

LUIZA JEDLINA-PANASIUK

*Instytut Parazytologii im. W. Stefańskiego PAN
Twarda 51/55, 00-818 Warszawa
e-mail: luiza@twarda.pan.pl*

PRÓBY WYKORZYSTANIA SZCZEPIONEK GENETYCZNYCH PRZECIWKO HELMINTOM

WSTĘP

Pojęcie szczepienia pojawiło się ponad 200 lat temu, kiedy Jenner, po raz pierwszy, podał wirusa ospy, aby zapobiec powstawaniu ospy prawdziwej. Przez ostatni wiek, rozwój i powszechne użycie szczepionek przeciwko różnym patogenom był wielkim triumfem nauk medycznych. Tak wielki postęp w tej dziedzinie nie był oczywiście przypadkowy. Niewątpliwie ogromnie przyczynił się do niego burzliwy rozwój, w ciągu ostatnich 15 lat, nowoczesnych technik biologii

molekularnej. Mimo to, nie ma skutecznej szczepionki przeciw takim ważnym chorobom pasożytniczym jak: malaria, leiszmanioza, toksoplazmoza, cryptosporidioza, schistosomoza czy fascjoloza. Wynika to ze złożoności cyklu życiowego i budowy pasożyta oraz ze złożoności oddziaływań między pasożytami i ich żywicielami. Te czynniki powodują, że skonstruowanie efektywnej szczepionki przeciw pasożytniczej jest bardzo trudne.

RODZAJE SZCZEPIONEK

Stosowane obecnie technologie otrzymywania antygenów do produkcji swoistych szczepionek przeciw pasożytniczym umożliwiają ich podział na 4 grupy.

SZCZEPIONKI ZAWIERAJĄCE ŻYWE ATENUOWANE PATOGENY

Szczepionki takie zawierają patogeny poddane przypadkowej mutacji, indukowanej przez niekorzystne warunki hodowli i długotrwałą selekcję osobników, stale monitorowanych i selekcyjowanych pod kątem zachowania antygenów i zmniejszenia ich żywotności. Wywołują one niezwykle ważną stymulację miejscową, istotną w pobudzeniu układu odpornościowego błon śluzowych. Jednakże ogranicza się stosowanie takich szczepionek, ponieważ istnieje obawa odtworzenia inwazyjnej formy patogenu. Na rynku dostępnych jest kilka tego rodzaju szczepionek przeciw pasożytniczym, głównie

przeciwko chorobom wywoływanych przez pierwotniaki, np. przeciwko toksoplazmozie owiec, kokcydiozie kur (WĘDRYCHOWICZ i WIŚNIEWSKI 2003).

SZCZEPIONKI ZAWIERAJĄCE NATYWNE (NATURALNE) ANTYPGENY

W skład ich wchodzi wyizolowane antygeny, najczęściej powierzchniowe, lub unieszkodliwione egzotoksyny wytwarzane przez pasożyty. W tym przypadku dużym problemem jest uzyskanie wystarczającej ilości materiału do szczepienia oraz żmudne procedury izolacji i oczyszczania białek antygenowych z organizmu wywołującego chorobę. Do tej pory przetestowano kilka szczepionek przeciwko inwazjom *F. hepatica* opartych na naturalnych (naturalnych) białkach strukturalnych bądź wydalniczych przynny (WĘDRYCHOWICZ i KLOCKIEWICZ 1994, SPITHILL i DALTON 1998). Zachęcające wyniki

otrzymano u bydła zaszczepionego mieszaniną natywnych katepsyn L1 i L2, gdzie uzyskano redukcję liczby przywr rozwijających się po zarażeniu sprawdzającym (ang. challenge) o 55% (MULCAHY i współaut. 1999).

SZCZEPIONKI OPARTE NA REKOMBINOWANYCH BIAŁKACH PATOGENU

Sklonowanie genu lub cDNA kodującego określone białko jest tylko pierwszym z wielu kroków niezbędnych do wyprodukowania zrekombinowanego białka. Drugim etapem jest wprowadzenie genu do komórki gospodarza, która będzie produkowała to białko. W komórkach bakteryjnych (najczęściej w *E coli*, *Bacillus subtilis*), w tani i prosty sposób i w dość krótkim czasie można otrzymać dużą ilość produktu. Choć okazuje się, że niektóre białka, eksprymowane na wysokim poziomie (więcej niż 10% masy wszystkich białek bakteryjnych), często ulegają nieprawidłowemu fałdowaniu i odkładane są w formie nierozpuszczalnych ciałek inkluzyjnych. Białka po ekstrakcji z tych struktur często są biologicznie nieaktywne. Białka otrzymuje się również w drożdżach (*Saccharomyces cerevisiae*), które są prostymi komórkami eukariotycznymi, przypominającymi jednak pod wieloma względami komórki ssacze, a rosną równie szybko jak komórki bakteryjne. Przeprowadzają również wiele z modyfikacji postranslacyjnych charakterystycznych dla ludzkich białek, a także można je pobudzić do wydzielania białek w medium (pożywki). Za pomocą wektorów bakulowirusowych można otrzymać ekspresję heterologicznych białek w komórkach owadzi. Ekspresja jest wprowadzanie na wysokim poziomie, ale mogą pojawiać się modyfikacje postranslacyjne, a ponadto koszt tych hodowli jest często zbyt duży. Na rynku jest dostępna szczepionka przeciw inwazjom kleszcza *Boophilus mi-*

