

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania
w Języku Angielskim



Lekarz Marta Dobrzyńska

Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Zmiany parametrów metabolicznych
w osoczu krwi pacjentów
z kleszczowym zapaleniem mózgu oraz z koinfekcjami bakteryjnymi

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotorzy:

Prof. dr hab. n. farm. Elżbieta Skrzydlewska
Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Prof. dr hab. n. med. Anna Moniuszko-Malinowska
Klinika Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Białystok, 2023

Praca doktorska została przygotowana w oparciu o wyniki będące elementem badań finansowanych z grantu Narodowego Centrum Nauki "Wykorzystanie badań multiomicznych do oceny konsekwencji metabolicznych chorób przenoszonych przez kleszcze" (NCN, SONATA BIS, 2017/26/E/NZ6/00277); kierownik grantu: prof. dr hab. Anna Moniuszko-Malinowska.

Składam serdeczne podziękowania
Pani Profesor dr hab. n. farm. Elżbiecie Skrzydlewskiej
oraz Pani Profesor dr hab. n. med. Annie Moniuszko-Malinowskiej
za zainteresowanie mnie tym tematem, cenne uwagi,
naukowe kierownictwo oraz za okazaną życzliwość
i pomoc w rozwiązywaniu problemów

Autorka

SPIS TREŚCI

I. Wstęp	7
1. Wirusy infekujące ośrodkowy układ nerwowy	8
2. Zmiany metaboliczne w OUN jako odpowiedź na infekcję wirusową	11
3. Flawiwirusy a ośrodkowy układ nerwowy	15
3.1. Wirus Zachodniego Nilu	17
3.2. Wirus dengi	19
3.3. Wirus Zika	22
3.4. Wirus japońskiego zapalenia mózgu	24
3.5. Wirus kleszczowego zapalenia mózgu	26
II. Założenia i cel pracy	29
III. Materiały i metody	31
IV. Wyniki	40
V. Dyskusja	53
VI. Wnioski	65
VII. Streszczenie w języku polskim	66
VIII. Streszczenie w języku angielskim	68
IX. Piśmiennictwo	70
X. Zgoda Komisji Bioetycznej	93
XI. Życiorys i doświadczenie naukowe doktoranta	95

Wykaz stosowanych skrótów

2-AG - 2-arachidonoiloglicerol
4-HNE - 4-hydroksynonenal
4-OI - 4-oktylitakonian
13-HODE - kwas 13-hydroksyoktadekadienowy
15-HETE - kwas 15-hydroksyeikozatetraenowy
15-PGJ2 - 15-prostaglandyna J2
25HC - oksysterol-25-hydroksycholesterol
AA - kwas arachidonowy
ADE - wzmocnienie zależne od przeciwciał
AEA - anandamid
AIDS - zespół nabytego niedoboru odporności
ALT - aminotransferaza alaninowa
ANOVA - analiza wariancji
ARE - element odpowiedzi antyoksydacyjnej
AST - aminotransferaza asparaginowa
BHT - butylohydroksytoluen
BMVECs - komórki śródbłonna mikronaczyniowego mózgu
CAT - katalaza
CB1 - receptor kannabinoidowy typu 1
CB2 - receptor kannabinoidowy typu 2
CBO - grupy karbonylowe białek
CCL - ligand chemokiny (motyw C-C)
CDC - Centrum Kontroli i Prewencji Chorób
CH25H - enzym cholesterol-25-hydroksylazę
CMV - Cytomegalowirus
COX - 1,2 - cyklooksygenaza-1,2
CRP - białko C-reaktywne
CXCL- ligand chemokina motywu C-X-C
DCs - komórki dendrytyczne
DENV - wirus dengi
DMF - fumaran dimetylu
DNA - kwas deoksyrybonukleinowy
ECs - komórki śródbłonna
ECS - układ endokannabinoidowy
EBV - wirus Ebstei- Barr
EDTA - kwas etylenodiaminotetraoctowy
EPA - kwas eikozapentaenowy
ER - retikulum endoplazmatyczne
FAMES - estry metylowe kwasów tłuszczowych
GPX - peroksydaza glutationowa
GSH - glutation
GSSGR - reduktaza glutationowa
HAV - wirus zapalenia wątroby typu A

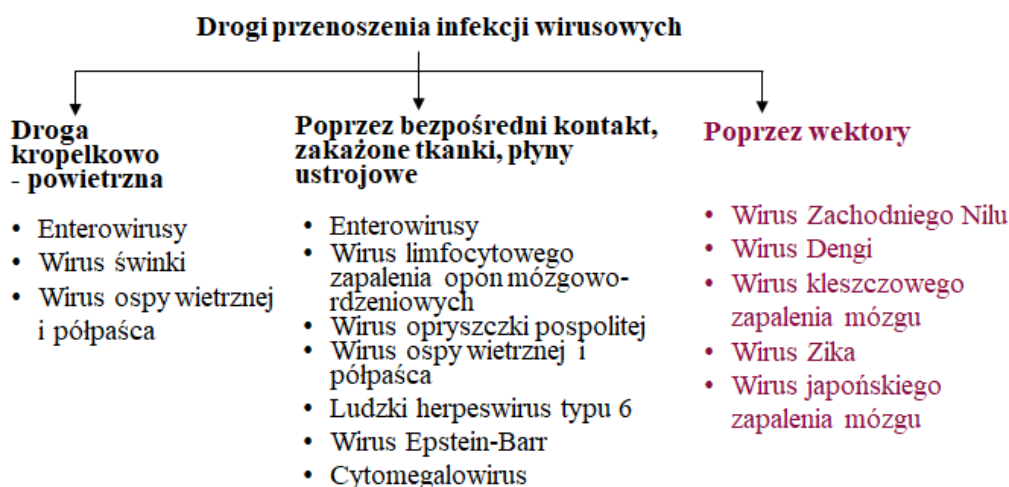
HBMEC - ludzkie komórki śródbłonna mikronaczyniowego mózgu
HCV - wirus zapalenia wątroby typu C
HGA - human granulocytic anaplasmosis, ludzka anaplazmoza granulocytarna
HHV-6 - ludzki wirus herpes typu 6
HIV - ludzki wirus niedoboru odporności
HO-1 - oksydaza hemowa 1
HSV - wirus opryszczki pospolitej
LDH - dehydrogenaza mleczanowa
IKK - inhibitor kinazy κ B
IL - interleukina
IFN- γ - Interferon-gamma
iNOS - syntaza tlenku azotu
IPS-1 - stymulator promotora interferonu beta 1
IRF - czynnik transkrypcyjny interferonu
IRG1 - gen odpowiedzi immunologicznej cis-akonitran 1
ISG - gen stymulowany interferonem
JNK - kinaza c-Jun
JEV - wirus japońskiego zapalenia mózgu
KZM - kleszczowe zapalenie mózgu
LA - kwas linolowy
LAMs - niska ekspresja cząsteczek adhezyjnych leukocytów
LANA - acetylacja lizyny antygeny jądrowego
LCMV - wirus limfocytarnego zapalenia mózgu
LD - Lyme disease, borelioza z Lyme
LOX 5 - lipooksygenaza 5
LTB4 - leukotrien B4
MAPKs - kinazy aktywowane mitogenami
MAV-1 - myszy adenowirus 1
MCP-1 - białko chemoatraktantu monocytów 1
MDA - dialdehyde malonowy
MDA5 - gen związany z różnicowaniem czerniaka 5
MeV - wirus odry
MMF - fumaran monometylu
MTP – mitochondrialne białko trójfunkcyjne
MuV- wirus świnki
NF- κ B - czynnik jądrowy kappa B
NMJ - połączenie nerwowo-mięśniowe
NO - tlenek azotu
NPCs - neuronalne komórki progenitorowe
NPs - neuroprostany
Nrf2 - czynnik transkrypcyjny pochodzenia erytroidalnego typu 2
NS - białko niestrukturalne
PGE2 - prostaglandyny E2
PNS - obwodowy układ nerwowy
PPAR - receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów
PUFAs - wielonienasycone kwasy tłuszczowe
OEA - oleoiloetanoloamid

ORF - otwarta ramka odczytu
OUN - ośrodkowy układ nerwowy
PAMPs - wzorce molekularne związane z patogenami
PEA - palmitoiloetanolamina
PLA 2 - fosfolipaza A2
PRRs - receptory rozpoznawania wzorców
RABV – wirus wścieklizny
RFA - reaktywne formy azotu
RFT - reaktywne formy tlenu
RIG-I - gen indukowany kwasem retinowym I (RIG-I)
RIPK - kinaza białkowa oddziałująca z receptorem
RNA - kwas rybonukleinowy
SDH - dehydrogenaza bursztynianowa
sMaf - białka Maf
SOD - dysmutaza ponadtlenkowa
STAT-1 - transduktor sygnału i aktywator transkrypcji 1
TCA - kwas trójkarboksylowy
TJs - ścisłe połączenia międzykomórkowe
TLRs - receptory Toll-podobne
TNF- α - czynnik martwicy nowotworów alfa
TRPV1 - receptor waniloidowy przejściowego potencjału 1
Trx – tioredoksyna
TrxR - reduktaza tioredoksyny
UPLC-MS/MS - ultrawysokosprawna chromatografia cieczowa-MS/MS
VZV - Varicella Zoster virus, wirus ospy wietrznej i półpaśca
WHO - Światowa Organizacja Zdrowia
WNV - West Nile virus, wirus Zachodniego Nilu
ZBP1 - białko wiążące Z-DNA 1
ZIKV - wirus Zika

I. Wstęp

XXI wiek charakteryzuje się nasilonymi zmianami klimatycznymi oraz destrukcyjną działalnością człowieka, która zakłóca całość ekosystemu, powodując rozprzestrzenianie się mikroorganizmów odzwierzęcych (w tym również wpływających na populację ludzką) w środowisku. Ponadto rosnące zapotrzebowanie na żywność pochodzenia zwierzęcego doprowadziło do wzrostu ilości hodowanych zwierząt gospodarskich, stwarzając większe możliwości krzyżowania się patogenów. Dlatego też każdego roku choroby odzwierzęce są obecnie przyczyną ponad 1 miliarda infekcji u ludzi, w tym ponad 1 miliona zgonów [Rahman i wsp. 2020]. Sytuacja ta prowadzi do powstawania nowych jak i nawrotów pozornie zapomnianych chorób. Dotyczy to szczególnie chorób zakaźnych. Powyższe przyczyny sprzyjają rozprzestrzenianiu się chorób zakaźnych w nowych regionach świata (np. malaria, gorączka Chikungunya) i ponownemu pojawianiu się, np. gruźlicy [El-Sayed i Kamel 2020]. Istotnym jest, że wiele patogenów niebezpiecznych dla człowieka przenoszonych jest przez zwierzęta. Skrajnym przykładem jest malaria – już teraz stanowiąca ogromne zagrożenie jako najbardziej rozpowszechniona choroba zakaźna na świecie, z prawie 247 milionami przypadków rocznie – na rozprzestrzenianie się której wpływa ocieplający się klimat, sprzyjający ekspansji komarów przenoszących malarię [<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>].

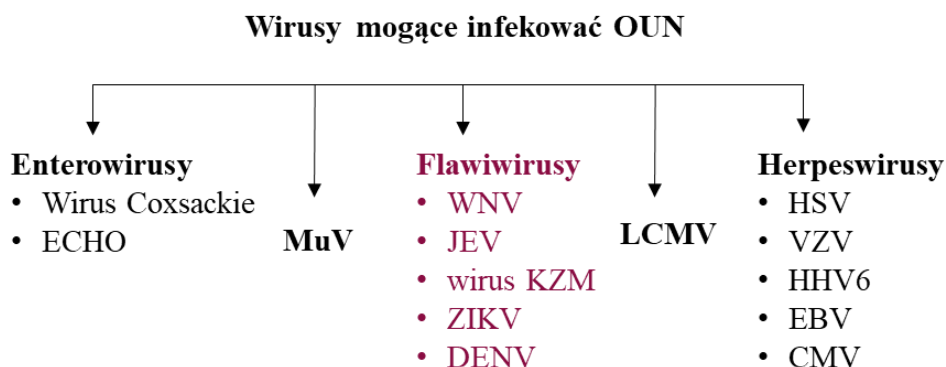
Oprócz komarów, jednym z najważniejszych wektorów chorób zakaźnych są kleszcze, na które wpływają także zmiany klimatyczne, ale również ciągle przemieszczanie się przedstawicieli populacji ludzkiej. Dlatego choroby przenoszone przez kleszcze rozprzestrzeniają się także na nowe terytoria. Zarówno komary, jak i kleszcze przenoszą różnorodne patogeny, tj. wirusy, bakterie i pierwotniaki, które są niebezpieczne zarówno dla ludzi, jak i zwierząt. Spośród chorób wywoływanych przez patogeny zewnętrzne, najwięcej problemów diagnostycznych i terapeutycznych stwarzają infekcje przenoszone przez wirusy, które mogą przedostawać się do organizmu człowieka najczęściej drogą kropelkową, poprzez kontakt bezpośredni lub mogą być przenoszone przez wektory (Ryc. 1) [Loh i wsp. 2015].



Rycina 1. Różne drogi przenoszenia wirusów do organizmu człowieka.

1. Wirusy infekujące ośrodkowy układ nerwowy

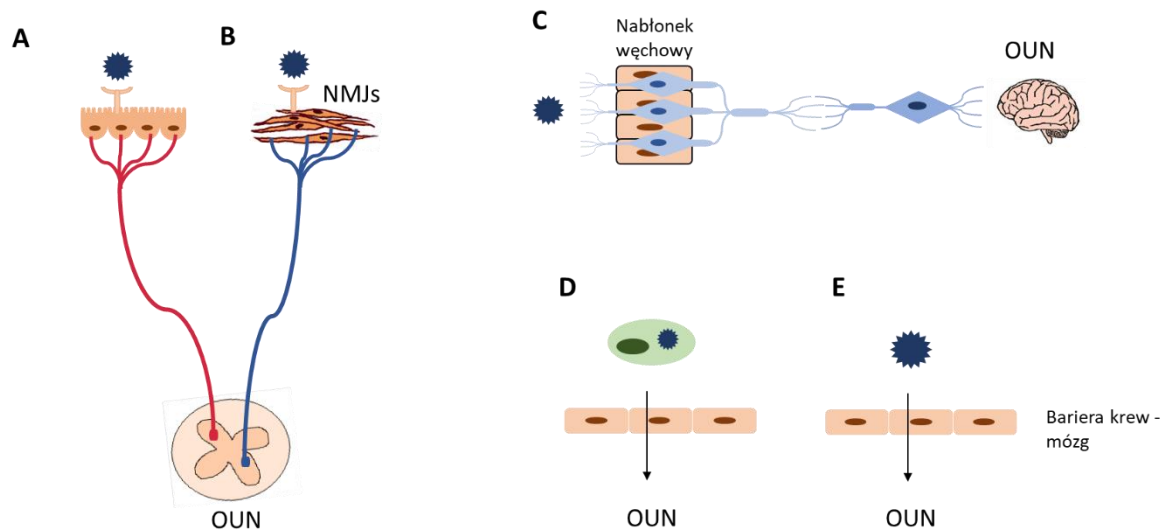
Chociaż większość wirusów replikuje jedynie w tkankach obwodowych, niektóre opracowały unikalne strategie docierania do ośrodkowego układu nerwowego (OUN), gdzie powodują infekcje [Kohil i wsp. 2021]. W wyniku zakażenia ośrodkowego układu nerwowego może dojść do zapalenia w określonych obszarach OUN, takich jak opony mózgowo-rdzeniowe, mózg, rdzeń kręgowy lub jednocześnie w wielu różnych obszarach OUN [Kohil i wsp. 2021]. Wirusy powodujące zakażenia OUN obejmują głównie enterowirusy [Coxsackie i ECHO], wirus świnki (MuV), wirus limfocytowego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych (LCMV), flawiwirusy [wirus Zachodniego Nilu (WNV), wirus japońskiego zapalenia mózgu (JEV), wirus kleszczowego zapalenia mózgu (wirus KZM), wirus Zika (ZIKV) i wirus dengi (DENV)] wirusy opryszczki [wirus opryszczki pospolitej (HSV), wirus ospy wietrznej-półpaśca (VZV) oraz w przypadku immunosupresji ludzki wirus opryszczki typu 6 (HHV-6)], natomiast u osób zakażonych ludzkim wirusem niedoboru odporności (HIV) zakażenie OUN może zostać wywołane przez innych przedstawicieli rodziny herpeswirusów [wirus Epsteina-Barra (EBV) i wirus cytomegalii (CMV)] (Ryc.2) [Toczyłowski i wsp. 2020, Ruan i wsp. 2022, Alburkat i wsp. 2020, Melvin i wsp. 2022, Król i wsp. 2019, Constant i wsp. 2022, Mayxay i wsp. 2020, Marques i wsp. 2019, da Silva Mello i wsp. 2020, Tyrberg i wsp. 2020, Abdelrahim i wsp. 2022, Wang i wsp. 2022, Skipperi wsp. 2020].



Rycina 2. Wirusy docierające do ośrodkowego układu nerwowego (OUN).

Wirusy dostają się do obwodowego układu nerwowego (PNS) lub ośrodkowego układu nerwowego (OUN) poprzez bezpośrednie infekowanie zakończeń nerwowych w tkankach lub poprzez wnikanie do komórek układu krążenia, które przenoszą je przez barierę krew-mózg do OUN [de Carvalho i wsp. 2019]. Wirus opryszczki może przedostać się do PNS poprzez wiązanie się z receptorami na zakończeniach aksonów neuronów czuciowych i autonomicznych (Ryc. 3A), które przekazują informacje czuciowe i trzewne. Większość tych wirusów przedostaje się tą drogą do organizmu ludzkiego i przechodzi w fazę latencji. Pomimo bezpośredniego połączenia synaptycznego między neuronami PNS a OUN, rozprzestrzenianie się zakażenia wirusem opryszczki do OUN jest rzadkie, ale ma niszczyielskie skutki [Tirabassi i wsp. 1998]. Miejscem przedostawania się wirusów, takich jak wścieklizna czy wirus polio, do OUN mogą być połączenia nerwowo-mięśniowe (NMJ),

ponieważ ciała komórkowe większości neuronów ruchowych znajdują się w rdzeniu kręgowym, które z kolei pozostają w kontakcie synaptycznym z obszarami motorycznymi w mózgu [Lewis i wsp. 2000] (Ryc. 3B). Wirus wścieklizny i wirus polio rozprzestrzeniają się do OUN poprzez NMJ; pierwszy dostaje się do NMJ natychmiast po ukąszeniu przez zakażone zwierzę, drugi zaś dostaje się do NMJ bardziej okrężną drogą. Wirusy te namnażają się w błonie śluzowej przewodu pokarmowego, a następnie przedostają się do węzłów chłonnych i krwi, a stamtąd mogą przedostawać się do OUN i replikować w neuronach ruchowych [Lewis i wsp. 2000, Ohka i wsp. 1998]. Na modelach zwierzęcych wykazano, że inwazja wirusa do OUN może również nastąpić poprzez nabłonek węchowy i neurony węchowe, głównie w przypadku HSV-1, wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej, wirusa choroby Borna, wirus wścieklizny (RABV), wirus grypy, wirusy paragrypy i priony (Ryc. 3C) [Detje i wsp. 2009]. Co więcej, niektóre wirusy dostają się do układu nerwowego bez infekowania neuronów, ale raczej poprzez infekowanie leukocytów, które krążąc we krwi mogą przenikać do mięszu mózgu.



Rycina 3. Drogi wnikania wirusa do OUN. A - rozprzestrzenianie się przez aksony neuronów czuciowych i autonomicznych, B - rozprzestrzenianie się przez połączenia nerwowo-mięśniowe (NMJ), C - infekcja nabłonka węchowego, D - wejście konia trojańskiego, E - bezpośrednia infekcja komórek śródbłonka (EC).

Mechanizm ten nazywany jest „koniem trojańskim”, ponieważ patogeny są ukryte w komórkach obrony immunologicznej, które w naturalny sposób są w stanie przekroczyć barierę krew-mózg (Ryc. 3D) [de Carvalho i wsp. 2019]. Bariera krew-mózg to fizjologiczna bariera oddzielająca ośrodkowy układ nerwowy (OUN) od reszty ciała i ma ona kluczowe znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania mózgu oraz ochrony OUN przed urazami i chorobami. Jego podstawowym elementem są komórki śródbłonka (ECs) naczyń włosowatych, które są unikalne w barierze krew-mózg – na tle ECs w innych tkankach - ponieważ charakteryzują się ścisłymi połączeniami międzykomórkowymi (TJ) i nie zawierają

małych porów, które umożliwiają transport międzykomórkowy na drodze pinocytozy [Obermeier i wsp. 2013]. Ponadto komórki śródbłonna charakteryzują się niskim poziomem pęcherzyków transcytotycznych, co znacząco ogranicza zarówno parakomórkowy, jak i transkomórkowy ruch cząsteczek przez warstwę ECs. Ponadto komórki śródbłonna wykazują niską ekspresję cząsteczek adhezyjnych leukocytów (LAM), co pomaga ograniczyć przepływ komórek odpornościowych z krwi do mózgu. Dzięki szczelnym połączeniom międzykomórkowym komórki śródbłonna OUN charakteryzują się unikalnymi właściwościami, specyficznymi tylko dla bariery krew-mózg, które sprawiają, że bariera krew-mózg nie ma nieszczelności charakterystycznej dla śródbłonna obwodowego [Obermeier i wsp. 2013]. Infekcje wirusowe zwykle prowadzą do zmniejszenia ekspresji i organizacji białek połączeń ścisłych, bezpośrednio wpływając na integralność monowarstwy śródbłonna, co może skutkować śmiercią komórki. Jednakże replikacja wirusa w komórkach śródbłonna mikronaczyniowego mózgu prowadzi do zwiększonej produkcji leukocytów i cytokin, takich jak IL-6 i TNF- α , a także reaktywnych form tlenu i azotu (RFT/RFA), co bezpośrednio wpływa na strukturę bariery krew-mózg i może skutkować zwiększoną jej przepuszczalnością [Papa i wsp. 2017, Soe i wsp. 2017, da Conceição i wsp. 2013]. W niektórych przypadkach wirusy obecne w układzie krążenia mogą również infekować komórki śródbłonna mikronaczyniowego mózgu (BMVEC), główny składnik bariery krew-mózg (Ryc. 3E). Do wirusów tych zalicza się: wirus Zachodniego Nilu (WNV), wirus Epsteina-Barra (EBV), wirus cytomegalii (CMV) oraz mysi adenowirus 1 (MAV-1) [Casiraghi i wsp. 2011, Verma i wsp. 2010, Gralinski i wsp. 2009, Fish i wsp. 1998]. Ciężkie zakażenia OUN mogą być również wywołane przez paramyksowirusy, takie jak wirus odry (MeV) i wirus świnki (MuV) [Ruan i wsp. 2022, Mathieu i wsp. 2021]. Pierwotne zakażenia MeV i MuV rozpoczynają się w górnych drogach oddechowych, a następnie infekcja tkanki limfatycznej powoduje wiremę i rozprzestrzenianie się wirusa na inne tkanki. MuV ma silne działanie neurotropowe i może powodować ostrą encefalopatię u dzieci. W związku z tym w płynie mózgowo-rdzeniowym dzieci, u których zdiagnozowano ostrą encefalopatię związaną z MuV, stwierdza się podwyższone poziomy kilku cytokin, tj. IFN- γ , IL-2, IL-6 i IL-10 [Watanabe i wsp. 2013]. W przeciwieństwie do MuV, infekcja MeV rozprzestrzenia się do OUN w ok. 0,1% przypadków, powodując kilka rodzajów wyniszczających chorób neurologicznych, w tym śmiertelne podostre stwardniające zapalenie mózgu, które objawia się od tygodni do lat po infekcji [Mathieu i wsp. 2021, Buchanan i Bonthius 2012]. Wyżej wymienione wybrane przykłady neuropatogenezy wywołanej przez różne rodziny wirusów pokazują, że choć przyczyną może być sama replikacja wirusa, to aktywowany układ odpornościowy, próbując wyeliminować infekcję, może również przyczynić się do uszkodzenia neuronów. Rekrutacja obwodowych komórek odpornościowych do OUN odgrywa zasadniczą rolę w ostatecznym wyniku neuroinfekcji wywołanej przez flawiwirusy, ponieważ limfocyty T odgrywają ważną rolę w niszczeniu komórek zakażonych wirusem, wytwarzaniu cytokin, zwiększaniu aktywności fagocytarnej makrofagów i stymulacja lokalnej produkcji przeciwciał przez limfocyty B [de Vries i Harding 2023]. De Vries i in. wykazali, że podczas infekcji flawiwirusem podzbiory komórek T wykazują różne wzorce migracji w OUN. Większość limfocytów CD4 zatrzymuje się w przestrzeniach okołonaczyniowych, natomiast większość cytotoksycznych limfocytów CD8 migruje do miąższu, gdzie pełnią swoje funkcje w sąsiedztwie zakażonych neuronów. Ponadto cytokiny i chemokiny rekrutują

leukocyty, które mogą indukować rozpad bariery krew-mózg. Flawiwirusy stymulują również leukocyty do wydzielania proteaz wpływających na integralność bariery krew-mózg. Dodatkowo stwierdzono, że JEV i DENV indukują wydzielanie proteazy (chimazy) przez komórki tuczne, która degradowuje białka bariery krew-mózg i jednocześnie niszczy ich strukturę [Hsieh i wsp. 2019, Syenina i wsp. 2020].

2. Zmiany metaboliczne w OUN jako odpowiedź na infekcję wirusową

W warunkach fizjologicznych mózg, podobnie jak inne narządy i tkanki organizmu, charakteryzuje się homeostazą redoks wynikającą z równowagi pomiędzy wytwarzaniem reaktywnych form tlenu (RFT) a działaniem mechanizmów antyoksydacyjnych. Z drugiej strony uważa się, że komórki mózgu są szczególnie podatne na przesunięcie tej równowagi w kierunku warunków prooksydacyjnych ze względu na zużycie przez nie stosunkowo dużych ilości tlenu do produkcji energii oraz słabsze mechanizmy obrony antyoksydacyjnej w porównaniu z komórkami innych narządów, co sprzyja rozwojowi stresu oksydacyjnego. Zatem nawet w warunkach fizjologicznych mózg ma wysoki potencjał prooksydacyjny, a jednocześnie duże wymagania metaboliczne, co czyni go szczególnie podatnym na stres oksydacyjny [Chiurchiù i wsp. 2016]. Ponadto błona komórkowa neuronów zawiera duże stężenia wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFAs), które są szczególnie podatne na oksydacyjne modyfikacje przez RFT [Salim 2017], co w konsekwencji może zakłócać prawidłowe funkcjonowanie tych komórek w metabolicznie zmienionych warunkach, w tym wynikających z infekcji [Tirabassi i wsp. 1998]. Infekcje wirusowe zwykle rozpoczynają się na obwodzie, głównie w nabłonku lub śródbłonku komórek. W konsekwencji dochodzi do odpowiedzi immunologicznej i sygnalizacji parakrynej, które są inicjowane w komórkach zakażonych i przenoszone do komórek niezainfekowanych przez wydzielane cytokiny [Mustafá i wsp. 2019]. Natomiast wirus może zostać usunięty poprzez działanie swoistych przeciwciał przeciwko wirusowi oraz limfocytów T w ramach adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej [de Vries i Harding 2023]. Infekcja wirusowa może rozprzestrzenić się na inne tkanki, prowadząc do silnej ogólnoustrojowej odpowiedzi immunologicznej, m.in. po przeniknięciu bariery krew-mózg może wywołać wyniszczające skutki w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) [Tirabassi i wsp. 1998]. Dlatego infekcje wirusowe układu nerwowego indukują złożoną odpowiedź wielokomórkową obejmującą komunikację między wieloma typami komórek, która służy do minimalizacji rozprzestrzeniania się wirusa, usuwania wirusa i resztek komórkowych, ochrony komórek gospodarza i zachowania funkcji neuronów. Za neuropatogenezę infekcji wirusami docierającymi do mózgu, w tym flawiwirusami, odpowiedzialna jest replikacja wirusa w neuronach i późniejsza lokalna odpowiedź zapalna [Mustafá i wsp. 2019]. Konsekwencją zakażenia OUN jest zatem stan zapalny i towarzyszący mu stres oksydacyjny, wywołany głównie dysfunkcją mitochondriów związaną ze zwiększoną aktywnością kompleksu mitochondrialnego I oraz zwiększoną produkcją aniono-rodników ponadtlenkowych na skutek przerwania łańcucha transportu elektronów i ich wycieku z matriksu mitochondriów, który może katalizować autoutlenianie hemoglobiny i wolnorodnikowe reakcje enzymatyczne, co w kontekście dużych stężeń jonów żelaza jako składnika hemu prowadzi do powstawania nadtlenu wodoru i wysoce reaktywnych rodników hydroksylowych. Dodatkowo może to zwiększać poziom uszkodzenia

tkanki nerwowej poprzez indukowanie uszkodzeń oksydacyjnych neuronów [Sadrzadeh i Saffari 2004, Macháček i wsp. 2016]. Ponadto, w astrocytach i mikrogleju, towarzyszy temu wzrost wydzielania tlenku azotu (NO) i cytokin prozapalnych, takich jak IL-6 i TNF- α [Chatel-Chaix i wsp. 2016]. Dodatkowo infekcja (w warunkach stresu oksydacyjnego) powoduje aktywację enzymów pro-oksydacyjnych, w tym oksydazy NADPH i oksydazy ksantynowej, które wytwarzają duże ilości anionorodników ponadtlenkowych oraz syntazy tlenku azotu (NOS) odpowiedzialnej za wytwarzanie tlenku azotu (II) [Konior i wsp. 2014]. W warunkach fizjologicznych enzymy przeciwutleniające redukują generację i nasilają metabolizm RFT, jednakże nadmierna produkcja RFT wynikająca z infekcji może uniemożliwić ich skuteczną eliminację [Blázquez i wsp. 2021]. Infekcje wirusowe przyczyniają się zwykle do zmniejszenia efektywności enzymów antyoksydacyjnych poprzez zmniejszenie dostępności m.in. jonów miedzi i cynku, a w konsekwencji zmniejszenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (Cu, Zn-SOD) [Almeida i wsp. 2020]. W warunkach fizjologicznych dysmutaza ponadtlenkowa odpowiada za dysmutację anionorodnika ponadtlenkowego, w wyniku czego powstaje nadtlenek wodoru, który jest usuwany przez peroksydazę glutationową, zapobiegając w ten sposób powstawaniu rodników hydroksylowych. Jednakże w stanach prozapalnych powstałych na skutek infekcji w osoczu pacjentów obserwuje się wyższą aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w porównaniu z peroksydazą glutationową, co prowadzi do zwiększenia poziomu rodników hydroksylowych i wzmożenia procesów oksydacyjnych, a w konsekwencji modyfikacji składników komórkowych, co skutkuje zaburzeniem szlaków metabolicznych i sygnalizacji w komórkach mózgowych [Dobrzyńska i wsp. 2022].

Infekcje wirusowe OUN mogą powodować ciężki przebieg choroby z towarzyszącymi krótko- i długoterminowymi następstwami oraz śmiertelnością. W konsekwencji wirusowe zakażenie OUN może prowadzić do zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, mózgu oraz rdzenia kręgowego [Kohil i wsp. 2021], przy czym wirusy neurotropowe potrafią przekraczać barierę krew-mózg, atakować ośrodkowy układ nerwowy i powodować choroby poprzez cytopatologię indukowaną wirusem lub neurotoksyczną przeciwwirusową odpowiedź immunologiczną organizmu pacjenta [de Carvalho i wsp. 2019]. Podczas infekcji wirusowych w organizmie żywiciela obserwuje się zmiany metaboliczne, które umożliwiają zarówno replikację wirusa, jak i te, których zadaniem jest ochrona organizmu przed następstwami infekcji [Pant i wsp. 2021]. Zdecydowana większość tych działań zachodzi na poziomie mitochondriów, gdyż do wprowadzenia wirusa do cytoplazmy komórek gospodarza poprzez receptor potrzebna jest energia w postaci ATP. Natomiast wirusy, jako bezwzględne pasożyty wewnątrzkomórkowe, są całkowicie zależne od mechanizmu metabolicznego komórki gospodarza w zakresie dostarczania energii i związków niezbędnych do ich replikacji. Uważa się, że regulacja w górę różnych elementów glikolizy, w tym szybkości glikolizy, poprzez ułatwienie syntezy nukleotydów, może sprzyjać replikacji wirusa [Abrantes i wsp. 2012], czyniąc cykl kwasów trikarboksylowych (TCA) kluczowym elementem biosyntezy związków niezbędnych do zajścia replikacji wirusa w komórki gospodarza na poziomie macierzy mitochondrialnej, co z kolei dostarcza prekursora, takiego jak cytrynian, do syntezy kwasów tłuszczowych. Ponadto wirusy mogą przeprogramować cykl TCA poprzez zwiększenie biosyntezy kwasów tłuszczowych, w tym długołańcuchowych kwasów tłuszczowych niezbędnych do tworzenia błon wirusowych [Koyuncu i wsp. 2017]. Wiadomo również, że

wirusy mogą wykorzystywać metabolity cyklu TCA do potranslacyjnych modyfikacji białek wirusowych, w tym acetylo-CoA może służyć jako substrat do acetylacji lizyny antygeny jądrowego (LANA) kodowanego przez wirusa opryszczki [Sánchez-García i wsp. 2021]. Wykazano również, że szlak glikolityczny jest indukowany w zakażeniu DENV w celu promowania skutecznej replikacji wirusa [Fontaine i wsp. 2015], co skutkuje wzrostem zużycia glukozy i ekspresji transportera glukozy 1 i heksokinazy 2, a zahamowanie tego szlaku metabolicznego zmniejsza replikację DENV. Wzrost spożycia glukozy może wynikać również z jej wykorzystania przez komórki zakażone DENV w celu zwiększenia ich zdolności do utleniania endogennych lub egzogennych kwasów tłuszczowych [Fernandes-Siqueira i wsp. 2018]. Replikacja wirusa wymaga odpowiedniego poziomu ATP zapewnianego przez β -oksydację [Heaton i Randall 2010].

Głównym źródłem węgla wykorzystywanym do zaspokajania potrzeb energetycznych komórek ssaków jest glutamina, która wspomaga cykl TCA. Podczas infekcji wirusowej zaobserwowano również rozległe przeprogramowanie metabolizmu węgla. Stwierdzono, że komórki zakażone HCMV wykorzystują glutaminę do napędzania cyklu TCA, umożliwiając wykorzystanie węgla pochodzącego z metabolizmu glukozy do syntezy kwasów tłuszczowych [Chambers i wsp. 2010]. Ponadto glutamina jest zużywana w wielu szlakach metabolicznych, które dostarczają azot do biosyntezy nukleotydów. Stwierdzono, że hamowanie replikacji DENV w warunkach niedoboru glutaminy może być związane z potrzebą wykorzystania zwiększonej wewnątrzkomórkowej puli nukleotydów podczas replikacji wirusa, a zatem poziomy związków zaangażowanych w metabolizm puryn i pirymidyn są znacznie podwyższone w komórkach zakażonych DENV. Dlatego zasugerowano, że DENV, aby zaspokoić swoje potrzeby replikacyjne, może wymagać glutaminy jako źródła węgla i azotu [Fontaine i wsp. 2015]. W konsekwencji flawiwirusy modyfikują metabolizm komórkowy gospodarza, zwiększając pulę nukleotydów i kofaktorów enzymatycznych, takich jak ATP, dla aktywności helikazy RNA [Jordan i Randall 2016]. Sprzyja to zmianie w strukturze błony retikulum endoplazmatycznego gospodarza w celu ustalenia chronionych miejsc replikacji. Uważa się, że te przedziały replikacyjne promują odpowiednie rusztowanie replikazy i stężenie substratów replikacji oraz odgrywają rolę ochronną dla wirusowego RNA przed cytozolowymi czujnikami wrodzonej odporności i mechanizmami jej degradacji [Jordan i Randall 2016]. Wirusy mogą również zakłócać utlenianie kwasów tłuszczowych, które jest procesem katabolicznym, w którym fosfolipidowe kwasy tłuszczowe są metabolizowane w celu wytworzenia energii. Stwierdzono, że utlenianie kwasów tłuszczowych ma kluczowe znaczenie dla proliferacji wirusa odry [Takahashi i wsp. 2007], podczas gdy zakażenie DENV indukuje również degradację lipidów i nasila β -oksydację, a terapia etomoksirem (inhibitorem β -oksydacji) zmniejsza replikację DENV [Heaton i Randall 2010]. Ponadto badania nad wirusem dengi wykazały, że DENV NS4B indukuje wydłużenie mitochondriów poprzez inaktywację białka 1 związanego z dynaminą, co ostatecznie osłabia przeciwwirusową odpowiedź immunologiczną gospodarza [Chatel-Chaix i wsp. 2016]. Biorąc pod uwagę, że wirus Zika wykazuje podobne działanie, zasugerowano, że promowanie wydłużania mitochondriów może być powszechną strategią specyficzną dla flawiwirusów [Sorouri i wsp. 2022]. Jednak w ostatnich latach coraz częściej podkreśla się, że metabolizm mitochondriów jest również kluczowym elementem w zapobieganiu infekcjom wirusowym, co wskazuje, że mitochondrialna sygnalizacja

przeciwwirusowa, która poprzez cykl TCA, transport elektronów kompleksu łańcucha oddechowego i utlenianie kwasów tłuszczowych jest istotnym elementem odpowiedzi immunologicznej gospodarza [Sorouri i wsp. 2022]. Metabolity cyklu TCA mogą służyć jako substraty wzmacniające ludzkie mechanizmy obronne, w tym acetylo-CoA jest kofaktorem wymaganym do ekspresji IFN- γ w efektorowych komórkach T [Qiu i wsp. 2019], fumaran hamuje piropozę w makrofagach reagując z GSDMD poprzez reakcję addycji Michaela [Humphries i wsp. 2020], podczas gdy konwersja genu odpowiedzi immunologicznej ciskonitran 1 (IRG1) do itakonianu indukuje ekspresję genów przeciwzapalnych, aby przeciwdziałać odpowiedziom prozapalnym [Mills i wsp. 2018]. Jednocześnie zarówno itakonian, jak i fumaran mogą silnie hamować replikację wirusa poprzez mechanizmy, które nie zostały dotychczas jednoznacznie zidentyfikowane. Wiadomo, że itakonian hamuje dehydrogenazę bursztynianową, regulując w ten sposób poziom bursztynianu, oddychanie mitochondrialne i produkcję cytokin prozapalnych (IL-1 β , IL-6, IL-12) [Cordes i wsp. 2016, Lampropoulou i wsp. 2016, Cordes i wsp. 2021], a także indukuje stres elektrofilowy i hamuje stan zapalny, w którym pośredniczy I κ B ζ [Bambouskova i wsp. 2018], zwiększając ekspresję genów, które wzmacniają szlaki sygnałowe TLR/IL-1R prowadzące do produkcji cytokin [Yamamoto i wsp. 2004, Ohto-Ozaki i wsp. 2020]. Itakonian modyfikując strukturę i funkcję białek na resztach cysteiny, działa jako immunomodulator [Hooftman i O'Neill 2019]. Ponadto wykazano, że pochodna itakonianu 4-oktylitakonian (4-OI) zmniejsza odpowiedź zapalną gospodarza związaną z infekcją, hamując jednocześnie między innymi replikację wirusa Zika [Olagnier i wsp. 2020]. Zatem itakonian i jego pochodne zmniejszają stan zapalny i związane z nim patologie oraz hamują replikację wirusa. Korzystając z mysiego modelu zakażenia wirusem Zika, stwierdzono, że wirus ten aktywuje szlak sygnalizacyjny obejmujący kinazę białkową oddziałującą z receptorem-3 (RIPK3), co prowadzi do zwiększenia ekspresji Acod-1, który hamuje replikację wirusa w neuronach [Daniels i wsp. 2019]. Ponadto, alkilując reszty cysteinowe białka Keap1, inhibitora cytozolowego czynnika transkrypcyjnego Nrf2, itakonian zapobiega jego degradacji i umożliwia jego translokację do jądra oraz skuteczność transkrypcyjną wobec białek przeciwutleniających i przeciwzapalnych [Hayes i Dinkova-Kostova 2014, Mills i wsp. 2018]. Nrf2 jest również aktywowany przez fumaran będący produktem utleniania bursztynianu i jego pochodne, takie jak fumaran monometylu (MMF) i fumaran dimetylu (DMF), które są zarówno silnymi immunomodulatorami, jak i przeciwutleniaczami [Cross i wsp. 2011]. Jednakże ostatnio wykazano, że ekspresja genu Nrf2, który reguluje transkrypcję układów antyoksydacyjnych glutationu i tioredoksyny, detoksykację, regenerację NADPH i metabolizm hemu [Tonelli i wsp. 2018], jest zmniejszona w biopsjach uzyskanych od pacjentów z COVID-19 [Olagnier i wsp. 2020], i wiadomo, że oprócz działania przeciwutleniającego i przeciwzapalnego, Nrf2 może również regulować wykrywanie wirusowego DNA w cytoplazmie i w ten sposób uwalniać przeciwwirusowy IFN typu I [Olagnier i wsp. 2018]. Fumaran, produkt utleniania bursztynianu przez dehydrogenazę bursztynianową, oraz jego pochodne, MMF i DMF, są silnymi immunomodulatorami i przeciwutleniaczami aktywującymi Nrf2 [Cecchini 2003, Wilms i wsp. 2010]. DMF hamuje dojrzewanie komórek dendrytycznych (DC) [Peng i wsp. 2012] i napędza produkcję IL-10, IL-12 i IL-23 przez DC, redukując w ten sposób patogenne komórki T [Schlöder i wsp. 2017], DMF hamuje także przejścia komórek Th1 do Th2, sygnalizację cytokin prozapalnych

i translokację jądrową prozapalnego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B oraz ekspresję cząsteczek adhezyjnych w limfocytach i komórkach śródbłona [Rubant i wsp. 2008, Gillard i wsp. 2015, McGuire i wsp. 2016, Wu i wsp. 2017, Dan Dunn i wsp. 2015]. Produktami ubocznymi mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów są RFTOS [Dan Dunn i wsp. 2015], które w nadmiarze mogą generować szkodliwe skutki, takie jak oksydacyjne modyfikacje lipidów, białek i kwasów nukleinowych. Coraz częściej RFT identyfikuje się jako aktywne elementy sygnalizacji międzykomórkowej [Sies i Jones 2020], w tym te zaangażowane w obronę immunologiczną przed wirusami i innymi patogenami [Nathan i wsp. 2013]. Komórkowe źródła RFT obejmują oksydazę NADPH i mitochondrialny łańcuch oddechowy [Escoll i wsp. 2019]. Ponadto powstające RFT poprzez aktywację inflamasomów, w tym NLRP3, biorą udział między innymi w odporności wrodzonej [Zhou i wsp. 2011]. Sugerowano nawet, że zmniejszenie poziomu RFT w mitochondriach może zwiększyć replikację wirusa [Kim i wsp. 2015]. Ważnym elementem aktywności metabolicznej mitochondriów jest to, że te organelle komórkowe nie działają w izolacji, ale w interakcji z innymi organellami, takimi jak retikulum endoplazmatyczne (ER), co jest szczególnie ważne dla biosyntezy lipidów. Ponadto stwierdzono, że subdomeny połączeń mitochondriów-ER odgrywają ważną rolę w indukcji sygnalizacji przeciwwirusowej z udziałem mitochondrialnego białka MAVS, umożliwiając między innymi wykrywanie wirusowego RNA [Hou i wsp. 2011]. Wiadomo, że zwiększony metabolizm energii i lipidów niezbędny do replikacji wielu wirusów jest odwracany przez IFN, działając w celu kontrolowania infekcji wirusowych. Jeden z genów stymulowanych interferonem, indukowany przez IFN typu I, wpływa na metabolizm komórkowy i koduje enzym cholesterol-25-hydroksylazę (CH25H), który przekształca cholesterol w rozpuszczalny oksysterol-25-hydroksycholesterol (25HC), co z kolei służy zmniejszeniu akumulacji cholesterolu w komórkach. Ogólnym efektem jest zwiększona odporność na kilka wirusów, takich jak ZIKV i inne flawiwirusy [Li i wsp. 2017]. W przebiegu neuroinfekcji flawiwirusami mikroglej może fizycznie otaczać i fagocytozować umierające neurony. Reaktywny mikroglej może eliminować dysfunkcyjne synapsy, co najprawdopodobniej pełni funkcję neuroprotekcijną.

