

Próby leczenia wścieklizny

Wścieklizna jest jedną z najstarszych chorób udokumentowanych w opisach. O wściekliwości wspominał Kodeks Eshnuna – prawo miasta Eshnuna w 23 wieku przed narodzeniem Chrystusa. Chorobę opisywali Demokryt i Arystoteles w 5-4 wieku B.C.. Celsus – 100 A.D. jako pierwszy wskazał na rolę dzikich zwierząt w transmisji choroby. W 1804 roku Zinke eksperymentalnie zakaził swojego jamnika poprzez wtarcie śliny chorego zwierzęcia na skaryfikowaną skórę psa i tym samym potwierdził kluczową rolę śliny w transmisji zakażenia. W 1879 roku Galatier opisał wściekliznę u królika, a w 1881 Pasteur wskazał na rolę ośrodkowego układu nerwowego (OUN) w patogenie choroby. Wiedza ta umożliwiła Pasteurowi - genialnemu mikrobiologowi francuskiemu – zastosowanie w 1885 roku po raz pierwszy szczepienia jako sposobu zapobiegania rozwojowi choroby. W 1903 roku Negri opisał ciała wtrętowe w komórkach nerwowych u osób zmarłych na wściekliznę. Warto wspomnieć, że przed Negrim, dr Orłowski – polski lekarz praktykujący w szpitalu warszawskim – obserwował ciała wtrętowe w 1898 roku.

Pomimo ogromnego postępu nauk biologicznych i pokrewnych jaki dokonał się w okresie ostatnich lat, pomimo opracowania skutecznych narzędzi diagnostycznych, pomimo opracowania skutecznych metod immunoprofilaktyki wirus wścieklizny ciągle stanowi zagrożenie dla zwierząt i człowieka. W przebiegu choroby obserwuje się postępujące zapalenie mózgowia i rdzenia kręgowego, które nieuchronnie prowadzi do śmierci. Wścieklizna jest chorobą o uznanym, najwyższym, prawie 100-procentowym współczynniku zejść śmiertelnych. Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) rokrocznie na świecie rejestrowanych jest od 59 do 70 tysięcy zgonów z powodu wścieklizny. Gross bo 99% zgonów występuje w Afryce i Azji i jest wynikiem transmisji wirusa od psów do ludzi. O skali zagrożenia świadczy liczba szczepień poekspozycyjnych, którym według danych WHO poddawanych jest na świecie co roku 15 milionów ludzi. I chociaż głównym rezerwuarem wirusa wścieklizny są zwierzęta mięsożerne, to zakażenie i zachorowanie może dotyczyć wszystkich zwierząt stałocieplnych. Szeroko stosowane akcje szczepień zwierząt towarzyszących i doustna immunizacja zwierząt wolno żyjących spowodowały znaczne ograniczenie występowania choroby, ale coraz

więcej przypadków wścieklizny diagnozuje się u nietoperzy. Kontakt z wściekłym nietoperzem jest równie niebezpieczny jak z wściekłym psem czy lisem. W 1997 roku w Holandii zdiagnozowano wściekliznę u kobiety, która wróciła z wyprawy do jaskiń w Kenii, gdzie podczas eksploatacji została zadrapana w ramię przez nietoperza. Australia uważana była za kontynent wolny od wścieklizny do roku 1996, kiedy to wykryto, że przyczyną śmierci dwóch osób był wirus wścieklizny. I w tym przypadku źródłem zakażenia były nietoperze. W Queensland, w sierpniu 1996 kobieta została pogryziona w palec podczas próby usuwania nietoperza z dziecka, na którym nietoperz usiadł. Sześć miesięcy później kobieta zgłosiła się do lekarza z prośbą o badanie na wściekliznę. Lekarz zalecił zabiegi poekspozycyjne, ale kobieta odmówiła. Po 27 miesiącach wystąpiły u niej objawy podobne do wścieklizny. Stan się pogarszał i kobieta zmarła po 19 dniach. Zwraca tu uwagę niezwykle długi okres wylęgania choroby – 810 dni. Drugi przypadek dotyczył także kobiety i także miał miejsce w Queensland. W listopadzie 1996 roku kobieta została zadrapana przez nietoperza. Objawy kliniczne wścieklizny wystąpiły 4-5 tygodni później, zgon nastąpił po 20 dniach. Nietoperze są także jednym z głównych wektorów wścieklizny w USA. Obecnie w Polsce rejestruje się z roku na rok coraz więcej przypadków wścieklizny u nietoperzy. Należy zatem zachować daleko idącą ostrożność przy wszelkich kontaktach z nietoperzami.