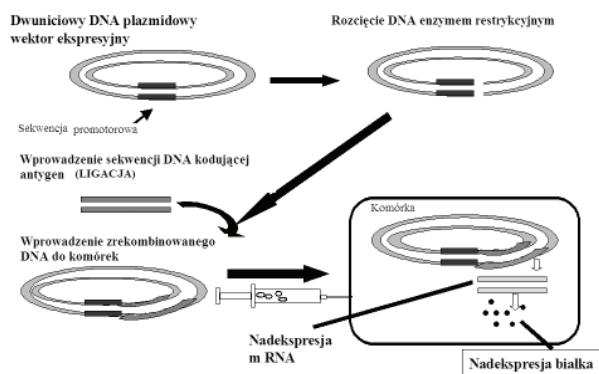
croplus, oparta na zrekombinowanym białku z jelita tego krwio pijnego stawonoga (WĘDRYCHOWICZ i WIŚNIEWSKI 2003).

SZCZEPIONKI Z NAGIEGO DNA

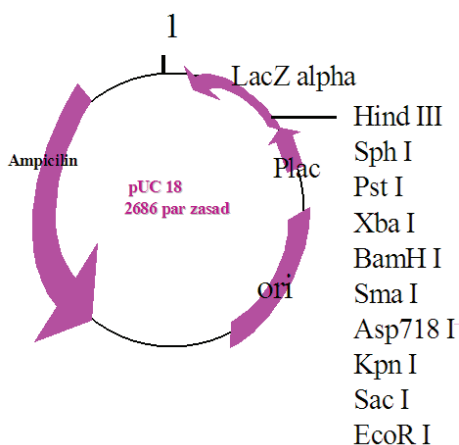
Szczepionki te zostały określone jako szczepionki trzeciej generacji. Są to szczepionki zawierające plazmidy ekspresyjne z promotorem eukariotycznym, w który wklonowany jest antygen pasożyta w formie cDNA. Białko wytwarzane na jego bazie w tkance szczepionego ssaka jest wychwytywane przez komórki prezentujące antygen, zarówno w kompleksach z cząsteczkami MHC klasy I, jak i II, zapewniając powstanie zarówno odpowiedzi immunologicznej pośredniczonej przez Th1, jak i Th2 (JAKÓBISIAK i współaut. 2002). Wyniki wielu eksperymentów wskazują, że na typ skutecznej odpowiedzi immunologicznej, wywołanej przez szczepienie DNA, może wpływać wiele czynników, między innymi: rodzaj plazmidu, rodzaj adjuwantu, miejsce i metoda podania, liczba dawek szczepionki, interwał czasowy pomiędzy kolejnymi dawkami itp. (KOFTA i WĘDRYCHOWICZ 2001). Szczepionki otrzymane metodami rekombinacji DNA są stabilne a ich stosowaniu nie towarzyszą niepożądane objawy. Preparaty można stosunkowo szybko modyfikować do zmian cech patogennego organizmu za pomocą immunomodulujących konstruktów DNA, mogących wywołać odmienne od naturalnych ochronnych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej.

JAK OTRZYMUJE SIĘ SZCZEPIONKĘ DNA?

Aby otrzymać szczepionkę DNA, musimy wyizolować RNA z danego pasożyta (tworzenie bibliotek cDNA). Metodą RT-PCR, za pomocą enzymu odwrotnej transkryptazy, otrzymujemy cDNA kodujący antygen szczepionkowy, który jest namnażany metodą PCR. Kolejną fazą jest wklejenie cDNA antygeny do wektora plazmidowego. Wektor, to cząsteczka DNA, będąca nośnikiem interesującej nas sekwencji DNA, która posiada zdolność do autonomicznej replikacji w danym typie komórek. Zapewnia powielanie wprowadzonego fragmentu DNA, czyli klonowanie (Ryc. 1), a czasami także wydają syntezę kodowanego przez gen białka (transkrypcję i translację oraz jego stabilność) jak ma to miejsce w tzw. wektorach ekspresyjnych (Ryc 2). Są różne typy wektorów a dobranie odpowiedniego zależy m.in. od tego, w jakich komórkach zamierzamy klonować gen. Najważniejszym elementem warunkującym spe-



Ryc. 1. Klonowanie antygeny szczepionkowego.



Ryc. 2. Mapa wektora UC18.