Znajomość mechanizmów neuroprotekcji mikrogleju w wirusowym zapaleniu opon mózgowo-rdzeniowych i zapaleniu mózgu może pomóc w projektowaniu racjonalnych, celowanych możliwości terapeutycznych. Inny mechanizm związany z neuroinfekcjami obejmuje zmiany w morfologii, ekspresji genów, zdolności proliferacyjnej i funkcji astrocytów (astrogliaza reaktywna) [Maximova i Pletnev 2018].

Wszystkie powyższe fakty wskazują, że interakcje wirus-gospodarz na poziomie komórkowym nie są proste i jednoznaczne. Konsekwencją tego jest ciągłe poszukiwanie odpowiedzi na pytanie, czy istnieje jednoznaczny sposób zapobiegania skutkom interakcji wirus-gospodarz.

3. Flawiwirusy a ośrodkowy układ nerwowy

Flawiwirusy, które są wirusami RNA, to jedyna grupa z rodziny Flaviviridae, która jest szeroko rozpowszechniona na całym świecie. Do najpowszechniejszych flawiwirusów przenoszonych przez stawonogi należą wirus KZM, WNV, DENV, ZIKV i JEV. Mają duże powinowactwo do OUN, przez co mogą powodować szereg potencjalnie śmiertelnych,

poważnych chorób, w tym zapalenie mózgu, ostre porażenie wiotkie czy wady wrodzone płodu. W ostatnich latach obserwuje się gwałtowny wzrost liczby zakażeń wywoływanych przez flawiwirusy, w szczególności wirus dengi, wirus Zachodniego Nilu i wirus Zika, a epidemie występują m.in. w obu Amerykach [WHO:<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/west-nile-virus>, CDC: <https://www.cdc.gov/vhf/virusfamilies/Flaviviridae.html>].

Flawiwirusy to wirusy otoczkowe, które mają pojedynczy genom RNA o dodatniej nici, zawierający czapkę 5' oraz regiony nieulegające translacji 5' i 3' (UTR), a także pojedynczą otwartą ramkę odczytu (ORF). ORF koduje dużą poliproteinę, która jest rozszczepiana ko- i potranslacyjnie na trzy białka strukturalne: C (białko kapsydu), prM (białko przedbłonowe) i E (białko otoczki) i oraz siedem białek niestukturalnych (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B i NS5). Białka strukturalne tworzą cząsteczkę wirusa i odgrywają istotną rolę w wejściu wirusa do komórki gospodarza, jak również w składaniu i uwalnianiu nowych wirionów. Ponadto białko kapsydu wiąże genomowy RNA, tworząc rdzeń nukleokapsydu, a glikoproteiny E i prM są wirusowymi białkami powierzchniowymi przyłączonymi do otoczki lipidowej pochodzącej od gospodarza. Natomiast białka niestukturalne tworzą wirusowy kompleks replikacyjny wewnątrz komórki gospodarza [Maximova i Pletnev 2018, Heinz i Stiasny 2017].

Do zakażenia flawiwirusami dochodzi głównie poprzez pokłucie przez komara lub kleszcza, co prowadzi do zainfekowania makrofagów i komórek dendrytycznych (DC) w skórze właściwej [Mazeaud i wsp. 2018]. Po miejscowej proliferacji zakażone komórki dendrytyczne mogą transportować wirusa do węzłów chłonnych, dzięki czemu może on rozprzestrzeniać się po całym organizmie docierając do różnych narządów, w tym mózgu [Mazeaud i wsp. 2018]. Gdy wirus dostanie się do OUN pierwszą linią obrony gospodarza jest wrodzona odpowiedź immunologiczna. Jest ona inicjowana przez wzorce molekularne związane z patogenami (PAMP) przez receptory rozpoznawania wzorców (PRR). PRR w tym receptory podobne do RIG-I (RLR), do których należą gen indukowany kwasem retinowym I (RIG-I) i gen związany z różnicowaniem czerniaka 5 (MDA5) lub receptory Toll-podobne (TLR), rozpoznają RNA oraz białka wirusa i aktywują czynniki transkrypcyjne: regulatorowy czynnik transkrypcyjny interferonu 3 i 7 (IRF3, IRF7) oraz NF- κ B, co prowadzi do produkcji interferonów typu I (IFN- α/β) i cytokin prozapalnych (IL-6 i IL-8), powodując reakcje zapalną i stresową [da Conceição i wsp. 2013, Cerny i wsp. 2014]. Uwolnione cząsteczki IFN-I wiążą się z receptorami IFN-I i aktywują kaskadę sygnalizacyjną JAK/STAT, która napędza ekspresję szerokiego zakresu genów stymulowanych interferonem, odpowiedzialnych za indukcję ekspresji genów przeciwwirusowych i zwiększone wytwarzanie stanu zapalnego (IL-6) i cytokiny immunoregulacyjnej (IL-4, IL-10) [Nasirudeen i wsp. 2011]. To powoduje, że flawiwirusy próbują hamować sygnalizację JAK/STAT, aby zakłócić odpowiedź komórkową na interferon i cytokiny [Ivashkiv i wsp. 2013]. Składniki wirusa i metabolity komórkowe wytwarzane w wyniku replikacji wirusa mogą również stymulować elementy kompleksu inflamazomu, prowadząc do wydzielania prozapalnej interleukiny IL-1 β i ostatecznie do śmierci komórki [Roby i wsp. 2020]. Powstawaniu stanów prozapalnych sprzyja także aktywacja szlaku sygnałowego NF- κ B, który indukuje geny prozapalne, w tym kodujące czynnik martwicy nowotworu (TNF- α), czyli IL-1 i IL-6 [Negash i wsp. 2013]. Sygnalizacja przez NF- κ B zależy od interakcji z nieenzymatycznym przeciwutleniaczem komórkowym, GSH, który modyfikując strukturę NF- κ B poprzez

glutationylację, hamuje jego działanie prozapalne [Ingram 2018]. Stwierdzono jednak, że infekcje niektórymi flawiwirusami obniżają poziom GSH [Almeida i wsp. 2020, Mullen i wsp. 2020], co może nasilać rozwój stanu zapalnego i replikację wirusa.

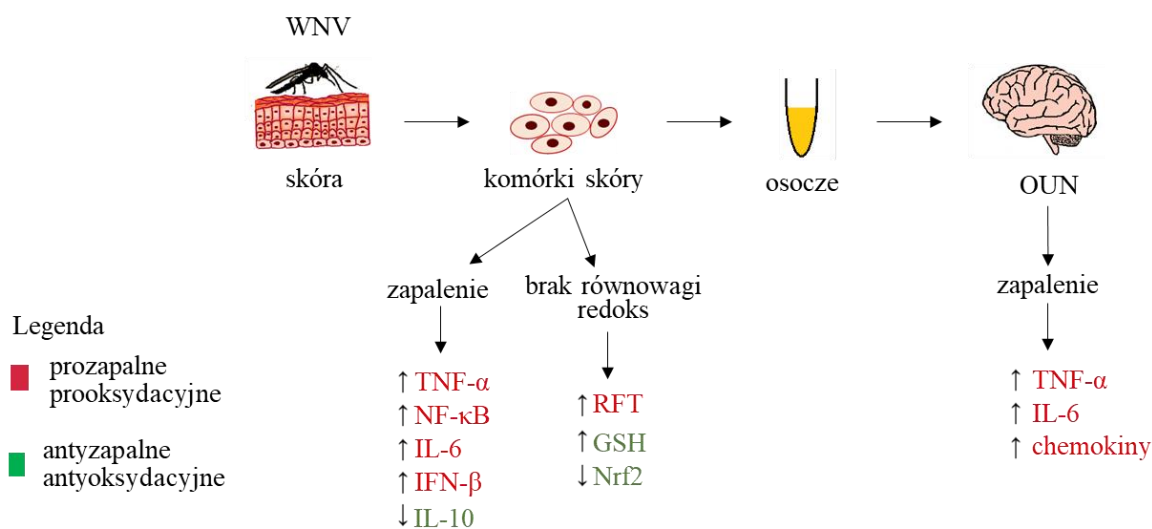
Ze względu na fakt, że stanom zapalnym towarzyszy zwykle stres oksydacyjny, w komórkach zakażonych flawiwirusem obserwuje się zwiększone wytwarzanie RFT, w tym anionu nadtlenkowego, rodnika hydroksylowego i nadtlenku wodoru [Łuczaj i wsp. 2016]. Jednocześnie obserwuje się zmniejszenie zdolności antyoksydacyjnej na poziomie antyoksydantów enzymatycznych, czyli aktywności dysmutazy nadtlenkowej (SOD), katalazy i peroksydazy glutationowej (GPX), których biosynteza jest zależna od aktywności transkrypcyjnej receptora Nrf2–Keap1 ścieżka [Negash i wsp. 2013]. Nrf2 jest sekwestrowany w cytozolu poprzez interakcję z Keap1, ułatwiając ubikwitynację Nrf2 i jego degradację proteasomalną, ograniczając w ten sposób ekspresję genów regulowanych przez Nrf2. Jednakże w warunkach stresu oksydacyjnego konformacja Keap1 ulega modyfikacji, głównie poprzez interakcję z 4-hydroksynonenalem (4-HNE), produktem peroksydacji kwasu arachidonowego, w wyniku czego następuje uwolnienie Nrf2 z kompleksu z Keap1 do cytozolu i jego przeniesienie do jądra komórkowego, gdzie Nrf2 tworzy heterodimer z małymi białkami Maf (sMaf) i wiąże się z elementem odpowiedzi antyoksydacyjnej (ARE). To inicjuje zależną od ARE transkrypcję białek cytoprotekcyjnych [Kumar i wsp. 2009], w tym enzymów przeciwutleniających, w celu osłabienia komórkowego stresu oksydacyjnego i zwalczania infekcji wirusowych. Jednakże niektóre flawiwirusy (DENV, ZIKV) hamują aktywność transkrypcyjną Nrf2, prowadząc do zahamowania transkrypcji genów antyoksydacyjnych, co w konsekwencji przyczynia się do przesunięcia równowagi redoks w kierunku warunków oksydacyjnych i rozwoju infekcji [Blázquez i wsp. 2021, Gęgotek i Skrzydlewska, 2015]. Niezależnie od skuteczności białek przeciwutleniających, komórki gospodarza wyposażone są w drobnocząsteczkowe przeciwutleniacze, takie jak witamina C, witamina E i glutation (GSH), których poziom również ulega znacznemu obniżeniu w wyniku zakażenia flawiwirusem [Almeida i wsp. 2020]. W konsekwencji zwiększona produkcja RFT i zmniejszona obrona antyoksydacyjna prowadzą do nasilenia infekcji wirusowej.

3.1. Wirus Zachodniego Nilu

Wirus Zachodniego Nilu (WNV) jest przenoszonym przez komary flawiwirusem, którego naturalnymi żywicielami są ptaki, podczas gdy ludzie i konie są jego przypadkowymi żywicielami [WHO: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/west-nile-virus>]. WNV występuje endemicznie na różnych obszarach Afryki, Azji i Bliskiego Wschodu. Ponadto, został on niedawno zidentyfikowany przez Centrum Kontroli i Zapobiegania Chorobom (CDC) jako główna przyczyna chorób przenoszonych przez komary w kontynentalnych stanach USA (CDC-<https://www.cdc.gov/westnile/statsmaps/index.html>). Do 10 stycznia 2023 r. do CDC zgłoszono łącznie 1035 przypadków choroby spowodowanej zakażeniem wirusem Zachodniego Nilu u ludzi, z czego 737 przypadków (71%) sklasyfikowano jako chorobę neuroinwazyjną (w tym zapalenie opon mózgowych lub zapalenie mózgu), a 298 przypadków (29%) wskazywało na zakażenie typu nieinwazyjnego [https://www.cdc.gov/westnile/statsmaps/preliminary_mapsdata2022/index.html]. Osoby, które są wyjątkowo podatne na zakażenie WNV, w tym osoby starsze, przewlekle chore i/lub

pacjenci z obniżoną odpornością, mogą rozwinąć ciężkie zapalenie mózgu i są bardziej narażone na śmierć w wyniku choroby [Chowdhury i Khan 2021]. Wprowadzony do organizmu człowieka przez pokłucie przez komara, WNV dostaje się do komórek skóry, a następnie do krwi. Sugeruje się, że wirus infekuje rezydujące w skórze DC, takie jak komórki Langerhansa, które następnie przemieszczają się do drenującego węzła chłonnego [Byrne i wsp. 2001]. W tym przypadku infekcji i ryzyku rozprzestrzeniania się wirusa przeciwdziała szybki rozwój wczesnej odpowiedzi immunologicznej, w tym produkcja IFN- β i IFN- γ oraz funkcje efektorowe wrodzonych komórek odpornościowych (limfocyty T $\gamma\delta$, komórki NK, neutrofile i makrofagi) [Bai i wsp. 2010, Purtha i wsp. 2008, Bourne i wsp. 2007, Wang i wsp. 2003]. Zainfekowane ludzkie komórki wykrywają wirusa i indukują produkcję IFN- β poprzez rozpoznawanie wirusowego RNA przez RIG-I i MDA5 [Errett i wsp. 2013]. Wiązanie wirusowego RNA promuje interakcję ze stymulatorem promotora interferonu beta 1 (IPS-1), co skutkuje rekrutacją białek sygnalizacyjnych (np. NEMO i TRAF3), prowadząc do aktywacji czynnika regulacyjnego interferonu 3 (IRF-3) i NF- κ B. Czynniki te przemieszczają się do jądra i wiążą się z regionem promotora genu IFN- β , a produkcja IFN- β prowadzi do zmniejszenia infekcji wirusowej [Basagoudanavar i wsp. 2011]. IFN- β jest pierwszą linią obrony gospodarza przed infekcją wirusową, więc wirus Zachodniego Nilu, za pośrednictwem niestrukturalnego białka NS1, hamuje ekspresję IFN- β . NS1 poprzez bezpośrednią interakcję z RIG-I i MDA5 powoduje ich degradację. To z kolei prowadzi do zahamowania ekspresji IFN- β , zapobiegając dalszej aktywacji szlaku sygnałowego RLR [Zhang i wsp. 2017]. WNV, poprzez receptor Toll-podobny, indukuje wydzielanie cytokin prozapalnych, w tym IL-6 i TNF- α , w tkankach obwodowych [Wang i wsp. 2004]. Sugeruje to, że wydzielany TNF- α może również modulować przepuszczalność bariery krew-mózg poprzez zmianę ścisłych połączeń komórek śródbłonka, umożliwiając WNV penetrację bariery i infekowanie neuronów [Wang i wsp. 2004]. Mechanizm, za pomocą którego WNV przenika przez barierę krew-mózg i powoduje zapalenie mózgu, pozostaje niewyjaśniony. Aktywacja receptorów rozpoznawania wzorców (PRR) w śródbłonku bariery krew-mózg przez WNV powoduje zależny od cytokin wzrost jej przepuszczalności, co powoduje przedostanie się wirusa do OUN [Daniels i wsp. 2014]. WNV może również przenikać do OUN za pomocą innych mechanizmów, np. wstecznego transportu aksonalnego, a następnie rozprzestrzeniać się na poziomie neuronów [Hunsperger i Roehrig 2006]. Innym możliwym mechanizmem wnikania WNV do OUN jest mechanizm "koniu trojańskiego", w którym wirus jest transportowany przez zakażone komórki odpornościowe, takie jak limfocyty lub neutrofile [Bai i wsp. 2010, Wang i wsp. 2008]. Odpowiedź zapalna na zakażenie WNV obejmuje silną aktywację mikrogleju i astrocytów, co prowadzi również do uwalniania cytokin prozapalnych, takich jak TNF- α i IL-6, oraz chemokin, takich jak ligandy chemokiny (motyw C-C) 2 i 5/CC-chemokiny 2 i 5 (CCL2, CCL5) oraz chemokina motywu C-X-C 10 (CXCL10) [Clarke i wsp. 2014]. Te mediatory prozapalne promują również rekrutację obwodowych komórek odpornościowych do OUN po infekcji wirusowej i regulują ich funkcję, kontrolując proliferację i usuwanie wirusa [Klein i wsp. 2005, Glass i wsp. 2005, Lim i wsp. 2011]. Wzrost odpowiedzi prozapalnej podczas infekcji WNV może również zwiększać wydzielanie IL-10, cytokiny przeciwzapalnej, przez komórki dendrytyczne [Kovats i wsp. 2016]. Wykazano również, że zakażenie WNV indukuje wzrost wytwarzania reaktywnych form tlenu w zakażonych komórkach nerki

chomika. Ten wzrost wytwarzania RFT powoduje wzrost poziomu GSH, prowadząc do nowego poziomu homeostazy komórkowej (Ryc.4) [Basu i wsp. 2017].



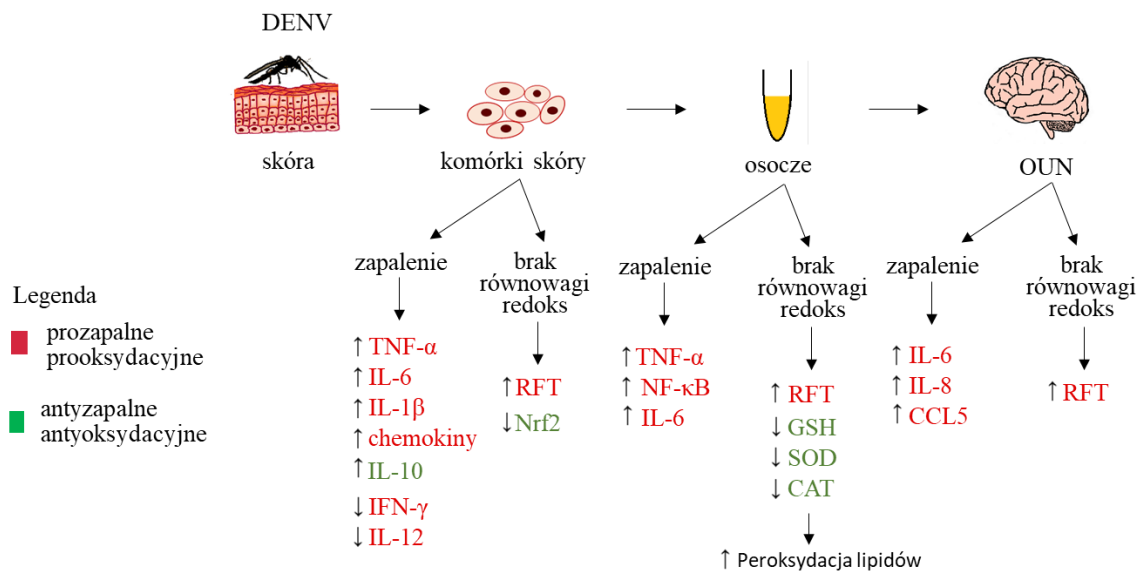
Rycina 4. Zmiany metaboliczne w komórkach i OUN podczas zakażenia wirusem Zachodniego Nilu (WNV).

3.2. Wirus dengi

Wirus dengi (DENV) to flawiivirus przenoszony przez komary z rodzaju *Aedes*, który powoduje jedną z najbardziej problematycznych infekcji wirusowych przenoszonych przez stawonogi na świecie. Objawia się jako samoograniczająca się choroba gorączkowa, która może prowadzić do śmierci. Zachorowalność na dengę rośnie szybciej niż na jakąkolwiek inną chorobę zakaźną, a w ostatnich dziesięcioleciach zaobserwowano jej dramatyczny wzrost. Według WHO, w ciągu ostatnich dwóch dekad liczba zgłoszonych przypadków dengi wzrosła ponad 8-krotnie, tj. z 505 430 do 5,2 miliona przypadków. Najwyższe wskaźniki zachorowalności obserwuje się w Azji (75%), Ameryce Łacińskiej i Afryce [WHO: https://www.who.int/health-topics/dengue-and-severe-dengue/dengue---timor-leste#tab=tab_2]. Większość przypadków dengi przebiega bezobjawowo lub charakteryzuje się łagodnymi objawami. Jednak może ona również objawiać się jako ciężka choroba grypopodobna charakteryzująca się wysoką gorączką, silnym bólem głowy, bólem mięśni i stawów, nudnościami, wymiotami, powiększonymi węzłami chłonnymi i wysypką. Co więcej, u niektórych osób może rozwinąć się ciężka postać gorączki denga, która może powodować krwawienie, uszkodzenie narządów, a nawet prowadzić do śmierci [WHO: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>, Halstead i Cohen 2015].

Po pokluciu przez komara przenoszącego DENV, komórki dendrytyczne (DC) i komórki Langerhansa skóry jako pierwsze ulegają zakażeniu; za ich pośrednictwem wirus dociera następnie do węzłów chłonnych [Cerny i wsp. 2014] zawierających komórki docelowe, takie jak monocyty, makrofagi i limfocyty [Jessie i wsp. 2004]. Stwierdzono, że

geny komórek dendrytycznych, takie jak RIG-I i MDA5, indukują wydzielanie IL-1 β , IL-6 i TNF- α , a także CCL2, CCL3 i CCL4, w odpowiedzi na produkty replikacji RNA DENV [Sprockholt i wsp. 2017]. Zwiększoną produkcję IL-6 stwierdzono również u dzieci hospitalizowanych z powodu zapalenia mózgu wywołanego wirusem dengi [Li i wsp. 2017]. Obecnie znanych jest pięć serotypów wirusa dengi, tj. DENV 1, DENV2, DENV3, DENV4 i DENV5 [Dwivedi i wsp. 2017, DeLano 2002]. Zakażenie którymkolwiek z nich zapewnia trwałą ochronę przed tym samym szczepem wirusa, podczas gdy wtórne zakażenie innym szczepem może powodować zjawisko patologiczne znane jako wzmocnienie zależne od przeciwciał (ADE), które prowadzi do ciężkich objawów choroby. Powodem tego jest fakt, że przeciwciała wytworzone podczas pierwszej infekcji wiążą się z wirusem innego szczepu, ale nie neutralizują go, podczas gdy opłaszczone przeciwciałami nieneutralizujące DENV ułatwiają wejście do komórek fagocytarnych promowanych przez nadekspresję receptorów Fc γ [Klimstra i wsp. 2005]. Co więcej, komórki T z poprzednich infekcji DENV mogą przyczyniać się do nieskuteczności w eliminacji komórek zakażonych wirusem, podobnie jak wydzielanie cytokin, takich jak IL-6 i IL-10, podczas gdy poziomy IL-12 i IFN- γ są regulowane w dół, a sygnały wyzwalane przez interakcje cytokina-receptor aktywują STAT-1 i IRF-1. Skutkuje to aktywacją transkrypcji genu iNOS i zwiększonym wytwarzaniem tlenku azotu (NO), co prowadzi do silnej supresji anty-DENV przez RFT. Sytuacja ta jest obserwowana szczególnie w przypadku ciężkiej wtórnej infekcji [Chareonsirisuthigul i wsp. 2007]. W badaniach *in vitro* wykazano, że hamowanie aktywności niestrukturalnego białka NS5 wirusa dengi przez tlenek azotu prowadzi do zmniejszenia replikacji DENV [Takhampunya i wsp. 2006]. W związku z tym zasugerowano, że NO działa jako ważny mediator immunologiczny przeciwko zakażeniu wirusem dengi, a jego poziomy mogą być przez niego regulowane. Jednak w zakażeniu ADE poziomy IL-12 i IFN- γ są zmniejszone, co prowadzi do zwiększonej ekspresji IL-10, która działa jako czynnik autokryny i wiąże się ze specyficznym receptorem, powodując hamowanie aktywacji STAT-1 i IRF-1, zmniejszając w ten sposób wytwarzanie NO [Chareonsirisuthigul i wsp. 2007]. Jednak inne niestrukturalne białko wirusa dengi, NS1, moduluje patogenezę Dengi poprzez bezpośrednią aktywację monocytów/makrofagów do wydzielania cytokin, które poprzez zaburzenie integralności śródbłonna zwiększają jego przepuszczalność, prowadząc do krwotoku [Beatty i wsp. 2015]. Odpowiedź immunologiczna na zakażenie DENV rozpoczyna się od produkcji przeciwciał, a następnie wydzielania IFN typu I, cytokin i chemokin (CXCL10, CXCL11, IL-6, CCL3, CCL5) [Sierra i wsp. 2014, Dalrymple i wsp. 2012] w celu prezentacji antygenów komórkom T. Z drugiej strony stwierdzono, że stres oksydacyjny zależny od NOX aktywuje, w ramach swojego działania przeciwwirusowego, czynniki regulatorowe IRF-3 i IRF-7, transduktor sygnału i aktywator transkrypcji 1 (STAT-1) oraz czynnik transkrypcyjny NF- κ B w komórkach B, co jest związane z poważnym uszkodzeniem komórek zakażonych wirusem [Olagnier i wsp. 2014]. Co więcej, wysoki poziom krążących cytokin prozapalnych, takich jak IL-1 β lub TNF- α , stwierdzony w organizmach pacjentów, również koreluje z cięższym przebiegiem choroby u pacjentów zakażonych DENV (Ryc.5) [Jaiyen i wsp. 2009].



Rycina 5. Zmiany metaboliczne w komórkach skóry (in vivo i in vitro), krwi i OUN podczas zakażenia wirusem dengi (DENV).

Takiej odpowiedzi sprzyja niestrukturalne białko NS2B, które zwiększa replikację wirusa i ekspresję genów zapalnych lub apoptotycznych, prowadząc do postępującego wzrostu stanu zapalnego i śmierci zakażonych komórek [Ferrari i wsp. 2020]. W związku z tym zarówno stres oksydacyjny, jak i wrodzona odpowiedź immunologiczna determinują nasilenie choroby dengi. Wykazano, że zakażenie ludzkich komórek śródbłonka mikronaczyniowego mózgu (HBMEC) wirusem dengi aktywuje oksydazę NADPH, co zwiększa wytwarzanie RFT. Zwiększenie wydzielania chemokin i cytokin zapalnych (CCL5, IL-6 i IL-8), nasila replikację wirusa i indukuje śmierć komórek, przyczyniając się w ten sposób do zwiększonej przepuszczalności śródbłonka [Monteiro Meuren i wsp. 2022]. Ponadto, reagując ze składnikami komórek gospodarza, RFT powodują np. wzrost peroksydacji lipidów ze wzrostem poziomu dialdehydu malonowego (MDA) obserwowanego w osoczu pacjentów [Soundravally i wsp. 2014]. Odkrycia te wskazują na jednoznaczny związek między stanem zapalnym i stresem oksydacyjnym a rozwojem ciężkiej postaci dengi [Soundravally i wsp. 2014]. Co więcej, równoległa aktywacja w komórkach dendrytycznych szlaków antyoksydacyjnych regulowanych przez czynnik transkrypcyjny Nrf2 może, poprzez próbę utrzymania homeostazy redoks, przyczyniać się do kontroli odpowiedzi przeciwwirusowej i apoptotycznej [Olagnier i wsp. 2014]. Jednak badania *in vitro* na ludzkich monocytarnych komórkach dendrytycznych wykazały, że wirus dengi, podobnie jak inni członkowie rodziny Flaviviridae, może wykorzystywać niestrukturalne białka wirusowe do zakłócania lub degradacji krytycznych składników sygnalizacyjnych w celu obejścia odpowiedzi przeciwwirusowej. Stwierdzono, że białko niestrukturalne NS2B zmniejsza aktywność Nrf2, prowadząc do zahamowania genów białek przeciwutleniających i stopniowego wzrostu poziomu RFT [Ferrari i wsp. 2020]. Potwierdzają to badania na myszach zakażonych DENV wykazujące, że podczas infekcji można zaobserwować wzrost poziomu RFT z jednoczesnym spadkiem wewnątrzkomórkowej aktywności GSH, SOD

i CAT, co prowadzi do stresu oksydacyjnego ze zwiększoną peroksydacją lipidów, ocenianą na podstawie poziomów MDA i aktywacji NF- κ B. Spowodowało to wzrost poziomu TNF- α i IL-6 w surowicy myszy zakażonych DENV, co zwiększa replikację wirusa dengi [Wang i wsp. 2013]. Z drugiej strony stwierdzono, że suplementacja myszy glutationem prowadzi do zwiększenia zdolności antyoksydacyjnych poprzez zwiększenie aktywności SOD i CAT oraz hamowanie peroksydacji lipidów, a także zmniejszenie aktywacji NF- κ B przy zmniejszonym wydzielaniu czynników prozapalnych, w tym TNF- α i IL-6 [Wang i wsp. 2013; Tian i wsp., 2010]. Interesujący jest wpływ wirusa dengi na procesy metaboliczne w komórkach docelowych. Wirus ten wykorzystuje rezerwy lipidowe komórki gospodarza, które są przechowywane w kropelkach lipidowych, które są degradowane w celu uwolnienia kwasów tłuszczowych za pomocą mechanizmu autofagii. Kwasy te ulegają utlenieniu, co napędza cykl kwasów trkarboksylowych, który dostarcza ATP i TCA potrzebne do replikacji wirusa [Heaton i Randall 2010].

3.3. Wirus Zika

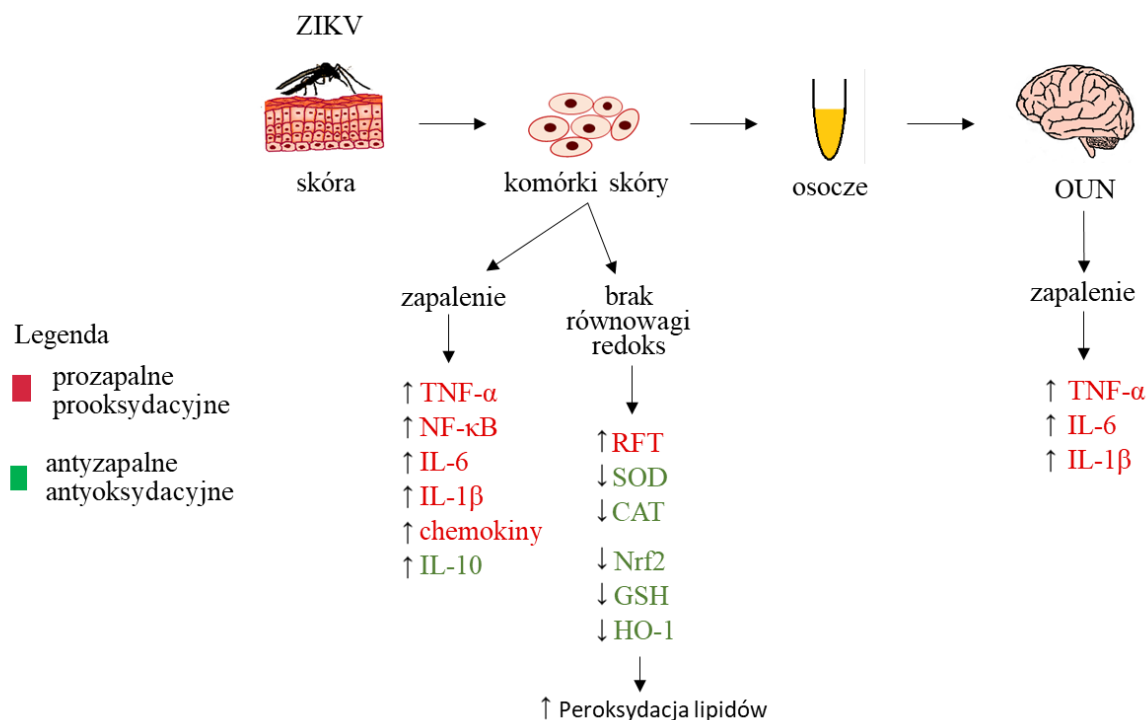
Wirus Zika (ZIKV) jest flawiwirusem przenoszonym przez komary z rodzaju *Aedes*. Zaobserwowano jednak również przenoszenie okołoporodowe poprzez kontakty seksualne oraz obecność ZIKV w mleku [Oliveira i wsp. 2016, Dupont-Rouzeyrol i wsp. 2016, Musso i wsp. 2015]. Początkowe infekcje wirusem ZIKA charakteryzowały się łagodnym przebiegiem. Jednakże, pierwszy wybuch epidemii spowodowany zakażeniem wirusem Zika wystąpił na wyspie Yap (Sfederowane Stany Mikronezji) w 2007r, podczas gdy kolejny wybuch odnotowano w latach 2013-2014 w Polinezji Francuskiej [WHO: https://www.who.int/newsroom/factsheets/detail/zikavirus?gclid=CjwKCAjwzuuqgBhAcEiwAdj5dRtsigH_XKpDEufCGTodNW1RRasHGD__iQvBhzJbbd2GJ0vltreZF8xoCZ5wQAvD_BwE].

Ponadto w 2015 r. WHO otrzymała pierwsze doniesienia o zlokalizowanych zakażeniach w Brazylii, a w październiku odnotowano pierwsze przypadki małogłowia u niemowląt matek narażonych na zakażenie wirusem ZIKV w czasie ciąży. Szybkie rozprzestrzenianie się infekcji w obu Amerykach doprowadziło WHO do ogłoszenia w lutym 2016 r., że zakażenie wirusem Zika związane z małogłowiem noworodków i innymi zaburzeniami neurologicznymi jest stanem zagrożenia zdrowia publicznego o zasięgu międzynarodowym [Kindhauser i wsp. 2016]. Obecnie wiadomo, że objawy kliniczne klasycznej choroby Zika charakteryzują się gorączką, wysypką, zapaleniem spojówek, bólem stawów i bólem głowy (CDC: <http://www.cdc.gov/zika/symptoms/index.html>) i może im towarzyszyć zespół Guillaina-Barrégo, ostre zapalenie rdzenia, zapalenie mózgu i rdzenia, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i zapalenie mózgu oraz polineuropatia czuciowa [da Silva i wsp. 2017, Olganier i wsp. 2016]. Po pokłuciu przez zakażonego komara wirus Zika, podobnie jak inne flawiwirusy, infekuje komórki dendrytyczne, gdzie następnie replikuje się i rozprzestrzenia przez krew do innych narządów [Sun i wsp. 2017]. ZIKV najpierw wiąże się z receptorami komórkowymi specyficznymi dla flawiwirusa, które obejmują DC-SIGN i białka receptora fosfatydyloseryny [Hamel i wsp. 2015]. Receptory te ułatwiają wejście ZIKV do makrofagów, monocytów, neuronalnych komórek progenitorowych (NPC) i komórek płodowych, powodując adhezję, migrację, replikację i unikanie odporności, a także

uwalnianie cytokin [Hamel i wsp. 2015]. W fibroblastach skóry ZIKV indukuje ekspresję receptorów rozpoznawania wzorców (PRR), takich jak TLR3, RIG-1 i MDA5, wzmacniając odpowiedź przeciwwirusową przeciwko zakażeniu ZIKV [Hamel i wsp., 2015]. Jednak badania z wykorzystaniem ludzkich embrionalnych komórek nerkowych wykazały, że białka NS2A i NS4A hamują aktywność promotora NF- κ B poprzez hamowanie czynników sygnalizacyjnych zaangażowanych w szlak sygnałowy MDA5/RIG-I [Lee i wsp. 2020].

Wczesną odpowiedzią na infekcję jest przeciwwirusowe działanie interferonu typu I (IFN) wytwarzanego przez komórki ssaków [Schneider i wsp. 2014]. Białka niestrukturalne wirusa Zika, takie jak NS1 i NS4B, mogą hamować produkcję IFN typu I, podczas gdy NS2B i NS3, tj. NS2B-NS3, hamują sygnalizację JAK-STAT poprzez promowanie degradacji Jak1 [Wu i wsp. 2017]. INF typu I przekazuje sygnał poprzez kinazy Janus (Jak1 i Tyk2) i transduktory sygnału transkrypcji (STAT1 i STAT2), prowadząc do indukcji genu stymulowanego interferonem (ISG), który ustanawia stan antywirusowy komórek, z hamowaniem sygnalizacji JAK-STAT promującej replikację wirusa [Wu i wsp. 2017]. Wykazano również, że zakażenie ZIKV ludzkich monocytów aktywuje sygnalizację TLR2, prowadząc do aktywacji NF- κ B i silnej odpowiedzi prozapalnej zależnej od NF- κ B, ze zwiększoną produkcją TNF- α , IL-1 β , IL-6 i IL-10 w monocytach zakażonych ZIKV, które mogą być zaangażowane w kontrolę proliferacji ZIKV. Towarzyszy temu również zwiększona ekspresja cytokin zależnych od STAT i chemokin CC, w tym IL-7, IL-15, CCL2, CCL3, CC15 i CCL7 w monocytach zakażonych ZIKV [Hernández-Sarmiento i wsp. 2023]. Badania na myszach zakażonych ZIKV wykazały również wysoki poziom TNF- α , IL-6 i IL-1 β w mikrogleju zwierząt [Wang i wsp. 2018]. Ponadto zakażenie ZIKV indukuje odpowiedź przeciwwirusową w celu kontrolowania replikacji wirusa w sposób niezależny od IFN, poprzez indukowanie ekspresji IL-27 [Hernández-Sarmiento i wsp. 2023].

