

## Kliešťová encefalitída- veľký problém v malom balení

Kliešť, živočích pomerne malých rozmerov a svojou stavbou a pomalým pohybom pripomínajúci larválne štádium Votrelca z filmu Alien. Toto zvieratko aj napriek svojej malebnosti dokáže človeku nahnať poriadny strach. Nie je to ale ním samotným. Je to skôr tým, čo sa schováva v jeho útrobach. Vírus kliešťovej encefalitídy je mnohými vedcami považované za jedno z najhorších infekčných ochorení, ktoré ľudstvo pozná a v posledných rokoch sa hlavne kvôli svojej epidemiologickej situácii a sezónnym opakovaniam stáva predmetom výskumov ale aj pozornosti médií a ľudí na Eurázijskom kontinente.

Prvé zmienky o ochorení sa datujú do roku 1931, kedy rakúsky lekár H. Schneider pozoroval sezónny výskyt choroby, ktorú nazval: „Epidemische akute Meningitis serosa“(Schneider, 1931). Pôvodcu ochorenia a teda vírus objavili neskôr v roku 1937 ruskí vedci v ľudských vzorkách, myšiach a kliešťoch *Ixodes persulcatus*. Hlavným dôvodom výskumu, ktorý viedol k objavu bolo skúmanie vtedy novej choroby nazvanej „jarno- letná encefalitída“. V Európe vírus izolovali poprvýkrát v roku 1948 dr. František Gallia, dr. Krejčí a dr. Rampas. Potvrdili taktiež domnienku, že prenášači tohto ochorenia sú kliešte a to izoláciou vírusu z rôznych vývojových štádií. Vírus bol pomenovaný ako „Vírus československej kliešťovej encefalitídy“. Krátko na to sa infekčný agens(pôvodca ochorenia) podarilo izolovať aj v ostatných krajinách s výskytom KE.

Vírus kliešťovej encefalitídy je najvýznamnejším zástupcom v rámci rodu *Flavivirus* z čeľade *Flaviridae*, ktorá je pomenovaná podľa svojho prototypového zástupcu, vírusu žltej zimnice(z lat. *flavus*- žltý). Vírus KE je taxonomicky členený na tri subtypy, ktoré odpovedajú trom genotypom: európsky, d'alekovýchodný a sibírsky (Ecker a kol., 1999)

U nás vyskytujúci sa genotyp a teda európsky subtyp kliešťovej encefalitídy má dvojfázový priebeh. Nákaza môže prebehnúť priamym kontaktom s nakazeným kliešťom počas sania krvi, kde vírus, nachádzajúci sa v slinných žľazách vstupuje do krvi človeka. Alternatívne sa človek môže nakaziť konzumáciou nepasterizovaného mlieka z infikovaného dobytká. Od nákazy nastupuje inkubačná doba, ktorá trvá približne 7-14 dní, v krajných prípadoch 3-30 dní. Prvá, viremická fáza má chrípkový charakter. Medzi symptómy patria najmä horúčky nad 38°, bolesti hlavy a svalov, slabosť a zvracanie. Pričom u niektorých pacientov prvá fáza nepribieha. Po nej nasleduje asymptomatické obdobie trvajúce 1-20 dní. Druhá fáza, neurologická, postihuje CNS, konkrétne encefalickú bariéru, ktorá podhlieha zápalu.

Symptomatické prejavy druhej fázy sú silné bolesti hlavy, vysoká horúčka, zvracanie, vertigo(závraty), hypertonus krku, poruchy vedomia a reči, ataxia(dezorganizované pohyby, strnulosť) a paréza(obrna). Mortalita európskeho subtypu je nízka asi okolo 1%. Problémom kliešťovej encefalitídy sú ale jej trvalé následky. U asi štvrtiny pacientov sa objaví takzvaný post-encefalitický syndróm, ktorý sa najčastejšie prejavuje pretrvávajúcimi bolesťami hlavy, kognitívnou dysfunkciou, poruchami spánku, tremorom, závratmi a v zriedkavých prípadoch aj zmenami správania, poruchami vedomia, trvalými parézami a paralýzou. Liečba je v súčasnosti len symptomatická a dôležitý je najmä kľudový režim. Teda hlavným spôsobom ako sa voči ochoreniu účinne chrániť je očkovanie, ktoré dostupné na požiadanie u každého všeobecného lekára.

V roku 2017 vedci z Parazitologického ústavu Českej AV vykonali sériu experimentov, v ktorých skúmali vplyv vírusu na integritu hematoencefalickej bariéry. Jedným z experimentov bola in vitro kultúra endoteliálnych buniek, ktoré za fyziologických okolností tvoria hematoencefalickú bariéru a mozgových gliálnych buniek. Princíp spočíval na systéme transwell, ktorý spočíva na systéme dvoch nádob, z ktorých je jedna menšia s priepustným dnom a je zavesená na okrajoch druhej- väčšej nádoby..V menšej miske bola vypestovaná kultúra endoteliálnych buniek s krvou a vo väčšej kultúra gliálnych buniek. Potom bol do endoteliálnej kultúry naočkovaný vírus KE a sledoval sa čas a spôsob jeho prenosu cez hematoencefalickú bariéru. Prvých 6 hodín bol vírus prítomný iba vo vrchnej komore, ale po 24 hodinách bol aj v spodnej komore avšak spoločne s ním boli prítomné aj infikované endoteliálne bunky, ktoré preniesli tento vírus aj do druhej kultúry. Ďalší experiment s týmito kultúrami overoval transendoteliálny elektrický odpor, ktorý mal potvrdiť či sa porušuje integrita hematoencefalickej bariéry. Hodnota sa od kontrolnej(neinfikovanej) vzorky nelíšila a zostávalo tvrdiť, že bariéra ostala neporušená. Táto hypotéza sa potvrdila aj nasledujúcim experimentom, v ktorom sa do vrchnej časti aplikovali fluorescentné farbivo, ktoré migrovalo do spodnej časti rovnako v infikovaných ako aj v neinfikovaných kultúrach. Tieto experimenty ukázali, že bunky hematoencefalickej bariéry sú citlivé na infekciu vírusom KE a prenášajú ho do mozgovej komory ale vírus samostatný nemá vplyv na integritu hematoencefalickej bariéry.