Plac, silny promotor; LacZ alpha, polilinker, oraz wykaz enzymów restrykcyjnych przecinających polilinker; Ampicilin, gen oporności na ampicylinę.

cyficzność wektora są sekwencje odpowiedzialne za inicjację replikacji, tzw. sekwencje *ori*. Najprostsze wektory posiadały wyłącznie jedno, unikalne miejsce restrykcyjne, w które można było wprowadzić obcy DNA. Obecnie najczęściej jest to tzw. Polilinker, tzw. syntetyczny odcinek DNA, w którym znajduje się zwykle kilkanaście miejsc rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne. Pozwala to na swobodniejszy dobór odpowiedniego do klonowania enzymu. Wektory zazwyczaj posiadają również geny markerowe, czyli geny kodujące białka odpowiedzialne za łatwo wyróżnialne cechy fenotypowe. Wektor musi być tak skonstruowany, aby istniała możliwość selekcji tych komórek, do których wniknął. Jego budowa powinna pozwalać także na odróżnienie wektora zrekombinowanego od takiego, który zamknął się bez włączenia fragmentu DNA. Taki konstrukt w odpowiedniej dawce, jest podawany do organizmu żywiciela, gdzie następnie cDNA antygeny ulega ekspresji, a wydzielane białko spełnia rolę antygeny. Ważnym elementem, w projektowaniu skutecznej szczepionki DNA jest zrozumienie zależności pomiędzy mechanizmami immunologicznymi żywiciela i pasożyta. Szczepienie DNA potrafi pobudzić odpowiedź immunologiczną Th1-zależną i Th2-zależną. Odpowiedź Th1, zależna charakteryzuje się produkcją przeciwciał IgG2 (IgG1 u ludzi) i aktywacją mechanizmu odpowiedzi cytotoksycznych komórek T. Odpowiedź Th2 – zależna związana jest z przeciwciałami IgM, IgG1 (IgG4 u ludzi), IgA i odpowiedzią przeciwciał IgE. Jednakże, rezultat szczepienia często zależy od kilku czynników.

CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA EFEKTYWNOŚĆ IMMUNIZACJI

Efektywność działania szczepionek przeciw pasożytniczych zależy od wielu czynników. Najważniejsze z nich to: dobór odpowiednich antygenów, wybór optymalnej drogi podania antygeny, dobór odpowiedniego protokołu immunizacji.

Wpływ formy antygeny na odpowiedź immunologiczną

Rodzaj i intensywność odpowiedzi immunologicznej wywoływanej szczepieniem zależy w dużej mierze od cech antygeny.

Istnieje wiele dowodów eksperymentalnych na to, że antygeny białkowe i podane w formie cDNA, stanowią odmienne „wyzwania” dla układu immunologicznego, zarówno w zakresie rozpoznania, jak i odpowiedzi obronnej (KOFTA i WĘDRYCHOWICZ 2001, WĘDRYCHOWICZ i WIŚNIEWSKI 2003). Dla prawidłowej odpowiedzi niezbędne jest rozpoznanie przez receptor limfocyty T cząsteczki antygeny zgodności tkankowej na powierzchni komórki prezentującej antygen lub komórki docelowej. Muszą one ulec wstępnemu przetworzeniu w komórce prezentującej antygen, gdyż limfocyty T nie rozpoznają natywnych białek pasożyta. Sekwencja aminokwasów i struktura „przetworzonych” peptydów determinują interakcje kompleksu MHC i receptora TCR limfocyty T. Tylko ścisła komplementarność struktur, warunkująca ich konformację przestrzenną, zapewnia rozpoznanie antygeny i wywołuje odpowiedź. Niektóre peptydy, nawet mające zdolność łączenia się z MHC, nie indukują proliferacji komórek T. Przetwarzane peptydy pasożyta są prezentowane głównie limfocytom T CD8, w kontekście antygeny zgodności tkankowej klasy I (obecnych na większości komórek organizmu), lub limfocytom T CD4, przy udziale cząsteczek MHC klasy II, znajdujących się na wyspecjalizowanych komórkach prezentujących antygen (APC). W zależności od profilu uwalnianych cytokin wśród limfocytów CD4 wyróżniono subpopulacje:

- Th1 – produkujące IL-2, interferon gamma i TNF, promujące odpowiedź komórkową;
- Th2 – produkujące IL-4, IL-5, IL-6 i IL-10, które wpływają na rozwój limfocytów B i potęgują odpowiedź humoralną.

