

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**REAKCE IMUNITNÍHO SYSTÉMU NA
SPIROCHÉTY LYMSKÉ BORELIÓZY
V ZÁVISLOSTI NA JEJICH PATOGENNÍM
POTENCIÁLU**

Bakalářská práce

Autor: Hana Šmídová

Vedoucí práce: Mgr. Jaroslava Lieskovská, Ph. D.

České Budějovice, 2020

Šmídová H., 2020: Reakce imunitního systému na spirochéty Lymeské boreliózy v závislosti na jejich patogenním potenciálu [Response of the immune system to Lyme borreliosis spirochetes depending on their pathogenic potential. Bc. Thesis, in Czech] 39 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

An infectious disease known as Lyme borreliosis is caused by the bacterium *Borrelia*, which is transmitted to humans by ticks. The bachelor thesis deals with the comparison of the pathogenic potential of three species of bacteria from the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, which are characterized by their antigenic equipment. Differences between these species result in different responses of the host immune system and also affect tissue specificity, it determines the target area in the body where a given bacterium persists and causes symptoms typical of its species.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 21. 5. 2020

.....

Hana Šmídová

Poděkování

Na prvním místě bych chtěla poděkovat své školitelce, paní doktorce Lieskovské, která byla po celou dobu mého psaní velmi ochotná a trpělivá. Pokaždé, když bylo třeba, mi poradila, postrčila mě tím správným směrem a poskytla cenné rady. Patří Vám to největší děkuji, paní doktorko.

Dále bych chtěla poděkovat celé své rodině a nejbližším, kteří mi byli oporou jak při psaní práce, tak i v průběhu celého studia. Děkuji, bez vás by to nešlo.

Seznam použitých zkratek

ACA	acrodermatitis chronica atrophicans (chronické onemocnění kůže)
Bbsl	<i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i>
Bbss	<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i>
BL	boreliový lymfocytom
CNS	centrální nervová soustava
CRASPs	complement regulator-acquiring surface proteins
Dbp	decorin binding protein
DNA	deoxyribonukleová kyselina, nosič genetické informace
EM	erythema migrans
IDO	indoleamine 2,3-dioxygenasa
IFN	interferon
IL	interleukin
kDa	kilodalton, atomová hmotnostní jednotka
LB	Lymfská borelióza
MAPK	mitogenem aktivovaná protein – kináza
NF-κB	nukleární faktor – kappa B
NLR	NOD-like receptor
Osp	outer surface protein; vnější povrchové proteiny
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PRR	pattern recognition receptor
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor; tumor nekrotizující faktor
VlsE	variable major protein – like sequence, expressed

Obsah

1. Úvod	7
2. Cíle práce	8
3. Obecná charakteristika <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....	9
3.1. <i>Borrelia</i>	9
3.2. Spirochéty	9
3.3. Životní cyklus <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....	10
3.4. Patogenita.....	10
4. Mechanismus infekce.....	11
4.1. Vznik infekce	11
4.2. Rozpoznání infekce.....	11
4.3. Fáze infekce a její projevy	12
4.3.1. Časná lokalizovaná fáze.....	12
4.3.2. Časná diseminovaná fáze	12
4.3.3. Pozdní (chronická) fáze	14
5. Antigeny <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	15
5.1. Povrchové antigeny	16
5.1.1. OspA.....	16
5.1.2. OspB.....	16
5.1.3. OspC.....	17
5.1.4. VlsE.....	17
5.2. Flagelin.....	18
5.3. Adhezivní proteiny.....	18
5.3.1. CRASPs.....	18
5.3.2. Erp proteiny	18
5.3.3. BBK32	19
5.3.4. Dbp.....	19
5.4. Pomocné proteiny	19
5.4.1. Salp15.....	19
5.4.2. Salp25D	20
5.4.3. Salp20.....	20
5.5. Hlavní antigeny pro diagnózu – WesternBlot.....	20
5.5.1. Antigeny pro WesternBlot.....	20
6. Druhy komplexu <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato.....	21
6.1. <i>B. burgdorferi</i> sensu stricto.....	21

6.1.1.	Patogenní potenciál	21
6.1.2.	Tkáňová specifita	22
6.2.	<i>B. garinii</i>	23
6.2.1.	Patogenní potenciál	23
6.2.2.	Tkáňová specifita	23
6.3.	<i>B. afzelii</i>	24
6.3.1.	Patogenní potenciál	24
6.3.2.	Tkáňová specifita	25
7.	Diskuze.....	26
8.	Závěr.....	30
9.	Použitá literatura	31

1. Úvod

Klíšťata jsou hlavními hostiteli pro bakterie rodu *Borrelia*, které způsobují infekční onemocnění známé jako Lymská borelióza. Do tohoto rodu bakterií můžeme zařadit více konkrétních druhů, které způsobují toto onemocnění s různým geografickým rozšířením, ale také druhy, které boreliózu nevyvolávají.

Pro nás je důležitý kmen *Borrelia burgdorferi* sensu lato, do kterého patří mnoho druhů *Borrelia* a jejich počet se bude zřejmě stále zvyšovat. Jako lidský patogen byly na základě dosud provedených studií potvrzeny druhy *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* a *Borrelia afzelii*. Ve většině případů způsobují Lymskou boreliózu u člověka právě tyto tři druhy.

Lymská borelióza je infekční multisystémové onemocnění, kterým trpí hlavně obyvatelé Evropy, Asie a Severní Ameriky. Jako i ostatní bakteriální onemocnění se léčí antibiotiky, avšak léky musí být nasazeny hned v počátku onemocnění při objevení prvních příznaků, aby byla léčba spolehlivá.

Druhy jsou charakteristické svými kombinacemi plasmidů, antigeny a funkcí. V důsledku těchto odlišností se mění jejich patogenní potenciál, a z toho vyplývá i změna reakce imunitního systému napadeného organismu. Některé druhy *Borrelia* způsobují zejména kožní problémy, jiné jsou příčinou neurologických komplikací nebo projevy kloubních, srdečních nebo očních onemocnění.

Ve své práci se tak zaměřím na charakteristiku různých kmenů bakterií, jejich patogenitu a k ní odpovídající reakce imunitního systému napadeného jedince. Hlubší zkoumání této problematiky by mohlo vést k užšímu zaměření se na konkrétní boreliové antigeny, což by mohlo být podkladem pro vyvíjení léčiv a celkové pochopení doteď ne tolik známých důvodů pro tkáňovou specifitu těchto bakterií.

2. Cíle práce

- Najít rozdíly v antigenní charakteristice různých kmenů borelií, všimnout si případných rozdílů v souvislosti s typem onemocnění, které vyvolávají.
- Popsat vztah mezi patogenitou borelií a aktivací složek imunitního systému.
- Najít a popsat boreliové antigeny, které jsou důležité pro patogenitu borelií.
- Odlišnosti v reakcích imunitních buněk na borelie s různou tkáňovou specifitou.

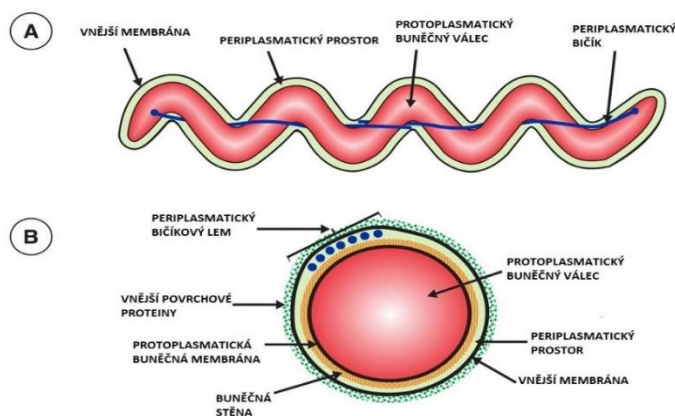
3. Obecná charakteristika *Borrelia burgdorferi* sensu lato

3.1. *Borrelia*

Bakterie rodu *Borrelia* řadíme do řádu Spirochaetales, třídy Spirochaetes a kmene Spirochaetae. V současnosti je známo asi 20 druhů *Borrelia* z druhové komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato (dále jen jako *B. burgdorferi*), z něž některé mohou být u lidí příčinou Lymeské boreliózy a jsou tudíž hlavním předmětem zkoumání. (Margos et al., 2011) Dalších více než 20 druhů je asociovaných s jinými onemocněními, nejčastěji s návratnou horečkou. Druhy *Borrelia* jsou mezi obratlovci přenášeny vektorem, tzn. přenašečem, z kmene členovců. (Brisson et al., 2013) Konkrétně se jedná o členovce z čeledi Ixodidae, běžně známé jako klíště. (Wang et al., 2014) Název bakterie získaly po francouzském biologovi Amédée Borrel a poprvé byly popsány roku 1907. (Margos et al., 2018)

3.2. Spirochéty

Buňky bakterií *Borrelia* jsou řazeny mezi Spirochéty. Jsou to tvarem dlouhé, štíhlé a pohyblivé spirály, jejichž bičíky, tzv. orgány pohyblivosti, jsou umístěny v periplasmatickém prostoru. Stejně jako ostatní Spirochéty obsahují *Borrelia* vnitřní a vnější membránu, které se však od ostatních v některých parametrech liší. (Izac et Marconi, 2019) Vnější membrána obsahuje menší počet membránových proteinů a postrádá lipopolysacharidy, namísto kterých je osazena povrchovými lipoproteiny (Osp). (Kung et al., 2013; Stanek et al., 2018) Spirochéty jsou jednobuněčné a rozmnožují se dělením.