Ďalšie pokusy z roku 2015 sa zameriavali na vplyv infekčného agensu na jednotlivé bunky mozgu- neuróny, gliálne bunky a astrocyty. Vo vzorke neurónov sa objavil zvýšený titer vírusu(počet aktívnych vírusových jednotiek v odobranej vzorke) a na elektrónovej tomografii sa ukázalo, že infekcia má veľký vplyv na morfológickú štruktúru neurónu(reorganizácia

štruktúry endoplazmatického retikula). Na 10 deň od nákazy pokusnej vzorky sa na snímkoch elektrónového mikroskopu objavili akumulované virálne antigény v koncentrických/prstencovitých útvaroch pripojené na jadro bunky. Taktiež sa na snímke objavili častice vírusu a zvláštne tubulárne útvary, ktoré neboli pozorované na kontrolnej vzorke. Dá sa teda predpokladať, že tieto štruktúry majú virálny pôvod a jednou z hypotéz je, že by to mohla byť štruktúra tvorená proteínom obalu vírusu. V astrocytoch boli pozorované známky autofágie v tomto prípade makroautofágie. Je to proces, ktorý pomáha bunke udržiavať stálosť vnútorného prostredia a má istú imunitnú funkciu. Princíp makrofágie spočíva v tvorbe špeciálnok bunecnej organely zvanej fagofóra, ktoré sa obkolesia okolo cudzorodej/odpadovej látky alebo nefunkčnej organely za vzniku autofagozómu. Ten fúzuje s lyzozómom a vzniká autofagolyzozóm, ktorý potom rozkladá všetko, čo je v jeho vnútri a premieňa to na látky potrebné pre bunku. Rovnakým spôsobom sa z bunky odstraňujú aj vírusy, čož by v tomto prípade nebol problém, avšak pri pokuse sa zistilo, že vírus KE využíva tento mechanizmus, aby bunku udržal nažive dlhšie a mohla vyprodukovať viacej viriónov. Pre overenie podávali vedci jednej vzorke buniek induktor autofágie- rapamycín a druhej vzorke inhibítor autofágie- spautín. Výsledok to potvrdil a vo vzorke s rapamycínom sa vytvorilo viacej viriónov ako vo vzorke druhej.

Ďalší výskum sa zameriaval na látky, ktoré by mohli byť použiteľné ako potenciálne antivirotikum. Po skúmaní stavby vírusu sa vybrali látky, ktoré priamo interagujú s mechanizmom replikácie v hostiteľskej bunke. Následne sa tieto látky testovali in vitro a u troch z nich bol pozorovaný vysoký supresívny efekt. U vybraných zlúčenín sa ďalej testovala cytotoxicita, pričom sa u jednej z nich potvrdila priamoúmerne s rastúcou dávkou. Najúčinnjšia z nich však bola 7-deaza-2'-CMA, ktorá bola testovaná in vivo na myšiach. U myší sa preukázali značne znížené klinické prejavy infekcie, znížila sa mortalita a aj titer vírusu. Popri tomto výskume sa podarilo vytvoriť aj mutanta odolného voči danej látke. Mutant sa od divokého typu odlišoval len zmenou jedného nukleotidu. Bol však fenotypovo nestabilný a po odstránení antivirotika z kultúry sa sekvencia víru obnovila.

Výskum v tejto oblasti ďalej napreduje a ja veľmi verím, že sa v blízkej dobe objaví aj liek na chorobu, ktorá môže zmeniť prechádzku po lese na niečo, čo sa s Vami bude v nepríjemnom slova zmysle niesť celý život. Lenže liek je zatiaľ v nedohľadne a nemáme ani len tušenie, kedy toto ochorenie bude len banalitou. Jedinou možnosťou, ktorá nám ostáva je prevencia a teda vymyslieť napríklad niečo, čo by ju uľahčilo diagnostikovať pri ľuďoch, ktorí neboli preventívne očkovaní a aj napriek jej dlhej inkubačnej dobe a včasne liečiť tým, čo je

dostupné. Toto je zatiaľ oblasťou, ktorej by sa mal paralelne výskum venovať. Ako raz Desiderius Erasmus povedal „*Prevenia je lepšia ako liek*“ a teda, keď konáš preventívne... niet, čo liečiť...

### **Bibliografia**

Růžek D. et al. Klíšťová encefalitída. 1.vyd. Praha : Grada Publishing, a.s. 2015. 200 s. ISBN 978-80-247-5305-8.

Ecker M. et al. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia: J Gen Virol 1999

Bílý, T. et al. Electron tomography analysis of tick-borne encephalitis virus infection in human neurons. Sci. Rep. 5, 10745; doi: 10.1038/srep10745 (2015).

Palus M, Vancova M, Sirmarova J, Elsterova J, Perner J, Ruzek D. Tick-borne encephalitis virus infects human brain microvascular endothelial cells without compromising blood-brain barrier integrity. Virology. 2017;507:110-122. doi:10.1016/j.virol.2017.04.012

Eyer L, Valdés JJ, Gil VA, et al. Nucleoside inhibitors of tick-borne encephalitis virus. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(9):5483-5493. doi:10.1128/AAC.00807-15