Zakażenie ZIKV prowadzi do zwiększenia produkcji RFT przez organizm w celu zwalczania infekcji, z jednoczesnym zahamowaniem aktywacji antyoksydacyjnego czynnika transkrypcyjnego Nrf2 i towarzyszącym mu obniżeniem ekspresji genów białek antyoksydacyjnych i ich biosyntezy (HO-1 SOD i CAT) [Almeida i wsp. 2020], a także obniżeniem poziomu GSH [Sahoo i wsp. 2023]. Obniżenie poziomu i aktywności oksygenazy hemowej-1, ze względu na jej udział w ograniczaniu replikacji ZIKV, sprzyja skutecznemu zakażeniu gospodarza przez ZIKV [Huang i wsp. 2017]. Zwiększone wytwarzanie RFT przy zmniejszonej zdolności antyoksydacyjnej prowadzi do stresu oksydacyjnego z nasiloną peroksydacją lipidów i zwiększonym poziomem jej biomarkera, tj. MDA [Almeida i wsp. 2020]. Z drugiej strony, zmniejszona wydajność czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w zakażeniu ZIKV, która zwykle odpowiada zwiększonej wydajności prozapalnego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, jest widoczna w zwiększonym wytwarzaniu cytokin prozapalnych, takich jak TNF- α i IL-6, IL1 β , które rekrutują inne typy komórek do zakażonej tkanki i aktywując je, zaostrzają stan zapalny. Ponadto mediatory te mogą również przyczyniać się do aktywacji szlaków śmierci komórkowej i dalszej indukcji stresu oksydacyjnego, co sprzyja oksydacyjnym modyfikacjom lipidów i białek, powodując dodatkowe zaburzenia metaboliczne w organizmie pacjenta (Ryc. 6) [Almeida i wsp. 2020, Tricarico i wsp. 2017].



Rycina 6. Zmiany metaboliczne zachodzące in vivo i in vitro w komórkach i ośrodkowym układzie nerwowym podczas zakażenia wirusem Zika (ZIKV).

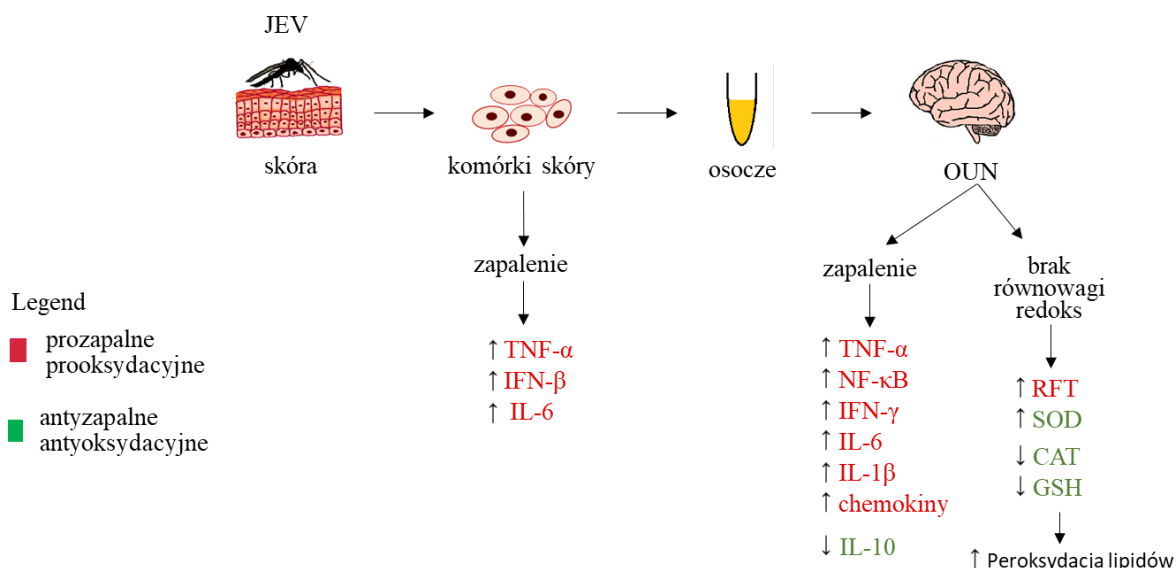
Ponadto w komórkach nerwowych ZIKV zwiększa ekspresję białek śmierci komórkowej, w tym: ZBP1, RIPK 1 i 3. Zainfekowane wirusem komórki nerwowe wyrażają gen odpowiedzi immunologicznej 1 (IRG1), którego produkt wytwarza itakonian z cisa-konitu, składnika cyklu TCA, który hamuje dehydrogenazę bursztynianową (SDH), utrzymując w ten sposób odpowiedni poziom bursztynianu, który zachowuje komórki nerwowe przy życiu. Zahamowanie aktywności SDH jednocześnie hamuje replikację ZIKV [Daniels i wsp. 2019].

3.4. Wirus japońskiego zapalenia mózgu

Wirus japońskiego zapalenia mózgu (JEV) jest flawiwirusem przenoszonym przez komary z rodzaju *Culex*, który wywołuje japońskie zapalenie mózgu wśród ludzi w krajach azjatyckich z szacowaną liczbą 68 000 przypadków klinicznych każdego roku, w tym 14 000-20 000 zgonów. Jednocześnie 30-50% osób, które przeżyły chorobę, ma trwałe następstwa neurologiczne lub psychiatryczne [WHO: <https://www.who.int/newsroom/factsheets/detail/japanese-encephalitis>]. JEV jest wysoce neuroinwazyjnym patogenem z objawami od łagodnej gorączki do aseptycznego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych lub zapalenia mózgu, objawiającymi się zaburzeniami czucia, drgawkami i ogniskowymi deficytami neurologicznymi z ostrym porażeniem wiotkim, które może wynikać z zajęcia komórek rogów przednich, przy czym 20-60% pacjentów wykazuje różnorodne zaburzenia ruchowe, zwłaszcza przejściowe cechy parkinsonizmu i dystonii [Misra i wsp. 2010].

Stwierdzono, że JEV wprowadzony do organizmu ludzkiego replikuje się najpierw w komórkach dendrytycznych i makrofagach; następnie jest przenoszony do lokalnych węzłów chłonnych [Wang i wsp. 2017], a stamtąd, za pomocą nowo wygenerowanych wirionów lub migrujących zakażonych komórek odpornościowych, w tym komórek dendrytycznych i limfocytów T - wirus rozprzestrzenia się do mózgu [Wang i wsp. 2017].

Badania na myszach wykazały, że JEV wywołuje stan zapalny, który zakłóca integralność bariery krew-mózg, a w konsekwencji zwiększa poziom mediatorów stanu zapalnego w mózgu należących do odpowiedzi immunologicznej Th1, a także chemokin i cytokin, w tym CXCL10, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, TNF- α , IL-6 i IFN- γ w OUN. Natychmiast po zakażeniu dochodzi do regulacji w górę ligandu chemokiny z motywem C-X-C 10 (CXCL10) i IFN γ , który indukuje ekspresję CXCL10, przy czym największe ilości mediatorów stanu zapalnego obserwuje się tuż przed przerwaniem bariery krew-mózg [Li i wsp. 2015]. Z kolei aktywowane przez JEV mikroglej uwalniają TNF- α i IL-1 β , które mogą zapewnić ochronę przed infekcją ośrodkowego układu nerwowego, ale mogą powodować śmierć neuronów [Chen i wsp. 2010]. Ponadto badania na myszach wykazały, że zakażenie JEV indukuje ekspresję receptorów TLR3 i RIG-I w mikrogleju zakażonych zwierząt, które zapewniają pierwszą linię obrony w przeciwwirusowej odpowiedzi immunologicznej poprzez uwalnianie cytokin i chemokin. Ponadto stwierdzono, że interakcja wirusowego RNA z TLR3 i RIG-I prowadzi do aktywacji czynnika jądrowego NF- κ B i indukcji ekspresji prozapalnych cytokin i chemokin, takich jak TNF- α , IL-6 i ligand chemokiny 2 (CCL2) [Jiang i wsp. 2014]. W badaniach *in vitro* wykazano również, że po infekcji wirusowej ludzkich lub świńskich DC można zaobserwować wzrost produkcji TNF i IFN- β [García-Nicolás i wsp. 2019] (ryc. 7).



Rycina 7. Zmiany metaboliczne zachodzące *in vivo* i *in vitro* w komórkach i ośrodkowym układzie nerwowym podczas zakażenia wirusem japońskiego zapalenia mózgu (JEV).

Ponadto wykazano, że JEV wywołuje odpowiedź zapalną, która sprzyja zwiększonemu poziomowi RFT w mikrogleju zwierzęcym [Ghoshal i wsp. 2007], co

prowadzi do zwiększonej aktywności głównego przeciwutleniacza, SOD, w komórkach glejowych mózgu.

Dokładny mechanizm indukcji SOD nie jest znany, ale sugeruje się, że może ona stanowić odpowiedź na silny mediator stanu zapalnego lub może być mechanizmem kompensacyjnym w celu zmniejszenia poziomu anionorodnika ponadtlenkowego, którego zwiększone ilości wykryto w komórkach zakażonych JEV [Liao i wsp. 2002]. Ponadto zakażenie JEV zmniejsza ekspresję tioredoksyny w ludzkich komórkach promonocytów [Yang i wsp. 2010], podczas gdy zakażenie JEV u szczurów sprzyja również zmniejszeniu aktywności CAT, GPx i GSH w mózgu, co zakłóca homeostatyczną równowagę redoks podczas infekcji i pogarsza warunki oksydacyjne, które promują peroksydację lipidów i wynikający z niej wzrost poziomu MDA [Kumar i wsp. 2009]. Wykazano również, że zakażenie JEV wiąże się z aktywacją mikrogleju u zwierząt, co skutkuje zwiększonym poziomem różnych mediatorów prozapalnych, takich jak indukowana syntaza tlenu azotu (iNOS), cyklooksygenaza 2 (COX 2), IL-6, IL-1b, TNF- α i białko chemoatraktantu monocytów 1 (MCP-1) [Ghoshal i wsp. 2007]. Podczas infekcji JEV obserwuje się obniżony poziom cytokiny przeciwzapalnej IL-10 w OUN, która promuje przeżycie neuronów i wszystkich komórek glejowych w mózgu poprzez blokowanie działania cytokin prozapalnych i promowanie ekspresji sygnałów przeżycia komórek [Swarup i wsp. 2007]. Ponadto, badania *in vitro* na ludzkich komórkach neuroblastoma zakażonych JEV wykazały upośledzoną β -oksydację PUFAs i zwiększoną ekspresję IL-6 i TNF- α . Stwierdzono również, że białko niestrukturalne 5 (NS5) JEV oddziałuje z podjednostkami α i β dehydrogenazy hydroksyacylo-CoA, dwoma składnikami mitochondrialnego białka trójfunkcyjnego (MTP) zaangażowanego w β -oksydację i zakłóca katabolizm PUFAs [Kao i wsp. 2015]. Uważa się, że nagromadzone PUFAs mogą wywoływać stres oksydacyjny w OUN, a także aktywację NF- κ B, a w konsekwencji zwiększoną produkcję cytokin prozapalnych, które przyczyniają się do patogenezy JEV. Zasugerowano ponadto, że ułatwia to proliferację i rearanżację błon w komórkach zakażonych JEV i prawdopodobnie przyczynia się zarówno do strukturalnych, jak i metabolicznych uszkodzeń komórek mózgu związanych z japońskim zapaleniem mózgu [Kao i wsp. 2015]. Ponadto badania *in vitro* z wykorzystaniem komórek nerki chomika wykazały, że białko NS5 może hamować ekspresję IFN- β poprzez hamowanie czynnika regulacyjnego IFN 3 (IRF3) i NF- κ B [Ye i wsp. 2017]. W konsekwencji, podczas infekcji JEV, chociaż inicjacja odpowiedzi immunologicznej przez komórki jest ważnym mechanizmem ochronnym OUN, nasilenie procesów prozapalnych, a w konsekwencji zaburzenie równowagi redoks sprzyja śmierci neuronów, co może skutkować nieodwracalnym uszkodzeniem mózgu.

3.5. Wirus kleszczowego zapalenia mózgu

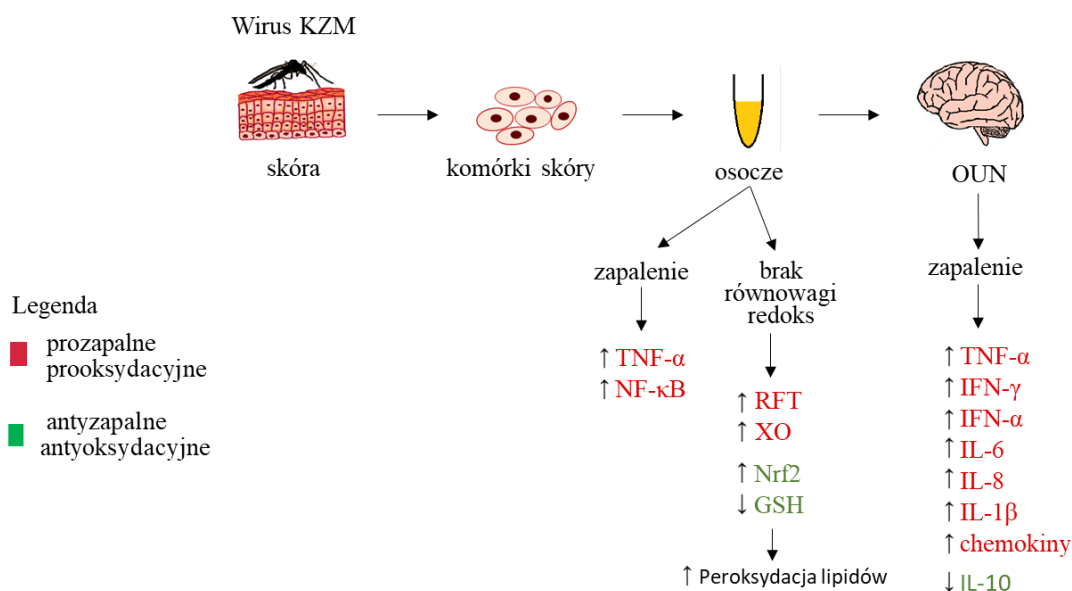
Wirus kleszczowego zapalenia mózgu (wirus KZM) jest flawiwirusem przenoszonym przez kleszcze. W rzadkich przypadkach do zakażenia może dojść drogą pokarmową, poprzez spożycie niepasteryzowanego mleka od zakażonych kóz, owiec lub krów. KZM powoduje kleszczowe zapalenie mózgu (KZM), które jest infekcją ośrodkowego układu nerwowego występującą w Europie i kilku regionach Azji. Chociaż chorobie można zapobiegać poprzez szczepienia, w ciągu ostatnich kilku dekad częstość jej występowania znacznie wzrosła, co

w konsekwencji stanowi rosnący problem zdrowotny w krajach europejskich i azjatyckich. Ponadto, w wyniku zwiększonego przemieszczania się ludzi, kleszczowe zapalenie mózgu staje się również problemem w innych regionach świata [WHO: https://www.who.int/health-topics/tick-borne-encephalitis#tab=tab_1].

Większość zakażeń wywołanych przez wirusa KZM przebiega bezobjawowo, natomiast jeśli choroba wystąpi to jej przebieg z reguły jest dwufazowy. Okres inkubacji kleszczowego zapalenia mózgu trwa zwykle 7-14 dni, po czym w ciągu kolejnych 1-8 dni pojawiają się typowe objawy przeziębienia z gorączką i złym samopoczuciem. Jednak u około 15% pacjentów wirus KZM dociera do ośrodkowego układu nerwowego, powodując zapalenie opon mózgowych, zapalenie mózgu, zapalenie rdzenia lub zapalenie korzonków nerwowych [WHO: https://www.who.int/health-topics/tick-borne-encephalitis#tab=tab_2]. Nawet po zakończeniu leczenia wielu pacjentów cierpi z powodu utrzymujących się objawów, takich jak ataksja, bóle głowy i zaburzenia koncentracji. ([Kohlmaier i wsp. 2021], WHO: https://www.who.int/health-topics/tick-borne-encephalitis#tab=tab_2). Po pokłuciu przez kleszcza zakażonego wirusem KZM, wirus replikuje się najpierw w komórkach skóry właściwej, a następnie w komórkach Langerhansa, makrofagach i neutrofilach [Labuda i wsp. 1996]. Rozpoznanie wirusa przez wrodzony układ odpornościowy prowadzi do migracji komórek dendrytycznych (DC) do pierwotnego miejsca zakażenia. Po zakażeniu komórki te ulegają aktywacji i przenoszą wirusa przez układ limfatyczny do regionalnego węzła chłonnego, a następnie do innych narządów.

Z drugiej strony, wprowadzenie wirusa KZM do organizmu wraz z mlekiem prowadzi do replikacji wirusa w komórkach nabłonka jelitowego, a następnie zakażenia komórek dendrytycznych [Dörrbecker i wsp. 2010]. W przypadku niewystarczającego miana przeciwciał, które specyficznym neutralizują wirusa, dochodzi do zakażenia OUN. Sposób, w jaki wirus KZM dostaje się do mózgu nie jest w pełni poznany, ale sugeruje się, że może to zrobić bez niszczenia bariery krew-mózg. Badania na pierwotnych ludzkich komórkach śródbłonki mikronaczyniowego mózgu (HBMEC) wykazały, że komórki zakażone wirusem KZM wytwarzają wysokie miana wirusa i promują wnikanie wirusa do mózgu bez zakłócania integralności bariery krew-mózg [Palus i wsp. 2017]. Zamiast tego badania na myszach wykazały, że wzrost przepuszczalności bariery krew-mózg występuje w późniejszych stadiach infekcji, czemu towarzyszą poważne objawy kliniczne i wysokie miana wirusa w mózgu. Uważa się, że jest to konsekwencja nadprodukcji cytokin (TNF- α , IL-6, IFN- γ) w mózgu [Růžek i wsp. 2011]. Z drugiej strony w OUN wirus lokalizuje się w neuronach, co przyczynia się do procesu zapalnego objawiającego się dysfunkcją lub degradacją komórek poprzez lizę lub martwicę/apoptozę [Ruzek i wsp. 2009]. Infekcja neuronów prowadzi do migracji limfocytów T do OUN, z odpowiedzią cytotoksycznych limfocytów T niezbędną do usunięcia wirusa. W niektórych przypadkach może to jednak również prowadzić do zwiększonej immunopatogenezy i uszkodzenia neuronów [Negash i wsp. 2013]. Komórki gospodarza mają kilka strategii obrony przed infekcją wirusową. Wirus KZM indukuje wrodzoną i adaptacyjną odpowiedź immunologiczną w miejscu zakażenia; jednak wirus opracował różne strategie blokowania wrodzonej odpowiedzi immunologicznej gospodarza, umożliwiając wirusowi skuteczną replikację w pierwotnie zakażonych komórkach. Działania te obejmują białko NS5, które uważa się za antagonistę interferonu typu I (IFN). Poprzez hamowanie szlaku sygnałowego JAK/STAT, czyni ono zainfekowane komórki odpornymi na

IFN typu I [Werme i wsp. 2008]. Jednak cytokiny prozapalne, takie jak TNF- α , IFN α , IL-1 β , IL-6 i IL-8 [Pokorna Formanova i wsp. 2019] oraz chemokiny, takie jak CXCL10, CXCL11, CXCL12 i CXCL13 (ryc.8) [Zajkowska i wsp. 2011], są również wykrywane w płynie mózgowo-rdzeniowym osób zakażonych wirusem KZM.



Rycina 8. Zmiany metaboliczne zachodzące we krwi i ośrodkowym układzie nerwowym podczas zakażenia wirusem kleszczowego zapalenia mózgu (wirus KZM).

IL-10 jest podwyższona w początkowej fazie kleszczowego zapalenia mózgu, ale w ciężkim przebiegu choroby, zwłaszcza w późniejszych dniach zakażenia, poziomy IL-10 w płynie mózgowo-rdzeniowym pacjentów zakażonych wirusem KZM są obniżone, co może przyczyniać się do zmniejszenia syntezy IFN- γ i działać jako stymulator immunosupresji promujący hamowanie kaskady cytokin prozapalnych typu 1. Ponadto, niski poziom IL-10 może skutkować wzrostem aktywności mediatorów prozapalnych, takich jak TNF- α , IL-6 i IFN- γ , co może sprzyjać cięższemu przebiegowi kleszczowego zapalenia mózgu i promować zmniejszoną produkcję przeciwciał przeciwko kleszczowemu zapaleniu mózgu [Günther i wsp. 2011]. Zwiększonej odpowiedzi prozapalnej u pacjentów zakażonych wirusem KZM towarzyszy zwykle nadprodukcja RFT, która powinna być kompensowana przez aktywację jednego z najważniejszych mechanizmów antyoksydacyjnych, tj. szlaku Nrf2/ARE [Kuzmenko i wsp. 2016].

Choroby przenoszone przez kleszcze stanowią poważny problem medyczny ze względu na ich powszechne występowanie oraz problemy diagnostyczne (brak specyficznych objawów) i w konsekwencji trudności terapeutyczne. Niezależnie jednak od objawów klinicznych, choroby te charakteryzują się zwykle zaburzeniami metabolicznymi związanymi ze stanem zapalnym i zaburzoną równowagą redoks. W związku z tym stale poszukuje się związku pomiędzy rodzajem patogenu/patogenów, a zmianami metabolicznymi i stanem chorobowym pacjenta, mając nadzieję na poprawę efektywności diagnostycznej oraz skuteczności rozwiązań terapeutycznych.

II. Założenia i cel pracy

Kleszcze żyjące w środowisku człowieka, mogą być nosicielami wielu patogenów, w tym wirusa kleszczowego zapalenia mózgu (wirus KZM), oraz bakterii takich jak: *Borrelia burgdorferi* i *Anaplasma phagocytophilum*. Ze względu na zmiany klimatyczne sprzyjające zwiększającej się liczbie kleszczy w środowisku naturalnym człowieka obserwuje się coraz więcej infekcji oraz koinfekcji powodowanych przez te mikroorganizmy, co stanowi problem zarówno diagnostyczny jak i terapeutyczny. Wiadomo, że w odpowiedzi na inwazję patogenów organizm gospodarza aktywuje leukocyty, które produkują duże ilości reaktywnych form tlenu i azotu (RFT i RFA), co wzmacnia obronę immunologiczną gospodarza przed patogenami. Ponadto, zakażeniu towarzyszy zwykle zmniejszenie efektywności endogennych antyoksydacyjnych mechanizmów obronnych, a sytuacja ta sprzyja rozwojowi stresu oksydacyjnego. Zaburzenie równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej przez patogeny, prowadzi do modyfikacji zarówno metabolizmu komórkowego, jak i sygnalizacji wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej.

Jednocześnie jednak stres oksydacyjny odgrywa podwójną rolę w chorobach zakaźnych, ponieważ RFT modyfikują zarówno podatność, jak i odporność organizmu gospodarza na infekcje. Jednak nadprodukcja RFT sprzyja cytotoksyczności i modyfikacjom związków endogennych oraz ich metabolitów w komórkach/tkankach gospodarza, w tym płynach biologicznych, ale sugeruje się również, że RFT biorą udział w konkurencji między patogenami. Może to zatem wskazywać na potencjalny mechanizm ochrony organizmu gospodarza w przypadku infekcji wielopatogenowej.

W konsekwencji celem pracy było porównanie zmian metabolicznych w osoczu krwi oraz granulocytach/limocytach pacjentów zakażonych wirusem KZM oraz pacjentów z koinfekcjami bakteryjnymi powodowanymi przez *Borrelia burgdorferi* i *Anaplasma phagocytophilum*.

Szczegółowe cele pracy dotyczyły oceny:

- parametrów równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej na poziomie RFT, w tym aktywności oksydazy ksantynowej oraz efektywności czynnika transkrypcyjnego Nrf2 i jego otoczenia oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych
- konsekwencji zaburzenia równowagi redoks poprzez ocenę procesu peroksydacji lipidów, w tym poziomu drobnocząsteczkowego elektrofilowego aldehydu 4-HNE i produktów oksydacyjnej cyklizacji oraz wpływu stresu na podstawowe modyfikacje struktury białek
- skutków zaburzonej równowagi redoks poprzez ocenę zmian aktywności enzymów lipolitycznych i w konsekwencji zmiany poziomu fosfolipidowych i wolnych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych oraz poziomu mediatorów lipidowych z grupy endokannabinoidów i eikozanoidów
- ekspresji receptorów związanych z białkiem G granulocytów modyfikowanych w wyniku działania endokannabinoidów oraz eikozanoidów
- parametrów stanu zapalnego na poziomie czynnika transkrypcyjnego NF- κ B w kontekście zmian w efektywności czynnika transkrypcyjnego Nrf2 oraz produktu efektywności

transkrypcyjnej NF- κ B – cytokiny TNF- α , w kontekście zmienionej w wyniku działania mediatorów lipidowych ekspresji receptorów błonowych związanych z białkiem G.

Celom szczegółowym niniejszych badań towarzyszyła ocena skuteczności działalności terapeutycznej, w odniesieniu do zmian metabolicznych we krwi pacjentów zakażonych wyłącznie wirusem kleszczowego zapalenia mózgu oraz pacjentów ze współzakażeniem bakteryjnym (*B. burgdorferi* i *A. phagocytophilum*) we wczesnej fazie choroby oraz po zakończeniu klasycznej farmakoterapii.

III. Materiały i metody

Materiały

Materiałem do badań była krew obwodowa pacjentów z KZM oraz koinfekcjami KZM i *Borrelia burgdorferi* lub *Anaplasma phagocytophilum* LD/HGA oraz osób zdrowych. Krew pobierano na antykoagulant (EDTA) celem pozyskania osocza oraz granulocytów. Protokół pobierania i wykorzystywania do badań próbek krwi został zatwierdzony przez Lokalną Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (Polska) nr RI-002/169/2018. Od wszystkich uczestników uzyskano pisemną, świadomą zgodę.

Próbki krwi pobrano od 40 pacjentów z kleszczowym zapaleniem mózgu (14 kobiet i 26 mężczyzn), średni wiek: 40 lat (23–58 lat) oraz od 6 pacjentów z koinfekcją KZM i innymi patogenami przenoszonymi przez kleszcze, w tym *Borrelia burgdorferi* (borelioza - choroba z Lyme (LD)) i *Anaplasma phagocytophilum* (ludzka anaplazmoza granulocytowa - HGA) (4 kobiety i 2 mężczyzn), mediana wieku: 42 lat (22–63 lata) leczonych w Klinice Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, Polska.

KZM rozpoznawano zgodnie z wytycznymi Europejskiej Akademii Neurologii (EAN) [EUR-Lex] na podstawie objawów klinicznych, dodatniego wyniku badań serologicznych i pleocytozy limfocytowej w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR).

Koinfekcje były rozpoznawane, jeśli u jednego pacjenta doszło do zakażenia co najmniej dwoma różnymi patogenami. LD definiowano na podstawie obrazu klinicznego rumienia wędrującego lub spełnienia kryteriów neuroboreliozy [Stanek i wsp., 2011, Mygland i wsp., 2010]. HGA rozpoznawano zgodnie z definicją przypadku CDC, gdy spełnione zostały wszystkie 3 kryteria [<https://wwwn.cdc.gov/nndss/conditions/ehrlichiosis-and-anaplasmosis/case-definition>, dostęp: 11 listopada 2019 r.]. Ponadto u dwóch pacjentów wykryto przeciwciała przeciwko *Borrelia burgdorferi* w klasie IgM i IgG i pacjenci byli leczeni z powodu prawdopodobnej neuroboreliozy. W czterech przypadkach na podstawie obrazu klinicznego, badań laboratoryjnych i PCR rozpoznano ludzką anaplazmozę granulocytarną, z czego u dwóch osób rozpoznano dodatkowo boreliozę. Podsumowując potrójna koinfekcja (KZM+borelioza+anaplazmoza) wystąpiła u dwóch osób, podwójna koinfekcja: KZM+borelioza rozpoznana została u dwóch osób i KZM+anaplazmoza wykryto u dwóch osób.

Pacjenci z KZM byli leczeni objawowo (leki przeciwiobrzękowe, przeciwzapalne, przeciwbólowe), chorzy z anaplazmozą otrzymywali doksycyklinę, zaś z boreliożą doksycyklinę lub ceftriakson.

Grupę kontrolną stanowiło 20 zdrowych dawców (7 kobiet i 13 mężczyzn, mediana wieku: 41 lat (28–55 lat)).

Krew pobierano dwukrotnie: przy przyjęciu pacjenta do szpitala oraz po zakończeniu leczenia. Średni czas pomiędzy tymi dwoma badaniami u pacjentów z KZM wynosił $29,4 \pm 10,99$ dni, minimalnie 7 dni, maksymalnie 52 dni, natomiast średni czas pomiędzy tymi dwoma badaniami u pacjentów współzakażonych wynosił $32,8 \pm 4,21$ dni, minimalnie 28 dni, maksymalnie 39 dni.

Próbki krwi pobierano do probówek z kwasem etylenodiaminotetraoctowym (EDTA) i przeprowadzono dwuetapowe wirowanie. W pierwszym etapie próbkę odwirowano przy 3000 x g (4°C) w celu oddzielenia osocza, kożuszka leukocyтарnego i erytrocytów. W celu uzyskania klarownej frakcji granulocytów uzyskany kożuszek leukocyтарny nałożono na Gradisol G (Aqua-Med ZPAM-KOLASA, Łódź, Polska) i poddano 25-minutowemu wirowaniu przy 300 x g w temperaturze pokojowej. W celu uzyskania klarownej frakcji limfocytów krew pełną nałożono na Gradisol L (Aqua-Med ZPAM-KOLASA, Łódź, Polska) i wirowano przez 25 minut przy 300 x g. Frakcję zawierającą limfocyty zebrano z warstwy Gradisol, przemyto trzykrotnie PBS (3 min wirowanie przy 300 x g) i ponownie zawieszono w PBS zawierającym mieszaninę inhibitorów proteazy. Komórki ze środkowej frakcji zebrano, przemyto i ponownie zawieszono w PBS zawierającym mieszaninę inhibitorów proteasomów. Czystość otrzymanych frakcji komórkowej oceniano mikroskopowo (Nikon Eclipse Ti, Nikon Instruments Inc., Nowy Jork, NY, USA). Do wszystkich próbek (osocza, granulocytów i limfocytów) dodano butylohydroksytoluen (BHT) jako przeciwutleniacz, aby zapobiec utlenianiu w czasie przechowywania próbek. Próbki przechowywano w temperaturze –80°C do czasu analizy.

Charakterystykę demograficzną i kliniczną pacjentów oraz grupy kontrolnej, a także porównanie ich danych laboratoryjnych przedstawiono w Tabeli 1 i Tabeli 2.

Tabela 1. Charakterystyka demograficzna i kliniczna pacjentów z zakażeniem wirusem KZM (KZM) i koinfekcją powodowaną przez wirusa KZM i bakteriami Bb/Ap w porównaniu do osób zdrowych.

	Kontrola	KZM	KZM+LB/HGA
Wiek (lata)	41 (28-55)	40 (23-58)	42 (22-63)
Płeć	5/20 kobiet (25%) 15/20 mężczyzn (75%)	14/40 kobiet (35%) 26/40 mężczyzn (65%)	4/6 kobiet (67%) 2/6 mężczyzn (33%)
Potwierdzone pokłucie przez kleszcza	0/20 (0%)	21/40 (52%)	5/6 (83%)
Czas od pokłucia przez kleszcza (dni)	-	26,8±16,6	17,58±4,95
Czas trwania hospitalizacji (dni)	-	12,85±2,6	12,34±1,97
Czas trwania objawów (dni)	-	7,5±6,9	4,26±2,63
Postać kliniczna			
Zapalenie opon mózgowych	0/20(0%)	25/40 (62,5%)	5/6 (83%)
Zapalenie opon i mózgu	0/20 (0%)	15/40 (37,5%)	1/6 (17%)
Zapalenie opon, mózgu i rdzenia	0/20 (0%)	0/40 (0%)	0/6 (0%)

Tabela 2. Porównanie danych laboratoryjnych pacjentów z zakażeniem wirusem KZM (KZM) i koinfekcją powodowaną przez wirusa KZM i bakteriami Bb/Ap przed oraz po leczeniu w porównaniu do osób zdrowych.

	Normy	KZM		KZM+LB/HGA	
		Przy przyjęciu	Po wyzdrowieniu	Przy przyjęciu	Po wyzdrowieniu
Pelna morfologia krwi					
WBC [$10^3/\mu\text{L}$]	4,00 – 10,00	10,16±2,37	6,11±1,48	7,27±1,36	5,37±1,46
Neutrofile [%]	40,0 – 72,0	73,77±9,52	51,18±7,93	60,33±7,07	42,58±11,58
Limfocyty [%]	18,00 – 48,00	16,2±7,76	34,83±6,35	27,37±6,11	42,72±11,24
Monocyty [%]	2,50 -10,00	8,99±2,53	9,79±2,15	10,15±2,61	9,56±3,18
RBC [$10^6/\mu\text{L}$]	4,00 – 5,50	4,40±0,43	4,50±0,32	4,28±0,56	4,14±0,62
HGB [g/dl]	12,00 – 16,00	13,32±1,28	13,68±1,09	12,67±1,26	12,5±1,39
PLT [$10^3/\mu\text{L}$]	130 - 350	251,44±87,43	270,59±134,4	262,67±66,98	218,4±19,42
CRP [mg/L]	0,00 – 5,00	11,52±15,61	0,93±0,54	2,35±2,08	0,81±0,26
Glukoza [mg/dL]	70 - 110	96,77±10,27	89,62±12,1	92,67±8,5	91,75±5,97
Kreatynina [mg/dL]	0,50 – 0,90	0,88±0,16	0,82±0,12	0,79±0,08	0,76±0,12
ALT [U/I]	0 – 31	21,10±19,17	24,17±17,20	17,75±11,27	12±5,24
AST [U/I]	0 - 32	15,59±5,26	22,42±9,23	17±3,67	16,33±3,21
Analiza PMR					
Cytoza [cells/ μl]	0-5	169,7±115,64	26,90±25,59	99±120,57	14,8±12,15
Białko [mg/dl]	15-45	75,95±20,56	54,46±26,32	69±58,49	48,2±27,74

Metody badawcze

Parametry prooksydacyjne

Ocena aktywności enzymu prooksydacyjnego

Aktywność oksydazy ksantynowej (XO; EC.1.17.3.2) oszacowano w osoczu jako szybkość wytwarzania kwasu moczowego z detekcji ksantyny przy długości fali 292 nm [Prajda i wsp. 1975]. Jedną jednostkę aktywności oksydazy ksantynowej zdefiniowano jako 1 μmol kwasu moczowego wytwarzanego na minutę (37°C). Aktywność enzymu wyrażono w jednostkach na ml osocza.

Ocena poziomu RFT

Analizie poddano 50 μl krwi i granulocyty/limfocyty uzyskane z 2 ml krwi pobranej do heparynizowanych kapilar. Spośród cząsteczek spinujących (inaczej znakowanych sondami) nadających się do wykorzystania biologicznego przyjęto 1-hydroksy-3-metoksykarbonylo-2,2,5,5-tetrametylopirolidynę (CMH, Noxygen Science Transfer & Diagnostics, Niemcy). Przygotowano 400 μM roztwór CMH w buforze (bufor Krebsa-Hepesa (KHB) zawierający 25 μM soli metanosulfonianowej deferoksaminy (DF) środka chelatującego i 5 μM trihydratu dietylotiokarbaminianu sodu (DETC) o pH 7,4. Krew i granulocyty/limfocyty w PBS zostały natychmiast potraktowane CMH (1:1) [Kuzkaya i wsp. 2003] 50 μl otrzymanego roztworu umieszczono w szklanej rurce kapilarnej EPR,

która została umieszczona we wnęce spektrometru e-scan (Noxygen GmbH/Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Niemcy) w celu gromadzenia danych. Utlenianie CMH prowadzi do powstania paramagnetycznego nitrotenku 3-metoksykarbonyloproksylu (CM•). Poziomy RFT wyrażono w nmol/ml.

Parametry antyoksydacyjne

Oznaczanie statusu antyoksydacyjnego (TAS)

Całkowity status antyoksydacyjny (TAS) określono spektrofotometrycznie (734 nm) przy użyciu kwasu 2,2'-azino-bis-3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego (ABTS) [Lee i wsp. 2017], a TAS wyrażono jako μmol Troloxu/ml.

Oznaczanie antyoksydantów enzymatycznych

Aktywność peroksydazy glutationowej (GSHPx–EC.1.11.1.6) w osoczu mierzono spektrofotometrycznie (340 nm) metodą Paglii i Valentine'a [Paglia i wsp. 1967] poprzez ocenę konwersji NADPH do NADP⁺. Jedną jednostkę aktywności GSH-Px zdefiniowano jako ilość enzymu katalizującego utlenianie 1 μmol NADPH min⁻¹ przy pH 7.4, 25°C. Aktywność enzymu wyrażono w jednostkach na ml osocza.

Aktywność reduktazy glutationowej (GSSGR–EC.1.6.4.2) w osoczu mierzono spektrofotometrycznie (340 nm) według metody Mize i Longdon [Mize i Langdon, 1962] poprzez monitorowanie utleniania NADPH do NADP⁺. Jedna jednostka GSSGR utleniała 1 μmol NADPH/min przy pH 7,4; 25°C. Aktywność enzymu wyrażono w jednostkach na ml osocza.

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (Cu,Zn–SOD–EC.1.15.1.1) w osoczu oznaczono spektrofotometrycznie (480 nm) według metody Misry i Fridovicha [Misra i Fridovich, 1972] zmodyfikowanej przez Sykesa [Sykes i wsp., 1978]. Jedną jednostkę Cu,Zn–SOD zdefiniowano jako ilość enzymu, która hamuje utlenianie epinefryny do adrenochromu o 50%. Aktywność specyficzną enzymu wyrażono w jednostkach na ml osocza.

Aktywność reduktazy tioredoksyny (TrxR-EC.1.8.1.9) w osoczu oszacowano przy użyciu komercyjnego zestawu testowego (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Test opierał się na redukcji kwasu 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoesowego) przez NADPH do kwasu 5-tio-2-nitrobenzoesowego, co oszacowano za pomocą pomiaru kolorymetrycznego przy 412 nm [Holmgren i Björnstedt, 1995]. Uzyskane dane wyrażono w jednostkach na ml osocza.

Poziom tioredoksyny (Trx) w osoczu oznaczano ilościowo metodą ELISA [Lovell i wsp., 2000]. Płytki ELISA (Nunc Immuno Maxisorp, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) z naniesionym osoczem inkubowano z pierwszorzędowym przeciwciałem kozim przeciwko Trx przez 24h (Abcam, Cambridge, MA, USA) i przez 1 godzinę z drugorzędowym przeciwciałem króliczym EnVision+Dual Link/HRP (1:100) (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA). Następnie dodawano 0,1 mg TMB w buforze cytrynowym/ml z 0,012% H₂O₂ jako chromogenem. Reakcję zatrzymano 2 M kwasem siarkowym i absorpcję odczytywano przy 450 nm przy 620 nm jako filtrze odniesienia. Poziom Trx wyrażono w mikrogramach na ml osocza.

Oznaczanie antyoksydantów niskocząsteczkowych

Zawartość GSH w osoczu mierzono według procedury Maeso, stosując elektroforezę kapilarną [Maeso i wsp., 2005]. Rozdział przeprowadzono wykorzystując kapilarę ze stopionej krzemionki o długości efektywnej 40 cm przy stałym napięciu 27 kV. 2,2 [75 μ m (wewnętrzna średnica) \times 40 cm (długość całkowita)/10 cm (długość do detektora)] przy detekcji spektrofotometrem przy 200 nm. Poziom zredukowanego glutationu wyrażono w nanomolach na ml osocza.

Do oznaczenia zawartości witamin A i E [De Leenheera i wsp., 1979] oraz witaminy C [Ivanović i wsp., 1999] wykorzystano metody HPLC. Ekstrakcję witamin A i E z osocza przeprowadzono heksanem zawierającym 0,025% butylowanego hydroksytoluenu. Fazę heksanową usunięto i osuszono, a do kolumny wstrzyknięto 50 μ l ekstraktu heksanowego. W celu oznaczenia kwasu askorbinowego zmieszano osocze i równą objętość kwasu metafosforowego. Próbkę odwirowano (1000 x g, 10 min) przed analizą w celu usunięcia pozostałości wytrąconych białek. Po odwirowaniu próbki natychmiast poddano analizie. Zawartość witamin analizowano w systemie HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA) z detektorem diodowym (294 nm) przy użyciu kolumny RP C18 dla witamin A i E; oraz kolumny RP C18 i detekcji UV przy 250 nm dla zastosowano oznaczenie witaminy C. Stężenie witamin wyrażono w nanomolach na ml osocza.