W latach 1960-1990 wścieklizna szerzyła się w Polsce głównie u zwierząt wolno żyjących, a lis rudy stanowił główny rezerwuariusz wirusa. W 1992 roku w Polsce zdiagnozowano 3084 ogniska wścieklizny, przy czym 70% wykrywano u lisa rudego. Polska wprowadziła doustną immunizację lisów przeciwko wściekliznie w 1993 roku. Najpierw była to strefa o głębokości 100 km wzdłuż granicy z Niemcami. Od 2002 roku akcję immunizacji lisów za pomocą szczepionki doustnej rozszerzono na cały kraj. Działania te doprowadziły do wysoce znaczącej redukcji liczby ognisk wścieklizny, gdyż w roku 2009 zarejestrowano jedynie 8 przypadków: 6 u lisa rudego i 2 u nietoperzy. Był to ogromny sukces i wydawało się, że Polska jest w przededniu ogłoszenia statusu „kraj wolny od wścieklizny”. Jednakże, po 7 latach wyników ujemnych w badaniu zwierząt na terenie południowo-wschodniej Polski wścieklizna zaatakowała ponownie dwa województwa: małopolskie i podkarpackie. Znow głównym rezerwuarem i wektorem wścieklizny był lis rudy. Ponieważ większość ekspozycji u ludzi wiąże się z pogryzieniem przez psy, polskie prawo od wielu lat stosuje wymóg (art. 6 Ustawy o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt – Dz. U. nr 69 poz. 625 z późniejszymi zmianami).

mi) obowiązkowego szczepienia psów przeciwko wściekliznie. Obowiązkowym szczepieniom co 12 miesięcy podlegają wszystkie psy będące w wieku powyżej trzeciego miesiąca życia.

W Polsce, dzięki wdrożeniu szybkiego, skutecznego systemu nadzoru i diagnostyki laboratoryjnej od 17 lat nie zarejestrowano przypadku wścieklizny u człowieka. Dwa ostatnie przypadki wystąpiły w latach 2000 i 2002. Pierwszy dotyczył kobiety w wieku 59 lat, która zmarła w szpitalu w Ostródzie 04.10.2000 roku. Ekspozycja miała miejsce 28.08.2000 od kota w miejscowości Karaś koło Iławy. Był to kot tej osoby, który powrócił do domu po dłuższej nieobecności, pogryzł, podrapał właścicielkę i zniknął. Gdyby kot został przedstawiony do badania prawdopodobnie tragedii udałooby się zapobiec. Przypadek ten wskazuje na bezwarunkową konieczność konsultacji z właściwymi służbami każdego przypadku ekspozycji, gdy zwierzęcia nie można przedstawić do badania laboratoryjnego. Drugi przypadek miał miejsce w województwie podkarpackim 16.01.2002 roku. Zmarł mężczyzna w wieku 28 lat po 18 dniach od wystąpienia pierwszych objawów klinicznych wścieklizny. W tym przypadku źródła zakażenia nie udało się ustalić.