Obr. 1: Schéma stavby spirochéty. A) Podélně. B) Průřez. (Zdroj: Charon et al., 2012)

3.3. Životní cyklus *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Druhy komplexu *B. burgdorferi*, způsobujícího Lymfskou boreliózu, jsou součástí cyklu mezi vektorem a hostitelem, který je ovlivněn prostředím a klimatem, ve kterém přenašeč a hostitel žijí. Klíšťata sloužící jako vektory pro spirochéty prochází třemi vývojovými stádii – larva, nymfa a dospělý jedinec. (Margos et al., 2011) Tomuto vývoji říkáme enzootický cyklus.

Larvy *B. burgdorferi* nejsou infikované, na rozdíl od druhů bakterií, které způsobují návratnou horečku, jelikož zde neprobíhá transovariální přenos z dospělého na vajíčka, a tak musí být každá nová generace klíštěte infikována.

Vajíčka klíšťat se líhnou do neinfikovaných larev, které se krmí na prvním hostiteli. Těmi jsou nejčastěji již infikovaní drobní savci, avšak dnes jsou důležitými hostiteli také stěhovaví ptáci. Nasycené larvy opouští primárního hostitele a cyklus dál pokračuje do stádia nymfy, která napadá sekundárního hostitele. Povaha sekundárních hostitelů bývá shodná s hostiteli primárními. Nymfy nesou největší zodpovědnost za přenos spirochét na člověka, kde dochází k infekci. Následuje stádium dospělého jedince, který se ovšem živí na velkých savcích, jako jsou například jeleni, kteří nejsou kompetentními hostiteli, avšak jsou nepostradatelní pro páření dospělých jedinců a tím i udržování populací klíšťat. (Radolf et al., 2012)

3.4. Patogenita

Jako patogenní je označován organismus, který je schopen způsobovat onemocnění u svého hostitele. Ne všechny kmeny komplexu *B. burgdorferi* tuto schopnost mají. Bylo však prokázáno, že patogenita nemusí nutně korelovat s produkcí protilátek.

U borelií nebyla dosud prokázána žádná produkce toxinů, tudíž je jejich patogenita definována právě reakcí imunitního systému, kterou vyvolávají v těle hostitele. Tato reakce pak závisí na antigenní komplexnosti borelie a na mechanismech úniku, které si borelie vyvinuly.

Patogenita je přisuzována plasmidu lp36. Mutantní kmeny, ve kterých tento plasmid chybí, nejsou schopny indukovat interferon typu I (konkrétně IFN – α), což v důsledku způsobuje snížení infekčnosti. Interferony typu I jsou produkovány dendritickými

buňkami a s jejich stimulací se výrazně zvyšuje exprese proteinu indoleaminy 2,3-dioxygenasy (IDO), jehož produkce je zprostředkována přes receptory TLR7 a TLR9. Nakonec bylo zjištěno, že velikost odpovědi interferonu typu I pozitivně koreluje se stimulací dendritických buněk hostitele a schopností indukovat IDO, což vede ke schopnosti diseminace infekce. (Love et al., 2015; Anderson et al., 1990)

4. Mechanismus infekce

4.1. Vznik infekce

Borrelia infikuje klíště při jeho krmení z nakaženého hlodavce, ptáka nebo plaza. Bakterie tak kolonizuje střevo klíštěte, dokud nedojde k dalšímu krmení. V této fázi část bakterií ze střeva přechází do slinných žláz, kterými se dostává do těla hostitele. (Kung et al., 2013) Klíšťata při sání krve vylučují společně se slinnými žlázami další látky (např. Salp15), které pomáhají bakteriím přežít. Jsou to látky proti srážení krve, látky potlačující svědění kůže a látky, které snižují imunitní odpověď hostitele. (Wen et al., 2020)

4.2. Rozpoznání infekce

Jelikož nebylo prokázáno, že by tyto bakterie produkovaly toxiny či jiné látky narušující extracelulární matrix, odvíjí se vznik veškerých zánětlivých procesů právě od těchto imunitních procesů. Při procesu rozpoznání infekce se uplatňují zejména mechanismy přirozené imunity.

Počátek imunitní odpovědi je iniciován rozpoznáním bakterie skrze její molekulární motivy asociované s patogenem (tzv. pathogen-associated molecular patterns, zkr. PAMPs) buňkami hostitelského imunitního systému, kterými jsou např. makrofágy, monocyty nebo dendritické buňky. Na povrch těchto buněk jsou exprimovány receptory, které rozpoznávají tyto patogenní vzorce (tzv. pattern recognition receptors, zkr. PRRs). Mezi tyto receptory patří zejména Toll – like receptory (TLRs) a NOD – like receptory (NLRs). (Steere et al., 2016)

TLR2 rozpoznává boreliové lipoproteiny, což vede k aktivaci transkripčního faktoru NF- κ B (nukleární faktor-kappa B) nebo aktivaci MAPK (mitogenem aktivovaná protein-kináza), čímž následně dochází k indukci mediátorů zánětlivé odpovědi. Tento receptor

společně s dalšími TLRs (TLR7, TLR8 a TLR9) spolupracuje na indukci interferonu a dalších protizánětlivých molekul.

NLRs reagují na samotnou bakterii nebo její PAMP v cytosolu a zvyšují indukci cytokinů. Produkce prozánětlivých a protizánětlivých cytokinů je zprvu vyvážená, avšak postupem času se počty mění a převažují tak cytokiny protizánětlivé. (*Radolf et al., 2012; Steere et al., 2016*)

4.3. Fáze infekce a její projevy

4.3.1. Časná lokalizovaná fáze

První známky o infekci se objevují dny až týdny po kousnutí klíštětem. Erythema migrans se objeví jako papula, která se postupně rozrůstá v prstencovou lézi. (*Tatum et al., 2020*) Časná fáze také může a nemusí zahrnovat systémové symptomy, jako je například horečka, zimnice nebo nevolnost. (*Soloski M. J. et al., 2014*) Erythema migrans se u některých nakažených vůbec neobjeví, a tak může bakterie migrovat dál do těla pomocí krve, lymfy i podél nervových vláken. (*Hofmann et al., 2017*)

4.3.1.1. Erythema migrans

Kožní aparát těla je při infekci napadený jako první a nejčastějším projevem LB je právě erythema migrans. EM je kožní léze, která vzniká v místě kousnutí klíštěte a proniknutí bakterií do těla. Léze počíná jako červená makula nebo papula a postupně se rozšiřuje. Pro úspěšnou diagnózu musí její průměr dosáhnout velikosti 5 cm. (*Stanek et al., 2018*) Obvykle se objevuje 2-30 dní po kousnutí klíštětem. Násobná EM je určena dvěma a více lézemi, z nichž jedna musí být velikostně charakteristická pro LB. (*Biesiada et al., 2012*)

4.3.2. Časná diseminovaná fáze

Diseminovaná fáze nastává týdny až měsíce po infikování klíštětem. (*Tatum et al., 2020*) Bakterie se šíří, vytváří mnohočetné léze erythema migrans a prolifерuje v boreliový lymfocytom. (*Uhde et al., 2016*) Vyskytují se neurologické abnormality, které se prezentují jako meningitida, kraniální neuritida, neuropatie, ataxie nebo Bannwarthův syndrom. (*Tatum et al., 2020*) Dalšími příznaky při napadení periferních nervů je pálení

kůže, necitlivost a bolesti v různých částech těla. Bakterie už proniká i do kloubů a napadá srdeční svalstvo. (*Bartůněk et al., 2013*)

4.3.2.1. Boreliový lymfocytom

BL je lokalizovaná lymforetikulární dermální proliferace, která se objevuje měsíc i déle po kousnutí. Projevuje se jako modrobílý plak nebo uzlík, nejčastěji na ušním lalůčku u infikovaných dětského věku nebo na bradavce u dospělých. (*Vasudevan et al., 2013*) U dětí se tento projev vyskytuje častěji než u starších pacientů. Výskyt BL není závislý na předešlém výskytu erythema migrans. Mohou se projevit společně, ale i nezávisle na sobě. (*Stanek et al., 2018*)

4.3.2.2. Kraniální neuritida

Nejčastěji se vyskytuje u pacientů dětského věku a mladistvých. Projevuje se hlavně obrnou periferního lícního nervu, která je často nešťastně zaměňována s Bellovou obrnou, což při absenci kožních projevů znemožňuje správnou diagnózu. Dalším poškozeným může být nerv statoakustický nebo nerv zrakový. (*Bartůněk et al., 2013*)

