

## Streszczenie

Wścieklizna jest ostrą infekcją ośrodkowego układu nerwowego. Znana jest ludzkości od ponad 4000 lat i mimo znacznego postępu w medycynie oraz badaniach nad patogenezą choroby powoduje na świecie ponad 59 000 zgonów rocznie. Czynnikiem etiologicznym choroby jest wirus wścieklizny należący do rodzaju *Lyssavirus*, którego transmisja następuje najczęściej przez pogryzienie, wraz ze śliną chorego zwierzęcia. Do chwili obecnej nie ma skutecznego leczenia klinicznej postaci choroby. Jedynym sposobem zabezpieczenia przed wścieklizną jest natychmiastowa profilaktyka poekspozycyjna obejmująca opracowanie rany oraz immunizację osoby po ekspozycji na wirus wścieklizny. Niemniej jednak, kiedy wystąpią objawy choroby, wścieklizna z reguły kończy się śmiercią. Nadzieję na opracowanie skutecznej terapii wścieklizny zrodziło zastosowanie w 2004 roku protokołu Milwaukee opartego na wprowadzeniu pacjentki w śpiączkę farmakologiczną oraz dożylnym podaniu ketaminy, midazolamu, rybawiryny i amantadyny. Był to przypadek jednostkowy, niemniej jednak przyczynił się on do zintensyfikowania badań nad poszukiwaniem skutecznych środków terapeutycznych działających bezpośrednio na wirus jak również na odpowiedź immunologiczną organizmu gospodarza na zakażenie. Patogeneza zakażeń wirusem wścieklizny jest procesem złożonym, a objawy choroby związane są nie tylko z obecnością samego wirusa w organizmie gospodarza, ale i odpowiedzią immunologiczną gospodarza na zakażenie wirusem prowadzące do dysfunkcji/degradacji komórek nerwowych gospodarza i w efekcie śmierci.

Głównym celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu inhibitorów wybranych szlaków immunologicznych zaangażowanych w odpowiedź organizmu na zakażenie SHBRV-18 na przebieg klinicznej postaci wścieklizny na modelu mysim. Założeniem badań było ograniczenie nadmiernego i szkodliwego stanu zapalnego organizmu, na skutek zakażenia SHBRV-18, poprzez zahamowanie szlaków przekazywania sygnału z udziałem TNF- $\alpha$ , IL-6 oraz MAPK. Do tej pory udowodniono udział tych szlaków immunologicznych w przebiegu wielu chorób, w tym także tych o podłożu wirusowym oraz o charakterze neurodegeneracyjnym i autoimmunologicznym. Zarówno TNF- $\alpha$ , jak i IL-6 biorą udział w odpowiedzi zapalnej organizmu w czasie zakażenia wirusem dengi, wykazującym się podobnie jak wirus wścieklizny charakterem neurotropowym. Aktywność szlaków MAPK wykazana została natomiast w przebiegu chorób o charakterze neurodegeneracyjnym takich jak choroba Alzheimera oraz stwardnienie

zanikowe boczne. Zastosowanie inhibitorów szlaków immunologicznych w przebiegu wyżej wymienionych chorób dało obiecujące rezultaty.

W przebiegu prowadzonych badań myszy, 7-tygodniowe samice, zakażone zostały wysoce zjadliwym szczepem wirusa wścieklizny SHBRV-18, po czym, od 5 dnia po zakażeniu, rozpoczęto podawanie wybranych inhibitorów szlaków immunologicznych. Wpływ inhibitorów TNF- $\alpha$ , IL-6 oraz MAPK na przebieg zakażenia SHBRV-18 testowano poprzez porównanie czasu przeżycia myszy w grupach doświadczalnych. W pobranych próbkach OUN myszy (mózdzek/pień mózgu, kora mózgowa oraz odcinek szyjny rdzenia kręgowego) zbadano miano wirusa, liczbę kopii genu *N* dla wirusowego białka nukleoproteiny oraz określono względny poziom ekspresji genów dla wybranych czynników szlaków immunologicznych.

W toku prowadzonych badań zaobserwowano statystycznie istotne wydłużenie czasu przeżycia w grupach, gdzie stosowano inhibitory TNF- $\alpha$  (iTNF- $\alpha$  + V) oraz MAPK (iMAPK + V) w odniesieniu do kontroli wirusa (V<sub>c</sub>). Podawanie inhibitorów TNF- $\alpha$ , IL-6 oraz MAPK nie zahamowało replikacji wirusa, o czym świadczy brak różnic, a wręcz wyższe miano RABV w grupie iTNF- $\alpha$  + V, w porównaniu do miana wirusa w grupie V<sub>c</sub>. Wynik ten pozwala przypuszczać, iż wydłużenie czasu przeżycia myszy leczonych inhibitorami szlaków immunologicznych było efektem ograniczenia szkodliwego stanu zapalnego ze strony gospodarza na zakażenie SHBRV-18, a nie bezpośredniego działania inhibitorów na wirus. Potwierdzeniem tej tezy jest spadek poziomu mRNA dla TNF- $\alpha$  w grupie iTNF- $\alpha$  + V w odniesieniu do kontroli wirusa.

