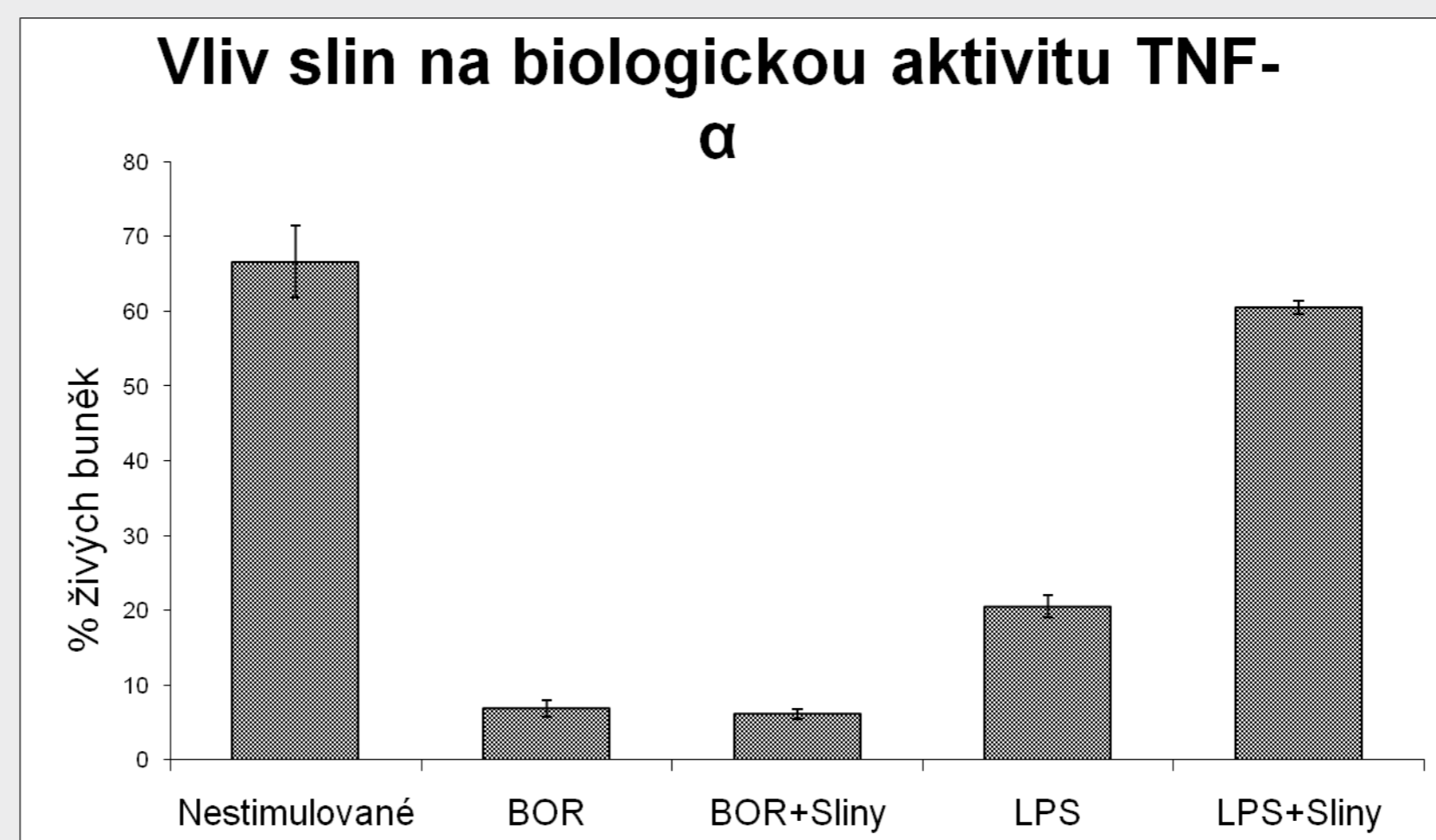
Z laboratorní myši kmene C57BL/6 byly odebrány oba femury a tibie. Následně byla v těchto kostí získána kostní dřevina a z ní pomocí negativní magnetické separace vyselektovány naivní neutrofilové. Tyto byly pak stimulovány pomocí lipopolysacharidu a borelií v přítomnosti či absenci slin. Pro stanovení produkce TNF- $\alpha$  byly z aktivovaných buněk po 24 hod odebrány supernatanty a množství TNF- $\alpha$  bylo stanoveno metodou Elisa. Biologická aktivita cytokinu byla stanovena rovněž z 24hod supernatantů pomocí TNF bioassay. Pro zjištění úrovně, na které je TNF- $\alpha$  inhibováno, byla provedena rt-PCR pro stanovení exprese TNF- $\alpha$  mRNA.