Ocena metabolizmu fosfolipidów

Profil fosfolipidowych kwasów tłuszczowych

Fosfolipidowe kwasy tłuszczowe w postaci estrów metylowych kwasów tłuszczowych (FAMES) oznaczono metodą chromatografii gazowej [Christie, 1993]. Frakcję lipidową wyizolowano metodą ekstrakcji Folcha, stosując mieszaninę chloroform/metanol (2:1, v/v) z 0,01% butylowanym hydroksytoluenu. Do rozdziału fosfolipidów kwasów tłuszczowych zastosowano technikę chromatografii cienkowarstwowej z heptanem - eterem diizopropylowym – kwasem octowym (60:40:3, v/v/v) jako faza ruchoma. Następnie fosfolipidowe kwasy tłuszczowe transmetylowano do estrów metylowych kwasów tłuszczowych przy użyciu trifluorku boru w metanolu. FAMES analizowano metodą chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID) przy użyciu chromatografu gazowego Clarus 500 (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Rozdzielenie składników próbki przeprowadzono za pomocą kolumny kapilarnej z fazą stacjonarną Varian CP-Sil 88 (50 m \times 0,25 mm, ID 0,2 μ m, Varian). Analizę jakościową przeprowadzono na podstawie porównania czasu retencji otrzymanych FAMES z autentycznymi wzorcami, a analizę ilościową przeprowadzono metodą wzorca wewnętrznego z kwasem nonadekanowym (19:0) i 1,2-dinonadekanoilo-sn-glicero-3-fosfocholimą (19:0 PC) jako standardem wewnętrznym. Poziomy LA, AA i EPA w osoczu wyrażono w μ g/ml.

Produkty peroksydacji lipidów

Produkt fragmentacji fosfolipidów (niskocząsteczkowy aldehyd - 4-HNE) mierzono metodą GC/MS w osoczu jako pochodna O-PFB-oksymu-TMS, stosując niewielkie modyfikacje metody Tsikas i in. [Tsikas i wsp., 2017] 4-HNE-d3 dodano jako standard

wewnętrzny i aldehydy uzyskano w pochodne przez dodanie chlorowodoru O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl) hydroksyloaminy (0,05 M w buforze PIPES, 200 μ l) i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze pokojowej. Po inkubacji próbki odbiałczono przez dodanie 1 ml metanolu i pochodną aldehydu-PFB-oksymu ekstrahowano przez dodanie 2 ml heksanu. Górną warstwę heksanową przeniesiono do rurek borokrzemowych i odparowano w strumieniu gazowego argonu, po czym dodano N,O-bis(trimetylosililo)trifluoroacetamid w 1% trimetylochlorosilanie. Do kolumny wstrzyknięto porcję 1 μ l. Zawartość 4-HNE oznaczono za pomocą kwadrupola MS/MS 7890A GC-7000 (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA) z wybranym trybem monitorowania jonów. Zastosowano następujące jony: m/z 2420 dla 4-HNE-PFB-TMS oraz m/z 2040 dla standardu wewnętrznego. 4-HNE wyrażono w nanomolach na ml osocza.

Oznaczenie produktu cyklizacji fosfolipidów [F2-izoprostanu (8-isoPGF2 α)] przeprowadzono metodą Coolena [Coolen i wsp., 2005]. Do izolacji F2-izoprostanu zastosowano ekstrakcję w fazie stałej. Dane uzyskano za pomocą systemu Agilent 1290 UPLC ze spektrometrem Agilent 6460 QqQ ze źródłem jonizacji przez elektrorozpylanie (ESI). 8-isoPGF2 α analizowano w trybie jonów ujemnych, stosując następujący tryb MRM: m/z 353,2 \rightarrow 193,1 (dla 8-isoPGF2 α) i 357,2 \rightarrow 197,1 (dla 8-isoPGF2 α -d4).

Produkt fragmentacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych fosfolipidów (dialdehyd malonowy, MDA) oznaczano metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas 7890A GC-7000 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) w oparciu o nieznacznie zmodyfikowaną metodę Tsikasa i wsp. [Tsikas i wsp., 2017]. Do osocza dodano benzaldehyd-d6 jako wzorzec wewnętrzny. Pochodne aldehydowe oddzielano przy użyciu kolumny kapilarnej HP-5 ms (średnica wewnętrzna 0,25 mm, grubość filmu 0,25 μ m, długość 30 m) i analizowano w wybranym trybie monitorowania jonów (SIM). Próbkę odbiałczono przez dodanie 1 ml metanolu. Pochodne MDA ekstrahowano heksanem. Warstwę heksanową odparowano i dodano N,O-bis(trimetylosililo)trifluoroacetamid w 1% trimetylochlorosilanie. Monitorowano następujące jony: m/z 204,0 i 178,0 dla MDA-PFB oraz m/z 307,0 dla pochodnych IS (benzaldehydu-D 6). Poziom MDA w osoczu wyrażono w nmol/ml.

Oznaczenie produktu cyklizacji PUFAs [całkowite neuroprostany - NPs] oparto na metodzie opisanej przez Fam [Fam i wsp., 2002]. Po etapie hydrolizy alkalicznej do izolacji neuroprostanołów zastosowano ekstrakcję do fazy stałej, a NPs oznaczono za pomocą systemu Agilent 1290 UPLC ze spektrometrem Agilent 6460 QqQ ze źródłem jonizacji elektrorozpylonej (ESI). Wszystkie szczegóły dotyczące oznaczania NPs zostały opisane we wcześniejszych opublikowanych badaniach [Łuczaj i wsp. 2016]. Poziom NPs w osoczu wyrażono w nmol/ml.

Aktywność PLA2, COX1/2 i LOX5

Analiza spektrofotometryczna została wykorzystana do zbadania aktywności enzymów zaangażowanych w metabolizm fosfolipidów i PUFAs: PLA2 (fosfolipaza A2; PLA2-EC.3.1.1.4) mierzono przy użyciu zestawu cPLA2 Assay Kit (Cayman Chemical Company w Ann Arbor, MI, USA); COX1/2 (cyklooksygenaza 1 i 2; COX1/2-EC.1.14.99.1/2) mierzono przy użyciu komercyjnego zestawu testowego (Cayman Chemical Company w Ann Arbor, MI, USA); lipooksygenazę-5 (LOX5) przy użyciu komercyjnego

zestawu testowego Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Steinheim, Niemcy) zgodnie z instrukcjami producenta [Žarković i wsp., 2022, Reynolds i wsp., 1994, Kulmacz i Wang 1995]. Aktywność PLA2 wyrażono w nmol arachidonilofosfatydylocholino/min/ml. Aktywność cyklooksygenaz wyrażono w U/ml. Aktywność LOX jest wyrażona w U/ml.

Poziom endokannabinoidów

Poziom endokannabinoidów: anandamidu (AEA), 2-arachidonyloglicerolu (2-AG), N-oleoiloetanolaminy (OEA) i N-palmitoiloetanolaminy (PEA) oznaczono przy użyciu ultra wydajnej chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (UPLC-MS/MS) [Luque-Córdoba i wsp., 2018]. Analizę LC-MS przeprowadzono na spektrometrze masowym Shimadzu (Kyoto, Japonia) Triple Quad 8060 i systemie UHPLC Shimadzu, podczas gdy rozdział chromatografii cieczowej uzyskano za pomocą kolumny analitycznej Poroshell 120 EC-C18 (3,0 × 150 mm; wielkość cząstek 2,7 μm. AEA, 2-AG, OEA i PEA zostały wyekstrahowane z próbek osocza, oczyszczone i oznaczone ilościowo przy użyciu techniki LC-MS z rozcieńczeniem stabilnego izotopu. Deuterowane endokannabinoidy: AEA-d8, 2-AG-d8 i OEA-d4 jako wzorce wewnętrzne. Próbkę analizowano w trybie jonów dodatnich przy użyciu wielokrotnego monitorowania reakcji (MRM). Przejścia prekursorów do jonów produktu były następujące: m/z 348,3→62,15 dla AEA, m/z 379,3→287,25 dla 2-AG, m/z 300,3→62,0 dla PEA, 326,3→62,0 dla OEA, m/z 356,2→63,05 dla AEA-d8, m/z 387,3→294,0 dla 2-AG-d8 i m/z 330,20→66,15 dla OEA-d4. Poziomy AEA, 2-AG, OEA i PEA w osoczu zmierzono względem krzywej standardowej, a następnie wyrażono jako pmol/ml.

Poziom eikozanoidów

Eikozanoidy: prostaglandyna E2 (PGE2), leukotrien B4 (LTB4), 15-deoksydelta12,14-prostaglandyna J2 (15d-PGJ2), kwas 13-S-hydroksyoktadekadienoinowy (13-HODE) i kwas 15-hydroksyeikozatetraenowy (15- HETE) zostały oznaczone przy użyciu ultra-wydajnej chromatografii cieczowej-tandemowej spektrometrii mas (UPLCMS/MS) [Watkins i wsp., 2016]. Do analizy LC-MS zastosowano spektrometr mas Triple Quad 8060 i system UHPLC firmy Shimadzu (Kyoto, Japonia), natomiast rozdział chromatograficzny cieczowy przeprowadzono na kolumnie analitycznej Eclipse Plus C18 (2,1x100 mm, wielkość cząstek 1,8 μm). PGE2, LTB4, 15d-PGJ2, 13-HODE i 15-HETE z próbek osocza ekstrahowano, oczyszczano i oznaczano ilościowo przy użyciu techniki LC-MS z rozcieńczeniem stabilnego izotopu. Deuterowane eikozanoidy: LTB4-d4, PGE2-d4, 15d-PGJ2-d4 i 15-HETE-d8 wykorzystano jako wzorce wewnętrzne. Próbkę analizowano w trybie jonów dodatnich przy użyciu wielokrotnego monitorowania reakcji (MRM). Przejścia jonów prekursora do jonów produktu były następujące: m/z 351.3→271.2 dla PGE2, m/z 315.2→271.2 dla 15-d-PGJ2, m/z 369.3→169.1 dla TXB2, m/z 319. 2→179,1 dla 12-HETE, m/z 355,0→275,3 dla PGD2-d4, m/z 373,0→173,1 dla TXB2-d4, m/z 319,3→275,2 dla 15-d-PGJ2-d4 i 327,0→226,2 dla 15-HETE-d8. Poziomy TXB2, PGE2, 15d-PGJ2 i 12-HETE w osoczu zmierzono względem krzywej standardowej, a następnie wyrażono jako pmol/ml.

Ekspresja białek

Pomiar ekspresji białka przeprowadzono za pomocą testu immunoenzymatycznego (ELISA) [Hnasko i wsp., 2011] Lizaty komórek (granulocyty i limfocyty) naniesiono na studzienki płytki ELISA (Nunc Immuno MaxiSorp, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Płytki z przyłączonymi białkami inkubowano w temperaturze 4°C przez 3 godziny z roztworem blokującym (5% odtłuszczone mleko w proszku w buforze wiążącym węglan). Po przemyciu PBS uzupełnionym 0,1% Tween 20, próbki inkubowano w temperaturze 4°C przez noc z odpowiednimi przeciwciałami pierwszorzędowymi przeciwko NF-κB (p52 lub p62), TNF-α, HO-1 (gospodarz: mysz) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Keap1, Nrf2, fosfo-Nrf2 (Ser40) (gospodarz: królik) (Santa Cruz Biotechnology, Kalifornia, USA). TRPV1 (gospodarz: mysz) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); CB1, CB2, (gospodarz: mysz) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA); PPARγ (gospodarz: królik) (Invitrogen, Waltham, MA, USA). Wszystkie przeciwciała zastosowano w stężeniu 1:1000. Następnie, po przemyciu (PBS uzupełniony 0,1% Tween 20), płytki inkubowano przez 30 minut z roztworem blokującym peroksydazę (3% H₂O₂, 3% odtłuszczonego mleka w proszku w PBS) w temperaturze pokojowej. Jako przeciwciało drugorzędowe zastosowano kozie przeciwciało przeciw królikowi/myszowi EnVision+ roztwór Dual Link/HRP (1:100) (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA). Po 1 godzinie inkubacji w temperaturze pokojowej usunięto przeciwciała wtórne i płytki inkubowano z roztworem substratu chromogenu (0,1 mg/ml TMB, 0,012 % H₂O₂) przez 40 minut. Reakcję zatrzymywano przez dodanie 2 M kwasu siarkowego i absorpcję odczytywano po 10 minutach przy 450 nm i automatycznie przeliczono z krzywych standardowych dla każdego białka (NF-κBp52; Lifespan Biosciences, Seattle, WA, USA, NF-κBp65; OriGene Technologies, Rockville, USA, TNF-α; Merck, Darmstadt, Niemcy, Nrf2; MyBioSource, San Diego, Kalifornia, USA, pNRF2; ludzki Nrf2 (fosfo S40), Abcam, Cambridge, GB, Keap1; Sino Biological, Eschborn, Niemcy i HO-1; Enzo Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA; CB1: Abcam, Cambridge, UK; CB2: Abnova, Taipei, Tajwan; TRPV1: Lifespan Biosciences, Seattle, WA, USA; PPARγ: Fine, Test Wuhan, Hubei, Chiny;). Uzyskane wartości przeliczono na mg białka w próbkach.

Modyfikacje oksydacyjne białek

Modyfikacje oksydacyjne białek w granulocytach oszacowano na poziomie tryptofanu i grup karbonylowych białka. W celu analizy poziomu tryptofanu próbki rozcieńczano w 0,1 mol/L H₂SO₄ (1:10) i mierzono emisję/wzbudzenie fluorescencji odpowiednio przy 325 nm/420 nm i 288 nm/338 nm [Hawkins i wsp., 2009]. Wszystkie wyniki normalizowano dla 1 miligrama białka. Poziom grup karbonylowych w białku oznaczono spektrofotometrycznie (370 nm) przy użyciu 2,4-dinitrofenylohydrazyny [Levine i wsp., 1990] i wyrażono jako nanomole grup karbonylowych na miligram białka.

Poziom adduktów 4-HNE-białka w granulocytach mierzono metodą ELISA przy użyciu pierwszorzędowego przeciwciała monoklonalnego mysiego przeciwciała monoklonalnego anty-4-HNE myszy (Invitrogen, Burlington, Kanada) i przeciwciała drugorzędowego przeciwróliczego/mysiego EnVision+ Dual Link/HRP (1:100) (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, USA). Stężenia adduktów 4-HNE-białko określono za pomocą krzywej kalibracyjnej w zakresie 0,5–25 pmol/mg BSA (r^2 - 0,9983) i znormalizowano dla 1 miligrama białka.

Analiza statystyczna

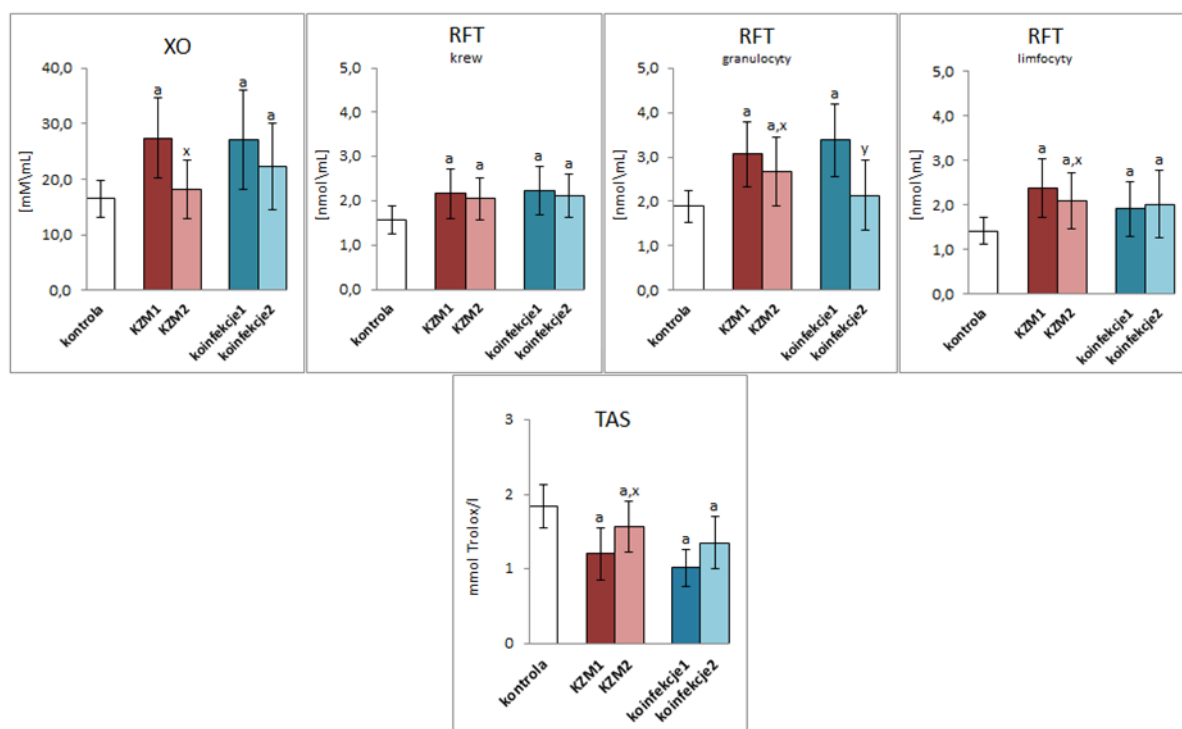
Dane wyrażono jako średnią \pm SD i analizowano za pomocą jednokierunkowej analizy wariancji (ANOVA), a następnie testu Tukeya post hoc przy użyciu oprogramowania Statistica (Statistica 13.3, StatSoft, Kraków, Polska). Wyniki porównano za pomocą testu U Manna – Whitneya i testu rang ze znakiem Wilcoxon. Za istotne uznano wartości $p < 0,05$ i tylko te wyniki omówiono szczegółowo.

Korelację pomiędzy poziomem markerów stresu oksydacyjnego a innymi markerami stanu zapalnego obliczono za pomocą testu korelacji rang Spearmana.

IV. Wyniki

Równowaga oksydacyjno-antyoksydacyjna

Wyniki niniejszej pracy wykazują, że zakażenie wirusem KZM, a także koinfekcja wirusowo-bakteryjna (KZM+ LD lub/ oraz KZM+HGA – oznaczone na rysunkach i w opisach dla uproszczenia jedynie jako koinfekcja) zwiększało aktywność jednego z podstawowych enzymów prooksydacyjnych krwi - oksydazy ksantynowej. Konsekwencją był zaobserwowany wzrost poziomu RFT zarówno we krwi pełnej, jak i we frakcji granulocytów jak i limfocytów (Ryc. 9).



Rycina 9. Aktywność oksydazy ksantynowej (XO) i poziom RFT oceniane w osoczu krwi, granulocytach i limfocytach oraz całkowity status antyoksydacyjny (TAS) pacjentów z KZM i pacjentów z koinfekcją (koinfekcje) przed (KZM1 vs koinfekcje1) i po terapii (KZM2 vs koinfekcje2) porównano z wartościami dla osób zdrowych (kontrola).

Istotności statystyczne dla wartości średnich oznaczono dla $p < 0,05$.

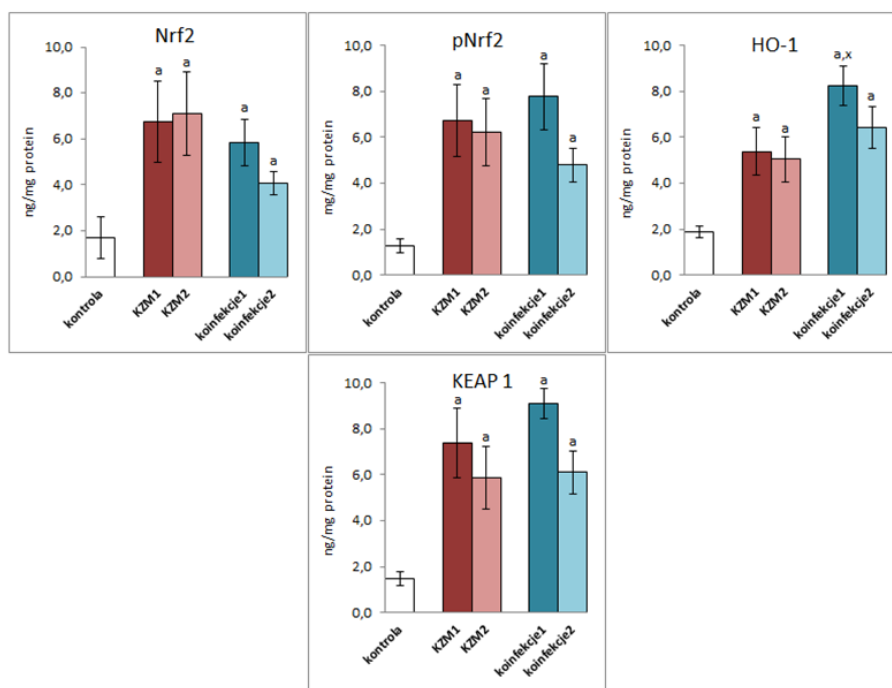
Legenda

- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów z KZM ($n = 40$) przed leczeniem (KZM1) lub pacjentów współzakażonych wirusem KZM oraz bakterią (*B.burgdorferi* lub *A.phagocytophilum*) ($n = 6$) przed leczeniem (koinfekcje1) i grupą kontrolną ($n = 20$) oznaczano jako "a" dla $p < 0,05$;
- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów z KZM ($n = 40$) po leczeniu (KZM2) vs przed leczeniem (KZM1) oznaczano jako "x" dla $p < 0,05$;
- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów z koinfekcjami ($n = 40$) po leczeniu (koinfekcje2) vs przed leczeniem (koinfekcje1) oznaczano jako "y" dla $p < 0,05$.

Koinfekcja wirusowo-bakteryjna nie modyfikuje znacząco odpowiedzi prooksydacyjnej organizmu pacjenta w porównaniu z zakażeniem wirusem KZM. Natomiast w okresie rekonwalescencji zarówno aktywność oksydazy ksantynowej, jak i poziom RFT uległy obniżeniu, co było szczególnie widoczne w granulocytach. Ponadto, w osoczu krwi pacjentów zarówno z zakażeniem wirusem KZM, jak i współzakażeniem bakteryjnym, wykazano obniżenie całkowitego statusu antyoksydacyjnego (TAS) w porównaniu z wartościami w grupie kontrolnej (Ryc. 9). Nie zaobserwowano jednak istotnych statystycznie różnic między dwiema grupami pacjentów przed leczeniem (KZM1 i koinfekcje1). W próbkach pobranych po leczeniu obserwowano (KZM2) znaczny wzrost wartości TAS, ale nie stwierdzono istotnego wzrostu statusu antyoksydacyjnego w osoczu pacjentów leczonych z koinfekcjami (koinfekcje2). Jednakże pomimo wzrostu wartości TAS po leczeniu w obu grupach pacjentów (KZM2 i koinfekcje2), wartości całkowitego statusu antyoksydacyjnego nie osiągnęły wartości kontrolnych.

Ze względu na nasiloną generację RFT i obniżenie TAS w wyniku zakażenia patogenami oraz nasilenie warunków prooksydacyjnych, dla organizmu gospodarza istotna jest skuteczność czynnika transkrypcyjnego Nrf2 odpowiedzialnego za transkrypcję białek cytoprotekcyjnych, w tym antyoksydantów. Wyniki tego badania wykazały, że ekspresja Nrf2, a także jego aktywnej fosforylowanej formy (pNrf2) znacznie wzrosła w odpowiedzi na infekcje (Ryc. 10). Ponadto pomimo wzrostu ekspresji cytozolowego inhibitora Nrf2 – białka KEAP1, skuteczność Nrf2 oceniana poziomem uznanego wskaźnika efektywności hemu oksygenazy Nrf2-1 (HO-1) uległa istotnemu zwiększeniu, co wskazywało na możliwość zwiększonego transkrypcję innych białek przeciwutleniających. Podwyższenie efektywności Nrf2 uwidacznia się również w istotnie podwyższonej aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, podstawowego enzymu odpowiedzialnego za dysmutację anionorodnika ponadtlenkowego, u pacjentów w początkowej fazie choroby (wirusowej oraz koinfekcji) i obniżenie po zastosowanej terapii. Jednakże pomimo zwiększonej efektywności transkrypcyjnej Nrf2, nie wszystkie badane białka antyoksydacyjne charakteryzowały się podwyższonym poziomem/aktywnością. Zarówno infekcja wirusem KZM, jak i koinfekcje bakteryjno-wirusowe zmniejszały aktywność enzymów należących do układu glutationowego oraz tioredoksynowego odpowiedzialnych m.in. za ochronę fosfolipidów. W przypadku układu glutationowego obserwowano obniżoną aktywność obu kooperujących enzymów: peroksydazy glutationowej (GPx) i reduktazy glutationowej (GSSGR), czemu towarzyszył obniżony poziom GSH i podwyższony poziom disiarczku glutationu (Ryc. 11). Obserwowany w tym badaniu spadek aktywności wyżej wymienionych enzymów mógł być efektem modyfikacji oksydacyjnych struktur nowo syntetyzowanych białek, a obniżony poziom GSH interakcji tego peptydu z 4-HNE. Natomiast terapia nie wpłynęła istotnie na powyższe parametry, poza obniżeniem poziomu utlenionego glutationu, co częściowo może wskazywać na cofanie się warunków prooksydacyjnych. Podobny kierunek zmian dotyczy składników układu tioredoksynowego, w tym reduktazy tioredoksyny, która podobnie jak układ zależny od glutationu wraz z tioredoksyną bierze udział w ochronie antyoksydacyjnej fosfolipidów (Ryc.11). Jednakże obniżenie poziomu tioredoksyny nie gwarantuje skutecznego funkcjonowanie tego układu. Szczególnie trudną sytuację zaobserwowano w przypadku koinfekcji, gdy obniżeniu uległ zarówno poziom Trx, jak i aktywność TrxR. Natomiast po terapii objawowej lub antybiotykoterapii nie zaobserwowano istotnej zmiany aktywności

enzymów, jednak w przypadku zakażenia wirusem KZM poziom Trx wzrósł, a w przypadku koinfekcji uległ obniżeniu.



Rycina 10. Ekspresja Nrf2, pNrf2, HO-1 i KEAP1 w granulocytach pacjentów z koinfekcją (koinfekcje) przed (KZM1 vs koinfekcje1) i po terapii (KZM2 vs koinfekcje2) porównano z wartościami dla osób zdrowych (kontrola).

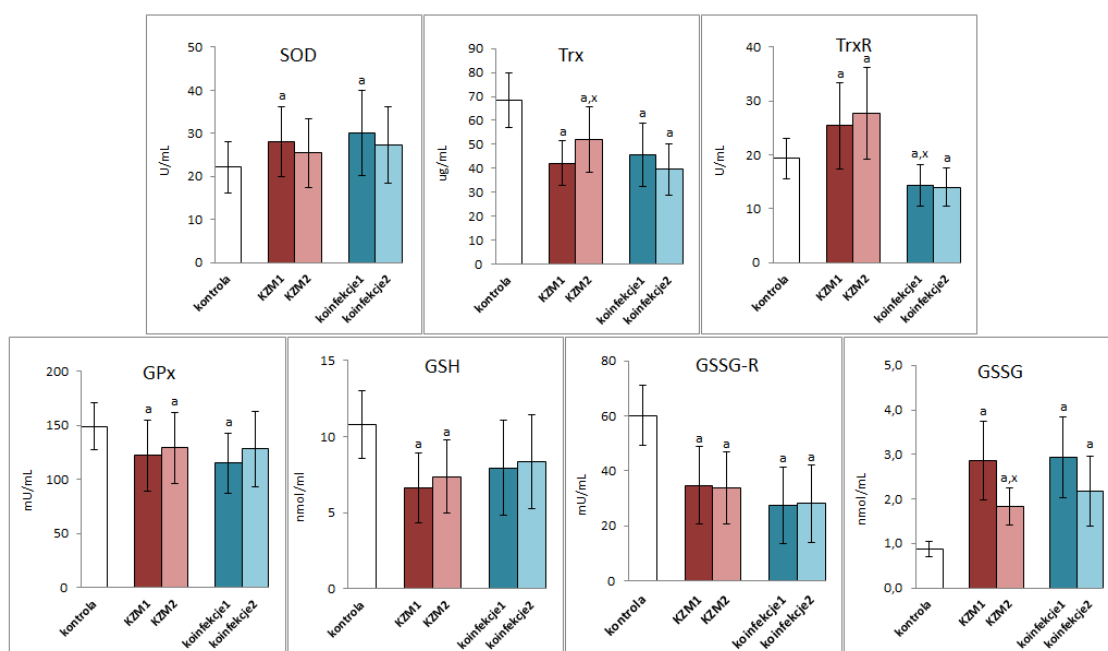
Istotności statystyczne dla wartości średnich oznaczono dla $p < 0,05$.

Legenda

- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów z KZM ($n = 40$) przed leczeniem (KZM1) lub pacjentów współzakażonych wirusem KZM oraz bakterią (*B.burgdorferi* lub *A.phagocytophilum*) ($n = 6$) przed leczeniem (koinfekcje1) i grupą kontrolną ($n = 20$) oznaczano jako "a" dla $p < 0,05$;
- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów z KZM ($n = 40$) po leczeniu (KZM2) vs przed leczeniem (KZM1) oznaczano jako "x" dla $p < 0,05$.

Pomimo zwiększonej efektywności aktywności transkrypcyjnej Nrf2 w wyniku infekcji, nie wszystkie badane enzymy antyoksydacyjne charakteryzowały się zwiększoną aktywnością. Zarówno infekcja wirusem KZM, jak i koinfekcja bakteryjno – wirusowa zmniejszają aktywność enzymów związanych z układem glutationowym i odpowiedzialnych za ochronę m.in. fosfolipidów, takich jak peroksydaza glutationowa (GPx) i reduktaza (GSSGR). Towarzyszył temu obniżony poziom GSH i podwyższony poziom dwusiarczku glutationu (Ryc.11). Obserwowany w tym badaniu obniżenie aktywności wyżej wymienionych enzymów mógł być efektem modyfikacji oksydacyjnych struktur nowo syntetyzowanych białek. W konsekwencji, pomimo podwyższonego poziomu białek enzymatycznych, obserwowana aktywność uległa zmniejszeniu. Natomiast terapia (objawowa i antybiotykoterapia) nie wpłynęła istotnie na powyższe parametry, poza zmniejszeniem poziomu utlenionego glutationu. W przeciwieństwie do obserwowanego spadku aktywności enzymów antyoksydacyjnych układu glutationowego podczas zakażenia wirusem KZM

i koinfekcji bakteryjnych, nastąpił wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, podstawowego enzymu antyoksydacyjnego zarówno w odpowiedzi komórkowej, jak i zewnątrzkomórkowej na warunki prooksydacyjne, które odpowiadają za dysmutację pierwszego wytworzonego anionu ponadtlenkowego. Podobny kierunek zmian dotyczy reduktazy tioredoksyny, która wraz z tioredoksyną i układem glutationowym bierze udział w ochronie antyoksydacyjnej fosfolipidów (Ryc.11). Jednakże towarzyszące zmniejszenie poziomu tioredoksyny w dalszym ciągu nie pozwalało na skuteczne funkcjonowanie układu. Szczególnie trudną sytuację zaobserwowano w przypadku koinfekcji, gdy spadł zarówno poziom Trx, jak i aktywność TrxR. Natomiast po terapii objawowej lub antybiotykoterapii nie zaobserwowano istotnej zmiany aktywności enzymów, jednak w przypadku zakażenia wirusem KZM poziom Trx wzrósł, a w przypadku koinfekcji zmniejszył się po terapii.



Rycina 11. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), aktywność tioredoksyny (Trx) i reduktazy tioredoksyny (TrxR) oraz aktywność peroksydazy glutationowej (GPx), poziom GSH, aktywność reduktazy glutationowej (GSSG-R) i poziom GSSG w osoczu pacjentów z KZM i pacjentów z koinfekcją (koinfekcje) przed (KZM1 vs koinfekcje1) i po terapii (KZM2 vs koinfekcje2) porównano z wartościami dla osób zdrowych (kontrola).

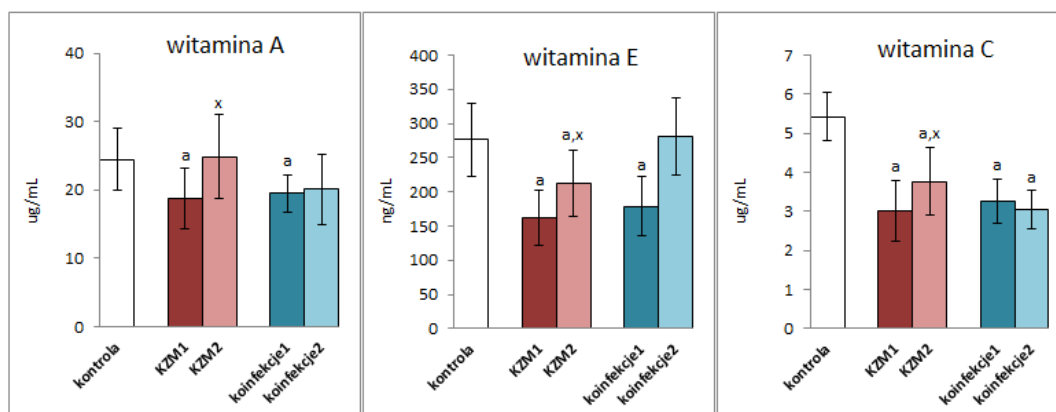
Istotności statystyczne dla wartości średnich oznaczono dla $p < 0,05$.

Legenda

- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów z KZM ($n = 40$) przed leczeniem (KZM1) lub pacjentów współzakażonych wirusem KZM oraz bakterią (*B.burgdorferi* lub *A.phagocytophilum*) ($n = 6$) przed leczeniem (koinfekcje1) i grupą kontrolną ($n = 20$) oznaczano jako "a" dla $p < 0,05$;
- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów z KZM ($n = 40$) po leczeniu (KZM2) vs przed leczeniem (KZM1) oznaczano jako "x" dla $p < 0,05$.

Niezależnie od modyfikacji antyoksydacyjnych układów enzymatycznych, zakażenie wirusem KZM jak i koinfekcje powodują również zmiany w poziomie parametrów

nieenzymatycznych, do którego zaliczają się m.in. współdziałające w organizmie witaminy A, E i C (Ryc.12). Wyniki tego badania wskazują, że poziom tych przeciwutleniaczy zmniejszał się zarówno podczas infekcji, jak i koinfekcji, natomiast ich poziom wzrastał po wyzdrowieniu jedynie u pacjentów zakażonych wirusem KZM. W przypadku koinfekcji antybiotykoterapia nie miała istotnego wpływu na poziom witamin A i C, natomiast sprzyjała podniesieniu poziomu witaminy E.



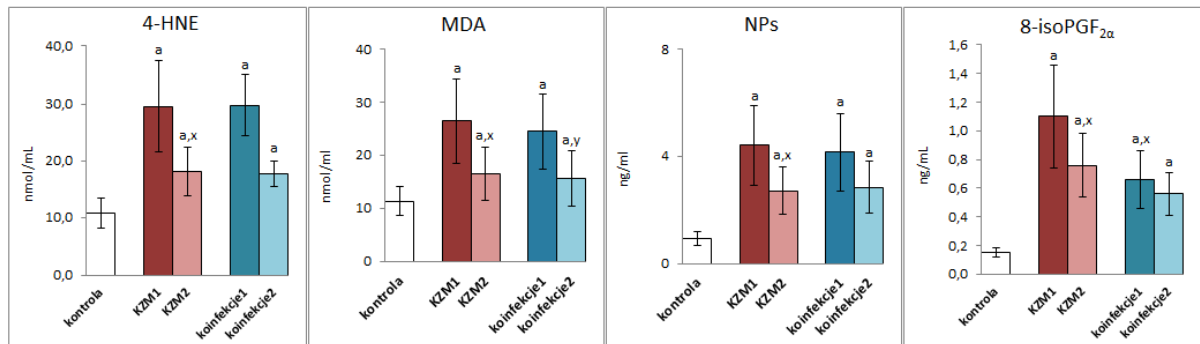
Rycina 12. Poziom witamin A, E i C w osoczu pacjentów z KZM i pacjentów z koinfekcją (koinfekcje) przed (KZM1 vs koinfekcje1) i po terapii (KZM2 vs koinfekcje2) porównano z wartościami dla osób zdrowych (kontrola).

Istotności statystyczne dla wartości średnich oznaczono dla $p < 0,05$.

Legenda

- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów z KZM ($n = 40$) przed leczeniem (KZM1) lub pacjentów współzakażonych wirusem KZM oraz bakterią (*B.burgdorferi* lub *A.phagocytophilum*) ($n = 6$) przed leczeniem (koinfekcje1) i grupą kontrolną ($n = 20$) oznaczano jako "a" dla $p < 0,05$;
- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów z KZM ($n = 40$) po leczeniu (KZM2) vs przed leczeniem (KZM1) oznaczano jako "x" dla $p < 0,05$.

Stres oksydacyjny towarzyszący infekcji wirusowej i koinfekcjom wirusowo-bakteryjnym sprzyjał oksydacyjnym modyfikacjom lipidów. W osoczu pacjentów z KZM oraz koinfekcjami bakteryjnymi wykazano istotny wzrost poziomu produktów oksydacyjnych fragmentacji PUFAs - malonaldehydu (MDA) i 4-HNE oraz produktów oksydacyjnej cyklizacji PUFAs - neuroprostanów (NPs) i izoprostanów 8-isoPGF2 α w porównaniu z wartościami w osoczu osób zdrowych (Ryc.13). Natomiast leczenie pacjentów z infekcją wirusową (KZM) i współinfekcją bakteryjną (koinfekcje) prowadziło do obniżenia poziomu produktów peroksydacji lipidów, a w grupie pacjentów z KZM po leczeniu obniżenie poziomu tych produktów był istotny statystycznie w porównaniu do wartości sprzed leczenia. Należy jednak również podkreślić, że nawet po leczeniu poziomy produktów peroksydacji lipidów nie osiągnęły wartości jak w grupie osób zdrowych.



Rycina 13. Poziom 4-HNE, MDA, NPs i 8-isoPGF_{2α} w osoczu pacjentów z KZM i pacjentów z koinfekcją (koinfekcje) przed (KZM1 vs koinfekcje1) i po terapii (KZM2 vs koinfekcje2) porównano z osobami zdrowymi (kontrola). Istotności statystyczne dla wartości średnich oznaczono dla $p < 0,05$.

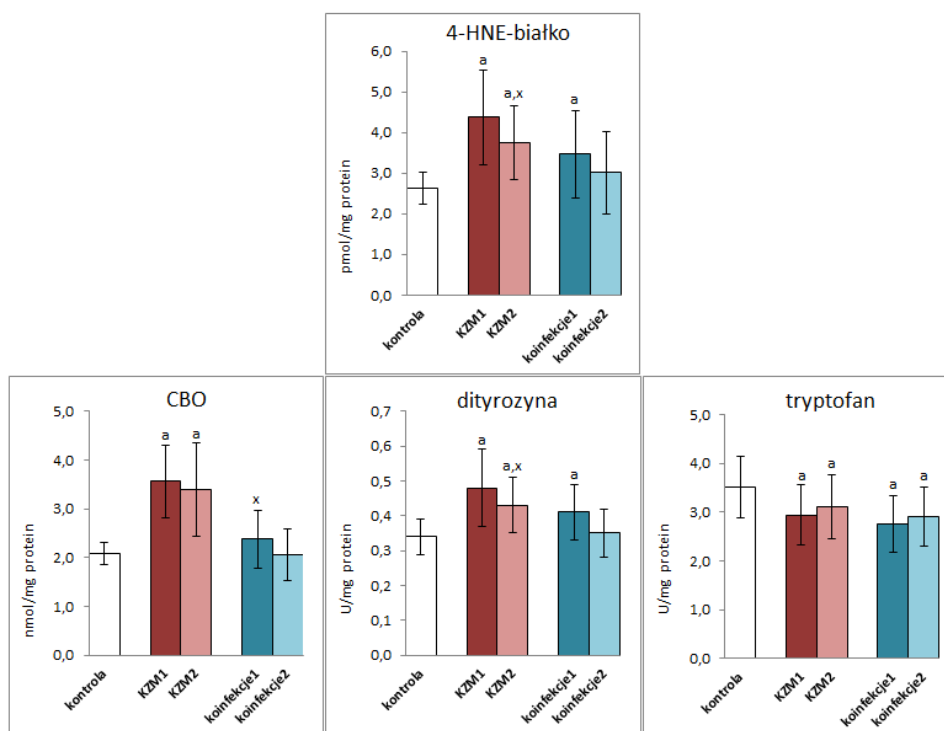
Legenda

- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów z KZM ($n = 40$) przed leczeniem (KZM1) lub pacjentów współzakażonych wirusem KZM oraz bakterią (*B.burgdorferi* lub *A.phagocytophilum*) ($n = 6$) przed leczeniem (koinfekcje1) i grupą kontrolną ($n = 20$) oznaczano jako "a" dla $p < 0,05$;
- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów z KZM ($n = 40$) po leczeniu (KZM2) vs przed leczeniem (KZM1) oznaczano jako "x" dla $p < 0,05$;
- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów z współzakażonych wirusem KZM oraz bakterią (*B.burgdorferi* lub *A.phagocytophilum*) ($n = 6$) po leczeniu (koinfekcje2) vs przed leczeniem (koinfekcje1) oznaczano jako "y" dla $p < 0,05$.