W wielu doświadczeniach wykazano, że w przypadku szczepionek przeciwwirusowych oraz przeciwbakteryjnych (TASCON i współaut. 1996), antygen białkowy stymu-

luje głównie odpowiedź typu humoralnego (Th2 zależną), zaś szczepionka DNA wywołuje również odpowiedź typu komórkowego (Th1). Po śródskórnym podaniu szczepionki w postaci wektora zawierającego cDNA kodujący określony antygen, obserwowano odpowiedź typu Th1, natomiast po wprowadzeniu tą samą drogą antygen w postaci białka, odpowiedź typu Th2 (RAZ i współaut. 1996). Pobudzenie odpowiedzi typu Th1 przy użyciu szczepionki DNA jest związane z wydzielaniem przez komórki prezentujące antygen interleukiny 12 (IL-12), która stymuluje produkcję interferonu gamma (IFN- γ), kierującego odpowiedź w stronę Th-1 (RAZ i współaut. 1996). W badaniach nad szczepionką przeciwko malarii ustalono, że podanie jako pierwszej dawki antygen w formie cDNA, a kolejnej w formie rekombinowanego antygen białkowego może wywołać wyższy poziom odporności na zarażenie niż dwukrotne podanie antygen w tej samej formie (KOFTA i WĘDRYCHOWICZ 2001).

W przypadku szczepionek przeciwko *F. hepatica* stwierdzono, że szczury immunizowane cDNA kodującym GST wykazywały zmniejszenie liczby przywr w wątrobach szczepionych szczurów o 54% w porównaniu z kontrolą zarażenia, natomiast szczury, którym podano antygen w formie rekombinowanego białka GST syntetyzowanego w komórkach owadzych wykazywały nieco niższy (48% redukcja) poziom odporności na zarażenie oraz inny profil i dynamikę odpowiedzi przeciwciał (WĘDRYCHOWICZ i współaut. 2002). Z kolei SMOOKER i współaut. (2001) wykazali, że katepsyna L podana w formie cDNA może wywoływać odpowiedź humoralną, która u myszy była znacznie niższa niż u owiec szczepionych białkową formą tego enzymu.

Wpływ wielkości i liczby dawek antygeny na odpowiedź immunologiczną

Do wywołania reakcji obronnej organizmu niezbędna jest odpowiednia dawka antygeny. W przypadku szczepienia DNA bardzo ważną rolę odgrywa też miejsce podania konstruktu wektor-cDNA antygeny. I tak na przykład, podczas iniekcji domięśniowej stosuje się standardowo 100 μ g na małe zwierzę laboratoryjne (szczur, mysz) (XU i LIEW 1994). Dodatkowo można wzmocnić pobieranie DNA antygeny, stosując domięśniowo bupiwakainę. Środek ten uszkadza włókna mięśniowe, które po regeneracji pobierają z komórek satelitarnych wektor w większej

ilości (DAVIS i wsp. 1995). KOFTA i współaut. (2000) uzyskali wysoki stopień odporności przeciwko inwazji *F. hepatica* u szczurów szczepionych 50 μ g cDNA proteiny cysteinowej z bupiwakainą. Mechanizm działania szczepionki DNA zależny jest od drogi podania, rodzaju antygeny i dawki DNA. Szczepionki DNA można podawać w różny sposób, w zależności od typu wywołania potrzebnej odpowiedzi immunologicznej.

Wpływ drogi podania antygeny na odpowiedź immunologiczną

Istnieje wiele dróg podawania szczepionek DNA (KOFTA i WĘDRYCHOWICZ 2001), jak i białkowych. By wprowadzić szczepionkę DNA do organizmu stosuje się zwykłą iniekcję, armatki genowe, aerozol, bądź krople do nosa. Najprostszym i najstarszym sposobem jest iniekcja domięśniowa. W odniesieniu do szczepionek DNA jest to metoda dość wydajna, ponieważ tkanka mięśniowa ma szczególną zdolność do wychwytywania DNA (DANKO i WOLFF 1994). W przypadku mięśni szkieletowych, przypuszcza się, że ważną rolę przyczyniającą się do skuteczności i wydajności ekspresji, odgrywają komórki dendrytyczne, należące do komórek prezentujących antygen (ERLT i XIANG 1996). Jednakże istnieją uzasadnione obawy, że szczepienie domięśniowe przeciwko pasożytom przewodu pokarmowego może być mało skuteczne ze względu na fakt, że domięśniowe podanie szczepionki wywołuje głównie systemową odpowiedź immunologiczną, zaś w odporności przeciwko pasożytom jelitowym istotną rolę odgrywa lokalna odpowiedź immunologiczna błon śluzowych. Stosuje się też kompleksy DNA-lipid, które w podaniu dożylnym wykazują większą ekspresję (produkcję antygenów), niż po podaniu domięśniowym. W ostatnim czasie zaczęto podawać DNA w formie aerozolu i uznano, że najlepsze wyniki uzyskuje się przy wykorzystaniu tej metody do leczenia chorób dróg oddechowych. Zachęcające wyniki w wywoływaniu odporności przeciwko inwazji *Ascaris suum* uzyskano podając antygen szczepionkowy w formie cDNA na błonę śluzową nosa myszy (TSUJI i współaut. 2003). Również nasze wcześniejsze badania nad wykorzystaniem proteiny cysteinowej do uodpornienia żywicieli przeciwko inwazji *F. hepatica* wykazały, że donosowe podanie cDNA tego enzymu wywołuje znaczącą odporność szczurów na zarażenie metacerkariami tej przywry (WĘDRYCHOWICZ i współaut. 2003). DNA można również podawać w for-

Tabela 1. Przykłady prowadzonych badań nad szczepionkami cDNA przeciwko pasożytom.