4.3.2.3. Aseptická meningitida

Zánět mozkových blan, který je provázen zmateností, přecitlivělostí na zvuky a světlo, ztuhlostí šíje a nevolnostmi, je určen lymfocytární pleocytózou (zvýšený počet lymfocytů v cerebrospinální tekutině). Jako důsledek zánětlivých změn v nervovém systému mohou vznikat komplikace jako trombóza drobných cév nebo hypoxie způsobená nedostatečnou cirkulací. (*Bartůněk et al., 2013*)

4.3.2.4. Bannwarthův syndrom

Bannwarthův syndrom, jinak také zvaný meningoradikuloneuritida, je po erythema migrans druhým nejčastějším projevem Lymfské boreliózy u dospělých jedinců. (*Stanek et al., 2018*) Projevuje se silnou bolestí hlavy, která velmi slabě reaguje na běžné léky proti bolesti. U pacientů dochází během měsíce k neurologickým deficitům, smyslovým poruchám nebo postižení obličejových nervů. (*Rauer et al., 2018*)

4.3.2.5. Lymská artritida

Pacienti s přetrvávajícími problémy po léčbě v časně fázi často trpí bolestmi kloubů, tzv. arthralgií. (*Rebman et al., 2020*) Tyto bolesti mohou být jediným projevem Lymské boreliózy, ze kterého se však mohou vyvinout chronické záněty kloubů, tzv. artritida. Bakterie se primárně infiltrují do synoviální tekutiny velkých kloubů, nejčastěji do kolen. Napadené mohou být i další části pohybové soustavy, jako např. šlachy, úpony vazů, kloubní pouzdra, vazy nebo svaly. (*Bartůněk et al., 2013*)

4.3.2.6. Lymská karditida

Zánětlivé postižení srdce se projevuje námahovou dušností, bolestmi na hrudi, nepravidelným srdečním rytmem nebo synkopami. (*Stanek et al., 2018*) Symptomy se neliší od jiných onemocnění oběhového ústrojí, a tak je určení diagnózy závislé na anamnéze pacienta, jeho možném pobytu v endemické oblasti, a hlavně na průkazném sérologickém vyšetření s využitím specifických antigenů. (*Bartůněk et al., 2013*)

4.3.3. Pozdní (chronická) fáze

Do pozdní fáze se infikovaný dostává měsíce až roky po nakažení. V tuto chvíli infekce způsobuje chronické artritidy nebo postboreliový syndrom, neurologické poškození se projevuje v narušení paměti, nálad nebo spánku. (*Tatum et al., 2020*) Bakterie napadá i jiné orgány, než je kůže a nervový systém. Dlouhodobá perzistence je příčinou vzniku acrodermatitis chronica atrophicans, chronické artritidy nebo chronické neuroboreliózy. (*Bamm et al., 2019*)

4.3.3.1. Acrodermatitis chronica atrophicans

ACA je pomalé progresivní onemocnění, které má dvojí průběh. Počáteční stadium se podobá erythema migrans, kdy se růžová až purpurová erythema objevuje většinou na končetinách. V pozdějším stadiu se rozvíjí hypo– nebo hyperpigmentace, kůže slábne, což má za důsledek viditelné cévy, a vykazuje známky epidermální atrofie. (*Nadal et al., 1988*) Nejčastěji se objevuje u starších lidí, zejména u žen. (*Hofmann et al., 2017*)

4.3.3.2. Chronická neuroborelióza

Lymská neuroborelióza v pozdním stadiu se může projevovat jako periferní neuritida ve spojení s ACA. V tomto případě pacienta postihují parézy, poruchy vnímání a bolesti. (Stanek et al., 2018) Dalším možným projevem je encefalomyelitida, která zahrnuje již zmíněné poruchy paměti, nálad nebo spánku a může přecházet až k degenerativním chorobám projevujícím se jako např. roztroušená skleróza. Ke správné diagnóze je tak nutné hledat postižení i jiných orgánů, které se u roztroušené sklerózy nevyskytuje, a provést vyšetření cerebrospinální tekutiny. (Bartůněk et al., 2013)

4.3.3.3. Chronická artritida

Při neléčení bolestí nebo zánětů kloubů v předchozím stadiu může následně onemocnění přejít do chronické podoby zánětu, které má dlouhé trvání. U zmiňované nejčastější artritidy kolenního kloubu dochází ke zmnožení synoviální tekutiny, která může v podkolenní vytvářet pseudocystu, u které hrozí perforace, a může tak pronikat mezi svalstvo dolní končetiny. Chronická artritida bývá monoartikulární nebo oligoartikulární. K diagnóze přispívá anamnéza, vyšetření synoviální tekutiny, séra a také vyloučení ostatních kloubních onemocnění. (Dlouhý et al., 2011)

5. Antigeny *Borrelia burgdorferi sensu lato*

Antigeny jsou látky, které v těle vyvolávají produkci protilátek a reakci imunitního systému infikovaného organismu. Pokud jsou antigeny označeny jako „specifické“, je již v těle hostitele vytvořena protilátka, která je přímým důkazem onemocnění. Nespecifické antigeny nejsou důkazem onemocnění, ale mohou podpořit potvrzení infekce v případě, že dojde k průkazu dalších antigenů. (Hořejší et al., 2005)

U spirochét Lymské boreliózy jsou studie zaměřeny hlavně na povrchové proteiny (Osp), které mohou borelie regulovat podle reakce hostitele. Umožňují vazbu na různé ligandy a tím by mohly být klíčovými k určení tkáňových specifit borelií. (Wang et al., 1999).

Antigen VlsE (variable major protein-like sequence, expressed) je druhově specifický, je jeden z hlavních antigenů exprimovaných v časně i pozdní fázi Lymské boreliózy a přítomnost specifických protilátek nebo přímo tohoto antigenu významně zvyšuje spolehlivost testů. Hraje důležitou roli v přežití borelií, jelikož se neustále mění při napadení hostitelského organismu. (*Lone et Bankhead, 2020*)

Bičíkový antigen, tzv. flagelin, tvoří stavební složku bičíků i u jiných pohyblivých bakterií a není tak specifický pouze pro borelie. Může však být podpůrný pro diagnózu Lymské boreliózy při průkazu dalších antigenů. (*Bartůněk et al., 2013*)

5.1. Povrchové antigeny

5.1.1. OspA

OspA je lipoprotein tvořený aminokyselinami a vylučovaný na povrch spirochét borelií. (*Shandilya et al., 2017*) Je to vysoce specifický antigen o velikosti 31, 32 a 32,5 kDa. Regulaci produkce pozitivně ovlivňuje vstup bakterie do střeva klíštěte, a naopak je potlačována při krmení klíštěte z hostitele. (*Caine et al., 2017*) Protein není běžně tvořen uvnitř savce, a proto je velmi těžko rozeznáván protilátkami v dodávaném krevním jídle. Má také schopnost vázat se na receptor ve střevě klíštěte. (*Tilly et al., 2016*)

Bylo objeveno 6 sérotypů antigenu OspA, z nichž se každý vyskytuje u jiného druhů *Borrelia* (*Comstedt et al., 2014*):

- *B. burgdorferi ss* – sérotyp 1
- *B. garinii* – sérotyp 3, 5 a 6
- *B. afzelii* – sérotyp 2
- *B. bavariensis* – sérotyp 4

5.1.2. OspB

Povrchový protein s molekulární hmotností 34 kDa, který má podobnou sekvenci a sktukturu jako OspA. Činí je to tak snadno zaměnitelnými, což je pro hostitele problém a pro bakterii výhodou. (*Tilly et al., 2016*) Větší variabilita OspB umožňuje borelii lepší vyhýbání se imunitnímu systému hostitele a více času na vytváření infekce. (*Coleman et al., 1994*)

5.1.3. OspC

Jeden z hlavních povrchových antigenů a dominantních faktorů boreliové infekčnosti, který má molekulovou hmotnost 22, 23 a 25 kDa. (Norek et Janda, 2017) Hraje roli ve výběru hostitele, vazbě plasminogenu, napadnutí a šíření v organismu, rozpoznání savčího prostředí a unikání přirozené imunitě. (Tilly et al., 2013) Jeho exprese je iniciována při vystavení klíštěte krvi hostitele a je tak přípravou pro vstup bakterie do hostitelské tkáně. (Caine et al., 2018) OspC má antifagocytární vlastnost, která může usnadnit únik spirochét před fagocyty během časně infekce savců. (Carrasco et al., 2015) Tento antigen vyvolává v hostiteli imunitní odpověď, která je vysoce specifická pro konkrétní OspC alely. (Durand et al., 2015)

Pomocí fenotypizace bylo určeno 27 typů OspC, z nichž jsou pro lidi patogenní pouze 4, a to typy A, B, I a K (Bartůněk et al., 2013):

- *B. burgdorferi ss* – typ A
- *B. garinii* – typ K
- *B. afzelii* – typ B a I

5.1.4. VlsE

Antigeně variabilní protein přítomný na povrchu spirochét během přetrvávající infekce. Jeho produkce se zvyšuje se snižující se produkcí OspC. (Tilly et al., 2013) VlsE protein se skládá z několika částí:

- chráněná oblast** – je zasazena v bakteriální membráně a udržuje v ní tak celý protein, transmembránová doména
- konstantní oblast** – přiléhá k oblasti chráněné a je obklopena oblastí variabilní, která ji tak u žijících borelií chrání před přímou reakcí imunitního systému hostitele; u mrtvé borelie, která je zpracována antigen-prezentujícími buňkami, je celý protein vystaven hostitelskému organismu, který tvoří protilátky právě proti konstantním oblastem
- variabilní oblast** – kryje konstantní oblast a odolává imunitnímu systému hostitele díky neustálým změnám rekombinací, které si borelie vytváří

kombinací tzv. variabilních, hlavnímu proteinu podobných sekvencí DNA (*Ohnishi et al., 2003; McDowell et al., 2002; EUROIMMUN*)

5.2. Flagelin

Flagelin je vnější antigen motorických orgánů, tzv. bičků, o velikosti 41 kDa, který se vyskytuje nejen u borelií, ale u všech bičíkatých bakterií. Z tohoto důvodu nemůže být tento antigen specifický pro diagnózu Lymfské boreliózy, ale je nejčastěji nacházeným antigenem při vyšetřování tohoto onemocnění.