Z przedstawionych powyżej informacji wynika, iż zagrożenie wścieklizną jest ciągle aktualne, a przy obecnej skali i zasięgu geograficznym przemieszczania się ludzi choroba może pojawiać się nawet na obszarach uznawanych za wolne. Stąd szczególnego znaczenia nabiera zasada unikania ekspozycji na zakażenie, a jeśli już do niej dojdzie to niezwłoczny kontakt ze służbami medycznymi i weterynaryjnymi w celu rozpoznania sytuacji i zastosowania procedur poekspozycyjnych (PEP). Wścieklizna jest chorobą w 99,99% przypadków kończącą się zejściem śmiertelnym. Literatura zna tylko kilka przypadków przeżycia ludzi, u których wystąpiła wścieklizna w formie klinicznej. Jednym z nich to przypadek 6-letniego chłopca w USA, który w 1970 roku został pogryziony przez nietoperza. U chłopca zastosowano profilaktykę poekspozycyjną (wg. WHO – PEP) oraz terapię fenytoinową dla złagodzenia napadów padaczkowych. Po 25 dniach od wystąpienia objawów chorobowych stan zdrowia pacjenta poprawił się i nie obserwowano utrzymywania się objawów neurologicznych w okresie kilkumiesięcznej obserwacji. Jednakże przypadki „wyleczenia” wścieklizny w stosunku do liczby zmarłych stanowią znikomy odsetek. Opracowany został eksperymentalny protokół postępowania terapeutycznego nazwany „protokołem Milwaukee”. Przewiduje on zastosowanie leków przeciwwirusowych oraz wprowadzenie chorego w śpiączkę farmakologiczną. Postępowanie to zastosowano u 15-letniej dziewczyn-

ki pokąsanej przez nietoperza, u której, miesiąc po pokąsaniu wystąpiły objawy wścieklizny. Po 31 dniach leczenia dziewczynka poddana została rehabilitacji, a po 76 dniach wróciła do domu. Jednakowoż w kolejnych przypadkach leczenia wg „protokołu Milwaukee” nie dało pozytywnych rezultatów. Zasada „protokołu Milwaukee” zakłada utrzymanie pacjenta przy życiu jak najdłużej aby uzyskać czas na wytworzenie odporności specyficznej przez co sam organizm doprowadzi do clearans wirusa z układu nerwowego. Patogeneza zakażenia wirusem wścieklizny jest złożona, nie do końca poznana i prawdopodobnie pobudzane przez wirus nadmierne reakcje obronne organizmu (reakcje odporności wrodzonej - innate immunity) mogą zaostrzać procesy patologiczne w ośrodkowym układzie nerwowym doprowadzając do zgonu. Główną przyczyną śmierci wydają się być zaburzenia funkcji neuronów, które są wynikiem replikacji wirusa wścieklizny i nadmiernych reakcji obronnych organizmu. Wczesna odpowiedź immunologiczna (niespecyficzna) organizmu na zakażenie wirusem wścieklizny, której efektem jest stan zapalny OUN, apoptoza komórek nerwowych nie zawsze jest korzystna dla gospodarza i może pogłębiać procesy patologiczne współuczestnicząc w degeneracji komórek nerwowych co prowadzi bezpośrednio do zejścia śmiertelnego. Podjęliśmy zatem badania nad przebiegiem zakażenia wirusem wścieklizny u zwierząt, którym podawaliśmy inhibitory wybranych szlaków odporności nieswoistej: czynnika martwicy nowotworu (tumor necrosis factor – TNF α), interleukiny 6 (IL-6), kinaz aktywowanych i mitogenami (MAPK), kaspazy 1. W celu ograniczenia replikacji wirusa wścieklizny zastosowaliśmy interferon α i β oraz preparaty przeciw wirusowe: faviopiravir (T705), ribawirynę łącznie z immunoglobulinami ludzkimi przeciwko wirusowi wścieklizny (HRIG). Dodatkowo, aby wymienione wyżej preparaty mogły przeniknąć do ośrodkowego układu nerwowego, zastosowano mannitol, który pełnił rolę czynnika otwierającego barierę krew – mózgowie.

Hipoteza robocza zakładała zbadanie na ile kontrola wybranych elementów odporności niespecyficznej łącznie z podaniem preparatów ograniczających replikację wirusa wścieklizny wpłynie na przebieg zakażenia. Gdyby, poprzez ograniczenie reakcji odporności wrodzonej i kontrolę replikacji wirusa, udało się wydłużyć przebieg zakażenia wirusem wścieklizny organizm zwierzęcia/człowieka uzyskałby dodatkowy czas na wytworzenie odporności swoistej i clearans wirusa z ośrodkowego układu nerwowego, a tym samym możliwy byłby powrót do zdrowia. Koncepcja ta skierowana jest do pacjentów, u których wystąpiły kliniczne objawy zakażenia wirusem wścieklizny i u których było już za późno na zasto-