Pasożyt	Żywiciel	cDNA	Wynik	Literatura
<i>Plasmodium yoeli</i>	Mysz	PyCSP, PyHEP17, PySSP2	Silna odpowiedź limfocytów T CD8+	HOFFMAN i współaut. 1994, 1997
<i>Plasmodium falciparum</i>	Małpa	Siedem antygenów z różnych stadiów rozwojowych pasożyta	Wysokie miano specyficznych przeciwciał	TINE i współaut. 1996
<i>Plasmodium falciparum</i>	Naczelnny	Siedem antygenów z różnych stadiów rozwojowych pasożyta	Brak odporności	OCKENHOUSE i współaut. 1998
<i>Leishmania major</i>	Mysz	Metaloproteinaza gp63	Zmniejszenie uszkodzeń i ilości pasożytów	XU i LIEW 1994
<i>Schistosoma japonicum</i>	Mysz	26 kDa GST	Odpowiedź przeciwciał, brak odporności	YANG i współaut. 1995
<i>Schistosoma mansoni</i>	Mysz	Sm23	63% odporności na uszkodzenia	HARN i współaut. 1998
<i>Taenia ovis</i>	Mysz	Różne formy 45 W	Różny poziom przeciwciał	DREW i współaut. 2000
<i>Taenia crassiceps</i>	Mysz	KETc7	Odporność: samice – 59% samce – 100%	ROSAS i współaut. 1998
<i>Fasciola hepatica</i>	Szczur	Proteinaza cysteinowa	Odporność: samice – 74% samce – 100%	KOFTA i współaut. 2000

mie kulek złota mikroskopijnej wielkości, opłaszczonych antygenem (ang. gene gun). Pistolet genowy bardzo często jest używany w pracach nad szczepionkami, wykorzystuje on sprężony hel do wstrzeliwania przez skórę żywiciela kuleczek złota o średnicy 1 mm, pokrytych cDNA antygenem. Po wstrzyknięciu dostają się one bezpośrednio do cytosolu komórek. Metoda ta, mimo że jest kosztowna, daje pomyślne wyniki szczepień już przy niewielkich ilościach antygenem.

WYNIKI BADAŃ NAD SZCZEPIONKAMI PRZECIWKO PASOŻYTOM

Do tej pory najwięcej badań przeprowadzono nad szczepionkami przeciwko inwazjom pierwotniaczym, w szczególności pasożytom z rodzaju *Plasmodium*, oraz *Leishmania sp.* (Tabela 1). Inwazje te są przyczyną wielu

zgonów ludzi na świecie. Szczepiąc myszy DNA kodującym białko gp63, pochodzącym od *Leishmania major*, a następnie zarażając je tym pasożytem, stwierdzono zmniejszenie uszkodzeń w porównaniu ze zwierzętami nie szczepionymi. COSTA i współaut. (1998) konstruowali plazmid zawierający DNA kodujący enzym wydzielany przez *Trypanosoma cruzi*. Myszy immunizowane tym konstruktem wykazywały znaczące zmniejszenie żywotności tego pasożyta.

Wcześniej, pozytywne próby nad szczepionkami DNA spowodowały, iż zostały wykorzystane do poszukiwań skutecznej szczepionki przeciw inwazjom robaków, tj. *Schistosoma sp.*, *Ancylostoma spp.* oraz *Fasciola hepatica*. Pierwsze szczepienie DNA przeciw pasożyтови wielokomórkowemu wykonano na myszy wektorem niosącym cDNA

białka błonowego schistosomuli, *Schistosoma mansoni* Sm23 (HARN i współaut. 1998), jednakże nie udało się otrzymać skutecznej szczepionki przeciwko inwazji *Schistosoma sp.* Niewielki sukces odniesiono po immunizacji owiec plazmidem zawierającym antygen (W45) przeciwko *Taenia ovis*, wywołującemu przede wszystkim wysokie miano przeciwciał IgG1 (ROTHEL i współaut. 1997).

W ostatnim czasie prowadzone są intensywne badania nad szczepionkami przeciwko chorobie motyliczej u bydła i owiec. Mimo pojawienia się szczepionek rekombinowanych, opartych na wybranych, wysoce immunogennych antygenach, które pobudzają silną odpowiedź humoralną, nie uzyskano wystarczającej odporności na zarażenie. Stąd koncepcje szczepionek skojarzonych, opartych na antygenach w formie DNA oraz białka, zawierających dodatkowo czynniki immunomodulujące.