Tento protein obsahuje stejné povrchové znaky jako neurony centrální nervové soustavy a periferní nervy, což může způsobovat autoimunitní reakce nebo demyelinizační procesy. Bičík borelie není tvořen pouze flagelinem, ale také vnitřním proteinem, který má molekulovou hmotnost 14 kDa. (*Bartůněk et al., 2013*)

5.3. Adhezivní proteiny

5.3.1. CRASPs

Povrchové lipoproteiny, tzv. complement regulator-acquiring surface proteins, které jsou díky svým adhezivním vlastnostem schopny navázat mediátory imunitní odpovědi hostitele. V našem případě jsou to primárně regulátory komplementu C3b, faktor H a FHL-1 (factor H like protein-1), jejichž navázáním může dojít k blokování funkce komplementu. (*Aslam et al., 2017*)

Povrch bakterií je vybaven celkem 5 typy tohoto lipoproteinu, značenými jako CRASP-1, -2, -3, -4 a -5.

5.3.2. Erp proteiny

Erp proteiny fungují na stejném principu jako CRASPs. Těchto proteinů je široká škála – OspE, OspF, Elps22, p21, ErpA a ErpP. Každý z nich disponuje odlišnou afinitou k mediátorům. (*Aslam et al., 2017*)

5.3.3. BBK32

Lipoprotein, který specificky inhibuje klasickou dráhu komplementu silnou vazbou C1 a C1r komplexu, a je tak chráněn před likvidací imunitním systémem. Je znám jako jediný příklad biomolekuly, která je schopna přímo a nekovalentně inhibovat klasickou dráhu komplementu. (*Garcia et al.*, 2016)

Mezi jeho další schopnosti patří vazby fibronektinu, glykoproteinu, který se nachází na povrchu buněčných membrán, v mezibuněčné hmotě a v tělních tekutinách. Díky své vysoké afinitě má fibronektin také mnoho funkcí, z nichž nejdůležitější jsou opsonizace, hojení ran, vývoj a morfogeneze. (*Brouwer et al.*, 2020)

5.3.4. Dbp

Adheziny, které rozpoznávají a váží proteoglykan dekorin. DbpA a DbpB, tzv. „decorin binding proteins“, mají velikost 18-20 kDa. Patří mezi povrchové adhezivní proteiny, které umožňují bakterii kolonizovat kromě primárně napadené tkáně, kterou bývá zpravidla kůže, i jiné orgány, jako jsou například klouby nebo srdce.

Dekorin je asociovaný na povrchu kolagenu v extracelulární matrix kůže a dalších orgánů. (*Hanson et al.*, 1998)

5.4. Pomocné proteiny

Antigeny, které se účastní mechanismu boreliové infekce a nachází se v klíštěcích slinách, se kterými je *Borrelia* přenášena do těla hostitele. Mezi tyto proteiny řadíme Salp15, Salp25D a Salp20.

5.4.1. Salp15

Nejvíce diskutovaný a studovaný protein obsažený v klíštěcích slinách. Bylo prokázáno, že se tato látka inhibuje aktivaci CD4⁺ T-lymfocytů a zabraňuje sekreci interleukinu 2. Tím je znemožněno navázání na OspC a zároveň i ochromena imunitní obrana hostitele zprostředkována komplementem nebo protilátkami. (*Aslam et al.*, 2017; *Wen et al.*, 2020)

5.4.2. Salp25D

Další z proteinů, který je produkován ve střevě a slinných žlázách klíštěte, umožňující únik borelie imunitnímu systému hostitele díky schopnosti detoxikovat reaktivní druhy kyslíku, které jsou produkovány neutrofily. (Kung et al., 2013)

5.4.3. Salp20

Posledním zmíněným z této skupiny proteinů je Salp20, protein, který je schopen inhibovat alternativní dráhu komplementu vazbou properdinu, který slouží jako iniciátor a pozitivní regulátor aktivity. (Blatt et al., 2016; Hourcade et al., 2016)

5.5. Hlavní antigeny pro diagnózu – WesternBlot

Seznam antigenů byl sestaven na základě informací z oficiálního webu společnosti EUROIMMUN – Anti-Borrelia EUROLINE.

5.5.1. Antigeny pro WesternBlot

- **VlsE** – povrchový antigen s vysokou variabilitou
- **p83/100** – vysoce specifický protein o velikosti, který je také označován jako „marker 3. stádia boreliózy“, protilátky proti němu vytvořené jsou charakteristické pro pozdní a chronickou fázi infekce
- **p41** – zevní antigen bičíků, společný pro všechny bičíkaté bakterie, nejčastěji nacházeným antigenem
- **BmpA** – „basic membrane protein A“ má velikost 39 kDa, je vysoce specifický a vyskytuje se při časně infekce společně s OspC
- **OspB** – vysoce specifický povrchový antigen o velikosti 34 kDa, detekovatelný při pozdní imunitní odpovědi
- **OspA** – další z vysoce specifických povrchových proteinů, jeho velikost je 30/31 kDa; díky OspA jsou borelie schopny adheze k epiteliálním buňkám v zažívacím traktu klíšťat, kde přežívají období podzimu a zimy (Bartůněk et al., 2013)
- **OspC** – vnější povrchový antigen s velikostí 21-25 kDa, vytvářený na povrchu borelie již při vstupu do těla hostitele

- **p19** – povrchový antigen OspE, který řadíme k Erp proteinům
- **DbpA** – „binding protein“, antigen o molekulární hmotnosti 17/18 kDa, pomocí kterého se borelie váže na dekorin

6. Druhy komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato

Do komplexu *B. burgdorferi* se k dnešnímu datu řadí 22 druhů, ze kterých 11 způsobuje onemocnění na evropském kontinentu. Jako lidský patogen jsou vyzdvihovány zejména tři z nich: *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* a *B. afzelii*. Heterogenita těchto borelií se odráží na různé imunitní odpovědi napadeného jedince a následně tak na klinických projevech. (Răileanu et al. 2020)

Další druhy jako např. *B. spielmanii*, *B. bisetii*, *B. valaisiana* nebo *B. lusitaniae* byly objeveny pouze v ojedinělých případech. (Stanek et al, 2018)

6.1. *B. burgdorferi* sensu stricto

B. burgdorferi sensu stricto je spojována s Lymskou nemocí převážně v Severní Americe a západní Evropě. (Mechai et al., 2016) Jejimi přenašeči jsou klíšťata rodu *Ixodes*, konkrétně *I. scapularis*, *I. pacificus* a *I. ricinus*, a hlavní hostiteli jsou hlodavci a stěhovaví ptáci. (Stone et al., 2017) Tento druh je nejčastěji spojován s kloubními projevy, zejména artritidami.

Byly objeveny 3 genotypy *Bbss*, které mají schopnost růst a šířit se v kůži, krvi a orgánech, a způsobovat tak infekci organismu. Subtypy jsou známé jako RST1, RST2 a RST3. (Bartůněk et al., 2013)

6.1.1. Patogenní potenciál

Obranný mechanismus hostitele vyvolává v přítomnosti *Bbss* větší expresi několika mediátorů vrozené imunitní odpovědi. Jsou to například interleukiny (IL – 1 β , IL – 6, IL – 8, IL – 10), tumor nekrotizující faktor (TNF), faktor stimulující růst kolonií granulocytů a makrofágů (GM – CSF) a chemokinové ligandy (CCL2, CCL3, CCL19).

Získaná imunita, která se zdá být při infekci dominantnější, je založena hlavně na odpovědích spojených s Th1 a Th17 lymfokiny.

Mediátory adaptované na Th1 lymfokiny jsou hlavně interferon γ (IFN – γ), interleukiny (IL – 12p40, IL – 12p70) a chemokinové ligandy s řady CXC (CXCL9, CXCL10).