sowanie procedury WHO PEP. PEP jest skuteczne jeśli jest zastosowane w odpowiednim czasie po ekspozycji na zakażenie. Jest to swego rodzaju wyścig z czasem. PEP ma na celu jak najszybsze wytworzenie odporności swoistej, która powinna zapobiec (zablokować) przedostaniu się wirusa wścieklizny z miejsca wnikięcia do ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Z chwilą gdy wirus dotrze do OUN i wystąpią kliniczne objawy wścieklizny w zasadzie takie przypadki kończą się w 100% zgonem. Zatem chciałbym przedstawić wyniki badań jakie zrealizowaliśmy w zespole Zakładu Wirusologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach finansowanych w ramach FP7 – grant EU Asklepios. Grant EU FP7 Asklepios realizowany był przez konsorcjum brytyjsko – holendersko – czesko – węgiersko – polskie. Wyniki badań zostały ogłoszone w renomowanym periodyku Vaccine w 2018 roku jako trzy publikacje (vaccine.2018.05.065; vaccine.2018.04.003; vaccine.2018.04.002) przedstawiające wyniki badań zespołu holendersko – polskiego.

Pojawia się pytanie: dlaczego wybrano inhibitory TNF- α , IL-6, MAPKs, kaspazy 1? Analiza literatury wskazywała na nadekspresję genów kodujących czynniki odporności wrodzonej (nieswoistej) w komórkach zakażonych atenuowanym wirusem wścieklizny i to głównie tych związanych ze szlakami sygnalizacyjnymi dla cytokin, chemokin w tym IL-6 ale także IFN α/β . Są to czynniki prozapalne, których nagromadzenie prowadzi do nacieku komórek T oraz komórek jednojądrzastych w OUN, a to skutkuje ciężkim zapaleniem mózgowia. Jako inhibitor szlaku TNF- α wybrano preparat leczniczy Remicade zawierający infliksimab – chimeryczne monoklonalne przeciwciało ludzko-mysie. Infliksimab tworzy stabilne kompleksy z białkiem TNF- α blokując jego aktywność biologiczną. Jako inhibitor szlaku IL-6 zastosowano preparat RoActemra, którego substancją czynną jest tocilizumab – przeciwciało monoklonalne wiążące się z receptorami komórkowymi dla IL-6. Blokada receptorów komórkowych dla IL-6 eliminuje wpływ tej chemokiny na komórki. Jako inhibitor szlaków MAP kinaz zastosowano preparat Nexavar, który, jako substancję czynną zawiera tozylan sorafenibu. Sorafenib jest inhibitorem licznych kinaz aktywowanych mitogenami, które to kinazy aktywują szereg procesów komórkowych. Jako inhibitory replikacji wirusa wścieklizny wykorzystano preparaty lecznicze ribawirynę, favipiravir, IFN- α i HRIG.

Badania wykonano na myszach szczepu C57BL/6 w wieku 7 tygodni zakupionych w certyfikowanej hodowli Harlan Laboratories. Myszy zakażano wirusem wścieklizny szczep SHBRV-18, który został udostępnio-

ny przez dra B. Dietzhold, Jefferson University, USA. Szczep tego wirusa Zakład Wirusologii PIW-et-PIB otrzymał z Erasmus Medical Center (EMC) w Rotterdamie. Po wystąpieniu pierwszych klinicznych objawów wścieklizny przystąpiono do podawania wymienionych preparatów w różnych kombinacjach. Wyniki w poszczególnych grupach zwierząt doświadczalnych oceniano w odniesieniu do grupy kontrolnej tj. grupy myszy zakażonych wirusem wścieklizny. W grupie kontrolnej nie stosowano żadnych preparatów leczniczych. Uzyskane wyniki poddawano analizie statystycznej za pomocą Graph Pad Prism 6 i Środowisko R oraz testów Shapiro-Wilka, Log-rank (Mantela-Coxa), U-Manna Whitneya oraz testu t-Studenta. Dla określenia zależności pomiędzy zmiennymi nie spełniającymi warunku rozkładu normalnego zastosowano nieparametryczny test Spearmana.