W konsekwencji w wyniku stresu oksydacyjnego obserwowanego w wyniku zakażenia dochodziło także do oksydacyjnych modyfikacji struktur białek spowodowanych zarówno bezpośrednim działaniem RFT, ocenianym jako podwyższony poziom dityrozyny w przypadku infekcji i koinfekcji oraz grup karbonylowych (CBO) zaobserwowanym jedynie w przypadku KZM (ryc.14). Dodatkowo, w obu grupach zakażonych pacjentów (KZM i koinfekcje) zaobserwowano obniżenie poziomu tryptofanu, prawdopodobnie jako skutek degradacji oksydacyjnej. Poziom tryptofanu nie zmienił się istotnie po leczeniu, natomiast w grupie chorych na KZM po terapii zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie poziomu dityrozyny.

Wzrost poziomu 4-HNE w wyniku infekcji skutkował również interakcjami tego reaktywnego aldehydu z grupami aminowymi białek z powstawaniem adduktów 4-HNE-białka, które powodowały modyfikacje struktury białek osocza krwi i prawdopodobnie, przynajmniej częściowo, odpowiedzialne były za obniżone aktywności białek enzymatycznych.

Leczenie powodowało obniżenie poziomu powstających modyfikacji, na ogół jednak zmiany te nie były istotne statystycznie.



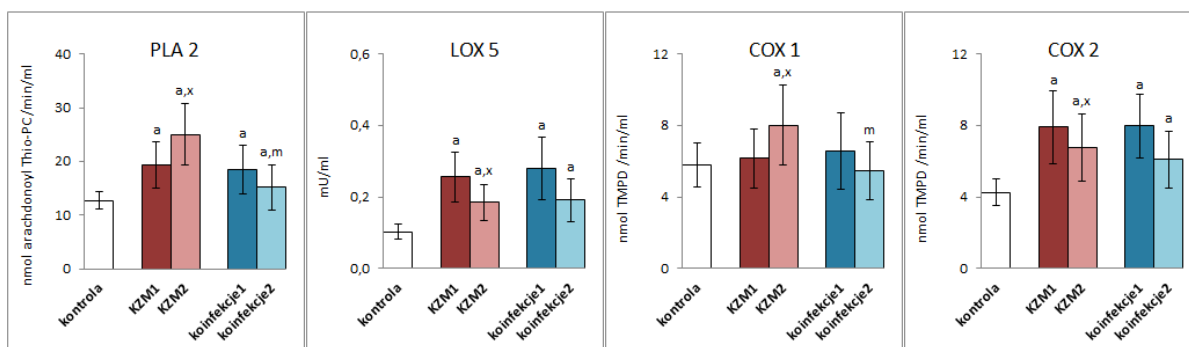
Rycina 14. Poziomy adduktów 4-HNE-białko, grup karbonylowych białek (CBO), dityrozyny i tryptofanu w osoczu pacjentów z KZM i pacjentów z koinfekcją (koinfekcje) przed (KZM1 vs koinfekcje1) i po terapii (KZM2 vs koinfekcje2) porównano z wartościami dla osób zdrowych (kontrola).

Istotności statystyczne dla wartości średnich oznaczono dla $p < 0,05$.

Legenda

- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów z KZM ($n = 40$) przed leczeniem (KZM1) lub pacjentów współzakażonych wirusem KZM oraz bakterią (*B.burgdorferi* lub *A.phagocytophilum*) ($n = 6$) przed leczeniem (koinfekcje1) i grupą kontrolną ($n = 20$) oznaczano jako "a" dla $p < 0,05$;
- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów z KZM ($n = 40$) po leczeniu (KZM2) vs przed leczeniem (KZM1) oznaczano jako "x" dla $p < 0,05$.

W wyniku zarówno zakażenia wirusem KZM, jak i współzakażenia obserwowane warunki prooksydacyjne sprzyjają modyfikacji aktywności enzymów zaangażowanych w metabolizm fosfolipidów i wolnych PUFAs (Ryc.15). Wykazano, że zarówno KZM, jak i współistniejące zakażenia powodują istotny statystycznie wzrost aktywności fosfolipazy A2 (PLA2), lipooksygenazy 5 (LOX5) oraz indukowalnej izoforny cyklooksygenazy (COX2). Istotna jest również obserwacja, że po leczeniu pacjentów z kleszczowym zapaleniem mózgu nastąpił dalszy wzrost aktywności zarówno PLA2, jak i COX1 oraz obniżenie aktywności LOX5 i indukowalnej izoforny cyklooksygenazy. Natomiast w przypadku współistniejących zakażeń farmakoterapia skutkowała redukcją aktywności wszystkich badanych enzymów.

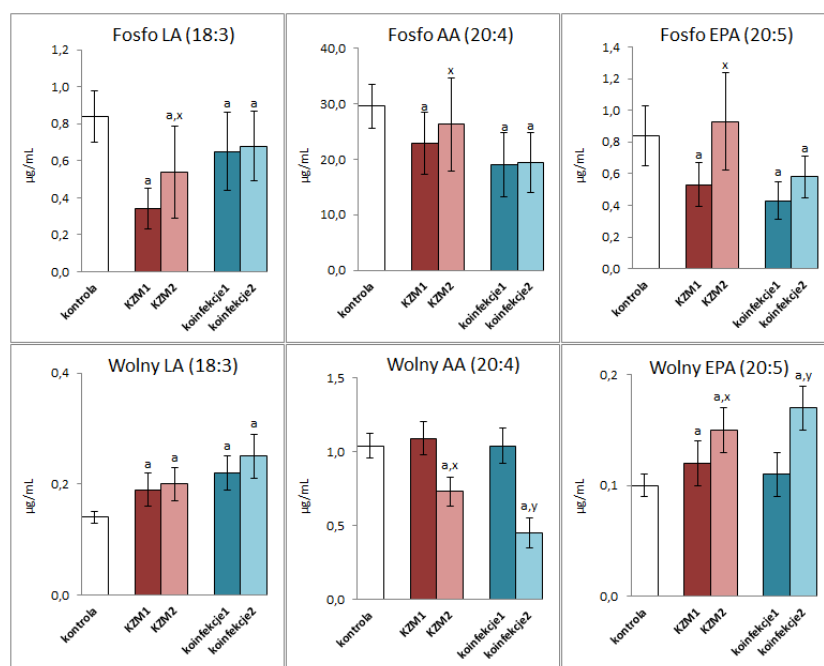


Rycina 15. Aktywność fosfolipazy A2 (PLA 2), lipooksygenazy-5 (LOX 5) i cyklooksygenaz 1/2 (COX 1 i 2) w osoczu pacjentów z KZM i pacjentów z koinfekcją (koinfekcje) przed (KZM1 vs koinfekcje1) i po terapii (KZM2 vs koinfekcje2) porównano z wartościami dla osób zdrowych (kontrola). Istotności statystyczne dla wartości średnich oznaczono dla $p < 0,05$.

Legenda

- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów z KZM ($n = 40$) przed leczeniem (KZM1) lub pacjentów współzakażonych wirusem KZM oraz bakterią (*B.burgdorferi* lub *A.phagocytophilum*) ($n = 6$) przed leczeniem (koinfekcje1) i grupą kontrolną ($n = 20$) oznaczano jako "a" dla $p < 0,05$;
- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów z KZM ($n = 40$) po leczeniu (KZM2) vs przed leczeniem (KZM1) oznaczano jako "x" dla $p \leq 0,05$;
- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów współzakażonych wirusem KZM oraz bakterią (*B.burgdorferii* lub *A.phagocytophilum*) ($n = 6$) przed leczeniem (koinfekcje1) i pacjentów z KZM ($n = 40$) przed leczeniem (KZM1) oznaczano jako "m" dla $p < 0,05$.

Wynikiem zakażenia wirusem KZM, jak i współzakażenia bakteryjnego były przesunięcia równowagi redoks, w organizmach pacjentów, w kierunku warunków prooksydacyjnych, co niezależnie od zmian wywołanych peroksydacją lipidów, spowodowało również zmiany w aktywności enzymów lipolitycznych, które skutkowały obserwowanymi w niniejszej pracy, kumulującymi się zmianami w poziomach zarówno fosfolipidowych jak i wolnych nienasyconych kwasów tłuszczowych. W rezultacie w osoczu krwi pacjentów zarówno z zakażeniem wirusem KZM, jak i z koinfekcjami bakteryjnymi dochodzi do obniżenia poziomu fosfolipidowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, takich jak kwas arachidonowy (AA 20:4), kwas α -linolenowy (LA 18:3) i kwas eikozapentaenowy (EPA 20:5), jednak w przypadku wolnych PUFAs doszło do wzrostu poziomu LA i EPA, a poziom AA nie uległ zmianie (Ryc.16). Natomiast po terapii u pacjentów z KZM doszło do wzrostu poziomu fosfolipidowych LA i EPA oraz wolnego EPA, a w przypadku koinfekcji wzrasta tylko poziom wolnego EPA. Jednakże w przypadku zakażenia wirusem KZM jak i koinfekcji bakteryjnej stwierdzono obniżenie poziomu wolnego AA. W pozostałych przypadkach terapia nie powodowała wzrostu poziomu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych.



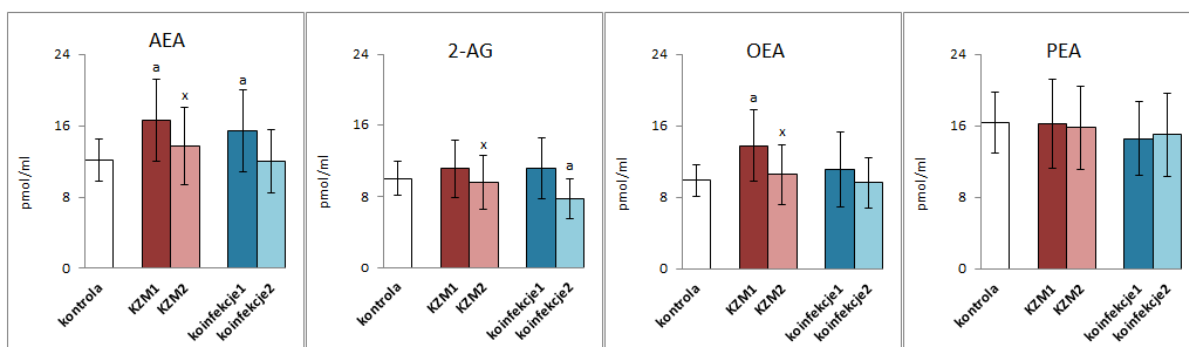
Rycina 16. Poziom fosfolipidów i wolnych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (kwas α -linolenowego (LA), kwasu arachidonowego (AA) i kwasu eikozapentaenowego (EPA) w osoczu pacjentów z KZM i pacjentów z koinfekcją (koinfekcje) przed (KZM1 vs koinfekcje1) i po terapii (KZM2 vs koinfekcje2) porównano z wartościami dla osób zdrowych (kontrola).

Istotności statystyczne dla wartości średnich oznaczono dla $p < 0,05$.

Legenda

- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów z KZM ($n = 40$) przed leczeniem (KZM1) lub pacjentów współzakażonych wirusem KZM oraz bakterią (*B.burgdorferi* lub *A.phagocytophilum*) ($n = 6$) przed leczeniem (koinfekcje1) i grupą kontrolną ($n = 20$) oznaczano jako "a" dla $p < 0,05$;
- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów z KZM ($n = 40$) po leczeniu (KZM2) vs przed leczeniem (KZM1) oznaczano jako "x" dla $p < 0,05$.
- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów z współzakażonych wirusem KZM oraz bakterią (*B.burgdorferi* lub *A.phagocytophilum*) ($n = 6$) po leczeniu (koinfekcje2) vs przed leczeniem (koinfekcje1) oznaczano jako "y" dla $p < 0,05$.

Konsekwencją bezpośredniego i pośredniego (poprzez enzymy) wpływu stresu oksydacyjnego na poziom PUFAs były obserwowane zmiany w poziomie mediatorów lipidowych, zarówno z grupy endokannabinoidów, jak i eikozanoidów. W przypadku endokannabinoidów infekcja wywołana przez wirus KZM powodowała znaczny wzrost poziomu anandamidu (AEA) i oleoilietanolamidu (OEA), których poziomy po farmakoterapii ulegały obniżeniu do wartości zbliżonych do tych w grupie kontrolnej (Ryc. 17). Natomiast w przypadku koinfekcji bakteryjnych (koinfekcje) kierunek obserwowanych zmian był taki sam, przy czym poziom 2-AG obniżył się poniżej wartości kontrolnych.

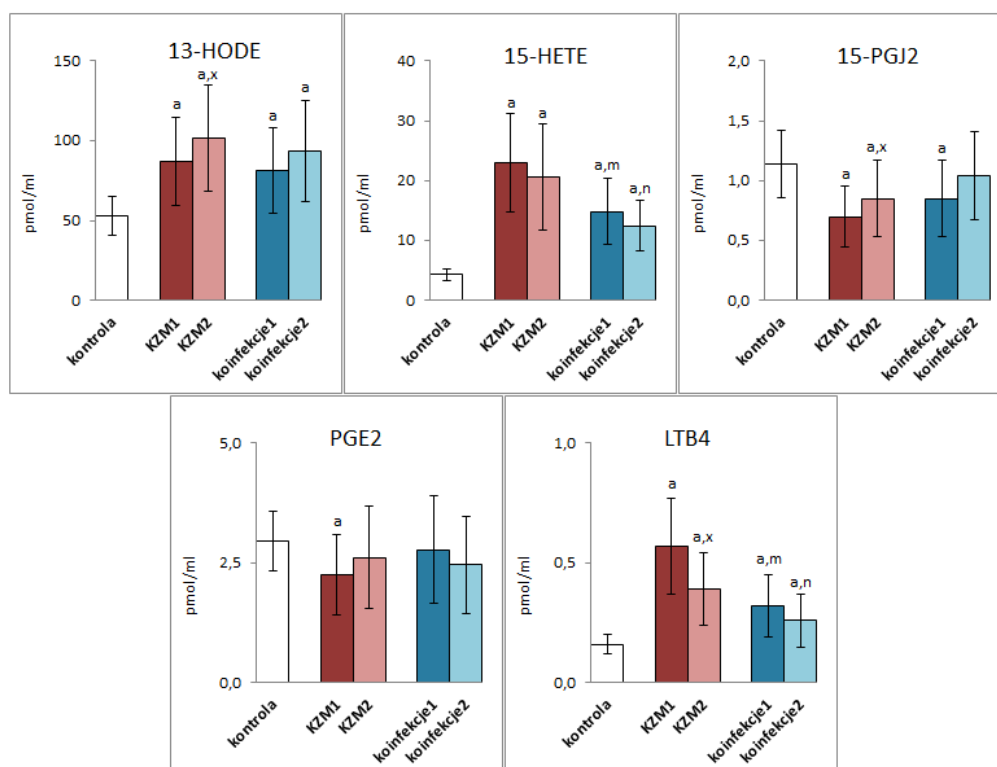


Rycina 17. Ekspresję anandamidu (AEA), 2-arachidonoilglicerolu (2-AG), palmitoiloetanoloaminy (PEA) i oleiloetanoloamidu (OEA) w osoczu pacjentów z KZM i pacjentów z koinfekcją (koinfekcje) przed (KZM1 vs koinfekcje1) i po terapii (KZM2 vs koinfekcje2) porównano z wartościami dla osób zdrowych (kontrola). Istotności statystyczne dla wartości średnich oznaczono dla $p < 0,05$.

Legenda

- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów z KZM ($n = 40$) przed leczeniem (KZM1) lub pacjentów współzakażonych wirusem KZM oraz bakterią (*B.burgdorferii* lub *A.phagocytophilum*) ($n = 6$) przed leczeniem (koinfekcje1) i grupą kontrolną ($n = 20$) oznaczano jako "a" dla $p < 0,05$;
- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów z KZM ($n = 40$) po leczeniu (KZM2) vs przed leczeniem (KZM1) oznaczano jako "x" dla $p < 0,05$;

Zmianom poziomu wolnych PUFAs w osoczu pacjentów z KZM i współzakażeniami bakteryjnymi (koinfekcje) towarzyszyły zmiany poziomu mediatorów lipidowych - eikozanoidów należących zarówno do grupy związków przeciwzapalnych (13-HODE, 15-HETE, 15-PGJ2), jak i prozapalnych (LTB4, PGE2) (Ryc. 18). W osoczu pacjentów z KZM przed leczeniem stwierdzono podwyższony poziom 13-HODE i 15-HETE oraz statystycznie obniżony poziom 15-PGJ2, natomiast po farmakoterapii poziom 13-HODE ulegał dalszemu podwyższeniu, a poziom 15-HETE nieznacznemu obniżeniu. Z kolei poziom 15-PGJ2 wzrósł w porównaniu do wartości sprzed leczenia, ale nie osiągnął poziomu w osoczu grupy kontrolnej. Kierunek zmian powyższych eikozanoidów w osoczu pacjentów ze współistniejącymi infekcjami bakteryjnymi był taki sam jak w osoczu pacjentów z KZM. Natomiast poziom prozapalnego LTB4 był kilkakrotnie podwyższony u pacjentów z KZM przed leczeniem, ale ulegał istotnemu obniżeniu po leczeniu. Podobny kierunek zmian, choć nie tak dramatyczny, zaobserwowano u pacjentów ze współistniejącymi zakażeniami. Z drugiej strony, poziom prozapalnej prostaglandyny PGE2 w osoczu pacjentów z KZM przed leczeniem był obniżony, a po leczeniu ulegał podwyższeniu, podczas gdy w osoczu pacjentów ze współistniejącymi zakażeniami bakteryjnymi stwierdzono tendencję do obniżania poziomu tej prostaglandyny, niezależnie od leczenia.



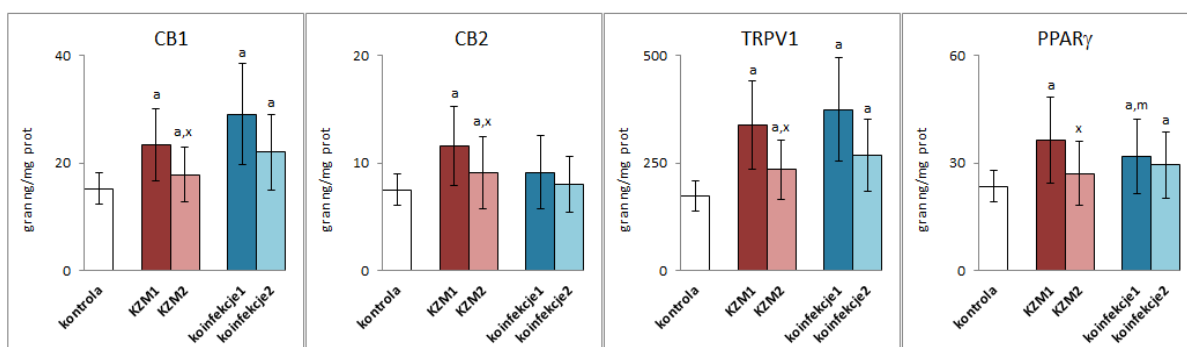
Rycina 18. Ekspresję przeciwzapalnych eikozanoidów przeciwzapalnych takich jak 15-prostaglandyna J2 (15-PGJ2), kwas 13-hydroksyoktadekadienowy (13-HODE), kwas 15-hydroksyeikozatetraenowy (15-HETE), oraz prozapalnych, w tym prostaglandyny E2 (PGE2) i leukotrienu B4 (LTB4) w osoczu pacjentów z KZM i pacjentów z koinfekcją (koinfekcje) przed (KZM1 vs koinfekcje1) i po terapii (KZM2 vs koinfekcje2) porównano z wartościami dla osób zdrowych (kontrola). Istotności statystyczne dla wartości średnich oznaczono dla $p < 0,05$.

Legenda

- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów z KZM ($n = 40$) przed leczeniem (KZM1) lub pacjentów współzakażonych wirusem KZM oraz bakterią (*B.burgdorferi* lub *A.phagocytophilum*) ($n = 6$) przed leczeniem (koinfekcje1) i grupą kontrolną ($n = 20$) oznaczano jako "a" dla $p < 0,05$;
- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów z KZM ($n = 40$) po leczeniu (KZM2) vs przed leczeniem (KZM1) oznaczano jako "x" dla $p < 0,05$;
- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów współzakażonych wirusem KZM oraz bakterią (*B.burgdorferi* lub *A.phagocytophilum*) ($n = 6$) przed leczeniem (koinfekcje1) i pacjentów z KZM ($n = 40$) przed leczeniem (KZM1) oznaczano jako "m" dla $p < 0,05$;
- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów pacjentów współzakażonych wirusem KZM oraz bakterią (*B.burgdorferi* lub *A.phagocytophilum*) ($n = 6$) po leczeniu (koinfekcje2) i i pacjentów z KZM ($n = 40$) po leczeniu (KZM2) oznaczano jako "n" dla $p < 0,05$.

Zmiany w poziomie endokannabinoidów i eikozanoidów skutkują zwiększoną ekspresją receptorów związanych z białkiem G (CB1, CB2, TRPV1 i PPAR γ), ocenioną w granulocytach pacjentów z KZM (Ryc. 19). Jednak w przypadku współinfekcji bakteryjnych obserwowano zwiększoną ekspresję jedynie CB1, TRPV1 i PPAR γ . Farmakoterapia, zwłaszcza KZM, spowodowała znaczny spadek ekspresji wszystkich oznaczonych receptorów w porównaniu z wartościami przed leczeniem. Jednak tylko

w przypadku receptorów CB1/2 i TRPV1 wartości te różniły się istotnie statystycznie od wartości przed leczeniem. W przypadku współinfekcji bakteryjnych farmakoterapia również przyczyniła się do obniżenia poziomu ekspresji badanych receptorów, jednak bez istotności statystycznej. Poza poziomem CB2, wszystkie pozostałe receptory granulocytów u pacjentów z koinfekcją (koinfekcje) i po farmakoterapii charakteryzują się wyższą ekspresją niż w granulocytach grupy kontrolnej, co wskazuje na utrzymujący się stres oksydacyjny w organizmie pacjentów.

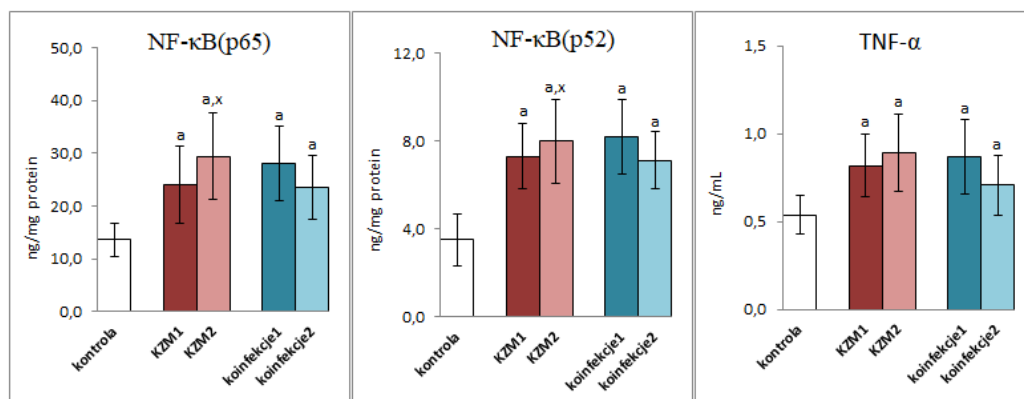


Rycina 19. Ekspresję CB1, CB2, TRPV1 i PPAR γ w granulocytach pacjentów z KZM i pacjentów z koinfekcją (koinfekcje) przed (KZM1 vs koinfekcje1) i po terapii (KZM2 vs koinfekcje2) porównano z wartościami dla osób zdrowych (kontrola). Istotności statystyczne dla wartości średnich oznaczono dla $p < 0,05$.

Legenda

- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów z KZM ($n = 40$) przed leczeniem (KZM1) lub pacjentów współzakażonych wirusem KZM oraz bakterią (*B.burgdorferi* lub *A.phagocytophilum*) ($n = 6$) przed leczeniem (koinfekcje1) i grupą kontrolną ($n = 20$) oznaczano jako "a" dla $p < 0,05$;
- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów z KZM ($n = 40$) po leczeniu (KZM2) vs przed leczeniem (KZM1) oznaczano jako "x" dla $p < 0,05$;
- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów współzakażonych wirusem KZM oraz bakterią (*B.burgdorferi* lub *A.phagocytophilum*) ($n = 6$) przed leczeniem (koinfekcje1) i pacjentów z KZM ($n = 40$) przed leczeniem (KZM1) oznaczano jako "m" dla $p < 0,05$.

Konsekwencją braku równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej w organizmie pacjentów z KZM i koinfekcjami bakteryjnymi było występowanie we krwi pacjentów stresu oksydacyjnego, który sprzyjał nasileniu odpowiedzi prozapalnej ocenianej na podstawie poziomu czynnika transkrypcyjnego NF- κ B i produktu jego aktywności transkrypcyjnej, cytokiny TNF- α . Wykazano, że ekspresja NF- κ B, obu podjednostek, a także TNF- α była znacząco zwiększona w początkowej fazie infekcji i utrzymuje się (lub nawet wzrasta) pomimo wyzdrowienia (Ryc. 20), co potwierdza, że utrzymującemu się po farmakoterapii stresowi oksydacyjnemu nadal towarzyszył mniejszy, ale jednak stan zapalny.



Rycina 20. Ekspresję podjednostek NF-κB (p65 i p52) ocenianych w granulocytach i aktywność TNF-α oznaczaną w osoczu pacjentów z KZM i pacjentów z koinfekcją (koinfekcje) przed (KZM1 vs koinfekcje1) i po terapii (KZM2 vs koinfekcje2) porównywano z wartościami dla osób zdrowych (kontrola). Istotności statystyczne dla wartości średnich oznaczono dla $p < 0,05$.

Legenda

- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów z KZM ($n = 40$) przed leczeniem (KZM1) lub pacjentów współzakażonych wirusem KZM oraz bakterią (*B.burgdorferi* lub *A.phagocytophilum*) ($n = 6$) przed leczeniem (koinfekcje1) i grupą kontrolną ($n = 20$) oznaczano jako "a" dla $p < 0,05$;
- różnice istotne statystycznie dla wartości parametrów pacjentów z KZM ($n = 40$) po leczeniu (KZM2) vs przed leczeniem (KZM1) oznaczano jako "x" dla $p < 0,05$.

V. Dyskusja

Prawidłowe funkcjonowanie organizmu człowieka wymaga zatem ścisłej kontroli procesów metabolicznych, w tym tych zaangażowanych w przekazywanie sygnałów ze środowiska, np. przez patogeny [Woodward i wsp. 2010]. Podczas infekcji wirusowych i bakteryjnych organizm gospodarza reaguje na cząsteczki sygnalizacyjne, które generowane są w odpowiedzi na obecność patogenu [Mullen i wsp. 2020]. Natomiast według Światowej Organizacji Zdrowia choroby zakaźne stanowią ogromne zagrożenie dla zdrowia człowieka, powodując w 2020 r. około 17% wszystkich zgonów na świecie. Kleszcze są wektorami szerokiego spektrum patogenów przenoszących wirusy, w tym m.in. wirus kleszczowego zapalenia mózgu (KZM) należący do rodziny Flaviviridae, a także bakterie takie jak *Borrelia burgdorferi* i *Anaplasma phagocytophilum* [Groth i wsp. 2022], które powodują choroby stwarzające problemy epidemiologiczne i kliniczne. Wiadomo również, że kleszcz *Ixodes ricinus* może przenosić kilka patogenów jednocześnie, takich jak *B.burgdorferi* i *A.phagocytophilum* [Dunaj i wsp. 2018]. Może to prowadzić do koinfekcji, która jest jeszcze trudniejsza do zdiagnozowania i leczenia ze względu na niespecyficzne objawy.

Ponieważ wirus KZM jest zwykle przenoszony podczas pokłucia przez kleszcza, infekcja rozpoczyna się w skórze. Po wprowadzeniu przez zakażonego kleszcza wirusa do organizmu człowieka dochodzi do lokalnej jego replikacji w komórkach dendrytycznych znajdujących się w skórze. Komórki te migrują do węzłów chłonnych, gdzie wirus ponownie się replikuje. Następnie poprzez naczynia limfatyczne i krwionośne wirus transportowany jest do układu siateczkowo-śródbłonkowego (śledziony, wątroby i szpiku kostnego). Wirus jest również w stanie przekroczyć barierę krew-mózg, ale dokładny mechanizm tego procesu jest nadal nieznan. W przypadku większości zakażonych pacjentów dochodzi do wyeliminowania wirusa przez mechanizmy odpornościowe opierające się głównie na działaniu cytotoksycznych limfocytów. Mimo to układ odpornościowy reaguje na wirusa, a wrodzona odpowiedź immunologiczna rozpoczyna się w momencie pojawienia się wirusa, który jest wykrywany przez receptory rozpoznające wzorce, zwłaszcza w przypadku receptorów Toll-podobnych. Pierwszą odpowiedzią na obecność wirusa jest produkcja interferonów, co nie tylko zapobiega replikacji wirusa, ale także aktywuje dalsze mechanizmy obronne w organizmie. Ponieważ ślina kleszcza hamuje funkcje komórek NK, uważa się, że funkcje tych komórek są stosunkowo mało istotne, szczególnie we wcześniejszych stadiach choroby [Ruzek i wsp. 2019, Kubes i wsp. 1994]. Dlatego komórki dendrytyczne, które są komórkami prezentującymi antygen, prezentują antygen wirusa KZM przez MHC II wraz z cząsteczkami kostymulującymi CD40, CD80 i CD86, prowadząc do aktywacji komórek nabytego układu odpornościowego. Aktywacja nabytego układu odpornościowego jest również zwiększona przez wytwarzanie cytokiny (IL-1 β , TNF- α , IL-6 i IL-8) przez komórki dendrytyczne i astrocyty [Bogovič i wsp. 2019, Palus i wsp. 2014]. W odpowiedzi adaptacyjnej na wirusa KZM obserwuje się odpowiedź zarówno humoralną jak i komórkową. Aktywacja humoralnego układu odpornościowego prowadzi do wytwarzania przez limfocyty B swoistych przeciwciał, podczas gdy odpowiedź komórkowa prowadzi do aktywacji limfocytów Th i Tc. Wiadomo, że przeciwciała wykazują aktywność przeciwwirusową,

a także należą do wiarygodnych markerów diagnostycznych, jednakże potrzebny jest dłuższy czas działania zanim ich produkcja będzie wystarczająca. Limfocyty odpowiadają za regulację układu odpornościowego, głównie poprzez produkcję dalszych cytokin. Główna funkcja limfocytów polega na zabijaniu zakażonych komórek, co zapobiega replikacji wirusa i infekcji innych komórek. Niemniej jednak w przypadku neuronów, które nie mogą się regenerować stanowi to problem, ponieważ reakcje te mogą przyczynić się do poważnego uszkodzenia OUN [Guziejko i wsp. 2020, Ruzek i wsp. 2019, Moniuszko-Malinowska i wsp. 2017, Czupryna i wsp. 2011].

Dotychczas wykazano, że zakażenie wirusem KZM skutkuje zmianami metabolicznymi w organizmie gospodarza, związanymi głównie z reakcją zapalną i modyfikacją odpowiedzi immunologicznej [Du i wsp. 2021]. Wyniki niniejszej pracy wskazują, że w grupie chorych na KZM występują istotne statystycznie różnice w liczbie białych krwinek, odsetku neutrofilii oraz stężeniu CRP przed i po leczeniu. Chociaż CRP jest stosowany jako marker stanu zapalnego w wielu schorzeniach, jego przydatność w KZM jest ograniczona. Potwierdzają to wyniki niniejszego badania wykazujące, że u większości chorych na KZM stężenie CRP w ostrej fazie choroby mieści się w granicach normy i dlatego nie można na jego podstawie monitorować przebiegu choroby. Ponadto u pacjentów z KZM stężenie CRP, WBC i odsetek neutrofilii we krwi obwodowej jest wyższe niż u pacjentów z koinfekcją KZM. W związku z tym podstawowe badania laboratoryjne mają ograniczoną przydatność w diagnostyce różnicowej chorób odkleszczowych, a istnieje potrzeba analizy innych parametrów biochemicznych.

Jednym z podstawowych elementów fizjologicznego stanu organizmu człowieka jest równowaga redoks obserwowana zarówno na poziomie komórek, jak i tkanek, w tym płynów ustrojowych [Lim i Leprivier, 2019]. Wynika to z faktu, że fizjologiczna generacja reaktywnych form tlenu (RFT) utrzymywana jest na relatywnie niskim poziomie, a ich aktywność biologiczna jest równoważona przez efektywnie działające antyoksydanty, w tym enzymatyczne jak i nieenzymatyczne [Lee i wsp. 2019]. Jednakże jednym z podstawowych elementów odpowiedzi na inwazję patogenów jest aktywacja leukocytów, której towarzyszy zwiększona aktywność enzymów prooksydacyjnych odpowiedzialnych za generowanie RFT, odgrywających kluczową rolę w obronie immunologicznej gospodarza przed patogenami [Griffiths i wsp. 2017]. W niniejszej pracy wykazano, że w osoczu krwi pacjentów zarówno z zakażeniem wirusem KZM, jak i z koinfekcją bakteryjną dochodzi do istotnego wzrostu aktywności podstawowego enzymu odpowiedzialnego za generację RFT w krwi - oksydazy ksantynowej i w konsekwencji towarzyszący mu wzrost poziomu RFT zarówno w krwi pełnej, jak i w granulocytach i limfocytach. Sytuacja taka sugeruje możliwe negatywne skutki dla organizmu człowieka skutkujące zaburzeniem fizjologicznej równowagi redoks w organizmie. Jednakże należy pamiętać, iż sugeruje się także, że RFT biorą również udział w degradacji patogenów, dzięki czemu mogą one ograniczać ich negatywny wpływ na organizm ludzki. Ponadto RFT mogą także brać udział w konkurencji międzypatogenowej [Nathan i wsp. 2013]. Mechanizm ten może wyjaśniać niewielkie różnice w poziomach RFT, a także stosunkowo niewielkie zmiany metaboliczne wynikające z koinfekcji bakteryjnej w porównaniu z samym zakażeniem wirusem KZM, w tym mniejszą stymulację granulocytów przez cytokiny prozapalne, co prowadzi do ich niższej aktywacji. Z drugiej strony antybiotyki stosowane w leczeniu pacjentów poprzez degradację bakterii zmniejszają

poziom dostarczanych przez nie LPS, które są silnymi aktywatorami neutrofilii, co może skutkować obniżeniem wytwarzania RFT.

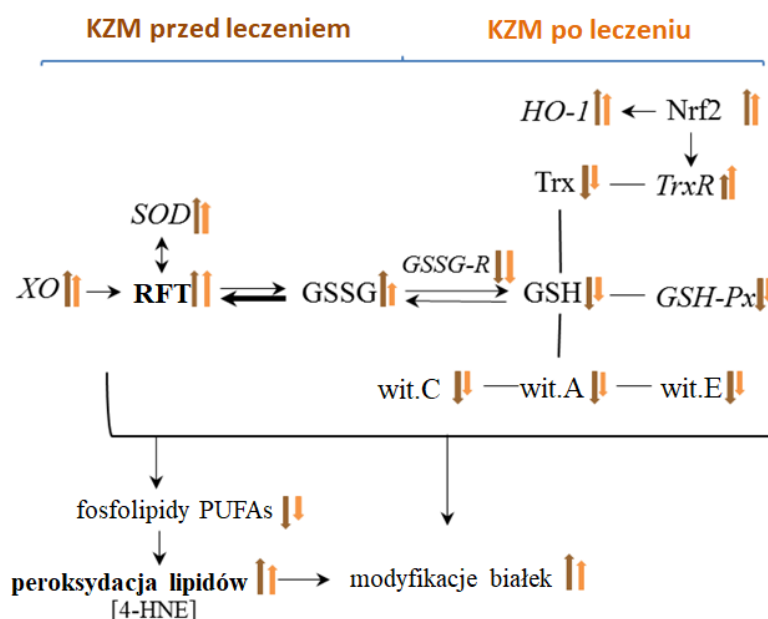
Niezależnie od korzystnej roli RFT w eliminacji patogenów, ich nadprodukcja sprzyja zaburzeniu zdolności przeciwutleniających w organizmie pacjenta. Infekcjom zwykle towarzyszą zmiany w efektywności endogennych mechanizmów obrony antyoksydacyjnej, które odpowiadają za utrzymanie równowagi redoks w warunkach fizjologicznych, jednak nadprodukcja RFT i stan zapalny zwykle towarzyszący infekcjom wirusowym przyczyniają się do obniżenia efektywności endogennych mechanizmów obrony antyoksydacyjnej [Ferrari i wsp. 2020, Dobrzyńska i wsp. 2022]. Sytuacja ta jest spójna ze znacznie obniżonym całkowitym staniem antyoksydacyjnym (TAS) osocza krwi pacjentów z zakażeniem wirusem KZM i współistniejącymi infekcjami bakteryjnymi. W wyniku farmakoterapii KZM dochodzi do istotnego statystycznie wzrostu poziomu TAS. Natomiast nie wykazano istotnych statystycznie różnic w wartościach TAS w grupie leczonych pacjentów ze współistniejącymi zakażeniami, co może być skutkiem niewielkiej liczebności tej grupy chorych.

Dzieje się tak na skutek obniżonej wydajności składników układu glutationowego poprzez zmniejszenie aktywności peroksydazy i reduktazy glutationowej oraz poziomu GSH, a także efektywności układu tioredoksynowego w wyniku obniżenia poziomu Trx. Wiadomo, że oba systemy współdziałają w celu ochrony komórek przed skutkami nadprodukcji RFT, zwłaszcza przed modyfikacjami oksydacyjnymi lipidów [Dunnill i wsp. 2017, Filomeni i wsp. 2010], co jest nieskuteczne zarówno w przypadku zakażenia wirusem KZM, jak i koinfekcji bakteryjnych. Ponadto obniżenie poziomu GSH sprzyja replikacji wirusa [Amatore i wsp. 2015], co może zaostrzyć proces chorobowy. Zmianom poziomu/aktywności powyższych przeciwutleniaczy towarzyszy również spadek poziomu innych nieenzymatycznych przeciwutleniaczy, w tym witamin A, E i C, które współpracują z glutationem w ochronie lipidów [Zal i wsp. 2012] (Ryc. 22). Jednakże ich obniżony poziom obserwowany w zakażeniu KZM i koinfekcjach potwierdza zmniejszenie ich działania ochronnego. W takiej sytuacji nawet zwiększona aktywność dysmutazy ponadtlenkowej i reduktazy tioredoksyny obserwowana w osoczu pacjentów z ww. infekcjami nie jest w stanie zapewnić skuteczności działania przeciwutleniającego.

Istnienie stresu oksydacyjnego w organizmie człowieka stwierdzono w przypadku wielu chorób wirusowych, m.in.: wirusowego zapalenia wątroby, AIDS i zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego [Georgescu i wsp. 2018, Ivanov i wsp. 2017]. Stres oksydacyjny odgrywa podwójną rolę w chorobach zakaźnych, ponieważ RFT modyfikują zarówno wrażliwość, jak i oporność organizmu gospodarza na infekcje [Ivanov i wsp. 2017, Pohanka 2013]. Jednakże nadprodukcja RFT sprzyja cytotoksyczności i uszkodzeniu cząsteczek/komórek/narządów gospodarza, w tym płynów biologicznych [Ivanov i wsp. 2017, Novaes i wsp. 2019], ale sugerowano również, że RFT uczestniczy w konkurencji między patogenami, która chroni organizm przed infekcjami wielopatogennymi [Nathan i wsp. 2013].

Wskazuje to wyraźnie, że standardowa farmakoterapia nie jest w stanie spowodować przywrócenia organizmu pacjentów do stanu fizjologicznego, co może sugerować potrzebę włączenia do farmakoterapii chorób przenoszonych przez kleszcze antyoksydantów, które pomogłyby organizmowi w regulacji stanu redoks organizmu. Za takim podejściem przemawiają również dane literaturowe dotyczące stosowania egzogennych antyoksydantów

jako wsparcia klasycznej farmakoterapii innych chorób, zarówno pochodzenia wirusowego, jak i bakteryjnego [Qin i wsp. 2020, Aubry i wsp. 2017].



Rycina 22. Graficzne przedstawienie wpływu zakażenia KZM na zmiany metaboliczne we krwi pacjentów przed i po leczeniu.

Wyniki niniejszej pracy wskazują zatem, że zarówno samo kleszczowe zapalenie mózgu, jak i współistniejące zakażenia bakteryjne sprzyjają powstawaniu stresu oksydacyjnego w organizmie pacjenta, a podobna sytuacja dotyczy wielu chorób, w tym tych wywoływanych zarówno przez wirusy, jak i bakterie [Almeida i wsp. 2020, Rockwood i wsp. 2018]. Jednakże, chociaż stres oksydacyjny odgrywa podwójną rolę w chorobach zakaźnych, ponieważ RFT modyfikują zarówno podatność, jak i odporność organizmu gospodarza na infekcję [Ivanov i wsp. 2017], ze względu na ich niespecyficzny charakter i unikalną reaktywność, RFT stają się szkodliwe zarówno dla patogenu, jak i gospodarza [Pohanka 2013], co sprzyja oksydacyjnym modyfikacjom podstawowych składników ludzkiego ciała, w tym lipidów i białek [Ingram 2018], które są kluczowe dla odpowiedzi immunologicznej gospodarza.