Z mediátorů spojených s imunitní odpovědí tvořenou Th17 lymfokiny jsou to interleukiny (IL – 17A, IL – 17F, IL – 21, IL – 22, IL – 23, IL – 25, IL – 27). (Cerar et al., 2016)

6.1.2. Tkáňová specifita

Jak již bylo zmíněno, *B. burgdorferi* sensu stricto má největší afinitu právě ke kloubním onemocněním, které jsou označovány jako Lymfská artritida.

Borelie se do kloubů dostává pomocí krevního oběhu, kde přichází do kontaktu s endotelovou buňkou v kapilární síti, která se nachází po synoviální membránou. Následně zde probíhají patologické změny a aktivace leukocytů. Produkce cytokinů, hydrolytických enzymů a dalších molekul pak způsobuje destrukci buněk tvořících kloubní chrupavku i pod ní ležící kosti. (Bartůněk et al., 2013)

Celý proces infekce začíná v místě kousnutí klíštěte, kde se bakterie dostává do kapilár a žil, dochází ke kontaktu s vaskulárním endotelem a bakterie se pomocí svých adhezivních proteinů přitahuje k endotelovým buňkám. Vazba fibronektinu, zprostředkována proteinem BBK32, získává bakterii dostatek času pro navázání na cévní stěnu, čímž je podpořen kontakt hostitele a patogenu. Borelie se tedy translokuje endotelem a extracelulární matrix, překračuje tkáňové bariéry, a tak se dostane až do cílové tkáně – do kloubů. BBK32 má také schopnost vázat glykosaminoglykany (GAGs), které jsou hlavní složkou synoviální tekutiny a chrupavek.

Dalším z podpůrných proteinů jsou DbpA, který má schopnost vázat dekorin, je silně exprimován v chrupavkách a jeho exprese koreluje s rozšířením borelie v kloubech, a Osp proteiny vázající plazminogen, který po přeměně na plazmin podporuje degradaci extracelulární matrix, což má za důsledek rozvoj infekce. (Brouwer et al., 2020)

6.2. *B. garinii*

B. garinii je původcem Lymbské boreliózy především v Evropě a Asii, přičemž dominujícím přenašečem je *I. ricinus*. Hostiteli, stejně jako u předchozího druhu, jsou stěhovaví ptáci a hlodavci. (Stone et al., 2017) Její šíření je rychlejší a projevy onemocnění větší než u *B. afzelii*. (Strle et al., 2009) Tento druh borelie je nejčastěji izolován od pacientů s neurologickými obtížemi, tudíž se řadí na první místo jako patogen způsobující Lymbskou neuroboreliózu.

6.2.1. Patogenní potenciál

Při průkazu Lymbské neuroboreliózy je podstatný nález mediátorů imunitní odpovědi v cerebrospinální tekutině.

U pacientů s klinicky evidentní Lymbskou boreliózou byly zjištěny vyšší hladiny interleukinů (IL – 2, IL – 5, IL – 6, IL – 8, IL – 10, IL – 12, IL - 18). Interleukin – 12 spouští Th1 odpověď, která vede k silně zánětlivé reakci způsobenou interferonem gama (IFN – γ) a tumor nekrotizujícím faktorem beta (TNF – β). Tyto mediátory byly však pozorovány i u klíšťové encefalitidy, a proto se podstatným pro Lymbskou neuroboreliózu stává jiný faktor.

Podstatný je nález zvýšené koncentrace CXCL13, který byl pozorován u lidí s roztroušenou sklerózou, potvrzenou Lymbskou neuroboreliózou a dalšími zánětlivými onemocněními. Tento chemokinový ligand se dnes zdá být nejučinnější pro diagnostiku neuroboreliózy, avšak jeho diagnostická hodnota není tak vysoká, aby mohl být považován za marker onemocnění. (Cerar et al., 2013)

6.2.2. Tkáňová specifita

Bakterie se do oblasti nervového systému dostává v případě, kdy nejsou v časně fázi infekce vlastním imunitním systémem podchyceny zánětlivé změny na pokožce a následně i lymfatických uzlinách. Nemoc pak přechází do diseminované fáze, kdy dochází k poškození nervového systému.

Borrelia proniká přes hematoencefalickou i hematoliquorovou bariéru do mozku, kde se pohybuje v mozkomíšním moku a poškozuje neurony, mozkomíšní pleny a míšní kořeny. Při dlouhé perzistenci bakterie vyvolávají v CNS imunitní, ale hlavně

autoimunitní procesy. Aktivují se buněčné i humorální imunitní reakce, na které mozkový endotel reaguje vaskulitidou. To může vést až k trombóze a následné hypoxii mozku, nervů i míchy. (Bartůněk et al., 2013)

Důležitými faktory pro tvorbu autoimunitních reakcí se zdají být povrchové proteiny – OspA a OspB, které tvoří pouzdro bakterií. OspA je pro protilátky špatně detekovatelný, zřejmě kvůli snížené regulaci při vstupu bakterie do těla hostitele, a proto zřejmě společně s variabilním OspB tvoří antigeny pozdní fáze neuroboreliózy. (Aslam et al., 2017) Dalším z důležitých antigenů je vnější bičíkový antigen, p41, který se strukturou podobá bílkovině v axonech a může tak být příčinou autoimunitních reakcí, které vedou k demyelinizaci axonů. (Bartůněk et al., 2013)

Bylo prokázáno, že *B. garinii* je citlivější k funkcím komplementu. To by mohlo být důvodem specializace této bakterie právě na nervový systém, kde není komplement tolik aktivní jako v jiných tkáních. (Alitalo et al., 2001)

6.3. *B. afzelii*

B. afzelii je dalším druhem borelie, která způsobuje onemocnění v Evropě a Asii pomocí přenašečů *I. ricinus* a *I. persulcatus*. (Tatum et al., 2020) Hostiteli mohou být hlodavci, avšak ne stěhovaní ptáci. (Heylen et al., 2017) Je primární příčinou výskytu acrodermatitis chronica atrophicans a dalších kožních projevů. (Steere et al., 2016)

6.3.1. Patogenní potenciál

V lézích erythema migrans po histologickém vyšetření byly objeveny infiltráty skládající se z větší části z T-lymfocytů, menší zastoupení měly histiocyty a B-lymfocyty. Zejména byla zjištěna přítomnost interferonu gama (IFN – γ), interleukinu 10, 1 β , 6 (IL – 10, IL - 1 β , IL – 6) a tumor nekrotizující faktor (TNF). Aspirát z puchýřů lézí obsahoval také T – buňky, makrofágy a dendritické buňky. (Marques et al., 2018)

V porovnání s EM, T – buňky a makrofágy v lézích acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) vykazují mnohem nižší nebo žádnou expresi interferonu gama (IFN – γ). Exprimují pouze tumor nekrotizující faktor (TNF) a interleukin 4 (IL – 4). Snížená exprese cytokinů a nedostatek IFN – γ je zřejmě klíčovým faktorem pro chronický charakter ACA. (Müllegger et al., 2000)

6.3.2. Tkáňová specifita

Kůže je klíčovým místem pro infekci u všech druhů *Borrelia*. Jak bylo výše uvedeno, z kůže se infikované bakterie mohou šířit do celého těla a napadat tak cílové tkáně. U *B. afzelii* se však zdá být cílovou tkání právě pokožka, na které se po prvotních příznacích (EM) začnou objevovat i kožní onemocnění typické právě pro tuto bakterii (např. ACA). (Meddeb et al., 2016)

Během sání klíštěte se exprimuje povrchový protein OspC, který napomáhá při kolonizaci savce jako hostitele. Při mechanickém pronikání do kůže hostitele biochemicky pomáhají bílkoviny z klíštěcích slin (např. Salp15), které díky svým imunopresivním vlastnostem snižují imunitní aktivity (např. koagulace, fibrinolýza). V této fázi je pro přežití bakterií klíčové unikání protilátkám hostitele, a proto se povrchový antigen OspC mění na více variabilní VlsE. Odtud se následně šíří bakterie pomocí motorického orgánu a dalších adhezivních proteinů do dalších tkání v těle. (Steere et al., 2016)

V časně fázi se při diagnostice spoléhá na průkazy antigenů VlsE, OspC a p41 (vnější bičíkový antigen). Pro pozdní fázi jsou podstatné antigeny p100 (marker pozdní fáze boreliózy) a p17/18 (DbpA). (Hofmann et al., 2017)

7. Diskuze

Bakterie z komplexu *B. burgdorferi* sensu lato mají velmi komplexní antigenní výbavu, která rozhoduje o jejich patogenním potenciálu, určuje jejich tkáňovou specifitu a mění reakce imunitního systému hostitele. Práce vychází z předchozích studií (Stanek et al., 2018; Steere et al., 2016), ve kterých autoři uvádí jako tři hlavní lidské patogeny *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* a *B. afzelii*.