Test log-rank potwierdził istnienie statystycznie istotne wydłużenie okresu przeżycia myszy zakażonych wirusem wścieklizny, którym podawano inhibitor TNF- α ($p=0,0087$) oraz myszy, którym podawano inhibitor MAP kinaz ($p=0,0024$). Inhibitor TNF- α wydłużał okres przeżycia średnio do 8,5 dni w stosunku do myszy grupy kontrolnej, a inhibitor MAP kinaz do 7,75 dni. Inhibitor IL-6 także wydłużył okres przeżycia jednakże różnica ta nie była statystycznie istotna w porównaniu do grupy kontrolnej. Ta statystycznie istotna różnica w przeżywalności myszy zakażonych wirusem wścieklizny i leczonych preparatami Remicade i Nexavar wskazuje na nowe możliwości terapeutyczne klinicznej postaci wścieklizny. Ciekawą obserwacją jest ta, że myszy leczone Remicade wykazywały statystycznie istotnie wyższe miano wirusa wścieklizny w OUN w porównaniu z grupą kontrolną, a mimo to żyły dłużej niż myszy grupy kontrolnej. Obserwacja ta może potwierdzać założoną na początku doświadczenia tezę, że odczyny odporności nieswoistej jakie wyzwała w zakażonych tkankach wirus wścieklizny w istotny sposób przyczyniają się do szybszego zejścia śmiertelnego.

W kolejnym eksperymencie postanowiono zbadać wpływ na przeżywalność myszy zakażonych wirusem wścieklizny, gdy zastosowano kombinację inhibitorów TNF- α , MAP kinaz i kaspazy 1 łącznie z IFN- α i β , fawipiravirem, ribawiryną i HRIG. Również te kombinacje preparatów spowodowały statystycznie istotne wydłużenie okresu przeżycia myszy leczonych w stosunku do okresu przeżycia myszy zakażonych, którym nie podawano żadnych preparatów ($p=0,0156$; $p=0,0093$). Ale w tym eksperymencie zarejestrowano statystycznie znamienne niższe miano wirusa wścieklizny w OUN w grupie myszy, którym podawano preparaty lecz-

nicze w stosunku do myszy pozostawionych bez leczenia. Był to prawdopodobnie efekt zastosowania preparatów antywirusowych (favipiravir, ribaviryna i HRIG).

Przedstawione wyniki badań należy traktować jako wstępne. Wskazują one na możliwość uzupełnienia terapii wścieklizny o inhibitory czynników odporności nieswoistej, ale potrzeba dalszych eksperymentów dla określenia optymalnej dawki tych inhibitorów.

Przeprowadzone eksperymenty, uzyskane wyniki oraz dyskusje przedstawiono szczegółowo w publikacjach zamieszczonych w periodyku *Vaccine*. Autorzy zachęcają do zapoznania się z tymi publikacjami. Tam też jest przedstawiona szczegółowa metodyka badań oraz graficzna prezentacja wyników. Powyższa kompilacja stanowi duży skrót i nie jest możliwe zaprezentowanie tabel, schematów i wykresów zamieszczonych w wymienionych publikacjach. Zawiera także dość obszerny wstęp, który wprowadza w zagadnienia patogenezy i zwalczania wścieklizny.

Rabies still remains one of the most serious diseases of mankind with serious impact on public health worldwide. The vaccination of dogs and oral immunization of wildlife have resulted in eradication of rabies in non-flying animals in many countries. However, illegal movement of pet animals creates a serious risk of reintroduction of rabies virus into the rabies free areas. The prevalence of rabies in humans in Europe is low at present, while half of the world human population lives in an endemic zones. A number of international organisations works on the global framework for elimination of dog-mediated human rabies. Many efforts have been undertaken to cure symptomatic rabies in humans. The paper describes shortly the proof of controlling of innate immunity on the course of the disease which experiments were published in *Vaccine* in 2018.

**Jan F. Żmudziński, Marcin Smreczak,
Anna Orłowska, Paweł Trębas,
Anna Marzec-Grządziel**

Zespół Zakładu Wirusologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - PIB w Puławach.