F. hepatica jest pasożytem wydzielającym do środowiska enzymy zabezpieczające przed wolnymi rodnikami tlenowymi, takie jak dysmutazy nadtlenkowe, peroksydazy glutationowe i transferazy S-glutationowe (GST). Wędrujące i rozwijające się motyllice wydzielają proteiny, które odcinają z powierzchni aktywnych limfocytów B, neutrofilów, komórek dendrytycznych, makrofagów i płytek krwi receptory CD 23 dla IgE. Odcinają również fragmenty Fc, przeciwciał związanych z ich antygenami powierzchniowymi, dzięki czemu unikają uszkodzenia w wyniku pośredniczonej przez przeciwciała reakcji cytotoxyczności ADCC (TORT i współaut. 1999).

Obiecujące wyniki szczepień otrzymano przy użyciu proteaz cysteinowych motylicy (z grup katepsyn L1 i L2). W wyniku podawania cielecom różnych ilości natywnej katepsyny L1, wyizolowanej z ES *F. hepatica*, uzyskano zmniejszenie populacji przywr osiedlających się w wątrobie po zarażeniu sprawdzającym o 53,7% w porównaniu z nieimmunizowaną kontrolą. Najlepsze jednak wyniki (redukcja populacji przywr o 72,4%) otrzymano po podaniu kombinacji natywnej hemoglobiny i katepsyny L2 przywry (DALTON i współaut. 1996). W wyniku dalszych badań stwierdzono, że podczas inwazji *F. hepatica* u bydła stymulowana jest silna odpowiedź przeciwciał z podklasy IgG1 przeciwko antygenom ekskrecyjno-sekrecyjnym przywry. Natomiast skuteczność eksperymentalnych szczepionek przeciwko fascjolozie bydła skorelowana była z wysokim poziomem przeciwciał z podklasy IgG2, czyli z pobudzeniem

innego niż naturalny mechanizmu odpowiedzi immunologicznej (MULCAHY i współaut. 1998).

Wiele antygenów szczepionkowych i protokołów immunizacji testowano na szczurach. W wyniku dwukrotnego podania do jamy otrzewnej szczurów białek ekstraktu somatycznego dorosłej przywry z niekompletnym adjuwantem Freund'a uzyskano, w zależności od dawki antygeny, zmniejszenie liczby przywr o 41–84% (OLDHAM 1983). Podając domięśniowo szczurom plazmid zawierający cDNA sklonowanej z mRNA dorosłych przywr proteazy cysteinowej, KOFTA i współaut. (2000) uzyskali sterylność odporność na zarażenie metacerkariami *F. hepatica* u samców i 78% redukcję liczby przywr docierających do wątroby u samic. Podając ten sam antygen na śluzówkę nosa stwierdzono 61–75% redukcję liczby przywr osiedlających się w wątrobie (WĘDRYCHOWICZ i współaut. 2003)

ZALETY I WADY STOSOWANIA SZCZEPIONEK DNA

Do tej pory nie poznano wszystkich mechanizmów działania szczepionek cDNA. Od początku, szczepionki DNA oferowały więcej korzyści niż tradycyjne szczepionki. Między licznymi zaletami, główną korzyścią szczepionek DNA, w porównaniu z konwencjonalnymi szczepionkami, jest fakt, że są one w stanie wywołać odpowiedź komórkową, jak i humoralną. Są one często silnie immunogenne, mogą pobudzać mechanizmy odpornościowe, odmienne od naturalnej odpowiedzi immunologicznej, co może być decydującym czynnikiem w ich działaniu. Poza tym, samo otrzymanie antygeny jest stosunkowo łatwe, po sklonowaniu fragmentu cDNA do odpowiedniego wektora można go wytwarzać w znacznej ilości (za pomocą reakcji PCR), a antygen powstający w organizmie immunizowanego osobnika jest identyczny (lub bardzo zbliżony) do natywnego białka patogenu. DNA jest trwałe i termostabilne, nie wymaga utrzymywania niskich temperatur podczas transportu i przechowywania. Koszty szczepionki DNA są stosunkowo niskie, mniejsze niż szczepionek z rekombinowanych białek. Szczepienie DNA jest przydatne w uodparnianiu niemowląt – zawodzi tu tradycyjne szczepionki, gdyż immunoglobuliny pochodzące od matki wiążą drobnoustroje ze szczepionek hamując możliwość rozwinięcia się odpowiedzi immunologicznej (SIEGRIST 1997). Już samo DNA może być stosowane jako adjuwant wzmacniając pobudzenie odpowiedzi immunologicznej. Obecność specy-

ficznych sekwencji DNA, bogatych w niemetylowane grupy CpG w wektorze, bądź zastosowane dodatkowo w składzie szczepionki, silnie pobudza odpowiedź Th typu 1, aktywując działanie IL 12, IL 6 i IFN- γ (COWDERY i współaut. 1996, HALPERN i współaut. 1996, KLINMAN i współaut. 1996).