## SHRNUTÍ

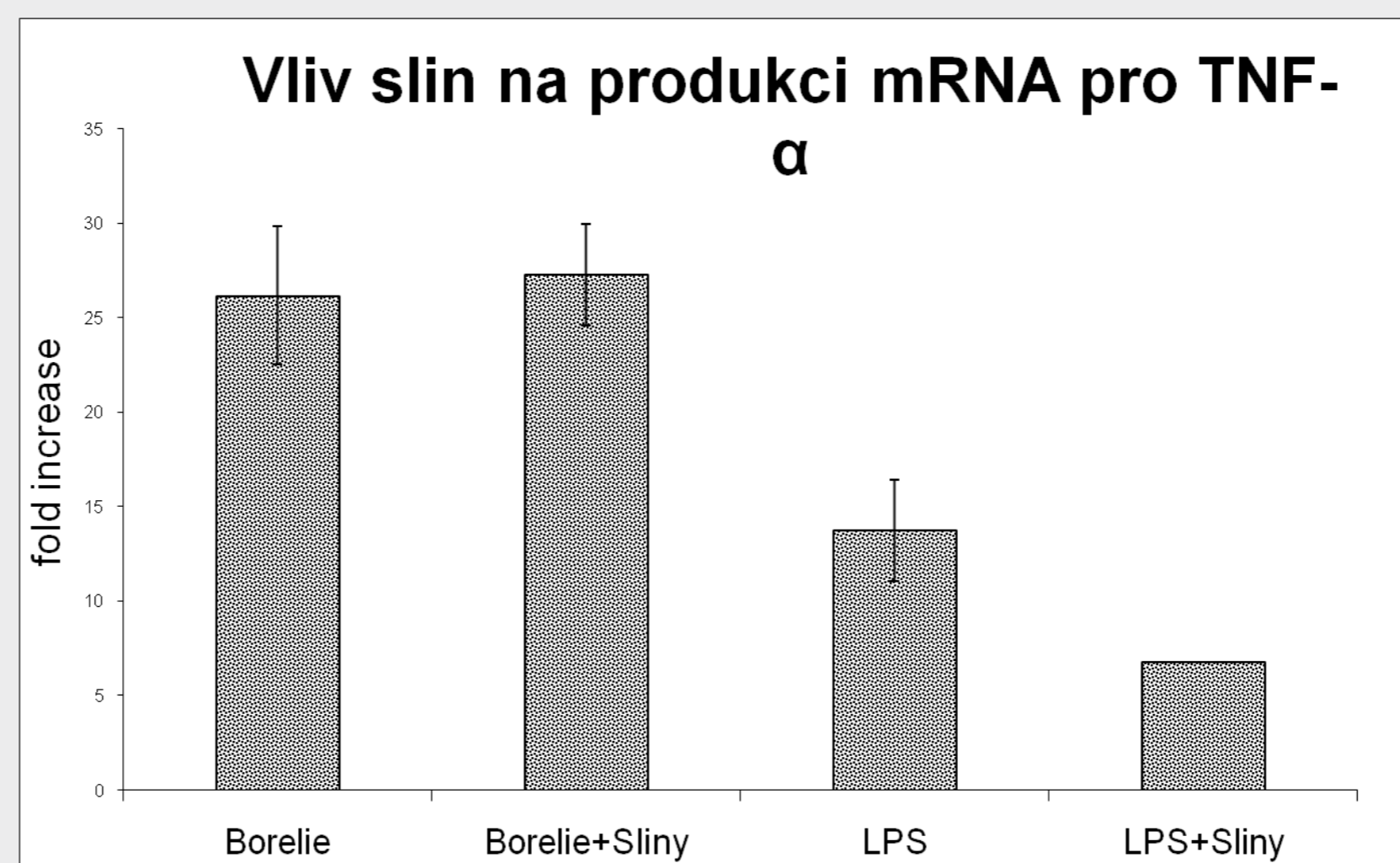
Z dosažených výsledků se zdá, že sliny klíštěte obecného ovlivňují TNF- $\alpha$  produkované neutrofilové dvěma způsoby. Při stanovení množství TNF- $\alpha$  metodou Elisa dochází k signifikantnímu poklesu jak ve skupině aktivované boreliemi tak LPS. Avšak biologická aktivita TNF- $\alpha$  je rozdílná. U skupiny neutrofilů aktivovaných boreliemi je produkované TNF plně aktivní, tedy schopno zabít L929 fibroblasty, což naznačuje že inhibice v Elise by mohla být způsobena spíše TNF vázajícím proteinem obsaženým ve slinách, který brání navázání TNF. S tím souhlasí také nezměněná exprese mRNA. Naopak ve skupině aktivované LPS dochází jak k potlačení biologického efektu TNF- $\alpha$  tak ke snížení exprese což naznačuje inhibici TNF- $\alpha$  na vnitrobuněčné úrovni. Mechanismus tohoto duálního účinku slin bude dále podrobněji zkoumán.



Sliny klíštěte obecného inhibují TNF- $\alpha$  produkované jak neutrofilové stimulované boreliemi tak LPS. Jiné cytokiny ovlivněny nebyly.



Biologická aktivita TNF- $\alpha$  (schopnost zabít senzitivní L929 fibroblasty) byla slinami potlačena pouze u neutrofilů aktivovaných s LPS, aktivita TNF- $\alpha$  produkovaného neutrofilové po stimulaci boreliemi zůstala nezměněna.



Expresie mRNA pro TNF- $\alpha$  zůstala po přidání slin nezměněna u neutrofilů aktivovaných boreliemi, u neutrofilů stimulovaných LPS byla exprese ve skupině se slinami snížena.