Elementami strukturalnymi błon biologicznych są lipidy, które są jednocześnie ważnymi cząsteczkami bioaktywnymi pośredniczącymi w kaskadach sygnałowych i zdarzeniach regulacyjnych w komórkach i płynach biologicznych, w tym w odpowiedzi na infekcje, zwłaszcza wirusowe, ponieważ zdolność do biosyntezy lipidów predysponuje organizm ludzki do infekowania go przez pasożyty [Lorizate i wsp. 2011]. Wirusy polegają wyłącznie na zasobach żywiciela w celu zaspokojenia swoich potrzeb lipidowych. W przypadku większości wirusów replikujących w cytoplazmie zakażonych komórek, lipidy są niezbędne do replikacji ich genomów [Lorizate i wsp. 2011]. Ponadto struktury błon gospodarza są modyfikowane w celu uniknięcia mechanizmów obrony przeciwwirusowej, ale

także w celu zapewnienia miejsca replikacji wirusa [Kasuga i wsp. 2021, Staring i wsp. 2018].

Zmniejszona skuteczność ochrony antyoksydacyjnej wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFAs) w fosfolipidach wraz ze wzrostem poziomu RFT sprzyjają peroksydacji lipidów ocenianej w tym badaniu poprzez obniżenie poziomu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (PUFAs) i podwyższenie poziomu produktów peroksydacji lipidów w osoczu pacjentów z KZM i bakteryjnymi koinfekcjami. Stwierdzono, że poziomy fosfolipidowych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, takich jak LA, AA i EPA oceniane w osoczu pacjentów w przebiegu zakażenia wirusem KZM oraz koinfekcji bakteryjnych ulegają obniżeniu, natomiast po leczeniu u osób zakażonych wirusem KZM ich poziomy ulegają podwyższeniu, co może wskazywać na skuteczność leczenia. Wiadomo natomiast, że podczas infekcji przenoszonych przez kleszcze dochodzi do ingerencji patogenu na poziomie OUN. Z kolei błony komórek nerwowych są bogate w fosfolipidy, które zawierają szczególnie duże ilości PUFAs, w tym zwłaszcza arachidonowego i eikozapentaenowego, które ze względu na dużą liczbę wiązań nienasyconych są niezwykle podatne na działanie RFT. W wyniku tego działania powstają stosunkowo duże ilości reaktywnych aldehydów, będących produktami fragmentacji oksydacyjnej, a także pochodnych prostaglandyn - produktów oksydacyjnej cyklizacji łańcuchów węglowodorowych kwasów tłuszczowych [Raefsky i wsp. 2018]. Ze względu na dużą ilość kwasu AA i EPA w mózgu, powstają produkty cyklizacji tych kwasów, czyli neuroprostan, które są przydatne w ocenie zaburzeń metabolicznych mózgu, gdyż można je identyfikować na podstawie zmian poziomu neuroprostanów we krwi [Miller i wsp. 2014]. Wykazano także, że również przedstawiciel innej grupy cyklicznych produktów peroksydacji lipidów - izoprostanów (8-izo-PGF 2α) bierze udział w patogenezie różnych chorób zakaźnych [Muhammad i wsp., Zheng i wsp. 2021]. Ponieważ izoprostan odgrywają także rolę w procesach prozapalnych, ich podwyższony poziom w osoczu krwi pacjentów z KZM wskazuje na nasilenie ogólnoustrojowego stanu zapalnego, którego celem jest zwalczanie infekcji. Natomiast w przypadku koinfekcji bakteryjnej obserwuje się obniżenie poziomu 8-izo-PGF 2α w porównaniu do KZM, co świadczy o upośledzeniu tego szlaku sygnałowego, a co za tym idzie, o mniejszej zdolności organizmu do zwalczania patogenów.

Jednakże w procesie peroksydacji lipidów dochodzi również do reakcji oksydacyjnej fragmentacji łańcuchów węglowodorowych PUFAs z utworzeniem α,β -nienasyconych, drobnocząsteczkowych reaktywnych aldehydów takich jak dialdehyd malonowy (MDA) i 4-hydroksynonenal (4-HNE) [Ayala i wsp. 2014]. Wzrost poziomu dialdehydu malonowego (MDA) związany jest głównie z oksydacyjną modyfikacją kwasu arachidonowego, którego poziom w osoczu pacjentów jest znacznie obniżony. Zatem zmiany w poziomie fosfolipidowych kwasów tłuszczowych i produktów peroksydacji lipidów potwierdzają uogólniony, w tym również w komórkach mózgu, stres oksydacyjny w organizmach pacjentów z kleszczowym zapaleniem mózgu i ze współistniejącymi zakażeniami bakteryjnymi. Efektem farmakoterapii jest istotne statystycznie obniżenie poziomu MDA i neuroprostanów u pacjentów z KZM po zastosowaniu farmakoterapii, wskazujące na poprawę ogólnoustrojowego metabolizmu fosfolipidów w tej grupie chorych. Efekt farmakoterapii, szczególnie biorąc pod uwagę poziom neuroprostanów, wskazuje na poprawę stanu bariery krew/mózg i prawdopodobnie zmniejszenie oksydacyjnego metabolizmu

fosfolipidów w komórkach mózgu, a tym samym lepszy stan neurologiczny pacjentów po leczeniu. Jednak w przypadku KZM ze współistniejącą infekcją bakteryjną znaczące obniżenie poziomu zaobserwowano jedynie dla MDA. Można zatem sugerować, że w komórkach mózgu nadal istnieją warunki prooksydacyjne i/lub stan bariery krew-mózg nie uległ całkowitej poprawie.

Również poziom drugiego z klasycznych i często analizowanych drobnocząsteczkowych reaktywnych aldehydów jakim jest 4-HNE ulega znaczącemu podwyższeniu w KZM i koinfekcjach bakteryjnych. Elektrofilowy 4-HNE tworzy addukty z większością nukleofilowych składników organizmu, w tym z resztami aminokwasowymi białek, takimi jak cysteina, histydyna i lizyna [Barrera i wsp. 2015], zaburzając procesy metaboliczne, w których biorą udział zmodyfikowane białka [Gęgoteki Skrzydlewska 2019, Pohl i Jovanovic 2019]. 4-HNE tworzy addukty z enzymami przeciwutleniającymi, które mogą zmniejszać jego skuteczność przeciwutleniającą [Bauera i Zarkovic 2015, Fang i wsp. 2016]. Jest to bardzo prawdopodobne w przypadkach chorób analizowanych w tym badaniu, ponieważ poziom adduktów 4-HNE-białka jest znacząco podwyższony. Dotyczy to głównie peroksydazy glutationowej, której aktywność w osoczu chorych na KZM i koinfekcję bakteryjną jest wyraźnie obniżona. Jednakże 4-HNE może również stymulować odpowiedź antyoksydacyjną, pozytywnie wpływając na aktywność czynnika transkrypcyjnego Nrf2. W warunkach fizjologicznych Nrf2, odpowiedzialny za biosyntezę białek cytoprotekcyjnych, w tym przeciwutleniaczy, tworzy kompleks ze swoim białkiem hamującym cytozol, Keap1, które kieruje czynnikiem transkrypcyjnym do ubiquitynacji i degradacji proteasomów [Ma i wsp. 2015]. Jednakże w warunkach utleniających zarówno RFT, jak i produkty peroksydacji lipidów, reagując z krytyczną resztą cysteiny Keap1, inaktywują ten inhibitor [Itoh i wsp. 2003], co prowadzi do aktywacji Nrf2, który reguluje transkrypcję genów, w tym kodujących białka biorące udział w procesie utrzymanie równowagi redoks, detoksykacja, naprawa uszkodzeń makromolekularnych i równowaga metaboliczna [Cuadrado i wsp. 2019]. O wzmożonej transkrypcji genów antyoksydacyjnych świadczy znacząco podwyższony poziom oksygenazy hemowej, co uważa się za podstawowy wskaźnik efektywności tego czynnika transkrypcyjnego [Ma i wsp. 2015]. Z drugiej strony obniżenie poziomu 4-HNE obserwowane po leczeniu może wynikać z jego interakcji z N-końcowym aminokwasem kinazy c-Jun (JNK), prowadzącej do jej aktywacji i translokacji do jądra [Gęgotek i Skrzydlewska 2015, Parola i wsp. 1998], co może również promować aktywację Nrf2 w odpowiedzi antyoksydacyjnej. Wcześniej stwierdzono, że nasilenie aktywności transkrypcyjnej genów antyoksydacyjnych przez Nrf2 koreluje z odpornością na infekcję HSV1 [Wyler i wsp. 2019], zatem podobna sytuacja może dotyczyć kleszczowego zapalenia mózgu. W stanach zapalnych, w tym w obserwowanym zakażeniu wirusem KZM i koinfekcjach bakteryjnych, aktywacja Nrf2 ostatecznie przywraca homeostazę redoks poprzez zwiększenie poziomu niezbędnych przeciwutleniaczy, w tym oksygenazy hemowej 1 (HO-1), o której wiadomo, że jest składnikiem skutecznej odporności komórek na liczne patogeny [Huang i wsp. 2017], ale także dysmutazy ponadtlenkowej i reduktazy tioredoksyny. To może wyjaśniać, dlaczego w odpowiedzi na wprowadzenie patogenu do organizmu człowieka i wynikającą z tego zwiększoną produkcję RFT, zwykle towarzyszy mu nadprodukcja przeciwutleniaczy [Ingram 2022, Lee 2018]. Wiadomo jednak, że molekularne

mechanizmy oporności modelowane przez Nrf2 w odpowiedzi na stres mogą się różnić w zależności od rodzaju patogenu, a także odpowiedzi immunologicznej gospodarza.

Niezależnie od bezpośredniej redukcji efektywności RFT i produktów peroksydacji lipidów, działanie elementów układu antyoksydacyjnego, takich jak Trx czy GSH, których poziom ulega obniżeniu w wyniku obserwowanego zakażenia wirusem KZM, ich znaczenie metaboliczne w organizmie wiąże się także z rolą modyfikatorów działania czynnik transkrypcyjny NF- κ B, który uczestniczy w odpowiedzi prozapalnej organizmu gospodarza [Liu i wsp. 2017]. Wiadomo, że Trx odpowiada za redukcję Cys62 NF- κ B, niezbędnej do biosyntezy białek prozapalnych [Zhu i wsp. 2019]; dlatego obniżony poziom Trx w osoczu pacjentów z zakażeniem wirusem KZM i koinfekcjami bakteryjnymi może wskazywać na częściowo obniżoną aktywność transkrypcyjną NF- κ B. Taki mechanizm działania Trx w zakażeniu wirusem KZM może wyjaśniać obserwowaną nielogiczną tendencję do zwiększania poziomu podjednostek NF- κ B i poziomu produktu jej aktywności transkrypcyjnej, cytokiny prozapalnej (TNF- α), natomiast po wyzdrowieniu towarzyszy jej tendencja do wzrost poziomu Trx. Natomiast w przypadku koinfekcji po antybiotykoterapii obserwuje się tendencję do dalszego obniżania poziomu Trx i w konsekwencji obniżania się poziomu TNF- α . Jednakże aktywność transkrypcyjna i sygnalizacyjna NF- κ B zależy także od poziomu GSH, który modyfikuje strukturę tego czynnika transkrypcyjnego poprzez glutationylację cysteiny 62, a tym samym hamuje jego działanie prozapalne [Pastore i Piemonte 2012]. Badania proteomiczne wykazały zwiększone tworzenie się adduktów białka GSH w osoczu pacjentów z KZM, a także z koinfekcjami [dane niepublikowane]. Może to być przyczyną obniżonego poziomu GSH w osoczu u pacjentów z KZM. Podobne wyniki obserwuje się w przypadku niektórych infekcji bakteryjnych, w tym wywołanych przez *B. burgdorferi*, które indukują glutationylację białek w organizmie gospodarza [Kerstholt i wsp. 2018]. GSH może glutationylować IKK – inhibitor NF- κ B w osoczu pacjentów z KZM, szczególnie w przypadku koinfekcji, co wskazuje na możliwość zwiększenia efektywności tego czynnika transkrypcyjnego. Glutationylacja poprzez indukcję aktywacji szlaku NF- κ B powoduje wzrost ogólnoustrojowego stanu zapalnego, znacznie silniejszy u pacjentów współzakażonych, gdy GSH silniej modyfikuje IKK niż u pacjentów z KZM. Dodatkowo w osoczu pacjentów zakażonych chorobami odkleszczowymi obserwuje się wysoki poziom kinaz, w tym PKA, PKC i CDK4. Zakłóca to szlaki sygnalizacyjne zależne od fosforylacji. Glutationylacja białek jest głównym mechanizmem odpornościowym redoks, który wpływa nie tylko na funkcję NF- κ B, ale także na białka takie jak STAT3, PKA, TRAF3 i TRAF6 [Mullen i wsp. 2020]. Dlatego też, hamując sygnalizację za pośrednictwem NF- κ B GSH może również odgrywać rolę przeciwzapalną i wywierać działanie ochronne w infekcjach [Ghezzi i wsp. 2011]. Jednakże wyniki opisane w tym badaniu dodatkowo uzupełniają tę wiedzę o informację, że poziom grup karbonylowych białek w przypadku koinfekcji są istotnie niższy w porównaniu do poziomu CBO w osoczu chorych na KZM, stąd indukcja aktywności NF- κ B może być niższa niezależnie od poziomu jego podjednostek, podobnie w obu grupach pacjentów. Z drugiej strony 4-HNE, którego poziom jest podwyższony w osoczu chorych na KZM i pacjentów współzakażonych, wpływa zarówno na bezpośrednią, jak i pośrednią sygnalizację prozapalną. Wiążąc się z cytoplazmatycznym inhibitorem NF- κ B – I κ B, 4-HNE może zwiększać aktywność transkrypcyjną NF- κ B, co objawia się podwyższonym poziomem TNF- α [Ji i wsp. 2001], który wiążąc się z odpowiednimi

receptorami stymuluje ekspresję NF- κ B. Wiadomo również, że interakcja 4-HNE z TLR zapobiega aktywacji tego białka transbłonowego, które tłumia funkcje odpornościowe inicjujące aktywację NF- κ B podczas infekcji bakteryjnej [Kim i wsp. 2009].

Stres oksydacyjny towarzyszący wirusowemu zapaleniu mózgu jak i koinfekcjom bakteryjnym towarzyszącym tej chorobie wirusowej sprzyja modyfikacjom metabolizmu lipidów nie tylko kontrolowanym przez RFT, ale również przez enzymy metabolizujące lipidy, w tym głównie fosfatazy, cyklooksygenazy i lipoksygenazy [Lopes Pires i wsp. 2017], których aktywność zwykle wzrasta w warunkach stresu oksydacyjnego, ze zwiększonym poziomem RFT [Lopes Pires i wsp. 2017]. W konsekwencji w warunkach infekcji (KZM) i koinfekcji bakteryjnej (koinfekcje) dochodzi do zwiększonej aktywacji enzymów lipolitycznych, w tym fosfolipazy A2 (PLA2) uwalniającej zarówno kwasy tłuszczowe, jak i produkty ich cyklizacji ze struktur lipidowych, a także cyklooksygenaz 1 i 2 (COX 1/2) oraz lipoksygenaz (LOX), w tym lipoksygenazy-5 (LOX 5), które metabolizują PUFAs do mediatorów lipidowych [Joshi i wsp. 2016]. Wyniki niniejszej pracy pokazują, że aktywność PLA2 w osoczu krwi pacjentów z infekcją wirusową (KZM) aktywność tego enzymu jest podwyższona w trakcie i po leczeniu, natomiast w przypadku koinfekcji bakteryjnej jest podwyższona tylko przed leczeniem. Skutkuje to dodatkowym, niezależnym od peroksydacji lipidów, obniżeniem stężenia fosfolipidowych kwasów tłuszczowych w osoczu, przy jednoczesnym wzroście poziomu wolnych kwasów tłuszczowych w osoczu przed leczeniem, szczególnie u pacjentów z kleszczowym zapaleniem mózgu. Wcześniejsze dane literaturowe wykazały, że w zakażeniu HCV wielonienasycone kwasy tłuszczowe, w tym AA, mogą nasilać przeciwwirusowe działanie IFN- α i przyczyniać się do aktywności antypatogennej [Leu i wsp. 2004]. Ponadto dane literaturowe pokazują również, że aktywność indukowalnej izoformy cyklooksygenazy (COX 2) jest regulowana w górę podczas infekcji wirusem grypy, przyczyniając się do nasilonej odpowiedzi cytokinowej obserwowanej w ciężkich infekcjach H5N1 u ludzi [Lee i wsp. 2011]. W konsekwencji można zasugerować, że znaczny wzrost aktywności enzymów metabolizujących PUFAs może być odpowiedzią organizmu na infekcję.

Dalsze konsekwencje wynikające ze zwiększonej aktywności enzymów odpowiedzialnych za metabolizm PUFAs do mediatorów lipidowych, w tym endokannabinoidów i eikozanoidów wynikają z ich działania, zarówno bezpośredniego, jak i pośredniego, głównie poprzez aktywację receptorów błonowych, które modulują zarówno równowagę redoks, jak i stan zapalny [Karu i wsp. 2022]. W wyniku enzymatycznego metabolizmu fosfolipidów powstają endokannabinoidy, które są istotnymi mediatorami lipidowymi regulującymi metabolizm komórkowy związany ze stresem oksydacyjnym oraz sygnalizacją prozapalną, gdyż oprócz roli modulatorów metabolizmu w OUN, endokannabinoidy są również obwodowymi mediatorami immunologicznymi, o działaniu przeciwzapalnym lub prozapalnym w zależności od ich składu chemicznego i aktywowanych przez nie receptorów (głównie receptorów endokannabinoidowych - CB1 i CB2) [Lu i Mackie 2021]. Do najobficiej występujących endokannabinoidów należą pochodne kwasu arachidonowego, takie jak N-arachidonoilietanoloamina (AEA) i 2-arachidonoiloglicerol (2-AG), oraz pokrewne związki będące metabolitami innych kwasów tłuszczowych, takie jak N-oleiloetanoloamina (OEA), N-palmitoiloetanoloamina (PEA) [Finn i wsp. 2021]. Spośród endokannabinoidów przedstawionych w niniejszej pracy, znaczący wzrost stężenia AEA

i OEA obserwuje się jedynie w osoczu pacjentów z kleszczowym zapaleniem mózgu, podczas gdy w przypadku współzakażenia bakteryjnego obserwuje się wzrost poziomu tylko AEA. Może to sugerować, że podwyższony poziom endokannabinoidów jest głównie konsekwencją hamowania aktywności enzymów rozkładających te mediatory lipidowe [Sakin i wsp. 2015]. Dane literaturowe wskazują również, że w infekcjach wirusowych wywołanych przez HIV lub wirusa Theiler, AEA może uczestniczyć w regulacji stanu zapalnego poprzez obniżenie poziomu cytokin prozapalnych i aktywację szlaków przeciwzapalnych w komórkach immunosupresyjnych [Krishnan i Chatterjee 2014, Mestre i wsp. 2011]. Natomiast OEA ma również właściwości przeciwzapalne i przeciwutleniające, co zapobiega uszkodzeniom śródbłonna naczyniowego [Di Paola i wsp. 2018].

Wiadomo, że endokannabinoidy działają jako agoniści receptorów związanych z białkiem G, takich jak CB1, CB2, TRPV1 i PPAR γ , których zwiększoną ekspresję zaobserwowano w granulocytach pacjentów z kleszczowym zapaleniem mózgu i współzakażeniem bakteryjnym. Receptory te są zaangażowane zarówno w regulację równowagi redoks, jak i stanu zapalnego [Apostu i wsp. 2019]. Wiadomo, że aktywacja receptorów CB1 zwiększa wytwarzanie RFT i TNF- α , co może nasilać stres oksydacyjny i stan zapalny, natomiast aktywacja receptorów CB2 sprzyja zmniejszeniu wytwarzania RFT i TNF- α , co prowadzi do redukcji stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego [Han i wsp. 2009], co może przyczyniać się do zmniejszenia infekcji wirusowej i bakteryjnej. Na taki wielokierunkowy efekt wskazuje silna aktywacja receptorów CB1 u pacjentów ze współistniejącymi infekcjami (koinfekcje), a jednocześnie znacznie niższa aktywacja receptorów CB2 w granulocytach tych pacjentów. Ponadto wykazano, że receptor CB2, ulegający ekspresji głównie w komórkach układu odpornościowego zmniejszających produkcję RFT i TNF- α , nie tylko redukuje zarówno stres oksydacyjny, jak i stan zapalny [Han i wsp. 2009], ale także reguluje kinazy białkowe aktywowane mitogenami (MAPK), a niektóre MAPK również stymulują fosfolipazy, w tym PLA2 [Correa i wsp. 2009, Han i wsp. 2015]. Wiadomo również, że poprzez aktywację rodziny receptorów z rodziny PPAR, endokannabinoidy hamują reakcje zapalne i wzmacniają odpowiedź gospodarza na stan zapalny [Borrelli i wsp. 2015]. Wyniki niniejszej pracy, które wskazują na znacznie niższą aktywację PPAR γ w przypadku współzakażenia niż w przypadku samego zakażenia wirusem KZM zdają się to potwierdzać powyższe sugestie. Natomiast dane literaturowe wskazują, że w przypadku innych chorób wirusowych, w tym COVID-19, OEA, której ekspresja jest również podwyższona tylko u pacjentów z KZM jest odpowiedzialna za osłabienie regulacji ekspresji genów prozapalnych związanych z czynnikiem transkrypcyjnym NF- κ B [Ghaffari i wsp. 2020, Akbari i wsp. 2022], a także moduluje efekty częściowo pośredniczące przez PPAR α [Flannery i wsp. 2021]. Ponadto u pacjentów z COVID-19 stwierdzono również, że aktywacja układu endokannabinoidowego (ECS) zmniejsza replikację wirusa i poziom cytokin prozapalnych [Lucaciu i wsp. 2021], dlatego podobną odpowiedź układu endokannabinoidowego, szczególnie w przypadku KZM, ale częściowo także w przypadku koinfekcji, można uznać za korzystny, a nawet pro-przeżyciowy efekt zakażonego organizmu.

W wyniku nasilonego przez PLA2 enzymatycznego metabolizmu endokannabinoidów i hydrolizy fosfolipidów, zwłaszcza tych zawierających kwas arachidonowy, a w konsekwencji enzymatycznego metabolizmu PUFAs, zależnego od aktywności COX 1/2 i LOXs, generowana jest inna grupa mediatorów lipidowych jakimi są eikozanoidy, które

mogą mieć zarówno działanie pro- jak i przeciwzapalne [Dennis i Norris 2015]. Dane literaturowe wyraźnie wskazują, że podczas infekcji aktywność PLA2 promowana przez wirusa jest niezbędna do produkcji 15-HETE i 13-HODE, i że są to dwa główne mediatory pochodzące z PUFAs, które należą do szlaków modulujących stan zapalny [Leghmar i wsp. 2015, Karu i wsp. 2022]. Zatem wzrost stężenia 13-HODE obserwowany po farmakoterapii pacjentów z kleszczowym zapaleniem mózgu i współzakażeniami bakteryjnymi (koinfekcje) może potwierdzać ustąpienie procesu chorobowego. Ponadto 13-HODE hamuje adhezję płytek krwi i apoptozę makrofagów [Karu i wsp. 2022], a także jest ligandem aktywującym receptor TRPV1 [Leghmar i wsp. 2015], którego zwiększoną aktywację obserwuje się w granulocytach pacjentów zarówno z KZM, jak i współzakażeniami bakteryjnymi. W przeciwieństwie do tego, poziom 15-HETE nie wykazuje wzrostu, ale tendencję do spadku po farmakoterapii. Może to wynikać z faktu, że 15-HETE ulega dalszemu metabolizmowi jako prekursor biosyntezy lipoksyny LXB4, która jest ważnym agonistą zakończenia stanu zapalnego [Biagini i wsp. 2022]. Zatem taka zmiana poziomu tych mediatorów może wskazywać na rzeczywiste ustąpienie stanu zapalnego. Wyniki niniejszego badania wskazują na ten sam kierunek zmian aktywności PLA2 i 15-HETE, co może również potwierdzać ich wzajemne oddziaływanie w przypadku KZM. Natomiast obniżony poziom 15-PGJ2 obserwowany w osoczu pacjentów zarówno z KZM, jak i współzakażeniami bakteryjnymi, który poprzez obniżenie poziomu TNF- α zmniejsza aktywację prozapalnego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B [Prasad i wsp. 2008], wskazuje na istniejący stan zapalny u pacjentów zarówno z KZM, jak i koinfekcjami oraz bardzo powolne ustępowanie stanu zapalnego po farmakoterapii.

Ponadto w osoczu pacjentów z KZM, a także ze współistniejącymi infekcjami bakteryjnymi obserwuje się, podwyższone poziomy LTB4. Wiadomo natomiast, że leukotrieny B4 (LTB4), powstające pod wpływem LOX 5 z kwasu arachidonowego, są zaangażowane we wczesne etapy stanu zapalnego podczas infekcji [Brandt i wsp. 2018]. Wykazano, że LTB4 promuje migrację i przeżycie neutrofilów, zwiększa wydzielanie enzymów z granulek neutrofilów i produkcję anionorodników ponadtlenkowych [Widegren i wsp. 2011]. Te leukotrieny mogą również uczestniczyć w rekrutacji limfocytów T do miejsc zapalenia [Li i wsp. 2015]. Wiadomo również, że LTB4 indukuje uwalnianie peptydu przeciwdrobnoustrojowego z neutrofilów, a w niektórych przypadkach hamuje replikację wirusów [Widegren i wsp. 2011, Gaudreault i Gosselin 2008]. Można zatem sugerować, że kilkukrotny wzrost poziomu LTB4 obserwowany na początku infekcji wirusem KZM stymuluje odpowiedź ochronną przed patogenami. Badania na myszach zakażonych wirusem grypy wykazały, że podawanie egzogennej LTB4 ma korzystny wpływ na przebieg infekcji [Gaudreault i Gosselin 2008]. Można zatem sugerować, że jest to powodem, iż po leczeniu obserwuje się znaczne zmniejszenie poziomu LTB4 w przebiegu KZM. Z drugiej strony, w przypadku współzakażenia wirusowo-bakteryjnego występuje znacznie mniejszy wzrost poziomu LTB4 i mniejsza redukcja po leczeniu. Badania nad metabolicznymi konsekwencjami zakażenia *Mycobacterium tuberculosis* wykazały, że prawidłowy stosunek LTB4/PGE2 jest niezbędny do kontrolowania odpowiedzi immunologicznej gospodarza, co sugeruje, że optymalna produkcja PGE2 jest również wymagana do skutecznej odpowiedzi immunologicznej [Sorgi i wsp. 2020]. Może to sugerować, że również w przypadku innych infekcji, w tym KZM i współinfekcjach bakteryjnych, sytuacja może być podobna. Jednak

u pacjentów z kleszczowym zapaleniem mózgu i współzakażeniem obserwuje się obniżone poziomy PGE₂, co może przyczyniać się raczej do osłabienia odpowiedzi immunologicznej.

Wiadomo ponadto, że eikozanoidy działają głównie poprzez receptory błonowe i że zarówno 13-HODE, jak i 15-HETE są agonistami receptorów PPAR γ , promując tym samym redukcję stanu zapalnego [Karu i wsp. 2022], a dodatkowo 13-HODE jest również ligandem aktywującym receptor TRPV1 [Leghmar i wsp. 2015], którego zwiększoną aktywację obserwuje się w granulocytach pacjentów zarówno z kleszczowym zapaleniem mózgu, jak i współzakażeniami bakteryjnymi. Biorąc jednak pod uwagę fakt, że oceniane receptory aktywowane są pod wpływem różnych mediatorów lipidowych, nie jest możliwe jednoznaczne powiązanie zmian w poziomie mediatorów i aktywowanych receptorów. Z drugiej strony, wyniki dotyczące receptorów wskazują, że wszystkie badane receptory są bardziej aktywowane na początku choroby, co zmniejsza się, zwykle tylko nieznacznie, po farmakoterapii. Taka odpowiedź może zatem wyraźnie wskazywać na regresję procesu chorobowego, ale nie wskazuje na stan fizjologiczny.

Podsumowanie

Rosnąca liczba zakażeń wirusem kleszczowego zapalenia mózgu oraz koinfekcji bakteryjnych stwarza narastające problemy diagnostyczny i terapeutyczne. Świadczą o tym stosunkowo niewielkie różnice w wartościach analizowanych parametrów metabolicznych obserwowane w obu grupach pacjentów, zarówno przed, jak i po farmakoterapii. Należy jednak brać pod uwagę fakt, że niewielkie różnice we krwi pacjentów zakażonych tylko wirusem jak i wirusem oraz bakteriami mogą wskazywać na pojawiający się efekt konkurencji między patogenami.

Jednak należy brać pod uwagę fakt iż odpowiedź metaboliczna żywiciela różnicuje jednak klasyczne zakażenie wirusem kleszczowego zapalenia mózgu od koinfekcji spowodowanej zakażeniem tymże wirusem oraz bakteriami (*Borrelia burgdorferi* lub *Anaplasma phagocytophilum*) Dotyczy to w szczególności zwiększonej aktywności TrxR w przypadku KZM i obniżonej w przypadku koinfekcji, co może znaleźć zastosowanie w diagnostyce różnicowej i terapii. Poza tym obniżone poziom przeciwutleniaczy (Trx i GSH) oraz zwiększone stężenie produktów peroksydacji lipidów (4-HNE i 8-iso-PGF₂ α) sprzyjają modyfikacjom struktury i funkcji białek, np. czynników transkrypcyjnych (Nrf2 i NF- κ B) modelując w ten sposób ich skuteczność. Z drugiej strony zwiększenie poziomu Trx po terapii może przyczynić się do nasilenia procesu zapalnego. Z kolei niższy poziom 8-izo-PGF₂ α obserwowany w przypadku koinfekcji może wskazywać na upośledzenie zdolności organizmu do reagowania na nasilenie stanu zapalnego.

Również obserwowana w niniejszej pracy zmiana w metabolizmie fosfolipidów osocza u pacjentów z kleszczowym zapaleniem mózgu oraz koinfekcjami bakteryjnymi wskazuje na zaburzenia metabolizmu fosfolipidów prowadzące do nadprodukcji ich metabolitów powstających w reakcjach enzymatycznych w tym z grupy endokannabinoidów i eikozanoidów, które biorą udział w dalszych przemianach metabolicznych w organizmie człowieka, bezpośrednio lub poprzez aktywację receptorów błonowych, co utrudnia jednoznaczne określenie konsekwencji tych modyfikacji. Częściowe zmniejszenie zmian po

klasycznej farmakoterapii wyraźnie wskazuje jedynie na cofnięcie się procesu chorobowego, a nie na powrót organizmu do stanu fizjologicznego.

Dlatego też, chcąc zapewnić nową perspektywę, zarówno diagnostyczną, jak i terapeutyczną, istnieje dalsza potrzeba analizy zmian metabolicznych w odniesieniu do większych grup pacjentów z KZM i koinfekcją. Natomiast biorąc pod uwagę przedstawione wyniki, w tym stres oksydacyjny i w konsekwencji zaburzony metabolizm fosfolipidów, można sugerować dodanie przeciwutleniaczy do klasycznej farmakoterapii zakażeń KZM, zwłaszcza przy koinfekcjach bakteryjnych.

VI. Wnioski

1. Zakażenie wirusem KZM oraz koinfekcje sprzyjają powstawaniu stresu oksydacyjnego wywołanego zmianami w aktywności/poziomie parametrów prooksydacyjnych oraz w większości przypadków obniżeniu aktywności/poziomu parametrów antyoksydacyjnych, co skutkuje nasiloną peroksydacją lipidów i oksydacyjnymi modyfikacjami białek. Obserwowany wzrost ekspresji czynnika transkrypcyjnego Nrf2 odpowiedzialnego za biosyntezę białek antyoksydacyjnych nie równoważy oksydacyjnych modyfikacji struktury/aktywności białek antyoksydacyjnych, co skutkuje przesunięciem równowagi redoks w kierunku prooksydacyjnym.
2. Klasyczne leczenie zarówno zakażenia wirusem KZM oraz koinfekcji jedynie w nieznaczny sposób modyfikuje równowagę redoks w porównaniu do stanu początkowego choroby, co świadczy o nieskuteczności leczenia w odniesieniu do omawianych zaburzeń metabolicznych. Niższy poziom 8-iso-PGF2 α w koinfekcjach wirusowo-bakteryjnych wskazuje na upośledzenie zdolności organizmu do nasilenia stanu zapalnego i zwalczania koinfekcji, natomiast podwyższony poziom Trx po terapii może wskazywać na ciągle istniejący proces zapalny, co potwierdzają poziomy NF- κ B i TNF- α .
3. Stres oksydacyjny spowodowany zakażeniem wirusem KZM oraz koinfekcjami sprzyja podwyższeniu aktywności enzymów lipolitycznych, a zwłaszcza indukowalnej izoformy COX (COX 2), czego konsekwencją jest nasilony metabolizm fosfolipidów (oceniany na poziomie fosfolipidowych oraz wolnych PUFAs) ze wzmożoną generacją metabolitów wolnych PUFAs, w tym endokannabinoidów (głównie AEA) oraz eikozanoidów pro-zapalnych i obniżonym poziomem eikozanoidów antyzapalnych, które działając zarówno bezpośrednio jak i poprzez receptory związane z białkiem G zwrótnie nasilają odpowiedź prooksydacyjną i prozapalną.
4. Klasyczna farmakoterapia zakażenia wirusem KZM oraz koinfekcji częściowo redukuje zaburzony metabolizm fosfolipidowych oraz wolnych PUFAs, jednak nie w sposób na tyle istotny, aby doprowadzić do stanu fizjologicznego.
5. Klasyczna farmakoterapia nie doprowadza do stanu fizjologicznego, a jedynie zmniejsza nasilenie zaburzeń metabolicznych związanych ze stresem oksydacyjnym i jego konsekwencjami oraz stanem zapalnym. Obserwowana odpowiedź metaboliczna organizmu chorych na choroby przenoszone przez kleszcze sugeruje rozważenie wprowadzenia do farmakoterapii preparatów antyoksydacyjnych, w tym o charakterze lipofilowym, które chroniłyby błony biologiczne przed skutkami metabolicznymi zakażeń.

VII. Streszczenie w języku polskim

Kleszcze żyjące w środowisku człowieka, mogą być nosicielami różnych patogenów, w tym wirusa kleszczowego zapalenia mózgu (KZM) oraz bakterii (*Borrelia burgdorferi* i *Anaplasma phagocytophilum*). Ze względu na zmiany klimatyczne sprzyjające zwiększającej się liczbie kleszczy w środowisku naturalnym człowieka obserwuje się coraz więcej infekcji oraz koinfekcji powodowanych przez te mikroorganizmy, co stanowi problem zarówno diagnostyczny jak i terapeutyczny.

W konsekwencji celem pracy było określenie zmian równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej i stanu zapalnego oraz ocena zaburzeń metabolicznych na poziomie lipidów i białek, ze szczególnym uwzględnieniem biologicznie aktywnych produktów metabolizmu lipidów u pacjentów zakażonych wirusem KZM oraz pacjentów z koinfekcjami powodowanymi przez *Borrelia burgdorferi* i *Anaplasma phagocytophilum*. Zgoda na badania udzielona została przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (nr R-I-002/169/2018).

Do badań zakwalifikowano osoby pokłute przez kleszcze, w liczbie 40 pacjentów z rozpoznaniem kleszczowego zapalenia mózgu (KZM), w tym 14 kobiet i 26 mężczyzn oraz 6 pacjentów z KZM oraz koinfekcjami, spowodowanymi przez bakterie *Borrelia burgdorferi* (borelioza z Lyme - LB) i *Anaplasma phagocytophilum* (ludzka anaplazmoza granulocytarna – HGA), 4 kobiety i 2 mężczyzn, leczonych w Klinice Chorób Zakaźnych i Neuroinfekcji Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Do badań wykorzystano osocze oraz granulocyty i limfocyty krwi pacjentów z KZM i z koinfekcjami (KZM+borelioza/anaplazmoza) oraz osób z grupy kontrolnej (20) dobranych pod względem wieku i płci do grupy badanej. Krew pacjentów pobierana była po przybyciu do szpitala oraz po zakończeniu leczenia.

Wyniki uzyskano standardowymi metodami stosowanymi w badaniach biochemicznych, w tym: poziom białek oznaczano techniką Elisy, aktywności enzymów oceniano metodami spektrofotometrycznymi, poziomy fosfolipidowych i wolnych PUFAs oraz produktów peroksydacji lipidów metodami wykorzystującymi GC/FID; GCMS i LCMS. Produkty enzymatycznego metabolizmu PUFAs (endokannabinoidy i eikozanoidy oznaczano metodami z wykorzystaniem LCMS.

Stwierdzono, że KZM oraz koinfekcje bakteryjne – promują wzmożone wytwarzanie RFT i zmniejszenie obrony antyoksydacyjnej, zwłaszcza w odniesieniu do składników układów: glutationu i tioredoksyny w osoczu, pomimo zwiększonej efektywności czynnika transkrypcyjnego Nrf2 w granulocytach. Zaobserwowany stres oksydacyjny sprzyja modyfikacjom oksydacyjnym fosfolipidów z istotnie podwyższonym stężeniem produktów peroksydacji lipidów (4-HNE, MDA, 8-isoPGF2 α , neuroprostany), a także modyfikacji białek ocenianych jako addukty 4-HNE-białka, grupy karbonylowe i dityrozyna oraz spadek poziomu tryptofanu, które mogą sprzyjać strukturalnej i funkcjonalnej modyfikacji czynników transkrypcyjnych: Nrf2 i NF- κ B. Jednocześnie obserwuje się obniżenie poziomu fosfolipidowych i wolnych wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (LA, AA, EPA). Uzyskane wyniki wskazują na potencjalną możliwość wykorzystania ocenianych parametrów metabolicznych do wprowadzenia farmakoterapii celowanej w przypadkach

zakażeń/koinfekcji. Wzmożona aktywność enzymów metabolizujących fosfolipidy i wolne PUFAs (PLA2, COX1/2, NOX5) przyczynia się do podwyższenia poziomu endokannabinoidów i eikozanoidów (13-HODE, 15-HETE, LTB4) z obniżeniem przeciwzapalnego 15-PGJ2, czemu towarzyszyła aktywacja receptorów granulocytów (CB1, CB2, TRPV1, PPAR γ) przed farmakoterapią i wykazywała jedynie tendencję do normalizacji po leczeniu.

Uzyskane wyniki potwierdzają problemy terapeutyczne dla chorób przenoszonych przez kleszcze. Świadczą o tym stosunkowo niewielkie różnice w parametrach metabolicznych w obu grupach pacjentów, zarówno przed, jak i po farmakoterapii. Można sugerować, że tylko częściowa redukcja zmian po klasycznej farmakoterapii wskazuje jedynie na cofnięcie się procesu chorobowego, a nie na powrót organizmu do stanu fizjologicznego. Dlatego też, biorąc pod uwagę przedstawione wyniki oraz fakt, że zaburzony metabolizm fosfolipidów na ogół wiąże się ze stresem oksydacyjnym, można sugerować rozważenie wprowadzenia przeciwutleniaczy, w tym zwłaszcza lipofilowych, do klasycznej farmakoterapii zakażeń KZM, zwłaszcza w przypadku koinfekcji.

VIII. Streszczenie w języku angielskim

Ticks living in the human environment, can carry various pathogens, including tick-borne encephalitis virus (TBE) and bacteria (*Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum*). Due to climate change favoring an increasing number of ticks in the human environment, more and more infections and co-infections caused by these microorganisms are observed, which poses both diagnostic and therapeutic problems.

Consequently, the purpose of this study was to determine changes in oxidation-antioxidant balance and inflammation, and to evaluate metabolic disturbances at the lipid and protein levels, with a special focus on biologically active products of lipid metabolism in patients infected with TBEV and patients with bacterial co-infections caused by *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum*. Approval for the study was granted by the Bioethics Committee of the Medical University of Białystok (No. R-I-002/169/2018).

The study enrolled tick-bitten individuals, with 40 patients diagnosed with tick-borne encephalitis (TBE), including 14 women and 26 men, and 6 patients with TBE and co-infections, caused by the bacteria *Borrelia burgdorferi* (Lyme borreliosis - LB) and *Anaplasma phagocytophilum* (human granulocytic anaplasmosis - HGA), 4 women and 2 men, treated at the Department of Infectious Diseases and Neuroinfections at the Medical University of Białystok. Plasma and blood granulocytes and lymphocytes from patients with TBE and co-infections (TBE+Borreliosis/anaplasmosis) and age- and sex-matched control subjects (20) were used for the study. Patients' blood was collected upon arrival at the hospital and at the end of treatment.