W trakcie tych rozważań nasuwają się pytania dotyczące bezpieczeństwa stosowania szczepionek DNA. Czy DNA mógłby być szkodliwy dla żywiciela przez integrację w jego genom lub przez pobudzenie odpowiedzi przeciwciał anty DNA? Czy antygen w tej formie, w małych dawkach, wywołuje tolerancję odpornościową? Lub przeciwnie, czy komórki zawierające wektor mogłyby być zniszczone przez komórki T cytotoksyczne (komórki Tc)? Wciąż, nie do końca poznane są wszystkie mechanizmy działania tej formy antygeny, toteż prowadzone są liczne badania poszukujące odpowiedzi na te pytania. Do tej pory badania nie ujawniły integracji antygeny w formie DNA do genomu szczepionego żywiciela (DANKO i WOLFF 1994).

Dotychczas nie stwierdzono także żadnych zmian patologicznych u człowieka. W fazie I badań klinicznych szczepionki DNA kodującej antygen malarii wykazano, że po 3 zastrzykach domięśniowych jedną z czterech dawek wektorów DNA (od 20 do 2500 mikrogramów), nie było żadnych znaczących kliniczne zmian hematologicznych bądź biochemicznych, oraz nie wykryto przeciwciał anty dsDNA (LE i współaut. 2000). Z kolei, immunohistochemia i mikroskopia elektronowa pokazują, że włókna mięśniowe u myszy są zniszczone po około 10 dniach po podaniu wektora DNA (DAVIS i współaut. 1997). Szczepionki DNA przynoszą nadzieję na skuteczne zapobieganie złożonym inwazjom pasożytniczym, gdzie szczepionki tradycyjne nie sprawdzają się.

Podsumowując dotychczasowe efekty szczepień DNA uważa się, że jest to metoda otwierająca nowe perspektywy profilaktyce przeciw pasożytniczej.

TRIALS AT APPLICATION OF GENETIC VACCINES AGAINST HELMINTHS

Summary

At present cloning technologies are being rapidly developed leading to creation of new vaccines, especially based on DNA or recombinant proteins. DNA vaccination appears to offer better prospects for the development of multivalent vaccines that will effectively activate both the humoral and cellular mechanisms of the immune system. Currently the possibility of DNA vaccination against such important parasitic diseases like malaria, leishmaniasis,

toxoplasmosis, cryptosporidiosis, schistosomiasis, fasciolosis is being widely explored. However, the outcome of vaccination depends vastly on vaccine formulations, dose and route of vaccine delivery, and the species or even strain against which the host is vaccinated. To overcome these problems much research is still needed, specifically focused on cloning and testing of new DNA target sequences.

LITERATURA

- COSTA F., FRANCHIN G., PEREIRA-CHOCOCOLA V. L., RIBEIRO M., SCHEKMAN S., RODRIGUES M. M., 1998. *Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces Trypanosoma cruzi infection in mice.* Vaccine 16, 768-774.
- COWDERY J. S., CHACE J. C., YI A., KRIEG A. M., 1996. *Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides.* J. Immunol. 156, 4570-4575.
- DALTON J. P., MCGONILE S., ROLPH T. P., ANDREWS S. J., 1996. *Induction of protective immunity in cattle against infection with Fasciola hepatica by vaccination with cathepsin L proteinases and with hemoglobin.* Infect. Immunol. 64, 5066-5074.
- DANKO I., WOLFF J. A., 1994. *Direct gene transfer into muscle.* Vaccine 12, S1499-1502.
- DAVIS H. L., MICHEL M. L., WHALEN R. G., 1995. *Use of plasmid DNA for direct gene transfer and immunization.* Ann. NY Acad. Sci. 772, 21-29.
- DAVIS H. L., BRAZOLOT MILLAN C. L., MANCINI M., MCCUSKIE M. J., HADCHOUEL M., COMANITA L., TIOLLAIS P., WHALEN R. G., MICHEL M. L., 1997. *DNA-based immunization against hepatitis B surface antigen (HBsAg) in normal and HBsAg-transgenic mice.* Vaccine 15, 849-852.
- DREW D. R., LIGHTOWLERS M., STRUGNELL R. A., 2000. *Humoral immune responses to DNA vaccine-expressing secreted, membrane bound and non-secreted forms of the Taenia ovis 45W antigen.* Vaccine 18, 2522-2532.
- ERTL H. C. J., XIANG Z., 1996. *Novel vaccine approaches.* J. Immunol. 156, 3579-3582.
- HALPERN, M. D., KDER, R. J., PISETSKY, D. S., 1996. *Bacterial DNA induces murine interferon-gamma production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor-gamma.* Cell Immunol. 167, 72-78.