Borelie jsou na člověka přenášeny klíštětem v době jeho krmení, tzn. sání krve z hostitele, kdy v těle vytváří infekci a vyvolávají tak imunitní odpověď. Díky svým povrchovým proteinům je bakterie schopná již od samého začátku unikat imunitnímu systému člověka a šířit se tak do dalších tkání. Mezi tyto antigeny patří hlavně OspC, který je produkován okamžitě po proniknutí do těla a je podporován proteinem Salp15 z klíštěčích slin. OspC je tak považován za první specifický marker, který by se měl při infekci borelií prokázat. (Durand et al., 2015) V počátku infekce je také považován za důležitý protein VlsE (Steere et al., 2016), což dává smysl díky jeho obrovské variabilitě, která je určována genovou konverzí alel, jejichž počet čítá až na několik milionů, a tudíž i jeho schopnost vyhýbat se obranným mechanismům imunitního systému je mnohem vyšší než u jiných antigenů.

Jako zdroj cytokinů působících při infekci kůže byly potvrzeny hlavně T – lymfocyty a makrofágy, jejichž počet byl při histologických rozborech stanoven jako nejvyšší. Hlavní rozdíl v přítomnosti konkrétních antigenů se týká IFN – γ produkovaného Th1 lymfocyty, který byl při pozdní fázi infekce v lézích acrodermatitis chronica atrophicans prokázán jako výrazně nižší než v časné fázi u erythema migrans, a naopak byla prokázána exprese IL – 4 produkovaného Th2 lymfocyty, který se v časné fázi neobjevil. (Mülleger et al., 2000) Tento nález je zřejmě způsoben aktivacemi rozdílných drah imunitní odpovědi, jelikož Th1 lymfocyty zvyšují funkci buněčné imunity, a naopak produkce Th2 lymfocyty je známkou humorální odpovědi organismu.

Za účelem šíření proniká bakterie mezi endotelovými buňkami a vstupuje tak do kapilár, odkud se dostává krví dál do těla. K tomu jsou uplatňovány zejména adhezivní proteiny Dbps a BBK32, které mají schopnost vazby na dekorin a fibronektin, které se nachází právě v extracelulární matrix, kolagenu nebo tělních tekutinách. Díky svému adhezivnímu potenciálu tyto látky dokáží inhibovat komplement. (Garcia et al., 2016; Brouwer et al., 2020)

Borelie jsou díky svému spirálovitému tvaru a komplexním pohybům schopné proniknout přes hematoencefalickou bariéru do centrálního nervového systému a infikovat jak její, tak i periferní nervy. U pacientů s klinicky diagnostikovanou Lymfskou neuroboreliózou byly prokázány vysoké koncentrace chemokinu CXCL13, které se objevují ještě před průkazem specifických protilátek. Jak ovšem uvádí ve své studii *Cerar et al. (2013)* koncentrace chemokinu v séru nebyla prokázána na takové úrovni, aby mohl být používán jako specifický marker pro toto neurologické onemocnění. Do budoucna by bylo proto příhodné zaměřit se více na tuto látku, která byla již prokázána jako určitý ukazatel neuroboreliózy a dalším zkoumáním by mohla být povýšena právě na specifický marker. Díky tomu by mohl být zařazen do testovacích souprav na průkaz onemocnění a antibiotická nebo jiná léčba by tak mohla být nasazena ještě dříve, než se projeví specifické protilátky.

Alitalo et al. (2001) ve své studii konstatují, že specializace *B. garinii* právě na nervovou tkáň je zapříčiněná zřejmě zvýšenou citlivostí této bakterie na imunitní odpověď komplementu, která není v této oblasti tak vysoká jako v jiných tkáních. Zvýšená citlivost by mohla značit i menší množství proteinů adhezivních ke komplementu na povrchu borelie. Tuto spekulaci potvrzuje další studie *Alitalo et al. (2005)* kde bylo zjištěno, že exprese proteinů vázajících faktor H byla u *B. garinii* zaznamenána pouze velmi slabá nebo vůbec žádná.

Co se týče dalších ze zmiňovaných proteinů majících roli v infekci nervového systému, *Bartůněk et al. (2013)* ve své publikaci přisuzuje důležitost při vzniku autoimunitní reakci povrchovým antigenům OspA a OspB. Tyto dva povrchové antigeny podle uvedené studie tvoří zevní pouzdro borelie, avšak jiné studie uvádí, že jejich exprese je snižována při krmení klíšťat z hostitele a že jsou omezeny pouze na střevo klíštěte. (*Schwan et al., 1995*)

Tato rozdílná fakta zatím nebyla více objasněna, avšak více pravděpodobné je, že snížení exprese těchto povrchových proteinů je jen na takovou úroveň, aby dokázaly obejít imunitní systém a projevit se až v pozdní fázi infekce právě při neuroborelióze.

Při diseminaci infekce do kloubní tkáně jsou podle *Brouwer et al., (2020)* uplatňovány hlavně adhezivní molekuly BBK32 a DbpA. BBK32 zprostředkovává vazbu s GAGs a přispívá tak ke kolonizaci kloubů a synoviální tekutiny. DbpA je schopný vázat decorin, který je součástí pojivové tkáně, kde se adheruje na kolagenní fibrily.

Jak již bylo zmíněno, patogenní potenciál borelií je určován imunitní odpovědí hostitele. Bakterie si však s průběhem času vyvinuly mnoho mechanismů, díky kterým dokáží komplexní obraně mechanismu unikat. Hlavní roli při imunitní reakci mají lymfocyty a s nimi spojená produkce cytokinů, dendritické buňky, makrofágy, komplement a neutrofilny.

Neutrofilny, nebo také neutrofilní granulocyty, jsou buňky vrozeného imunitní systému. Jako jedny z prvních se dostávají k ložisku zánětu a jejich důležitou funkcí při obraně organismu je opsonizace a fagocytóza mikroorganismů. Po fagocytóze jsou mikroorganismy ničeny pomocí mikrocidních produktů obsažených v granulech neutrofilů. Bylo prokázáno, že některé bakterie tomuto mechanismu unikají pomocí modulace apoptózy neutrofilů, tím, že jí zpomalují a zajišťují si tak přežití v hostitelském organismu. (Kobayashi et al., 2003)

Dalším příkladem obrany *B. burgdorferi* je také schopnost stimulace produkce protizánětlivého cytokinu IL – 10, který hraje roli jak při unikání spirochét imunitní odpovědi, tak i při omezení zánětlivé reakce, kterou vyvolávají. IL – 10 byl nalezen v lézích EM a jeho zvýšená produkce je spojována s mírnějšími systémovými příznaky LB. Deficit tohoto cytokinu byl prokázán sníženým počtem borelií, což by mohlo být spojováno s menším poškozením a zánětlivou reakcí v tkáni, ale zároveň by to také umožňovalo bakteriím vyhnout se imunitnímu systému. (Steere et al., 2016)

Schopnost inhibice funkce komplementu je také velmi známý faktor unikání borelií. Mezi nejdůležitější proteiny obsažené u *B. burgdorferi*, které tuto schopnost mají, jsou CRASPs a Erp proteiny. Aktivita komplementu je většinou potlačována navázáním jeho regulátorů právě na tyto antigeny. Navázání faktoru H nebo FHL – 1 je podporována degradace C3b, a to zřejmě znemožňuje usmrcení alternativní dráhou. Ačkoliv ve studii Alitalo et al. (2001) nepopisují žádný mechanismus, kterým by borelie přímo ovlivňovaly klasickou dráhu komplementu, Garcia et al. (2016) zjistili, že tuto schopnost má antigen BBK32, který je schopný inhibovat komponent komplementu C1 a je tak zatím jedinou biomolekulou, která tuto funkci má.

Když shrneme veškeré poznatky, dostaneme komplexní charakter imunitní obrany hostitele, ze které vyplývá rozmanitý patogenní potenciál borelií z komplexu *B. burgdorferi*. V samém počátku infekce jsou nejdůležitější imunitní procesy zprostředkovávány vrozenou imunitní odpovědí, která začíná rozpoznáváním infekce

pomocí receptorů (TLRs, NLRs). Dále se uplatňují hlavně fagocyty (neutrofilů, makrofágy), které jsou schopné pohlcovat cizorodé částice a mikroorganismy v těle, a v neposlední řadě také komplement, který svou aktivovanou klasickou a alternativní drahou stimuluje chemotaxi, zprostředkovává opsonizaci a zajišťuje fagocytózu. (Radolf et al., 2012; Morgan et al., 2015)

Při následné fázi infekce se dostávají na řadu T a B lymfocyty, z nichž při reakci na boreliovou infekci převažují T buňky. Tyto buňky jsou aktivovány přes své imunoreceptory a zajišťují jak buněčnou, tak i látkovou imunitní odpověď. Lymfocyty jsou schopné produkce cytokinu, kterými dochází k regulaci imunitního systému. Při infekci způsobené pro člověka patogenními kmeny *Borrelia* se hladiny produkce cytokinů liší podle napadené tkáně. U kožních infekcí byly zjištěny největší koncentrace cytokinů produkovaných právě T – buňkami a B – buňky zde neměly takové zastoupení. Cytokiny jako například IFN – γ , TNF a některé interleukiny byly zaznamenány při časně fázi kožní infekce. V pozdní fázi infekce výrazně klesá nebo úplně mizí exprese IFN – γ a objevují se pouze TNF a IL – 4. Při pozorování pacientů s Lymfskou boreliózou je za nejdůležitější cytokin považován chemokin CXCL13, který má velký potenciál pro to, aby se stal markerem pro toto onemocnění. Dále se zde vyskytovaly také určité koncentrace IFNs, INF – γ a TNF – β . Tyto cytokiny však nebylo možné určit jako specifické, protože se vyskytují i u jiných onemocnění nervového systému. Pro kloubní onemocnění se ukázaly jako důležité hlavně cytokiny produkované Th1 a Th17 lymfocyty, ke kterým patří hlavně INF – γ , chemokinové ligandy z řady CXC a interleukiny.