Results were obtained by standard methods used in biochemical studies, including: Elisa technique for protein levels determination, spectrophotometric methods for enzymes activity assessing, GCFID/GCMS/LCMS for phospholipid and free PUFAs as well as lipid peroxidation products level examination and LCMS for products of PUFAs enzymatic metabolism (endocannabinoids and eicosanoids) determination.

It was found that TBE and bacterial co-infections promote increased production of ROS and decreased antioxidant defense, especially with regard to system components glutathione and thioredoxin in plasma, despite increased efficiency of transcription factor Nrf2 in granulocytes. The observed oxidative stress promotes oxidative modifications of phospholipids with significantly increased levels of lipid peroxidation products (4-HNE, MDA, 8-isoPGF2 α , neuroprostanes), as well as protein modifications assessed as 4-HNE-protein adducts, carbonyl groups and dityrosine, and a decrease in tryptophan levels, which may promote structural and functional modification of transcription factors: Nrf2 and NF- κ B. At the same time, there is a decrease in the levels of phospholipid and free polyunsaturated fatty acids (LA, AA, EPA). The results indicate the potential possibility of using the evaluated metabolic parameters to introduce targeted pharmacotherapy in cases of bacterial infections/co-infections. Increased activity of enzymes that metabolize phospholipids and free PUFAs (PLA2, COX 1/2, NOX5) contributes to increased levels of endocannabinoids and eicosanoids (13-HODE, 15-HETE, LTB4) with decreased anti-inflammatory 15-PGJ2, which was accompanied by activation of granulocyte receptors (CB1, CB2, TRPV1, PPAR γ) before pharmacotherapy and showed only a tendency to normalize after treatment.

The results confirm the therapeutic problems for tick-borne diseases. This is evidenced by relatively small differences in the values of metabolic parameters in both groups of patients, both before and after pharmacotherapy. It can be suggested that only a partial reduction in lesions after classical pharmacotherapy indicates only a reversal of the disease process, and not a return of the body to a physiological state. Therefore, taking into account the presented results and the fact that impaired phospholipid metabolism is generally associated with oxidative stress, one can suggest the introduction of antioxidants especially lipophilic into the classical pharmacotherapy of TBE infection, especially in the case of bacterial co-infections.

IX. Piśmiennictwo

- Abdelrahim NA, Mohamed N, Evander M, Ahlm C, Fadl-Elmula IM. 2022. Human herpes virus type-6 is associated with central nervous system infections in children in Sudan. *Afr J Lab Med* 11: 2225-2010 doi:10.4102/ajlm.v11i1.1718
- Abrantes JL, Alves CM, Costa J, Almeida FC, Sola-Penna M, Fontes CF, Souza TM. 2012. Herpes simplex type 1 activates glycolysis through engagement of the enzyme 6-phosphofructo-1-kinase (PFK-1). *Biochim Biophys Acta* 1822:1198–1206 doi:10.1016/j.bbadis.2012.04.011
- Akbari N, Ostadrahimi A, Tutunchi H, Pourmoradian S, Farrin N, Najafipour F i wsp. 2022. Possible therapeutic effects of boron citrate and oleoylethanolamide supplementation in patients with COVID-19: A pilot randomized, double-blind, clinical trial. *J Trace Elem Med Biol* 71:126945. doi:10.1016/j.jtemb.2022.126945.
- Alburkat H, Jääskeläinen AJ, Barakat AM, Hasony HJ, Sironen T, Al-Hello H i wsp. 2020. Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infections and Seroprevalence, Southern Iraq *Emerg Infect Dis* 26:3002-3006. doi: 10.3201/eid2612.201792.
- Almeida LT, Ferraz AC, da Silva Caetano CC, da Silva Menegatto MB i wsp. 2020. Zika virus induces oxidative stress and decreases antioxidant enzyme activities in vitro and in vivo. *Virus Res* 286:198084 doi:10.1016/j.virusres.2020.198084
- Amatore D, Sgarbanti R, Aquilano K, Baldelli S, Limongi D, Civitelli L i wsp. 2015. Influenza virus replication in lung epithelial cells depends on redox-sensitive pathways activated by NOX4-derived ROS. *Cell Microbiol* 17:131–145.
- Apostu D, Lucaciu O, Mester A, Benea H, Oltean-Dan D, Onisor F i wsp. 2019. Cannabinoids and bone regeneration. *Drug Metab Rev* 51(1):65–75. doi:10.1080/03602532.2019.1574303.
- Aubry M, Laughhunn A, Santa Maria F, Lanteri MC, Stassinopoulos A, Musso D. 2017. Pathogen inactivation of Dengue virus in red blood cells using amustaline and glutathione. *Transfusion* 57:2888-2896, doi:10.1111/trf.14318.
- Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. 2014. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longevity* 1:31 doi: 10.1155/2014/360438
- Bai F, Kong KF, Dai J, Qian F, Zhang L, Brown CR i wsp. 2010. A paradoxical role for neutrophils in the pathogenesis of West Nile virus. *J Infect Dis* 202:1804–1812, doi:10.1086/657416
- Bambouskova M, Gorvel L, Lampropoulou V, Sergushichev A, Loginicheva E, Johnson K i wsp. 2018. Electrophilic Properties of Itaconate and Derivatives Regulate the Ikbζ-ATF3 Inflammatory Axis. *Nature* 556:501–504 doi: 10.1038/s41586-018-0052-z
- Barrera G, Pizzimenti S, Ciamporcero ES, Daga M, Ullio C, Arcaro A i wsp. 2015. Role of 4-Hydroxynonenal-Protein Adducts in Human Diseases. *Antioxid Redox Signal* 22:1681–1702

- Basagoudanavar SH, Thapa RJ, Nogusa S, Wang J, Beg AA, Balachandran S. 2011. Distinct roles for the NF- κ B RelA subunit during antiviral innate immune responses. *J Virol* 85:2599–2610 doi:10.1128/JVI.02213-10
- Basu M, Courtney SC, Brinton MA. 2017. Arsenite-induced stress granule formation is inhibited by elevated levels of reduced glutathione in West Nile virus-infected cells. *PLoS Pathog* 13:e1006240 doi:10.1371/journal.ppat.1006240
- Bauer G, Zarkovic N. 2015. Revealing Mechanisms of Selective, Concentration-Dependent Potentials of 4-Hydroxy-2-Nonenal to Induce Apoptosis in Cancer Cells through Inactivation of Membrane-Associated Catalase. *Free Radic Biol Med* 81:128–144.
- Beatty PR, Puerta-Guardo H, Killingbeck SS, Glasner DR, Hopkins K i wsp. 2015. Dengue virus NS1 triggers endothelial permeability and vascular leak that is prevented by NS1 vaccination. *Sci Transl Med* 7:304ra141 doi: 10.1126/scitranslmed.aaa3787
- Biagini D, Franzini M, Oliveri P, Lomonaco T, Ghimenti S, Bonini A i wsp. 2022. MS-based targeted profiling of oxylipins in COVID-19: A new insight into inflammation regulation. *Free Radic Biol Med* 180:236-243. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2022.01.021.
- Bogovič P, Lusa L, Korva M, Pavletič M, Resman Rus K, Lotrič-Furlan S, i wsp. 2019. Inflammatory Immune Responses in the Pathogenesis of Tick-Borne Encephalitis. *J Clin Med* 8:731.
- Borrelli F, Romano B, Petrosino S, Pagano E, Capasso R, Coppola D i wsp. 2015. Palmitoylethanolamide, a naturally occurring lipid, is an orally effective intestinal anti-inflammatory agent. *Br J Pharmacol* 172:142-158. doi:10.1111/bph.12907.
- Blázquez AB, Martín-Acebes MA, Poderoso T, Saiz JC. 2021. Relevance of Oxidative Stress in Inhibition of Eif2 Alpha Phosphorylation and Stress Granules Formation During Usutu Virus Infection. *PLoS Negl Trop Dis* 15:p.e0009072 doi: 10.1371/journal.pntd.0009072
- Bourne N, Scholle F, Silva MC, Rossi SL, Dewsbury N, Judy B i wsp. 2007. Early production of type I interferon during West Nile virus infection: Role for lymphoid tissues in IRF3-independent interferon production. *J Virol* 81:9100–9108
- Brandt SL, Klopfenstein N, Wang S, Winfree S, McCarthy BP, Territo PR i wsp. 2018. Macrophage-derived LTB₄ promotes abscess formation and clearance of *Staphylococcus aureus* skin infection in mice. *PLoS Pathog* 14(8):e1007244. doi:10.1371/journal.ppat.1007244.
- Buchanan R, Bonthius DJ. 2012. Measles Virus and Associated Central Nervous System Sequelae. *Semin Pediatr Neurol* 19:107-114 doi:10.1016/j.spn.2012.02.003
- Byrne S, Halliday GM, Johnston LJ, King NJ. 2001. Interleukin-1 beta but not tumor necrosis factor is involved in West Nile virus-induced Langerhans cell migration from the skin in C57BL/6 mice. *J Invest Dermatol* 117:702–9 doi:10.1046/j.0022-202x.2001.01454.x
- Casiraghi C, Dorovini-Zis K, Horwitz MS. 2011. Epstein-Barr virus infection of human brain microvessel endothelial cells: a novel role in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 230:173-177

- Cecchini G. 2003. Function and Structure of Complex II of the Respiratory Chain. *Annu Rev Biochem* 72:77–109 doi: 0.1146/annurev.biochem.72.121801.161700
- Cerny D, Haniffa M, Shin A, Bigliardi P, Tan BK, Lee B i wsp. 2014. Selective Susceptibility of Human Skin Antigen Presenting Cells to Productive Dengue Virus Infection. *PLoS Pathog* 10:e1004548 doi:10.1371/journal.ppat.1004548
- Chambers JW, Maguire TG, Alwine JC. 2010. Glutamine metabolism is essential for human cytomegalovirus infection. *J Virol* 84:1867–1873.
- Chareonsirisuthigul T, Kalayanarooj S, Ubol S. 2007. Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *J Gen Virol* 88:365–375 doi:10.1099/vir.0.82537-0
- Chatel-Chaix L, Cortese M, Romero-Brey I, Bender S, Neufeldt CJ, Fischl W i wsp. 2016. Dengue Virus Perturbs Mitochondrial Morphodynamics to Dampen Innate Immune Responses. *Cell Host Microbe* 20:342–356 doi:10.1016/j.chom.2016.07.008
- Chen CJ, Ou YC, Lin SY, Raung SL, Liao SL, Lai CY i wsp. 2010. Glial activation involvement in neuronal death by Japanese encephalitis virus infection. *J Gen Virol* 91:1028–1037 doi:10.1099/vir.0.013565-0
- Chiurchiù V, Orlacchio A, Maccarrone M. 2016. Is Modulation of Oxidative Stress an Answer? The State of the Art of Redox Therapeutic Actions in Neurodegenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2016:7909380 doi:10.1155/2016/7909380
- Correa F, Docagne F, Mestre L, Clemente D, Hernangómez M, Loría F, Guaza C. 2009. A Role for CB2 Receptors in Anandamide Signalling Pathways Involved in the Regulation of IL-12 and IL-23 in Microglial Cells. *Biochem Pharmacol* 77(1):86-100. doi:10.1016/j.bcp.2008.09.014.
- Chowdhury P, Khan SA. 2021. Global emergence of West Nile virus: Threat & preparedness in special perspective to India. *Indian J Med Res* 154:36–50 doi:10.4103/ijmr.IJMR_642_19
- Christie WW. 1993. *Advances in Lipid Methodology II*; Oily Press Lipid Library; Oily Press: Bridgewater, NJ, USA.
- Clarke P, Leser JS, Quick ED, Dionne KR, Beckham JD, Tyler KL. 2014. Death Receptor-Mediated Apoptotic Signaling Is Activated in the Brain following Infection with West Nile Virus in the Absence of a Peripheral Immune Response. *J Virol* 88:1080-1089 doi:10.1128/JVI.02944-13
- Coolen SAJ, van Buuren B, Duchateau G, Upritchard J, Verhagen H. 2005. Kinetics of Biomarkers: Biological and Technical Validity of Isoprostanes in Plasma. *Amino Acids* 29:429–436.
- Constant O, Barthelemy J, Nagy A, Salinas S, Simonin Y. 2022. West Nile Virus Neuroinfection in Humans: Peripheral Biomarkers of Neuroinflammation and Neuronal Damage. *Viruses* 14: 756 doi:10.3390/v14040756

- Cordes T, Metallo CM. 2021. Itaconate Alters Succinate and Coenzyme A Metabolism via Inhibition of Mitochondrial Complex II and Methylmalonyl-CoA Mutase. *Metabolites* 11:117 doi: 10.3390/metabo11020117
- Cordes T, Wallace M, Michelucci A, Divakaruni AS, Sapcariu SC, Sousa C i wsp. 2016. Immunoresponsive Gene 1 and itaconate inhibit succinate dehydrogenase to modulate intracellular succinate levels. *J Biol Chem* 291:14274–14284 doi: 10.1074/jbc.M115.685792
- Cross S, Cook DR, Chi AW, Vance PJ, Kolson LL, Wong BJ i wsp. 2011. Dimethyl Fumarate, an Immune Modulator and Inducer of the Antioxidant Response, Suppresses HIV Replication and Macrophage-Mediated Neurotoxicity: A Novel Candidate for HIV Neuroprotection. *J Immunol* 187:5015–5025 doi:10.4049/jimmunol.1101868
- Cuadrado A, Rojo AI, Wells G, Hayes JD, Cousin SP, Rumsey WL i wsp. 2019. Therapeutic Targeting of the NRF2 and KEAP1 Partnership in Chronic Diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 18:295–317.
- da Conceição TM, Rust NM, Berbel ACER, Martins NB, do Nascimento Santos CA, Da Poian AT, de Arruda LB. 2013. Essential role of RIG-I in the activation of endothelial cells by dengue virus. *Virology* 435:281–292 doi: 10.1016/j.virol.2012.09.
- Czupryna P, Moniuszko A, Pancewicz SA, Grygorczuk S, Kondrusik M, Zajkowska J. 2011. Tick-borne encephalitis in Poland in years 1993-2008--epidemiology and clinical presentation. A retrospective study of 687 patients. *Eur J Neurol* 18(5):673-679. doi:10.1111/j.1468-1331.2010.03278.x
- Dalrymple NA, Mackow ER. 2012. Endothelial cells elicit immune-enhancing responses to dengue virus infection. *J Virol* 86:6408–6415 doi:10.1128/JVI.00213-12
- Dan Dunn J, Alvarez LA, Zhang X, Soldati T. 2015. Reactive oxygen species and mitochondria: a nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol* 6:472–485 doi:10.1016/j.redox.2015.09.005
- Daniels BP, Kofman SB, Smith JR, Norris GT, Snyder AG, Kolb JP, i wsp. 2019. The Nucleotide Sensor ZBP1 and Kinase RIPK3 Induce the Enzyme IRG1 to Promote an Antiviral Metabolic State in Neurons. *Immunity* 50:64–76 doi:10.1016/j.immuni.2018.11.017
- Daniels BP, Holman DW, Cruz-Orengo L, Jujjavarapu H, Durrant DM, Klein RS. 2014. Viral Pathogen-Associated Molecular Patterns Regulate Blood-Brain Barrier Integrity via Competing Innate Cytokine Signals. *mBio* 5 doi:10.1128/mBio.01476-14
- da Silva Mello C, Cabral-Castro MJ, Silva de Faria LC, Mauro Peralta J, Puccioni-Sohler M., 2020. Dengue and chikungunya infection in neurologic disorders from endemic areas in Brazil. *Neurol Clin Pract* 10:497-502 doi:10.1212/CPJ.0000000000000776
- da Silva IRF, Frontera JA, Bispo de Filippis AM, Nascimento OJMD. 2017. Neurologic complications associated with the Zika virus in Brazilian adults. *JAMA Neurol* 74:1190-1198 doi: 10.1001/jamaneurol.2017.1703

- de Carvalho GC, Borget MY, Bernier S, Garneau D, Duarte AJDS, Dumais N. 2019. RAGE and CCR7 mediate the transmigration of Zika-infected monocytes through the blood-brain barrier. *Immunobiol* 224:792–803 doi:10.1016/j.imbio.2019.08.007
- DeLano WL. 2002. Pymol: an open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newslett Protein Crystallogr* 40:82–92.
- De Leenheer AP, De Bevere VORC, De Ruyter MGM, Claeys AE. 1979. Simultaneous Determination of Retinol and α -Tocopherol in Human Serum by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 162:408–413.
- de Vries L, Harding AT. 2023. Mechanisms of Neuroinvasion and Neuropathogenesis by Pathologic Flaviviruses. *Viruses*. 15(2):261. doi:10.3390/v15020261
- Dennis EA i Norris PC. 2015. Eicosanoid Storm in Infection and Inflammation. *Nat Rev Immunol* 15(8):511-523. doi:10.1038/nri3859.
- Detje CN, Meyer T, Schmidt H, Kreuz D, Rose JK, Bechmann I i wsp. 2009. Local type I IFN receptor signaling protects against virus spread within the central nervous system. *J Immunol* 182:2297-2304 doi: 10.1080/13550280590922793
- Di Paola M, Bonechi E, Provensi G, Costa A, Clarke'a G, Ballerini K i wsp. Passani. 2018. Oleoylethanolamide treatment affects gut microbiota composition and the expression of intestinal cytokines in Peyer's patches of mice. *Sci. Rep.* 8: 1-12, doi:10.1038/s41598-018-32925-x.
- Dobrzyńska M, Moniuszko-Malinowska A, Jarocka-Karpowicz I, Czupryna P, Groth M, Skrzydlewska E. 2022. Metabolic Response to Tick-Borne Encephalitis Virus Infection and Bacterial Co-Infections. *Pathogens* 11:384 doi:10.3390/pathogens11040384
- Dörrbecker B, Dobler G, Spiegel M, Hufert FT. 2010. Tick-borne encephalitis virus and the immune response of the mammalian host. *Travel Med Infect Dis* 8: 213–222 doi:10.1016/j.tmaid.2010.05.010
- Du Y, Mi Z, Xie Y, Lu D, Zheng H, Sun H, i wsp. 2021. Insights into the Molecular Basis of Tick-Borne Encephalitis from Multiplatform Metabolomics. *PLoS Negl Trop Dis* 15:e0009172.
- Dunaj J, Moniuszko-Malinowska A, Swiecicka I, Andersson M, Czupryna P, Rutkowski K, i wsp. 2018. Tick-borne infections and co-infections in patients with non-specific symptoms in Poland. *Adv Med Sci* 63:167-172.
- Dunnill, C, Patton T, Brennan J, Barrett J, Dryden M, Cooke J i wsp. 2017. Reactive Oxygen Species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *Int Wound J* 14:89–96.
- Dupont-Rouzeyrol M, Biron A, O'Connor O, Huguon E, Descloux E. 2016. Infectious Zika viral particles in breastmilk. *Lancet* 387:P1051 doi:10.1016/S01406736(16)00624-3
- Dwivedi VD, Tripathi IP, Tripathi RC, Bharadwaj S, Mishra SK. 2017. Genomics, proteomics and evolution of dengue virus. *Brief Funct Genomics* 16:217–227 doi:10.1093/bfgp/elw040

- El-Sayed A, Kamel M. 2020. Climatic changes and their role in emergence and re-emergence of diseases. *Environ Sci Pollut Res* 27:22336–22352 doi:10.1007/s11356-020-08896-w
- Errett JS, Suthar MS, McMillan A, Diamond MS, Gale Jr. M. 2013. The Essential, Nonredundant Roles of RIG-I and MDA5 in Detecting and Controlling West Nile Virus Infection. *J Virol* 87: 11416 - 11425 doi:10.1128/JVI.01488-13
- Escoll P, Platon L, Buchrieser C. 2019. Roles of mitochondrial respiratory complexes during infection. *Immunometabolism* 1:e190011.
- EUR-Lex-32012D0340-EN-EUR-Lex. Available online: https://eur-lex.europa.eu/eli/dec_impl/2012/340/oj (accessed on 7 February 2022).
- Fam SS, Murphey LJ, Terry ES, Zackert WE, Chen Y, Gao L i wsp. 2002. Formation of highly reactive A-ring and J-ring isoprostane-like compounds (A4/J4-neuroprostanes) in vivo from docosahexaenoic acid. *J Biol Chem* 277:36076–84 doi:10.1074/jbc.M205638200.
- Fang C, Zhang H, Wan J, Wu Y, Li K, Jin C i wsp. 2016. Control of Leaf Senescence by an MeOH-Jasmonates Cascade That Is Epigenetically Regulated by OsSRT1 in Rice. *Mol Plant* 9:1366–1378.
- Fernandes-Siqueira LO, Zeidler JD, Sousa BG, Ferreira T, Da Poian AT. 2018. Anaplerotic role of glucose in the oxidation of endogenous fatty acids during dengue virus infection. *mSphere* 3:e00458-17 doi:10.1128/mSphere.00458-17
- Ferrari M, Zevini A, Palermo E, Muscolini M, Alexandridi M, Etna MP, i wsp. 2020. Dengue virus targets Nrf2 for NS2B3-mediated degradation leading to enhanced oxidative stress and viral replication. *J Virol* 94:e01551-20. doi:10.1128/JVI.01551-20.
- Filomeni G, Desideri E, Cardaci S, Rotilio G, Ciriolo MR. 2010. Under the ROS: thiol network is the principal suspect for autophagy commitment. *Autophagy* 6: 999–1005.
- Finn DP, Haroutounian S, Hohmann AG, Krane E, Soliman N, Rice ASC. 2021. Cannabinoids, the Endocannabinoid System, and Pain: A Review of Preclinical Studies. *Pain* 162:S5–S25. doi:10.1097/j.pain.0000000000002268.
- Fish KN, Soderberg-Naucler C, Mills LK, Stenglein S, Nelson JA. 1998. Human cytomegalovirus persistently infects aortic endothelial cells. *J Virol* 72:5661-5668
- Flannery LE, Kerr DM, Hughes EM, Humphrey RM, Finn DP Roche M. 2021. N-acylethanolamine regulation of TLR3-induced hyperthermia and neuroinflammatory gene expression: A role for PPAR α . *J Neuroim* 358:577654. doi:10.1016/j.jneuroim.2021.577654.
- Fontaine KA, Sanchez EL, Camarda R, Lagunoff M. 2015. Dengue virus induces and requires glycolysis for optimal replication. *J Virol* 89:2358–2366. doi:10.1128/JVI.02309-14
- García-Nicolás O, Lewandowska M, Ricklin ME, Summerfield A. 2019. Monocyte-Derived Dendritic Cells as Model to Evaluate Species Tropism of Mosquito-Borne Flaviviruses. *Front Cell Infect Microbiol* 9:2019 doi:10.3389/fcimb.2019.00005

- Gaudreault E i Gosselin J. 2008. Leukotriene B4 Induces Release of Antimicrobial Peptides in Lungs of Virally Infected Mice. *J Immunol* 180(9):6211-6221. doi:10.4049/jimmunol.180.9.6211.
- Georgescu SR, Mitran CI, Mitran MI, Caruntu C, Sarbu MI, Matei C i wsp. 2018. New insights in the pathogenesis of HPV infection and the associated carcinogenic processes: the role of chronic inflammation and oxidative stress. *J Immunol Res* 2018:5315816.
- Gęgotek A, Skrzydlewska E. 2019. Biological Effect of Protein Modifications by Lipid Peroxidation Products. *Chem Phys Lipids* 221:46–52.
- Gęgotek A, Skrzydlewska E. 2015. The role of transcription factor Nrf2 in skin cells metabolism. *Arch Dermatol Res* 307:385–396 doi:10.1007/s00403-015-1554-2
- Gillard GO, Collette B, Anderson J, Chao J, Scannevin RH, Huss DJ i wsp. 2015. DMF, But Not Other Fumarates, Inhibits NF-kappaB Activity In Vitro in an Nrf2-Independent Manner. *J Neuroimmunol* 283:74–85 doi:10.1016/j.jneuroim.2015.04.006
- Ghaffari S, Roshanravan N, Tutunchi H, Ostadrahimi A, Pouraghaei M, Kafil B. 2020. Oleoylethanolamide, A Bioactive Lipid Amide, as A Promising Treatment Strategy for Coronavirus/COVID-19. *Arch Med Res* 51:464-467. doi:10.1016/j.arcmed.2020.04.006.
- Ghezzi P. 2011. Role of Glutathione in Immunity and Inflammation in the Lung. *Int J Gen Med* 4:105–113.
- Ghoshal A, Das S, Ghosh S, Mishra MK, Sharma V, Koli P i wsp. 2007. Proinflammatory mediators released by activated microglia induces neuronal death in Japanese encephalitis. *Glia* 55:483-496 doi: 10.1002/glia.20474
- Glass WG, Lim JK, Cholera R, Pletnev AG, Gao JL, Murphy PM. 2005. Chemokine receptor CCR5 promotes leukocyte trafficking to the brain and survival in West Nile virus infection. *J Exp Med* 202:1087–1098 doi:10.1084/jem.20042530
- Gralinski LE, Ashley SL, Dixon SD, Spindler KR. 2009. Mouse adenovirus type 1-induced breakdown of the blood-brain barrier. *J Virol* 83:9398-9410
- Groth M, Skrzydlewska E, Dobrzyńska M, Pancewicz S, Moniuszko-Malinowska A. 2022. Redox imbalance and its metabolic consequences in tick-borne diseases. *Front Cell Infect Microbiol* 12:870398 doi:10.3389/fcimb.2022.870398.
- Griffiths HR, Gao D, Pararasa C. 2017. Redox Regulation in Metabolic Programming and Inflammation. *Redox Biol* 12:50-57. doi:10.1016/j.redox.2017.01.023.
- Guziejko K, Czupryna P, Pancewicz S, Świerzbńska R, Dunaj J, Kruszewska E i wsp. 2020. Analysis of CCL-4, CCL-17, CCL-20 and IL-8 concentrations in the serum of patients with tick-borne encephalitis and anaplasmosis. *Cytokine* 125:154852. doi:10.1016/j.cyto.2019.154852
- Günther G, Haglund M, Lindquist L, Forsgren M, Andersson J, Andersson B i wsp. 2011. Tick-borne encephalitis is associated with low levels of interleukin-10 in cerebrospinal fluid. *Infect Ecol Epidemiology* 1:6029 doi:10.3402/iee.v1i0.6029

- Halstead SB, Cohen SN. 2015. Dengue Hemorrhagic Fever at 60 Years: Early Evolution of Concepts of Causation and Treatment. *Microbiol Mol Biol Rev* 79:281-91 doi:10.1128/MMBR.00009-15
- Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N i wsp. 2015. Biology of Zika virus infection in human skin cells. *J Virol* 89:8880–8896 doi:10.1128/JVI.00354-15
- Han X, Wang T, Zhang J, Liu X, Li Z, Wang G i wsp. 2015. Apolipoprotein CIII regulates lipoprotein-associated phospholipase A2 expression via the MAPK and NFkB pathways. *Biol Open* 4:661–665. doi:10.1242/bio.201410900.
- Han KH, Lim S, Ryu J, Lee CW, Kim Y, Kang JH i wsp. 2009. CB1 and CB2 cannabinoid receptors differentially regulate the production of reactive oxygen species by macrophages. *Cardiovasc Res* 84:378–386. doi:10.1093/cvr/cvp240.
- Hawkins CL, Morgan PE, Davies MJ. 2009. Quantification of Protein Modification by Oxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 46:965–988.
- Hayes JD, Dinkova-Kostova AT. 2014. The Nrf2 Regulatory Network Provides an Interface Between Redox and Intermediary Metabolism. *Trends Biochem Sci* 39:199–218 doi:10.1016/j.tibs.2014.02.002
- Heaton NS, Randall G. 2010. Dengue Virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host Microbe* 8:422–32. doi: 10.1016/j.chom.2010.10.006
- Heinz FX, Stiasny K. 2017. The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. *Microbiol Mol Biol Rev* 81:e00055-16 doi:10.1128/MMBR.00055-16.
- Hernández-Sarmiento LJ, Valdés-López JF, Urcuqui-Inchima S. 2023. American-Asian- and African lineages of Zika virus induce differential pro-inflammatory and Interleukin 27-dependent antiviral responses in human monocytes. *Virus Res* 325:199040 doi:10.1016/j.virusres.2023.199040
- Hnasko R, Lin A, McGarvey JA, Stanker LH. A 2011. Rapid Method to Improve Protein Detection by Indirect ELISA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 410:726–731.
- Hooftman A, O'Neill LAJ. 2019. The Immunomodulatory Potential of the Metabolite Itaconate. *Trends Immunol.* 40:687–698 doi:10.1016/j.it.2019.05.007
- Holmgren A, Björnstedt M. 1995. Thioredoxin and Thioredoxin Reductase. *Methods Enzymol.* 252:199–208.
- Hou F, Sun L, Zheng H, Skaug B, Jiang QX, Chen ZJ. 2011. MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell* 146:448–461 doi:10.1016/j.cell.2011.06.041
- Hsieh JT, Rathore APS, Soundarajan G, John ALS. 2019. Japanese encephalitis virus neuropenetrance is driven by mast cell chymase. *Nat Commun* 10:706 doi: 10.1038/s41467-019-08641-z

- Huang H, Falgout B, Takeda K, Yamada KM, Dhawan S. 2017. Nrf2-dependent induction of innate host defense via heme oxygenase-1 inhibits Zika virus replication. *Virology* 503:1–5 doi:10.1016/j.virol.2016.12.019
- Humphries F, Shmuel-Galia L, Ketelut-Carneiro N, Li S, Wang B, Nemmara VV i wsp. 2020. Succination inactivates gasdermin D and blocks pyroptosis. *Science* 369:1633–1637 doi:10.1126/science.abb9818
- Hunsperger EA, Roehrig JT. 2006. Temporal analyses of the neuropathogenesis of a West Nile virus infection in mice. *J Neurovirol* 12:129–139.
- Ingram SL. 2022. Regulation of Oxidoreductase Enzymes during Inflammation. Available online: <https://research.brighton.ac.uk/en/studentTheses/regulation-of-oxidoreductase-enzymes-during-inflammation>
- Ingram SL. 2018. Regulation of oxidoreductase enzymes during inflammation. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:203889495>
- Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, O'Connor T, Yamamoto M. 2003. Keap1 Regulates Both Cytoplasmic-Nuclear Shuttling and Degradation of Nrf2 in Response to Electrophiles. *Genes Cells* 8:379–391.
- Ivanov AV, Bartosch B, Isagulants MG. 2017. Oxidative stress in infection and consequent disease. *Oxid Med Cell Longev* 2017:e3496043.
- Ivanović D, Popović A, Radulović D, Medenica M. 1999. Reversed-Phase Ion-Pair HPLC Determination of Some Water-Soluble Vitamins in Pharmaceuticals. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 18:999–1004.
- Ivashkiv LB, Donlin LT. 2013. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol* 14:36–49 doi: 10.1038/nri3581.
- Jaiyen Y, Masrinoul P, Kalayanaroj S, Pulmanusahakul R, Ubol S. 2009. Characteristics of dengue virus-infected peripheral blood mononuclear cell death that correlates with the severity of illness. *Microbiol Immunol* 53: 442–450 doi:10.1111/j.1348-0421.2009.00148.x
- Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. 2004. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis* 189:1411–1418. doi:10.1086/383043
- Ji C, Kozak KR, Marnett LJ. 2001. IκB Kinase, a Molecular Target for Inhibition by 4-Hydroxy-2-Nonenal. *J Biol Chem* 276:18223–18228.
- Jiang R, Ye J, Zhu B, Song Y, Chen H, Cao S. 2014. Roles of TLR3 and RIG-I in mediating the inflammatory response in mouse microglia following Japanese encephalitis virus infection. *J Immunol Res* 2014:787023 doi:10.1155/2014/787023
- Jordan TX, Randall G. 2016. Flavivirus modulation of cellular metabolism. *Curr Opin Virol* 19:7-10 doi:10.1016/j.coviro.2016.05.007
- Joshi V, Venkatesha SH, Ramakrishnan C, Nanjaraj Urs AN, Hiremath V, Moudgil KD i wsp. 2016. Celastrol Modulates Inflammation Through Inhibition of the Catalytic Activity of Mediators of Arachidonic Acid Pathway: Secretory Phospholipase A 2

- Group IIA, 5-Lipoxygenase and Cyclooxygenase-2. *Pharmacol Res* 113:265-275. doi:10.1016/j.phrs.2016.08.035.
- Kao YT, Chang BL, Liang JJ, Tsai HJ, Lee YL, Lin RJ, Lin YL. 2015. Japanese Encephalitis Virus Nonstructural Protein NS5 Interacts with Mitochondrial Trifunctional Protein and Impairs Fatty Acid β -Oxidation. *PLoS Pathog* 11: e1004750 doi:10.1371/journal.ppat.1004750
- Karu N, Kindt A, Lamont L, van Gammeren AJ, Ermens AAM, Harms AC i wsp. 2022. Plasma Oxylipins and Their Precursors Are Strongly Associated with COVID-19 Severity and with Immune Response Markers. *Metabolites* 12:619. doi:10.3390/metabo12070619.
- Kasuga Y, Zhu B, Jang KJ, Yoo JS. 2021. Innate immune sensing of coronavirus and viral evasion strategies. *Exp Mol Med* 53:723-736.
- Kerstholt M, Vrijmoeth H, Lachmandas E, Oosting M, Lupse M, Flonta M i wsp. 2018. Role of Glutathione Metabolism in Host Defense against *Borrelia burgdorferi* Infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115: E2320–E2328.
- Krishnan G i Chatterjee N. 2014. Endocannabinoids Affect Innate Immunity of Muller Glia during HIV-1 Tat Cytotoxicity. *Mol Cell Neurosci* 59:10-23. doi:10.1016/j.mcn.2014.01.001.
- Kim S, Kim MJ, Park DY, Chung HJ, Kim CH, Yoon JH, Kim HJ. 2015. Mitochondrial reactive oxygen species modulate innate immune response to influenza A virus in human nasal epithelium. *Antiviral Res* 119:78–83 doi:10.1016/j.antiviral.2015.04.011
- Kim YS, Park ZY, Kim SY, Jeong E, Lee JY. 2009. Alteration of Toll-like Receptor 4 Activation by 4-Hydroxy-2-Nonenal Mediated by the Suppression of Receptor Homodimerization. *Chem-Biol Interact* 182:59–66.
- Kindhauser MK, Allen T, Frank V, Santhana RS, Dye C. 2016. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bull World Health Organ.* 94:675-686C doi:10.2471/BLT.16.171082.
- Klein RS, Lin E, Zhang B, Luster AD, Tollett J, Samuel MA i wsp. 2005. Neuronal CXCL10 directs CD8+ T-cell recruitment and control of West Nile virus encephalitis. *J Virol* 79:11457–11466 doi:10.1128/JVI.79.17.11457-11466.2005
- Klimstra WB, Williams JC, Ryman KD, Heidner HW. 2005. Targeting Sindbis virus-based vectors to Fc receptor-positive cell types. *Virology* 338:9–21.
- Kohlmaier B, Schweintzger NA, Sagmeister MG, Švendová V, Kohlfürst DS, Sonnleitner A i wsp. 2021. The Eu-Tick-Bo Study Group. Clinical Characteristics of Patients with Tick-Borne Encephalitis (TBE): A European Multicentre Study from 2010 to 2017. *Microorganisms* 9:1420 doi:10.3390/microorganisms9071420
- Konior A, Schramm A, Czesnikiewicz-Guzik M, Guzik TJ. 2014. NADPH oxidases in vascular pathology. *Antioxid Redox Signa* 20:2794–2814 doi:10.1089/ars.2013.5607

- Kovats S, Turner S, Simmons A, Powe T, Chakravarty E, Alberola-Ila J. 2016. West Nile virus-infected human dendritic cells fail to fully activate invariant natural killer T cells. *Clin Exp Immunol* 186: 214–226 doi:10.1111/cei.12850
- Kohil A, Jemmieh S, Smatti MK, Yassine HM. 2021. Viral meningitis: an overview. *Arch Virol* 166:335–345 doi:10.1007/s00705-020-04891-1
- Koyuncu OO, MacGibeny MA, Hogue IB, Enquist LW. 2017. Compartmented neuronal cultures reveal two distinct mechanisms for alpha herpesvirus escape from genome silencing. *PLoS Pathog* 13:e1006608 doi:10.1371/journal.ppat.1006608.
- Król ME, Borawski B, Nowicka-Ciełuszecka A, Tarasiuk J, Zajkowska J. 2019. Outbreak of alimentary tick borne encephalitis in Podlaskie voivodeship, Poland. *Przegl Epidemiol* 73: 239-248 doi:10.32394/pe.73.01
- Kubes M, Fuchsberger N, Labuda M, Zuffová E, Nuttall PA. 1994. Salivary Gland Extracts of Partially Fed *Dermacentor Reticulatus* Ticks Decrease Natural Killer Cell Activity In Vitro. *Immunology* 82:113–116.
- Kulmacz RJ, Wang LH. 1995. Comparison of hydroperoxide initiator requirements for the cyclooxygenase activities of prostaglandin H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 270:24019–24023.
- Kumar S, Misra UK, Kalita J, Khanna VK, Khan MY. 2009. Imbalance in oxidant/antioxidant system in different brain regions of rat after the infection of Japanese encephalitis virus. *Neurochem Int* 55:648-654 doi:10.1016/j.neuint.2009.06.008
- Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. 2003. Interactions of Peroxynitrite, Tetrahydrobiopterin, Ascorbic Acid, and Thiols: Implications for Uncoupling Endothelial Nitric-Oxide Synthase. *J Biol Chem* 278:22546–22554.
- Kuzmenko YV, Smirnova OA, Ivanov AV, Starodubova ES, Karpov VL. 2016. Nonstructural Protein 1 of Tick-Borne Encephalitis Virus Induces Oxidative Stress and Activates Antioxidant Defense by the Nrf2/ARE Pathway. *Intervirology* 59:111–117 doi: 10.1159/000452160
- Labuda M, Austyn JM, Zuffova E, Kozuch O, Fuchsberger N, Lysy J, Nuttall PA. 1996. Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology* 219:357–366.
- Lampropoulou V, Sergushichev A, Bambouskova M, Nair S, Vincent EE, Loginicheva E i wsp. 2016. Itaconate links inhibition of succinate dehydrogenase with macrophage metabolic remodeling and regulation of inflammation. *Cell Metab* 24:158–166 doi: 10.1016/j.cmet.2016.06.004
- Lee JY, Ngan Nguyen TT, Myoung J. 2020. Zika Virus-Encoded NS2A and NS4A Strongly Downregulate NF- κ B Promoter Activity. *J Microbiol Biotechnol* 30:1651-1658 doi:10.4014/jmb.2011.11003
- Lee BWL, Ghode P, Ong DST. 2019. Redox Regulation of Cell State and Fate. *Redox Biol* 25: 101056. doi:10.1016/j.redox.2018.11.014.

- Lee C. 2018. Therapeutic Modulation of Virus-Induced Oxidative Stress via the Nrf2-Dependent Antioxidative Pathway. *Oxid Med Cell Longev* 2018:6208067
- Lee SG, Wang T, Vance TM, Hubert P, Kim DO, Koo SI, Chun OK. 2017. Validation of Analytical Methods for Plasma Total Antioxidant Capacity by Comparing with Urinary 8-Isoprostane Level. *J Microbiol Biotechnol.* 27(2):388-394 doi:10.4014/jmb.1604.04053.
- Lee SMY, Gai WW, Cheung TKW, Peiris JSM. 2011. Antiviral effect of a selective COX-2 inhibitor on H5N1 infection in vitro. *Antiviral Research* 91:330-334. doi:10.1016/j.antiviral.2011.07.011
- Leghmar K, Cenac N, Rolland M, Martin H, Rauwel B, Bertrand-Michel J i wsp. 2015. Cytomegalovirus Infection Triggers the Secretion of the PPAR γ Agonists 15-Hydroxyeicosatetraenoic Acid (15-HETE) and 13-Hydroxyoctadecadienoic Acid (13-HODE) in Human Cytotrophoblasts and Placental Cultures. *PLoS ONE* 10(7):e0132627. doi:10.1371/journal.pone.0132627.
- Lewis P, Fu Y, Lentz TL. 2000. Rabies virus entry at the neuromuscular junction in nerve-muscle cocultures. *Muscle Nerve* 23:720–730
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG i wsp. 1990. Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. *Methods Enzymol.* 186:464–478.
- Leu GZ, Lin TY, Hsu JTA. 2004. Anti-HCV activities of selective polyunsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 318:275-280. doi:10.1016/j.bbrc.2004.04.019.
- Li C, Deng YQ, Wang S, Ma F, Aliyari R, Huang XY, i wsp. 2017. 25-Hydroxycholesterol protects host against zika virus infection and its associated microcephaly in a mouse model. *Immunity* 46:446–56 doi:10.1016/j.immuni.2017.02.012
- Li H, Li Y, Wen B, Zhang J, Wang C, Song Z, Li S i wsp. 2017. Dengue virus and Japanese encephalitis virus infection of the central nervous system share similar profiles of cytokine accumulation in cerebrospinal fluid. *Cent Eur J Immunol* 42:218-222 doi:10.5114/ceji.2017.69366
- Li F, Wang Y, Yu L, Cao S, Wang K, Yuan J i wsp. 2015. Viral Infection of the Central Nervous System and Neuroinflammation Precede Blood-Brain Barrier Disruption during Japanese Encephalitis Virus Infection. *J Virol* 89:5602-14. doi:10.1128/JVI.00143-15
- Li XJ, Fu HY, Yi WJ, Zhao YJ, Wang J, Li JB i wsp. 2015. Dual role of leukotriene B4 receptor type 1 in experimental sepsis. *J Surg Res* 193:902-908. doi:10.1016/j.jss.2014.09.013.
- Liao SL, Raung SL, Chen C. 2002. Japanese encephalitis virus stimulates superoxide dismutase activity in rat glial cultures. *Neurosci Lett* 324:133–136
- Lim JKM, Leprivier G. 2019. The impact of oncogenic RAS on redox balance and implications for cancer development. *Cell Death Dis* 10:955. doi:10.1038/s41419-019-2192-y.

