

STRESZCZENIE

Wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV) jest patogenem ssaków kopytnych, w tym zwierząt hodowlanych. Do tej pory udokumentowano niewiele przypadków zakażeń wśród ludzi, które zwykle cechowały się łagodnymi, grypopodobnymi objawami. VSV wykazuje jednak neurotropizm u doświadczalnie zakażanych zwierząt laboratoryjnych. Rosnące zainteresowanie wykorzystaniem VSV jako wirusa szczepionkowego oraz w terapii chorób nowotworowych wymagają dokładnego określenia bezpieczeństwa stosowania tego wirusa u ludzi. Ze względu na to oraz na wcześniejsze dokonania Laboratorium Wirusologii w określaniu poziomu nieswoistej odpowiedzi przeciwwirusowej, zdecydowano się zidentyfikować populacje leukocytów odpowiedzialne za produkcję VSV w przypadku zakażenia oraz określić efekty replikacji wirusa w tych komórkach w modelu *in vitro*.

Celem pracy była identyfikacja populacji ludzkich leukocytów krwi obwodowej wrażliwych na zakażenie VSV, a następnie charakterystyka efektów wywołanych tym zakażeniem w modelu *in vitro*: wpływu na ekspresję genów stymulowanych interferonem, zmiany odsetka głównych populacji leukocytów, wpływu na ekspresję markerów powierzchniowych oraz na wytwarzanie cytokin i chemokin. Wyniki badań różnych zespołów, w tym Laboratorium Wirusologii, potwierdzają możliwość namnażania się VSV w ludzkich leukocytach, jednak nie skupiają się na wyjaśnieniu szczegółów tego procesu, który z każdym rokiem nabiera coraz większego znaczenia.

W pierwszym etapie badań zoptymalizowano metodę fluorescencyjnej identyfikacji komórek zakażonych VSV za pomocą cytometrii przepływowej z wykorzystaniem przeciwciał specyficznie rozpoznających wiriony w trakcie replikacji. Na podstawie krzywej zależności odsetka zakażonych komórek od czasu oraz wyników badań opublikowanych przez Laboratorium Wirusologii ustalono optymalny czas inkubacji zakażonych komórek na 18 godzin. Przetestowano również użyteczność wirusa inaktywowanego promieniowaniem UV jako kontroli negatywnej zakażenia. Następnie potwierdzono zróżnicowaną podatność ludzkich leukocytów na zakażenie VSV, co pozwoliło na wydzielenie wśród analizowanych prób dwóch grup - pochodzących od osób słabo i silnie podatnych na zakażenie. W nadsączach znad

badanych komórek, z podziałem na wspomniane grupy, określono poziom wytwarzanych cytokin - TNF- α , IFN- γ i IL-10. Zauważono, że komórki osób słabo i silnie podatnych na zakażenie VSV różnią się między sobą ilością spontanicznie wytwarzanego TNF- α . Przeanalizowano też poziom ekspresji genów stymulowanych interferonem oraz genów kodujących cytoplazmatyczne receptory - RIG-I i MDA-5 - biorące udział w rozpoznaniu wirusa przez komórkę. Ekspresja wszystkich spośród badanych genów zwiększyła się w wyniku zakażenia VSV, lecz największy efekt zaobserwowano w przypadku genu kodującego białko MxA.

W kolejnym etapie badań zidentyfikowano populacje leukocytów wrażliwych na zakażenie VSV, którymi okazały się monocyty i komórki dendrytyczne. Zauważono również, że replikacja wirusa w monocytach powoduje zmniejszenie odsetka komórek CD14-pozytywnych. W celu wykluczenia wpływu czynników wydzielanych przez komórki na obserwowany efekt, leukocyty stymulowano nadsączami z nadzakazanych komórek. Zarówno ten rodzaj stymulacji, jak i inkubacja leukocytów z ligandami dla TLR3 i TLR4 oraz zakażenie wirusem inaktywowanym (VSV-UV-I), nie powodowały tak znaczących zmian w odsetku komórek CD14⁺, co sugeruje, że aktywna replikacja VSV w komórkach zakażonych jest wymagana do osiągnięcia tego efektu.

Przeanalizowano możliwe przyczyny tak znacznej redukcji odsetka komórek CD14⁺ takie jak: różnicowanie się monocytów do komórek dendrytycznych oraz apoptozę komórek CD14⁺. Wykazano, że zakażenie leukocytów VSV prowadzi do wyraźnego różnicowania się monocytów do komórek dendrytycznych CD11c⁺CD123⁻, o fenotypie komórek niedojrzałych ze względu na ekspresję markerów CD40, CD83 i CD86. Z kolei analiza apoptozy w badanych próbach ujawniła istotny wzrost liczby komórek apoptotycznych wśród komórek CD14⁺ po zakażeniu VSV. Za pomocą testu luminometrycznego dowiedziono, że wykryta apoptoza przebiega z udziałem kaspaz 3/7. Wynika z tego, że spadek ekspresji markera CD14 na monocytach spowodowany replikacją VSV był efektem nałożenia się dwóch procesów - różnicowania się monocytów do komórek dendrytycznych oraz ich apoptozą, przy czym uzyskane rezultaty sugerują, że większą rolę odgrywa pierwszy z nich.

W przedstawionej pracy podjęto także próbę scharakteryzowania środowiska cytokinowego zakażonych leukocytów wraz z podziałem prób na pochodzące od osób podatnych i słabo podatnych na zakażenie VSV. Dowiedziono, że replikacja wirusa powodowała przede wszystkim zwiększone wytwarzanie IL-2R oraz IFN- α , a także

obniżenie wytwarzania chemokiny RANTES. Komórki pochodzące od osób słabo podatnych na zakażenie w wyniku tego zakażenia wytwarzały mniej IL-10, IL-12, IL-15 i IL-1 β w porównaniu do komórek niezakażanych; natomiast pochodzące od osób podatnych na zakażenie wytwarzały więcej IL-2R. Wymienione grupy różniły się między sobą pod względem spontanicznej produkcji cytokin w przypadku: eotaksyny, IL-2, IFN- γ , IL-15 i IL-1 β . Uzyskane w przedstawionej pracy doktorskiej rezultaty przedyskutowano w świetle dostępnych doniesień literaturowych oraz wpływu na bezpieczeństwo terapii onkolitycznych z wykorzystaniem VSV.