Rozdíly mezi patogenními a nepatogenními boreliemi nejsou až tolik prozkoumané. Důvodem zřejmě bude orientace studií a výzkumů zaměřená spíše na patogenní druhy, které ohrožují zdraví a život člověka. Love et al. (2015) však ve své studii uvádí, že klíčovým by mohl být lineární plasmid lp36, díky kterému je možná indukce IFN – α , se kterou je spojena i produkce proteinuIDO. Pozitivní korelace těchto procesů je uvedena jako možný důvod diseminace infekce v těle hostitele.

Anderson et al. (1990) objevili kmen *Bbss* 25015, který se oproti patogenní kmenu N40 prokázal jako infekční, ale ne patogenní. Testované krysy a myši infikované kmenem 25015 vykazovali silnou imunologickou odpověď, tzn. produkci protilátek, ale jejich patogenita nebyla zřejmá. To vedlo k poznatku, že produkce protilátek nakaženého jedince nemusí nutně korelovat k patogenitou borelie, která imunologickou odpověď vyvolává.

8. Závěr

Cílem práce bylo najít rozdíly v antigenní charakteristice různých kmenů borelií. V práci jsem se zaměřila na tři kmeny, které jsou prokázány jako patogeny pro člověka – *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* a *B. afzelii*. Nejpodstatnějším faktem je, že borelie exprimují na svém povrchu mnoho antigenů, které jsou velmi variabilní, a tím zvyšují náročnost jejich zkoumání a pochopení. Bylo vybráno několik hlavních antigenů, které jsou při laboratorních diagnostikách stanoveny jako průkazné, a jejich funkce a vlastnosti byly popsány. V souvislosti s typem onemocnění, které konkrétní druhy borelií vyvolávají, se prokázalo jako signifikantní vždy jen málo antigenů, jejichž exprese byla oproti ostatním značně zvýšena. To by mohlo být důvodem jejich tkáňové specifity, která se u zmíněných tří kmenů liší.

V závislosti na koncentraci exprimovaných antigenů reaguje imunitní systém hostitele různými mechanismy a produkuje odlišné cytokiny. U některých typů onemocnění byl také zaznamenán rozdíl mezi koncentracemi cytokinů v časně a pozdní fázi infekce. To by mohlo být vysvětlením pro chronický charakter některých onemocnění.

Okolo patogenního potenciálu borelií je stále mnoho nevysvětleného. Z důvodu zaměření většiny výzkumů na druhy patogenních borelií bylo obtížné zjistit více informací o druzích nepatogenních, a proto i otázka ohledně jejich odlišnosti není zcela zodpovězena. Povedlo se však zjistit, že jedním z hlavních důvodů by mohla být absence, či naopak přítomnost jednoho z lineárních plasmidů borelie.

Základem budoucích studií zaměřených na toto téma by mohlo být detailnější prozkoumání hostitelských faktorů a bakteriálních antigenů, které jsou asociovány s patogenitou. Pochopení reakcí imunitního systému na důležité boreliové antigeny by mohlo vést k dlouho očekávanému nalezení vakcíny proti Lymbské borelióze.

9. Použitá literatura

Alitalo A., Meri T., Rämö L., Sakari Jokiranta T., Heikkilä T., Seppälä I. J. T., Oksi J., Viljanen M., Meri S. (2001): Complement evasion by *Borrelia burgdorferi*: Serum-resistant strains promote C3b inactivation. *Infect Immun.* 69(6): 3685-3691.

Anderson J. F., Barthold S. W., Magnarelli L. A. (1990): Infectious but nonpathogenic isolate of *Borrelia burgdorferi*. *Jurnal of clinical mikrobiology.* 28: 2693-2699.

Aslam B., Nisar M. A., Khurshid M., Salamat M. K. F. (2017): Imunne escape strategies of *Borrelia burgdorferi*. *Future Microbiol.* 12: 1219-1237.

Bamm V. V., Ko J. T., Mainprize I. L., Sanderson V. P., Wills M. K. (2019): Lyme disease frontiers: Reconciling *Borrelia* biology and clinical conundrums. *Pathogens.* 8(4): 299.

Bartůněk P., Bojar M., Calda P., Diblík P., Hercogová J., Hoza J., Hulínská D., Janovská D., Pícha D., Valešová M. (2013): *Lymeská borelióza 4., přepracované a doplněné vydání.* Praha: Grada. 168 s. ISBN 978-80-247-4355-4.

Biesiada G., Czepiel J., Leśniak M. R., Garlicki A., Mach T. (2012): Lyme disease: review. *Arch Med Sci.* 8(6): 978 – 982.

Blatt A. Z., Pathan S., Ferreira V. P. (2016): Properdin: A tightly regulated critical inflammatory modulator. *Immunol Rev.* 274(1): 172-190.

Brisson D., Drecktrah D., Eggers C. H., Samuels D. S. (2013): Genetics of *Borrelia burgdorferi*. *Annu Rev Genet.* 46:10.1146.

Brouwer M. A. E., van de Schoor F. R., Vrijmoeth H. D., Netea M. G., Joosten L. A. B. (2020): A joint effort: The interplay between the innate and the adaptive immune system in Lyme arthritis. *Immunol Rev.* 294(1): 63-79.

Caine J. A., Lin Y.-P., Kessler J. R., Sato H., Leong J. M., Coburn J. (2017): *Borrelia burgdorferi* outer surface protein C (OspC) binds complement component C4b and confers bloodstream survival. *Cell Microbiol.* 19(12):10.1111/cmi.12786.

Carrasco S. E., Troxell B., Yang Y., Brandt S. L., Li H., Sandusky G. E., Condon K. W., Serezani C. H., Yang X. F. (2015): Outer surface protein OspC in an antiphagocytic factor that protects *Borrelia burgdorferi* from phagocytosis by macrophages. *Infect Immun.* 83(12) 4848-4860.

Cerar T., Ogrinc K., Lotrič-Furlan S., Kobal J., Levičnik-Stežinar S., Strle F., Ružić-Sabljić E. (2013): Diagnostic value of cytokines and chemokines in Lyme neuroborreliosis. *Clin Vaccine Immunol.* 20(10): 1578-1584.

Cerar T., Strle F., Stupica D., Ruzic-Sabljić E., McHugh G., Steere A. C., Strle K. (2016): Differences in genotype, clinical features and inflammatory potential of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto strains from Europe and the United States. *Emerg Infect Dis.* 22(5): 818-827.

Charon N. W., Cockburn A., Li Ch., Liu J., Miller K. A., Miller M. R., Motaleb A., Wolgemuth C. W. (2012): The unique paradigm of spirochete motility and chemotaxis. *Annu Rev Microbiol.* 66: 349-370.

Coleman J. L., Rogers R. C., Rosa P. A., Benach J. L. (1994): Variations in the OspB gene of *Borrelia burgdorferi* result in differences in monoclonal reactivity and in production of escape variants. *Infect Immun.* 62(1): 303-307.

Comstedt P., Hanner M., Schüler W., Meinke A., Lundberg U. (2014): Design and development of a novel vaccine for protection against Lyme borreliosis. *PLoS One*. 9(11): e113294.

Dlouhý P., Honegr K., Krbková L., Pícha D., Roháčová H., Štruncová V. (2011): Lymeská borelióza: Doporučený postup v diagnostice, léčbě a prevenci. Dostupný na: <https://www.infekce.cz/DoporLB11.htm>

Durand J., Jacquet M., Paillard L., Rais O., Gern L., Voordouw M. J. (2015): Cross-immunity and community structure of a multiple-strain pathogen in the tick vector. *Appl Environ Microbiol*. 81(22): 7740-7752.

Garcia B. L., Zhi H., Wager B., Höök M., Skare J. T. (2016): *Borrelia burgdorferi* BBK32 inhibits the classical pathway by blocking activation of the C1 complement complex. *PLoS Pathog*. 12(1): e1005404.

Hanson M. S., Cassatt D. R., Guo B. P., Patel N. K., McCarthy M. P., Dorward D. W., Höök M. (1998): Active and passive immunity against *Borrelia burgdorferi* decorin binding protein A (DbpA) protects against infection. *Infect Immun*. 66(5): 2143-2153.