- Lim JK, Obara CJ, Rivollier A, Pletnev AG, Kelsall BL, Murphy PM. 2011. Chemokine receptor Ccr2 is critical for monocyte accumulation and survival in West Nile virus encephalitis. *J Immunol* 186:471-478 doi: 10.4049/jimmunol.1003003
- Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. 2017. NF-KB Signaling in Inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2:17023.
- Loh EH, Zambrana-Torrel C, Olival KJ, Bogich TL, Johnson CK, Mazet JA i wsp. 2015. Targeting Transmission Pathways for Emerging Zoonotic Disease Surveillance and Control. *Vector Borne Zoonotic Dis* 15:432-7 doi:10.1089/vbz.2013.1563.
- Lorizate M, Kräusslich HG. 2011. Role of lipids in virus replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a004820 doi:10.1101/cshperspect.a004820
- Lovell MA, Xie C, Gabbita SP, Markesbery WR. 2000. Decreased Thioredoxin and Increased Thioredoxin Reductase Levels in Alzheimer's Disease Brain. *Free Radic Biol Med* 28:418-427.
- Lopes Pires ME, Clarke SR, Marcondes S, Gibbins JM. 2017. Lipopolysaccharide potentiates platelet responses via toll-like receptor 4-stimulated Akt-Erk-PLA2 signalling. *PLoS ONE* 12(11):e0186981. doi:10.1371/journal.pone.0186981.
- Lu HC i Mackie K. 2021. Review of the Endocannabinoid System. *Biol. Psychiatry Cogn. Neurosci. Neuroimaging* 6(6):607-615. doi:10.1016/j.bpsc.2020.07.016.
- Lucaciu O, Aghiorghiesei O, Petrescu NB, Mirica LC, Benea HRC Apostu D. 2021. In quest of a new therapeutic approach in COVID-19: the endocannabinoid system. *Drug Metab Rev* 53(4):478-490. doi:10.1080/03602532.2021.1895204.
- Luque-Córdoba D, Calderón-Santiago M, Luque de Castro MD, Priego-Capote F. 2018. Study of sample preparation for determination of endocannabinoids and analogous compounds in human serum by LC-MS/MS in MRM Mode. *Talanta* 185:602-610.
- Łuczaj W, Moniuszko A, Jarocka-Karpowicz I, Pancewicz S, Andrisic L, Zarkovic N, Skrzydlewska E. 2016. Tick-borne encephalitis- lipid peroxidation and its consequences, *Scand J Clin Lab Invest* 76:1-9 doi:10.3109/00365513.2015.1084040
- Ma JQ, Tuersun H, Jiao SJ, Zheng JH, Xiao JB, Hasim A. 2015. Functional Role of NRF2 in Cervical Carcinogenesis. *PLoS ONE* 10:e0133876.
- Macháček T, Panská L, Dvořáková H, Horák P. 2016. Nitric oxide and cytokine production by glial cells exposed in vitro to neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti*. *Parasit Vectors* 9:579 doi:10.1186/s13071-016-1869-7
- Maeso N, García-Martínez D, Rupérez FJ, Cifuentes A, Barbas C. 2005. Capillary Electrophoresis of Glutathione to Monitor Oxidative Stress and Response to Antioxidant Treatments in an Animal Model. *J. Chromatogr. B* 822, 61-69.
- Marques FJP, Teixeira MCS, Barra RR, de Lima FM, Scofano Dias BL, Pupe C i wsp. 2019. Children Born With Congenital Zika Syndrome Display Atypical Gross Motor Development and a Higher Risk for Cerebral Palsy. *J Child Neurol* 34:81-85 doi:10.1177/0883073818811234

- Mathieu C, Bovier FT, Ferren M, Lieberman NAP, Predella C, Lalande A i wsp. 2021. Molecular features of the measles virus viral fusion complex that favor infection and spread in the brain. *mBio* 12:e00799-21. Doi:10.1128/mBio.00799-21.
- Maximova OA, Pletnev AG. 2018. Flaviviruses and the Central Nervous System: Revisiting Neuropathological Concepts. *Annu Rev Virol* 5(1):255-272 doi:10.1146/annurev-virology-092917-043439
- Mayxay M, Douangdala P, Vilayhong C, Phommasone K, Chansamouth V, Vongsouvath M i wsp. 2020. Outcome of Japanese Encephalitis Virus (JEV) Infection in Pediatric and Adult Patients at Mahosot Hospital, Vientiane, Lao PDR. *Am J Trop Med Hyg* 104:567-575 doi:10.4269/ajtmh.20-0581.
- Mazeaud C, Freppel W and Chatel-Chaix L. 2018. The Multiples Fates of the Flavivirus RNA Genome During Pathogenesis. *Front Genet* 9:595 doi: 10.3389/fgene.2018.
- McGuire VA, Ruiz-Zorrilla DT, Emmerich CH, Strickson S, Ritorto, MS, Sutavani RV i wsp. 2016. Dimethyl Fumarate Blocks Pro-Inflammatory Cytokine Production via Inhibition of TLR Induced M1 and K63 Ubiquitin Chain Formation. *Sci Rep* 6:31159 doi:10.1038/srep31159
- Melvin AJ, Mohan KM, Vora SB, Selke S, Sullivan E, Wald A. 2022. Neonatal Herpes Simplex Virus Infection: Epidemiology and Outcomes in the Modern Era. *Pediatr Infect Dis J* 11: 94–101 doi:10.1093/jpids/piab105
- Mestre L, Iñigo PM, Mecha M, Correa FG, Hernangómez-Herrero M, Loría F i wsp. 2011. Anandamide Inhibits Theiler's Virus Induced VCAM-1 in Brain Endothelial Cells and Reduces Leukocyte Transmigration in a Model of Blood Brain Barrier by Activation of CB1receptors. *J Neuroinflamm* 8:102. doi: 10.1186/1742-2094-8-102.
- Miller E, Morel A, Saso L, Saluk J. 2014. Isoprostanes and Neuroprostanes as Biomarkers of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Oxi. Med Cell Longev* 2014:572491. doi:10.1155/2014/572491.
- Mills EL, Ryan DG, Prag HA, Dikovskaya D, Menon D, Zaslona Z i wsp. 2018. Itaconate Is an Anti-Inflammatory Metabolite That Activates Nrf2 via Alkylation of KEAP1. *Nature* 556:113–117 doi:10.1038/nature25986
- Misra UK, Kalita J. 2010. Overview: Japanese encephalitis. *Prog Neurobiol* 91:108–120.
- Misra H.P, Fridovich I. 1972. The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase. *J Biol Chem* 247, 3170–3175.
- Mize CE, Langdon RG. 1962. Hepatic Glutathione Reductase. I. Purification and General Kinetic Properties. *J Biol Chem* 237:1589–1595.
- Moniuszko-Malinowska A, Czupryna P, Dunaj J, Świerzbńska R, Guziejko K, Rutkowski R i wsp. 2017. Evaluation of NF-κB concentration in patients with tick-borne encephalitis, neuroborreliosis, anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum* with tick-borne encephalitis virus co-infection. *Cytokine* 90:155-160. doi:10.1016/j.cyto.2016.10.014

- Monteiro Meuren L, Beatriz Prestes E, Premazzi Papa M, Pinheiro de Carvalho LR, Mucunã Mustafá Y, Silva da Costa L i wsp. 2022. Infection of Endothelial Cells by Dengue Virus Induces ROS Production by Different Sources Affecting Virus Replication, Cellular Activation, Death and Vascular Permeability. *Sec Viral Immunol* 13:2022 doi:10.3389/fimmu.2022.810376
- Muhammad Y, Aminu YK, Ahmad, A.E, Iliya S, Muhd N, Yahaya M i wsp. 2020. An Elevated 8-Isoprostaglandin F2 Alpha (8-Iso-PGF2 α) in COVID-19 Subjects Co-Infected with Malaria. *Pan Afr Med J* 37:78.
- Mullen L, Mengozzi M, Hanschmann EM, Alberts B, Ghezzi P. 2020. How the Redox State Regulates Immunity. *Free Radic Biol Med* 157:3–14 doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.12.022
- Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau VM. 2015. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis* 21:359-361 doi:10.3201/eid2102.141363
- Mustafá YM, Meuren LM, Coelho SVA, de Arruda LB. 2019. Pathways Exploited by Flaviviruses to Counteract the Blood-Brain Barrier and Invade the Central Nervous System. *Front Microbiol* 10:525 doi:10.3389/fmicb.2019.00525
- Galkin A. 2019. Brain Ischemia/Reperfusion Injury and Mitochondrial Complex I Damage. *Biochem Mosc* 84:1411–1423 doi:10.1134/S0006297919110154
- Mygland A, Ljøstad U, Fingerle V, Rupprecht T, Schmutzhard E, Steiner I. 2010. European Federation of Neurological Societies EFNS Guidelines on the Diagnosis and Management of European Lyme Neuroborreliosis. *Eur. J. Neurol.* 17:8-e4.
- Nasirudeen AMA, Wong HH, Thien P, Xu S, Lam KP, Liu DX. 2011. RIG-I, MDA5 and TLR3 Synergistically Play an Important Role in Restriction of Dengue Virus Infection. *PLoS Negl Trop* 5:e926 doi:10.1371/journal.pntd.0000926
- Nathan C, Cunningham-Bussel A. 2013. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol* 13:349–361 doi:10.1038/nri3423
- Negash AA, Ramos HJ, Crochet N, Lau DTY, Doehle B, Papic N i wsp. 2013. IL-1 β Production through the NLRP3 Inflammasome by Hepatic Macrophages Links Hepatitis C Virus Infection with Liver Inflammation and Disease. *PLoS Patog* 9:e1003330 doi:10.1371/journal.ppat.1003330
- Novaes RD, Teixeira AL, de Miranda AS. 2019. Oxidative stress in microbial diseases: pathogen, host, and therapeutics. *Oxid Med Cell Longev* 2019: e8159562
- Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. 2013. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med* 19:1584–1596 doi: 10.1038/nm.3407
- Ohka S, Yang WX, Terada E, Iwasaki K, Nomoto A. 1998. Retrograde transport of intact poliovirus through the axon via the fast transport system. *Virology* 250:67–75
- Ohto-Ozaki H, Hayakawa M, Kamoshita N, Maruyama T, Tominaga S i wsp. 2020. Induction of IkB ζ Augments Cytokine and Chemokine Production by IL-33 in Mast Cells *J Immunol* 204:2033–2042 doi:10.4049/jimmunol.1900315

- Olagnier D, Brandtoft AM, Gunderstofte C, Villadsen NL, Krapp C, Thielke AL i wsp. 2018. Nrf2 Negatively Regulates STING Indicating a Link Between Antiviral Sensing and Metabolic Reprogramming. *Nat Commun* 9:3506 doi:10.1038/s41467-018-05861-7
- Olagnier D, Farahani E, Thyrssted J, Blay-Cadanet J, Herengt A, Idorn M i wsp. 2020. SARS-CoV2-Mediated Suppression of NRF2-Signaling Reveals Potent Antiviral and Anti-Inflammatory Activity of 4-Octyl-Itaconate and Dimethyl Fumarate. *Nat Commun* 11:4938 doi:10.1038/s41467-020-18764-3
- Olagnier D, Amatore D, Castiello L, Ferrari M, Palermo E, Diamond MS i wsp. 2016. Dengue Virus Immunopathogenesis: Lessons Applicable to the Emergence of Zika Virus. *JMB* 428: 3429-3448 doi:10.1016/j.jmb.2016.04.024
- Olagnier D, Peri S, Steel C, van Montfoort N, Chiang C, Beljanski V i wsp. 2014. Cellular Oxidative Stress Response Controls the Antiviral and Apoptotic Programs in Dengue Virus-Infected Dendritic Cells. *PLoS Pathog* 10:e1004566 doi:10.1371/journal.ppat.1004566
- Oliveira Melo AS, Malinger G, Ximenes R, Szejnfeld PO, Alves Sampaio S, Bispo de Filippis M. 2016. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet Gynecol* 47:6-7 doi: 10.1002/ug.15831
- Paglia DE, Valentine WN. 1967. Studies on the Quantitative and Qualitative Characterization of Erythrocyte Glutathione Peroxidase. *J Lab Clin Med* 70, 158–169.
- Palus M, Vancova M, Sirmarova J, Elsterova J, Perner J, Ruzek D. 2017. Tick-borne encephalitis virus infects human brain microvascular endothelial cells without compromising blood-brain barrier integrity. *Virology* 507:110-122 doi: 10.1016/j.virol.2017.04.012
- Palus M, Bílý T, Elsterová J, Langhansová H, Salát J, Vancová M, Růžek D. 2014. Infection and Injury of Human Astrocytes by Tick-Borne Encephalitis Virus *J Gen Virol* 95:2411–2426.
- Pant A, Dsouza L, Yang Z. 2021. Alteration in cellular signaling and metabolic reprogramming during viral infection. *mBio* 12:e0063521. doi:10.1128/mBio.00635-21
- Papa MP, Meuren LM, Coelho SV, Lucas CG, Mustafá YM, Lemos Matassoli F i wsp. 2017. Zika virus infects, activates, and crosses brain microvascular endothelial cells, without barrier disruption. *Front Microbiol* 8:1–17 doi: 10.3389/fmicb.2017.02557
- Parola M, Robino G, Marra F, Pinzani M, Bellomo G, Leonarduzzi G i wsp. 1998. HNE Interacts Directly with JNK Isoforms in Human Hepatic Stellate Cells. *J Clin Investig* 102:1942–1950.
- Pastore A i Piemonte F. 2012. S-Glutathionylation Signaling in Cell Biology: Progress and Prospects. *Eur J Pharm Sci* 46:279–292.
- Peng H, Guerau-de-Arellano M, Mehta VB, Yang Y, Huss DJ, Papenfuss TL i wsp. 2012. Dimethyl Fumarate Inhibits Dendritic Cell Maturation via Nuclear Factor kB (NF-Kb) and Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 and 2 (ERK1/2) and Mitogen Stress-

Activated Kinase 1 (MSK1) Signaling. *J Biol Chem* 10:28017–28026
doi:10.1074/jbc.M112.383380

- Pohanka M. 2013. Role of oxidative stress in infectious diseases. A review. *Folia Microbiol* 58:503–513
- Pohl EE i Jovanovic O. 2019. The Role of Phosphatidylethanolamine Adducts in Modification of the Activity of Membrane Proteins under Oxidative Stress. *Molecules* 24:4545
- Pokorna Formanova P, Palus M, Salat J, Hönig V, Stefanik M, Svoboda P, Ruzek D. 2019. Changes in cytokine and chemokine profiles in mouse serum and brain, and in human neural cells, upon tick-borne encephalitis virus infection. *J Neuroinflammation* 16:205
doi:10.1186/s12974-019-1596-z
- Prajda N, Weber G. 1975. Malignant Transformation-Linked Imbalance: Decreased Xanthine Oxidase Activity in Hepatomas. *FEBS Lett.* 59, 245–249.
- Prasad R, Giri S, Singh AK, Singh L. 2008. 15-deoxy-delta12, 14-prostaglandin J2 attenuates endothelial-monocyte interaction: implication for inflammatory diseases. *J Inflamm* 5:14. doi:10.1186/1476-9255-5-14.
- Purtha WE, Chachu KA, Virgin HW 4th, Diamond MS. 2008. Early B-cell activation after West Nile virus infection requires alpha/beta interferon but not antigen receptor signaling. *J Virol* 82:10964–10974 doi: 10.1128/JVI.01646-08
- Qin M, Z Cao, J Wen, Q Yu, C Liu, F Wang, F Yang, Y Li, G Fishbein, S Yan, i wsp. 2020. An antioxidant enzyme therapeutic for COVID-19. *BioRxiv* 205211.
doi:10.1101/2020.07.15.205211
- Qiu J, Villa M, Sanin DE, Buck MD, O'Sullivan D, Ching R i wsp. 2019. Acetate promotes T cell effector function during glucose restriction. *Cell Rep* 27:2063–2074.e5
doi:10.1016/j.celrep.2019.04.022
- Rahman MT, Sobur MA, Islam MS, Ievy S, Hossain MJ, El Zowalaty ME i wsp. 2020. Zoonotic Diseases: Etiology, Impact, and Control. *Microorganisms* 8:1405
doi:10.3390/microorganisms8091405
- Raefsky SM, Furman R, Milne G, Pollock E, Axelsen P, Mattson MP i wsp. 2018. Deuterated polyunsaturated fatty acids reduce brain lipid peroxidation and hippocampal amyloid β -peptide levels, without discernable behavioral effects in an APP/PS1 mutant transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 66:165-176.,
doi:10.1016/j.neurobiolaging.2018.02.024.
- Reynolds LJ, Hughes LL, Yu L, Dennis EA. 1994. 1-Hexadecyl-2-Arachidonoylthio-2-Deoxy-Sn-Glycero-3-Phosphorylcholine as a substrate for the microtiterplate assay of human cytosolic Phospholipase A2. *Anal Biochem* 217:25–32.
- Roby JA, Esser-Nobis K, Dewey-Verstelle EC, Fairgrieve MR, Schwerk J, Lu AY i wsp. 2020. Flavivirus Nonstructural Protein NS5 Dysregulates HSP90 to Broadly Inhibit JAK/STAT Signaling. *Cell* 9:899 doi:10.3390/cells9040899
- Rockwood N, Costa DL, Amaral EP, Du Bruyn E, Kubler A, Gil-Santana L i wsp. 2017. *Mycobacterium tuberculosis* induction of heme oxygenase-1 expression is dependent on

oxidative stress and reflects treatment outcomes. *Front Immunol* 8:542. doi:10.3389/fimmu.2017.00542.

- Ruan J, Dong W, Liu Y, Zhang Y, Niu B, Chen Q i wsp. 2022. Establishment of a model to assess mumps virus neurovirulence in neonatal Wistar rats. *Vaccine* 40:6397-6403, doi:10.1016/j.vaccine.2022.09.014
- Rubant, S, Ludwig RJ, Diehl S, Hardt K, Kaufmann R, Pfeilschifter JM i wsp. 2008. Dimethylfumarate Reduces Leukocyte Rolling In Vivo Through Modulation of Adhesion Molecule Expression. *J Invest Dermatol* 128:326–331 doi:10.1038/sj.jid.5700996
- Ruzek D, Avšič Županc T, Borde J, Chrdle A, Eyer L, Karganova G. i wsp. 2019. Tick-Borne Encephalitis in Europe and Russia: Review of Pathogenesis, Clinical Features, Therapy, and Vaccines. *Antivir Res.* 164:23–51.
- Ruzek D, Salat J, Palus M, Gritsun TS, Gould EA, Dykova I i wsp. 2009. CD8+ T-cells mediate immunopathology in tick-borne encephalitis. *Virology* 384:1–6 doi: 10.1016/j.virol.2008.11.023.
- Růžek D, Salát J, Singh SK, Kopecký J. 2011. Breakdown of the blood-brain barrier during tick-borne encephalitis in mice is not dependent on CD8+ T-cells. *PLoS One* 6:e20472, doi:10.1371/journal.pone.0020472
- Sadrzadeh SMH, Saffari Y. 2004. Iron and brain disorders. *Am J Clin Pathol* 121:64-70 doi:10.1309/EW0121LG9N3N1YL4
- Sahoo BR, Crook AA, Pattnaik A, Torres-Gerena AD, Khalimonchuk O, Powers R i wsp. 2023. Redox Regulation and Metabolic Dependency of Zika Virus Replication: Inhibition by Nrf2-Antioxidant Response and NAD(H) Antimetabolites. *J Virol* 97 doi: 10.1128/jvi.01363-22
- Sakin YS, Dogrul A, Ilkaya F, Seyrek M, Ulas UH, Gulsen M, Bagci S. 2015. The effect of FAAH, MAGL, and Dual FAAH/MAGL inhibition on inflammatory and colorectal distension-induced visceral pain models in Rodents. *Neurogastroenterol Motil* 27:936-944. doi:10.1111/nmo.12563.
- Salim S. 2017. Oxidative Stress and the Central Nervous System. *J Pharmacol Exp Ther* 360:201–205 doi:10.1124/jpet.116.237503
- Sánchez-García FJ, Pérez-Hernández CA, Rodríguez-Murillo M, Moreno Altamirano MMB. 2021. The role of tricarboxylic acid cycle metabolites in viral infections. *Front Cell Infect Microbiol* 11:725043 doi:10.3389/fcimb.2021.725043
- Schlöder J, Berges C, Luessi F, Jonuleit H. 2017. Dimethyl Fumarate Therapy Significantly Improves the Responsiveness of T Cells in Multiple Sclerosis Patients for Immunoregulation by Regulatory T Cells. *Int J Mol Sci* 18:271 doi:10.3390/ijms18020271
- Schneider WM, Dittmann Chevillotte M, Rice CM. 2014. Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annu Rev Immunol* 32:513-545, doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120231

- Skipper C, Schleiss MR, Bangdiwala AS, Hernandez-Alvarado N, Taseera K, Nabeta HW i wsp. 2020. Cytomegalovirus Viremia Associated With Increased Mortality in Cryptococcal Meningitis in Sub-Saharan Africa. *Clin Infect Dis* 71:525–531 doi:10.1093/cid/ciz864.
- Sierra B, Perez AB, Garcia G, Aguirre E, Alvarez M, Gonzalez D i wsp. 2014. Role of CC chemokine receptor 1 and two of its ligands in human dengue infections under the Cuban situation. *Microbes Infect* 16:40–50 doi: 10.1016/j.micinf.2013.10.011
- Sies H, Jones DP. 2020. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21:363–383 doi:10.1038/s41580-020-0230-3
- Soe HJ, Khan AM, Manikam R, Samudi Raju C, Vanhoutte P, Sekaran SD. 2017. High dengue virus load differentially modulates human microvascular endothelial barrier function during early infection. *J Gen Virol* 98:2993–3007 doi:10.1099/jgv.0.000981
- Sorgi CA, Soares EM, Rosada RS, Bitencourt CS, Zoccal KF, Pereira PAT i wsp. 2020. Eicosanoid pathway on host resistance and inflammation during Mycobacterium tuberculosis infection is comprised by LTB4 reduction but not PGE2 increment. *Biochim. Biophys Acta Mol Basis Dis* 1866(3):165574. doi:10.1016/j.bbadis.2019.165574
- Sorouri M, Chang T, Hancksa DC. 2022. Mitochondria and viral infection: advances and emerging battlefronts. *mBio* 13:e02096-21
- Soundravally R, Hoti SL, Patil SA, Cleetus CC, Zachariah B, Kadhiravan T i wsp. 2014. Association between proinflammatory cytokines and lipid peroxidation in patients with severe dengue disease around defervescence. *Int J Infect Dis* 18:68-72 doi:10.1016/j.ijid.2013.09.022
- Sprokholt JK, Kaptein TM, van Hamme JL, Overmars RJ, Gringhuis SI, Geijtenbeek TBH. 2017. RIG-I-like Receptor Triggering by Dengue Virus Drives Dendritic Cell Immune Activation and TH1 Differentiation. *J Immunol* 198:4764–4771. doi:10.4049/jimmunol.1602121
- Stanek G, Fingerle V, Hunfeld KP, Jaulhac B, Kaiser R, Krause A, i wsp. 2011. Lyme Borreliosis: Clinical Case Definitions for Diagnosis and Management in Europe. *Clin Microbiol. Infect.* 17:69–79.
- Staring J, Raaben M, Brummelkamp TR. 2018. Viral escape from endosomes and host detection at a glance. *J Cell Sci* 131:jcs216259 doi:10.1242/jcs.216259
- Sun X, Hua S, Chen HR, Ouyang Z, Einkauf K, Tse S i wsp. 2017. Transcriptional changes during naturally acquired Zika virus infection render dendritic cells highly conducive to viral replication. *Cell Rep* 21:3471–3482 doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.087
- Swarup V, Ghosh J, Duseja R, Ghosh S, Basu A. 2007. Japanese encephalitis virus infection decrease endogenous IL- 10 production: correlation with microglial activation and neuronal death. *Neurosci Lett* 420:144–149 doi:10.1016/j.neulet.2007.04.071
- Syenina A, Saron WAA, Jagaraj CJ, Bibi S, Arock M, Gubler DJ i wsp. 2020. Th1-Polarized, Dengue Virus-Activated Human Mast Cells Induce Endothelial Transcriptional Activation and Permeability. *Viruses* 12:1379 doi:10.3390/v12121379

- Sykes JA, McCormack FX, O'Brien TJA. 1978. Preliminary Study of the Superoxide Dismutase Content of Some Human Tumors. *Cancer Res.* 38:2759–2762.
- Takahashi M, Watari E, Shinya E, Shimizu T, Takahashi H. 2007. Suppression of virus replication via down-modulation of mitochondrial short chain enoyl-CoA hydratase in human glioblastoma cells. *Antiviral Res* 75:152–158 doi:10.1016/j.antiviral.2007.02.002
- Takhampunya R, Padmanabhan R, Ubol S. 2006. Antiviral action of nitric oxide on dengue virus type 2 replication. *J Gen Virol* 87:3003–3011 doi:10.1099/vir.0.81880-0
- Tian Y, Jiang W, Zhang NGJ, Chen W, Fan D, Zhou D, An J. 2010. Inhibitory effects of glutathione on dengue virus production. *Biochem Biophys Res Commun* 397:420-424, doi:10.1016/j.bbrc.2010.05.108
- Tirabassi RS, Townley RA, Eldridge MG, Enquist LW. 1998. Molecular mechanisms of neurotropic herpesvirus invasion and spread in the CNS. *Neurosci Biobehav* 22:709-720
- Toczyłowski K, Wieczorek M, Bojkiewicz E, Wietlicka-Piszczyńska M, Gad B, Sulik A. 2020. Pediatric Enteroviral Central Nervous System Infections in Białystok, Poland: Epidemiology, Viral Types, and Drivers of Seasonal Variation. *Viruses* 12:893. Doi:10.3390/v12080893
- Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. 2018. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal* 29:1727–1745 doi:10.1089/ars.2017.7342
- Tricarico PM, Caracciolo I, Crovella S, D'Agaro P. 2017. Zika virus induces inflammasome activation in the glial cell line U87-MG. *Biochem Biophys Res Commun* 492:597–602 doi:10.1016/j.bbrc.2017.01.158
- Tsikas D, Rothmann S, Schneider JY, Gutzki FM, Beckmann B, Frölich JC. 2017. Simultaneous GC-MS/MS Measurement of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal in Human Plasma: Effects of Long-Term L-Arginine Administration. *Anal Biochem* 524:31–44.
- Tyrberg T, Nilsson S, Blennow K, Zetterberg H, Grahn A. 2020. Serum and cerebrospinal fluid neurofilament light chain in patients with central nervous system infections caused by varicella-zoster virus. *J Neurovirol* 26:719–726 doi:10.1007/s13365-020-00889-2
- Verma S, Kumar M, Gurjav U, Lum S, Nerurkar VR. 2010. Reversal of West Nile virus-induced blood-brain barrier disruption and tight junction proteins degradation by matrix metalloproteinases inhibitor. *Virology* 397:130-138
- Wang J, Ge J, Wang Y, Xiong F, Guo J, Jiang X i wsp. 2022. EBV miRNAs BART11 and BART17-3p promote immune escape through the enhancer-mediated transcription of PD-L1. *Nat Commun* 13:866 doi:10.1038/s41467-022-28479-2
- Wang J, Liu J, Zhou R, Ding X, Zhang Q, Zhang C, Li L. 2018. Zika virus infected primary microglia impairs NPCs proliferation and differentiation *Biochem Biophys Res Commun* 497: 619-625 doi:10.1016/j.bbrc.2018.02.118

- Wang P, Li M, Lu W, Zhang D, Hu Q, Liu Y. 2017. DC-SIGN promotes Japanese encephalitis virus transmission from dendritic cells to T cells via virological synapses. *Virology* 488:495–502 doi: 10.1007/s12250-017-4034-3
- Wang P, Hu K, Luo S, Zhang M, Deng X, Li C i wsp. 2016. DC-SIGN as an attachment factor mediates Japanese encephalitis virus infection of human dendritic cells via interaction with a single high-mannose residue of viral E glycoprotein. *Virology* 488, 108–119 doi: 10.1016/j.virol.2015.11.006
- Wang J, Chen Y, Gao N, Wang Y, Tian Y, Wu J i wsp. 2013. Inhibitory Effect of Glutathione on Oxidative Liver Injury Induced by Dengue Virus Serotype 2vInfections in Mice. *PLoS ONE* 8:e55407 doi:10.1371/journal.pone.0055407
- Wang S, Welte T, McGargill M, Town T, Thompson J, Anderson JF i wsp. 2008. Drak2 contributes to West Nile virus entry into the brain and lethal encephalitis. *J Immunol* 181:2084–2091 doi:10.4049/jimmunol.181.3.2084
- Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, Flavell RA. 2004. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med* 10:1366–1373 doi: 10.1038/nm1140
- Wang T, Scully E, Yin Z, Kim JH, Wang S, Yan J i wsp. 2003. IFN- γ -Producing $\gamma\delta$ T cells help control murine West Nile Virus infection. *J Immunol* 171:2524–2531
- Watanabe M, Suyama K, Hashimoto K, Sato M, Ohara S, Abe Y i wsp. 2013. Mumps virus-associated acute encephalopathy: case report and review of the literature. *J Child Neurol* 28:243-245 doi:10.1177/088307381244106
- Watkins BA, Kim J, Kenny A, Pedersen TL, Pappan KL, Newman JW. 2016. Circulating levels of endocannabinoids and oxylipins altered by dietary lipids in older women are likely associated with previously identified gene targets. *Biochim Biophys Acta* 1861, 1693-1704.
- Weber D, Milkovic L, Bennett SJ, Griffiths HR, Zarkovic N, Grune T. 2013. Measurement of HNE-Protein Adducts in Human Plasma and Serum by ELISA-Comparison of Two Primary Antibodies. *Redox Biol* 1, 226–233.
- Werme K, Wigerius M, Johansson M. 2008. Tickborne encephalitis virus NS5 associates with membrane protein scribble and impairs interferon-stimulated JAK-STAT signalling. *Cell Microbiol* 10:696–712 doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01076.x
- Widegren H, Andersson M, Borgeat P, Flamand L, Johnston S, Greiff L. 2011. LTB4 increases nasal neutrophil activity and conditions neutrophils to exert antiviral effects. *Respir Med* 105:997-1006. doi:10.1016/j.rmed.2010.12.021.
- Wilms H, Sievers J, Rickert U, Rostami-Yazdi M, Mrowietz U, Lucius R. 2010. Dimethylfumarate Inhibits Microglial and Astrocytic Inflammation by Suppressing the Synthesis of Nitric Oxide, IL-1beta, TNF-Alpha and IL-6 in an In-Vitro Model of Brain Inflammation. *J Neuroinflam* 7:30 doi:10.1186/1742-2094-7-30
- Woodward JJ, Iavarone AT, Portnoy DA. 2010. c-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. *Science* 328(5986):1703-5 doi:10.1126/science.1189801.

- Wu Q, Wang Q, Mao G, Dowling CA, Lundy SK, Mao-Draayer Y. 2017. Dimethyl Fumarate Selectively Reduces Memory T Cells and Shifts the Balance Between Th1/Th17 and Th2 in Multiple Sclerosis Patients. *J Immunol* 198:3069–3080 doi:10.4049/jimmunol.1601532
- Wu Y, Liu Q, Zhou J, Xie W, Chen C, Wang Z i wsp. 2017. Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-operation of multiple nonstructural proteins in vitro. *Cell Discov* 3:17006 doi:10.1038/celldisc.2017.6
- Wylter E, Franke V, Menegatti J, Kocks C, Boltengagen A, Praktijnjo S i wsp. 2019. Single-Cell RNA-Sequencing of Herpes Simplex Virus 1-Infected Cells Connects NRF2 Activation to an Antiviral Program *Nat Commun* 10:4878.
- Yamamoto M, Yamazaki S, Uematsu S, Sato S, Hemmi H, Hoshino KK i wsp. 2004. Regulation of Toll/ IL-1-Receptor-Mediated Gene Expression by the Inducible Nuclear Protein IkappaBzeta. *Nature* 430:218–222 doi:10.1038/nature0273
- Yang TC, Lai CC, Shiu SL, Chuang PH, Tzou BC, Lin YY i wsp. 2010. Japanese encephalitis virus down-regulates thioredoxin and induces ROS-mediated ASK1-ERK/p38 MAPK activation in human promonocyte cells. *Microbes Infect* 12: 643–651 doi:10.1016/j.micinf.2010.04.007
- Ye J, Chen Z, Li Y, Zhao Z, He W, Zohaib A i wsp. 2017. Japanese encephalitis virus NS5 inhibits type I interferon (IFN) production by blocking the nuclear translocation of IFN regulatory factor 3 and NF-κB. *J Virol* 91:e00039-17 <https://doi.org/10.1128/JVI.00039-17>.
- Zal F, Mostafavi-Pour Z, Amini F, Heidari A. 2012. Effect of vitamin E and C supplements on lipid peroxidation and GSH-dependent antioxidant enzyme status in the blood of women consuming oral contraceptives. *Contraception* 86:62–66.
- Zajkowska J, Moniuszko-Malinowska A, Pancewicz S, Muszyńska-Mazur A, Kondrusik M, Grygorczuk S i wsp. 2011. Evaluation of CXCL10, CXCL11, CXCL12 and CXCL13 chemokines in serum and cerebrospinal fluid in patients with tick borne encephalitis (TBE). *Adv Med Sci* 56:311–317 doi:10.3390/ijms221910615
- Žarković N, Łuczaj W, Jarocka-Karpowicz I, Orehovec B, Baršić B, Tarle M, i wsp. 2022. Diversified effects of COVID-19 as a consequence of the differential metabolism of phospholipids and lipid peroxidation evaluated in the plasma of survivors and deceased patients upon admission to the hospital. *Int J Mol Sci* 23:11810 doi:10.3390/ijms231911810.
- Zhang HL, Ye HQ, Liu SQ, Deng CL, Li XD, Shi PY, Zhang B. 2017. West Nile Virus NS1 Antagonizes Interferon Beta Production by Targeting RIG-I and MDA5. *J Virol* 24:91(18):e02396-16 doi:10.1128/JVI.02396-16.
- Zheng L, Fei J, Feng CM, Xu Z, Fu L, Zhao H. 2021. Serum 8-Iso-PGF2α Predicts the Severity and Prognosis in Patients With Community-Acquired Pneumonia: A Retrospective Cohort Study. *Front Med* 8: 633442
- Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. 2011. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469:221–225 doi:10.1038/nature09663

Zhu Z, Chen X, Sun J, Li Q, Lian X, Li S i wsp. 2019. Inhibition of Nuclear Thioredoxin Aggregation Attenuates PM2.5-Induced NF-KB Activation and pro-Inflammatory Responses. *Free Radic Biol Med* 130:206–214.

X. Zgoda Komisji Bioetycznej

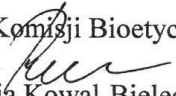
KOMISJA BIOETYCZNA
UNIwersYTETU MEDYCZNEGO w BIAŁYMSTOKU
ul. Jana Kilińskiego 1
15-089 Białystok
tel. (085) 748 54 07, fax. (085) 748 55 08
prorektorkl@umwb.edu.pl

Białystok, 26-04-2018

Uchwała nr: R-I-002/169/2018

Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, po zapoznaniu się z projektem badania zgodnie z zasadami GCP/ Guidelines for Good Clinical Practice /- **w y r a ż a z g o d ę** na prowadzenie tematu badawczego: „Wykorzystanie badań multiomicznych do oceny konsekwencji metabolicznych chorób przenoszonych przez kleszcze” przez dr hab. Annę Moniuszko-Malinowską wraz z zespołem badawczym z UMB.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej UMB


prof. dr hab. Otylia Kowal-Bielecka

**KOMISJA BIOETYCZNA
PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM W BIAŁYMSTOKU**

ul. Jana Kilińskiego 1
15-089 Białystok
tel. 85 748 54 07
komisjabioetyczna@umb.edu.pl

Białystok, 16.02.2023 r.

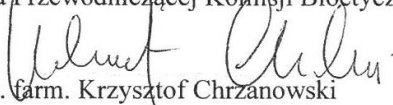
Dot. zgody KB: **R-I-002/169/2018**

Sz. P.
prof. dr hab. Anna Moniuszko-Malinowska

Komisja Bioetyczna przy UMB na posiedzeniu w dniu 16.02.2023 r. zapoznała się z wnioskiem do tematu badawczego: „Wykorzystanie badań multiomicznych do oceny konsekwencji metabolicznych chorób przenoszonych przez kleszcze” i **wyraża zgodę** na włączenie do zespołu badawczego:

- lek. Marty Dobrzyńskiej z Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej.

Z-ca Przewodniczącej Komisji Bioetycznej przy UMB


dr n. farm. Krzysztof Chrzanowski

Pouczenie:

1. Odwołanie od uchwały komisji bioetycznej wyrażającej opinię może wnieść:

1) wnioskodawca;

2) kierownik podmiotu, w którym eksperyment medyczny ma być przeprowadzony;

3) komisja bioetyczna właściwa dla ośrodka, który ma uczestniczyć w wieloośrodkowym eksperymencie medycznym.

2. Odwołanie, o którym mowa w ust. 1, wnosi się za pośrednictwem komisji bioetycznej, która podjęła uchwałę, do Odwoławczej Komisji Bioetycznej w terminie 14 dni od dnia doręczenia uchwały wyrażającej opinię.

XI. Życiorys i doświadczenie naukowe doktoranta

DANE PERSONALNE

Imię i nazwisko Marta Dobrzyńska
Data urodzenia 28.05.1997

WYKSZTAŁCENIE

2016 - 2022 kierunek lekarski, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
2013 - 2016 I Liceum Ogólnokształcące im. Adama Mickiewicza w Białymstoku, klasa o profilu biologiczno-chemiczno-matematycznym

PRZEBIEG PRACY ZAWODOWEJ

01.10.2022 do chwili obecnej asystent w Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

01.10.2022-31.10.2023 lekarz stażysta w Uniwersyteckim Szpitalu Klinicznym w Białymstoku.

DOŚWIADCZENIA W PRACY NAUKOWEJ

2019-2022 aktywne uczestnictwo w kole naukowym przy Zakładzie Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

01.02.2021 - 30.07.2022 uczestnictwo w projekcie naukowym pt. „ Wykorzystanie badań multiomicznych do oceny konsekwencji metabolicznych chorób przenoszonych przez kleszcze”, finansowanego ze środków NCN (Konkurs SONATA BIS 7).

SPIS PUBLIKACJI

1. Gęgotek A., Jastrząb A., **Dobrzyńska M.**, Biernacki M., Skrzydlewska E. Exogenous Antioxidants Impact on UV-Induced Changes in Membrane Phospholipids and the Effectiveness of the Endocannabinoid System in Human Skin Cells. *Antioxidants* 2021, 10, 1260. doi:10.3390/antiox10081260
2. **Dobrzyńska M.**, Moniuszko-Malinowska A., Jarocka-Karpowicz I., Czupryna P., Groth M., Skrzydlewska E. Metabolic Response to Tick-Borne Encephalitis Virus Infection and Bacterial Co-Infections. *Pathogens* 2022, 11, 384. doi:10.3390/pathogens11040384
3. Groth M., Skrzydlewska E., **Dobrzyńska M.**, Pancewicz S., Moniuszko-Malinowska A. Redox Imbalance and Its Metabolic Consequences in Tick-Borne Diseases. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2022, 12, 23 pp, Article ID 870398
4. **Dobrzyńska M.**, Moniuszko-Malinowska A., Skrzydlewska E. Metabolic response to CNS infection with flaviviruses. *J Neuroinflammation*. 2023 Sep 29;20(1):218. doi: 10.1186/s12974-023-02898-4.

Zestawienie liczby publikacji z ich punktacją MNiSW oraz IF

Rodzaj publikacji	Liczba publikacji	Punkty MNiSW	IF
Publikacje w czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR)	4	400	27,579
Komunikaty naukowe	1	-	-