Analiza markerów zaangażowanych w zaprogramowaną śmierć komórki (Mcl-1, Bcl-2, JNK3, CASP3 oraz CYCS), jako odpowiedź organizmu gospodarza na zakażenie wirusem, wykazała, że apoptoza nie jest głównym patomechanizmem zaangażowanym w obronę organizmu przed zakażeniem SHBRV-18.

Niniejsza praca ma charakter ściśle poznawczy, a przeprowadzone badania zawierają się w obszarze nauk podstawowych. Uzyskane wyniki, dostarczają nowych i cennych danych w zakresie badań nad poszukiwaniem skutecznej terapii wścieklizny po wystąpieniu objawów klinicznych choroby. Przedstawione wyniki badań mogą stanowić podstawę do opracowania terapii skojarzonej opartej na synergistycznym działaniu substancji przeciwwirusowych, jak również leków ograniczających destrukcyjny wpływ układu immunologicznego na organizm. Ponadto analiza markerów apoptotycznych wzbogaca wiedzę dotyczącą patogenezy zakażenia SHBRV-18 oraz mechanizmów odpowiedzi immunologicznej wrodzonej organizmu gospodarza.

## Abstract

Rabies is an acute inflammation of the central nervous system. It has been known to for more than 4000 years and despite significant advances in medicine and research on the pathogenesis of the disease it causes more than 59,000 deaths each year. The etiological agent of the disease is the rabies virus of the genus *Lyssavirus*, which is transmitted most often by bite, with the saliva of the infected animal. Until now, there is no effective clinical treatment for the disease. The only protection against rabies is immediate post-exposure prophylaxis including wound washing and immunisation of the organism exposed to rabies. Unfortunately, when the symptoms of an illness occur, rabies usually ends in death. The hope to develop an effective rabies therapy was raised in 2004 by the application of the Milwaukee protocol based on the patient's introduction to pharmacological coma and intravenous administration of ketamine, midazolam, ribavirin and amantadine. Unfortunately, it was an individual case, but it did result in an intensification of research on the search for effective therapeutic agents acting directly on the virus as well as on the host immune response. The pathogenesis of rabies virus infections is a complex and the symptoms of the disease are connected not only with the presence of the virus itself in the host organism but also to the host's immune response to the virus infection which leads to dysfunctions/degradation of the host's nerve cells and as a result to death.

The main aim of this study was to investigate the effect of inhibitors of selected immune pathways involved in the organism's response to SHBRV-18 infection on the clinical course of rabies in the mouse model. The aim of the study was to limit excessive and harmful inflammation of the organism as a result of SHBRV-18 infection by inhibiting signal transmission pathways involving TNF- $\alpha$ , IL-6 and MAPK. To date, these immunological pathways have been proven to contribute to the course of many diseases, including viral, neurodegenerative and autoimmune diseases. Both TNF- $\alpha$  and IL-6 are involved in the inflammatory response of the organism during infection with the dengue virus, which like rabies virus shows neurotrophic character. The activity of the MAPK pathways was demonstrated in the course of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and lateral sclerosis. The use of immunological pathway inhibitors in the course of the above mentioned diseases has given promising results.

In the course of the study, 7-week old female mice were infected with a highly pathogenic strain of rabies virus SHBRV-18, after which, from the 5th day after the infection, administration of selected immunological pathway inhibitors was started. The effect of TNF- $\alpha$ , IL-6 and MAPK inhibitors on the course of SHBRV-18 infection was tested by comparing the survival of mice in experimental groups. In the mouse CNS samples taken (cerebellum/brain stem, cerebral cortex and spinal cord cervical section) the virus titre, the number of *N* gene copies for viral nucleoprotein and the relative gene expression level for selected factors of the immune pathways were investigated.

In the course of the study, statistically significant survival extension was observed in the groups where TNF- $\alpha$  (TNF- $\alpha$  + V) and MAPK (iMAPK + V) inhibitors were applied with respect to virus control (V<sub>c</sub>). The administration of TNF- $\alpha$ , IL-6 and MAPK inhibitors did not inhibit virus replication, as evidenced by the absence of differences or even higher RABV titers in the iTNF- $\alpha$  + V group compared to the virus titre in the V<sub>c</sub> group. This result suggests that the increase in survival of mice treated with immunological pathway inhibitors was due to the reduction of harmful inflammation from the host to SHBRV-18 infection and not to the direct action of inhibitors on the virus. This is confirmed by the decrease in the mRNA level for TNF- $\alpha$  in the iTNF- $\alpha$  + V group compared to virus control.

Analysis of the markers involved in the programmed cell death (Mcl-1, Bcl-2, JNK3, CASP3 and CYCS), as a host organism response to the virus infection, showed that apoptosis is not a leading mechanism involved in the protection of the organism against SHBRV-18 infection.

This dissertation has a strictly cognitive character and is in the area of basic sciences. The obtained results provide new and valuable data in the field of research for effective clinical therapy of rabies, after the onset of the symptoms of the disease. The presented results may be the basis for the development of combined therapy based on synergistic effects of anti-viral substances, as well as drugs reducing the destructive effect of the immune system on the organism. In addition, analysis of apoptotic markers improves the knowledge on the pathogenesis of SHBRV-18 infection and on the mechanisms of host innate immune response.