Heylen D. J. A., Sprong H., Krawczyk A., Van Houtte N., Genné D., Gomez-Chamorro A., van Oers K., Voordouw M. J. (2017): Inefficient co-feeding transmission of *Borrelia afzelii* in two common European songbirds. *Sci Rep*. 7: 39596.

Hofmann H., Fingerle V., Hunfeld K.-P., Huppertz H.-I., Krause A., Rauer S., Ruf B. (2017): Cutaneous Lyme borreliosis: Guideline of the German Dermatology Society. *Ger Med Sci*. 15: Doc14.

Hořejší V., Bartůňková J., Brdička T., Špišek R. (2017): *Základy imunologie* (6., aktualizované vydání). Praha: TRITON. 304 s. ISBN 978-807-5532-503.

Hourcade D. E., Akk A. M., Mitchell L. M., Zhou H., Hauhart R., Pham Ch. T. N. (2016): Anti – complement activity of the *Ixodes scapularis* salivary protein Salp20. *Mol Immunol.* 69: 62-69.

Izac J. R. et Marconi R. T. (2019): Diversity of the Lyme disease spirochetes and its influence on immune response to infection and vaccination. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 49(4): 671-686.

Kobayashi S. D., Braughton K. R., Whitney A. R., Voyich J. M., Schwan T. G., Musser J. M., DeLeo F.R. (2003): Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(19): 10948-10953.

Kung F., Anguita J., Pal U. (2013): *Borrelia burgdorferi* ant tick proteins supporting pathogen persistence int the vector. *Future Microbiol.* 8: 41-56.

Lone A. G., Bankhead T. (2020): The *Borrelia burgdorferi* VlsE lipoprotein prevents antibody binding to an arthritis related surface antigen. *Cell Rep.* 30(11): 3663-3670.

Love A. C., Schwartz I., Petzke M. M. (2015): Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by *Borrelia burgdorferi* in human immune cells correlates with pathogenic potential. *J Leukoc Biol.* 97(2): 379-390.

Margos G., Gofton A., Wibberg D., Dangel A., Marosevic D., Loh S., Oskam C., Fingerle V. (2018): The genus *Borrelia* reloaded. *PLoS One*. 13(12): e0208432.

Margos G., Vollmer S. A., Ogden N. H., Fish D. (2011): Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Infect Genet Evol*. 11(7): 1545-1563.

Marques A., Schwartz I., Wormser G. P., Wang Y., Hornung R. L., Demirkale C. Y., Munson P. J., Turk S.-P., Williams C., Lee Ch.-Ch. R., Yang J., Petzke M. M. (2018): Transcriptome assessment of erythema migrans skin lesions in patients with early Lyme disease reveals predominant interferon signaling. *J Infect Dis*. 217(1): 158-167.

McDowell J. V., Sung S.-Y., Hu L. T., Marconi R. T. (2002): Evidence that the variable regions of the central domain of VlsE are antigenic during infection with lyme disease spirochetes. *Infect Immun*. 70(8): 4196-4203.

Mechai S., Margos G., Feil E. J., Barairo N., Lindsay L. R., Michel P., Ogden N. H. (2016): Evidence for Host-Genotype Associations of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *PLoS One*. 11(2): e0149345.

Meddeb M., Carpentier W., Cagnard N., Nadaud S., Grillon A., Barthel C., De Martino S. J., Jaulhac B., Boulanger N., Schramm F. (2016): Homogeneous inflammatory gene profiles induced in human dermal fibroblasts in response to the three main species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *PLoS One*. 11(10): e0164117.

Morgan B. P., Harris C. L. (2015): Complement, a target for therapy in inflammatory and degenerative diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 14(12): 857-877.

Müllegger R. R., McHugh G., Ruthazer R., Binder B., Kerl H., Steere A. C. (2000): Differential expression of cytokine mRNA in skin specimens from patients with erythema migrans or acrodermatitis chronica atrophicans. *Journal of Investigative Dermatology*. 115(6): 1115-1123.

Nadal D., Gundelfinger R., Flueler U., Boltshauser E. (1988): Acrodermatitis chronica atrophicans. *Arch Dis Child*. 63(1): 72-74.

Norek A., Janda L. (2017): Epitope mapping of *Borrelia burgdorferi* OspC protein in homodimeric fold. *Protein Sci*. 26(4): 796-806.

Ohnishi J., Schneider B., Messer W. B., Piesman J., de Silva A. M. (2003): Genetic variation at the *vlsE* locus of *Borrelia burgdorferi* within ticks and mice over the course of a single transmission cycle. *J Bacteriol*. 185(15): 4432-4441.

Radolf J. D., Caimano M. J., Stevenson B., Hu L. T. (2012): Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nat Rev Microbiol*. 10(2): 87-99.

Răileanu C., Tauchmann O., Vasić A., Wöhnke E., Silaghi C. (2020): *Borrelia miyamotoi* and *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) identification and survey of tick-borne encephalitis virus in ticks from north-eastern Germany. *Parasit Vectors*. 13: 106.

Rauer S., Kastenbauer S., Fingerle V., Hunfeld K.-P., Huppertz H.-I., Dersch R. (2018): Lyme neuroborreliosis. *Dtsch Arztebl Int*. 115(45): 751-756.

Rebman A. W., Aucott J. N. (2020): Post-treatment Lyme disease as a model for persistent symptoms in Lyme disease. *Front Med*. 7: 57.

Schwan T. G., Piesman J., Golde W. T., Dolan M. C., Rosa P. A. (1995): Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92: 2909-2913.

Shandilya S., Yilmaz N. K., Sadowski A., Monir E., Schiller Z. A., Thomas W. D. Jr., Klempner M. S., Schiffer C. A., Wang Y. (2017): Structural and molecular analysis of a protective epitope of Lyme disease antigen OspA and antibody interaction. *J Mol Recognit*. 30(5): 10.1002/jmr.2595.

Soloski M. J., Crowder L. A., Lahey L. J., Wagner C. A., Robinson W. H., Aucott J. N. (2014): Serum inflammatory mediators as markers of human lyme disease activity. *PLoS One*. 9(4): e93243.

Stanek G., Strle F. (2018): Lyme borreliosis – from tick bite to diagnosis and treatment. *FEMS Microbiol Rev*. 42(3): 233-258.

Steere A. C., Strle F., Wormser G. P., Hu L. T., Branda J. A., Hovius J. W. R., Li X., Mead P. S. (2016): Lyme borreliosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2:16090.

Stone B. L., Tourand Y., Brissette C. A. (2017): Brave new worlds: The expanding universe of Lyme disease. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 17(9): 619-629.

Strle K., Drouin E. E., Shen S., Khoury J. E., McHugh G., Ruzic-Sabljić E., Strle F., Steere A. C. (2009): *Borrelia burgdorferi* stimulates macrophages to secrete higher levels of cytokines and chemokines than *Borrelia afzelii* or *Borrelia garinii*. *J Infect Dis*. 200(12): 1936-1943.

Tatum R, Pearson-Shaver AL. *Borrelia burgdorferi*. [Updated 2019 Nov 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532894/>

Tilly K., Bestor A., Rosa P. A. (2016): Functional equivalence of OspA and OspB, but not OspC, in tick colonization by *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun.* 84(5): 1565-1573.

Tilly K., Bestor A., Rosa P. A. (2013): Lipoprotein succession in *Borrelia burgdorferi*: similar but distinct roles for OspC and VlsE at different stages of mammalian infection. *Mol Microbiol.* 89(2): 216-227.

Uhde M., Ajamian M., Li X., Wormser G. P., Marques A., Alaedini A. (2016): Expression of C- reactive protein and serum amyloid A in early to late manifestations of lyme disease. *Clin Infect Dis.* 63(11): 1399 – 1404.

Vasudevan B., Chatterjee M. (2013): Lyme borreliosis and skin. *Indian J Dermatol.* 58(3): 167 – 174.

Wang G., Liveris D., Mukherjee P., Jungnick S., Margos G., Schwartz I. (2014): Molecular Typing of *Borrelia burgdorferi*. *Curr Protoc Microbiol.* 34:12C.5.1-12C.5.31.

Wang G., van Dam A. P., Schwartz I., Dankert J. (1999): Molecular typing of *Borrelia burgdorferi sensu lato*: Taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* 12(4): 633-653.

Wen S., Wang F., Ji Z., Pan Y., Jian M., Bi Y., Zhou G., Luo L., Chen T., Li L., Ding Z., Abi M.-E., Liu A., Bao F. (2020): Salp15, a multifunctional protein from tick saliva with potential pharmaceutical effects. *Front Immunol.* 10: 3067.

Internetové zdroje

- Antibodies against Borrelia. EUROIMMUN: a PerkinElmer company [online]. [cit. 2020-05-20]. Dostupné z: <https://www.euroimmun.com/products/indications/infektions-serologie/ak-gegen-borrelien-fsme-viren.html#c487>
- EUROIMMUN – systémy pro diagnózu borreliózy Westernblotem. EUROIMMUN: Laboratorium für experimentelle Immunologie GmbH [online]. [cit. 2020-05-20]. Dostupné z: https://www.dynex.cz/files/download/EUROLINE-WB_VlsE_cz_OBR1432.pdf