- HARN D. A., REYNOLDS S. R., CHIKUNGUWO S., DIS-SAYANKE S., SKELLY P., SHOEMAKER C., OKANO M., 1998. *Peptide and DNA vaccines for schistosomiasis, and discovery of a novel adjuvant that promotes antibody responses*. Parasitol. Int. 47 (Suppl.), 14.
- HOFFMAN S. L., SEDEGAH M., HEDSTROM R. C., 1994. *Protection against malaria by immunization with a Plasmodium yoelli circumsporozoite protein nucleic acid vaccine*. Vaccine 12, 1529-1533.
- HOFFMAN S. L., DOOLAN D. L., SEDEGAH M., AGUIAR J. C., WANG R., MALIK A., GRAMZINSKI R. A., WEISS W. R., HOBART P., NORMAN J. A., MARGALITH M., HEDSTROM R. C., 1997. *Strategy for development of a pre-erythrocytic Plasmodium falciparum DNA vaccine for human use*. Vaccine 15, 842-845.
- JAKÓBISIAK M., 2002. *Immunologia*. Wydanie Naukowe PWN, Warszawa.
- KLINMAN D. M., YI A. K., BEAUCAGE S. L., CONOVER J., KRIEG A. M., 1996. *CpG motifs present in bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon-gamma*. PNAS 93, 2879-2883.
- KOFTA W., MIWSZCZANEK J., PLUCIENNICZAK G., WĘDRYCHOWICZ H., 2000. *Successful DNA vaccination of rats against fasciolosis*. Vaccine 18, 2985-2990.
- KOFTA W., WĘDRYCHOWICZ H., 2001. *c-DNA vaccination against parasitic infections: advantages and disadvantages*. Vet. Parasitol. 94, 243-247.
- LE T. P., COONAN K. M., HEDSTROM R. C., CHAROENVIT Y., SEDEGAH M., EPSTEIN J. E., KUMAR S., WANG R. B., DOOLAN D. L., MAGUIRE J. D., PARKER S. E., HOBART P., NORMAN J., HOFFMAN S. L., 2000. *Safety, tolerability and humoral immune responses after intramuscular administration of a malaria DNA vaccine to healthy adult volunteers*. Vaccine 18, 1893-1901.
- MEEUSEN E. N. T., BRANDON M. R., 1994. *The use of antibody-secreting cell probes reveal tissue-restricted immune responses during infection*. Eur. J. Immunol. 24, 469-474.
- MULCAHY G., O'CONNOR F., CLERY D., HOGAN S. F., DOWD A. J., ANDREWS S. J., DALTON J. P., 1999. *Immune responses of cattle to experimental anti-Fasciola hepatica vaccines*. Res. Vet. Sci. 67, 27-33.
- OCKENHOUSE C. F., SUN P., LANAR D. E., WELLDE B. T., HALL B. T., KESTER K., STOUTE J. A., MAGILL A., KRZYCH U., FARLEY L., WIRTZ R. A., SADOFF J. C., KASLOW D. C., KUMAR S., PRESTON CHURCH L. W., CRUTHER J. M., WIZEL B., HOFFMAN S., LALVANI A., HILL A. V. S., TINE J. A., GUITO K. P., DE TAISNE C., ANDERS R., HORII T., PAOLETTI E., ROPLEY BALLOU W., 1998. *Phase I/IIa safety, immunogenicity, and efficacy trial on NYVAC-Pf7, a pox-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for Plasmodium falciparum malaria*. J. Inf. Dis. 177, 1664-1673.
- OLDHAM G., 1983. *Protection against Fasciola hepatica in rats with adult fluke antigen in Freund's adjuvant: influence of antigen batch, antigen dose and number of sensitising injections*. Res. Vet. Sci. 34, 240-244.
- RAZ E., TIGHE H., SATO Y., CORR M., DUDLER J. A., ROMAN M., SWAIN S. L., SPIEGELBERG H. L., CARSON D. A., 1996. *Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization*. PNAS 93, 5141-5145.
- ROSAS G., CRUZ-REVILLA C., FRAGOSO G., LOPEZ-CASILLAS F., PEREZ A., BONILLA M. A., ROSALES R., SCIUTTO E., 1998. *Taenia crassiceps cysticercosis: humoral immune response and protection elicited by DNA immunization*. J. Parasitol. 84, 516-523.
- ROTHEL J. S., WATERKEYN J. G., STRUGNELL R. A., WOOD P. R., SEOW H. F., VADOLAS J., LIGHTOWLERS M. W., 1997. *Nucleic acid vaccination of sheep: use in combination with a conventional adjuvanted vaccine against Taenia ovis*. Immunol. Cell Biol. 75, 41-46.
- SIEGRIST C. A., 1997. *Potential advantages and risks of nucleic acid vaccines for infant immunization*. Vaccine 15, 798-800.
- SMOOKER P. M., STEEPER K. R., DREW D. R., STRUGNELL R. A., SPITHILL T. W., 2001. *Humoral responses in mice following vaccination with DNA encoding glutathione-S-transferase of Fasciola hepatica*. Parasite Immunol. 21, 357-364.
- SPITHILL T. W., DALTON J. P., 1998. *Progress in development of liver fluke vaccines*. Parasitol. Today 14, 224-228.
- TASCON R. E., COLSTON M. J., RAGNO S., 1996. *Vaccination against tuberculosis by DNA injection*. Nat. Med. 2, 888-892.
- TINE J. A., LANAR D. E., SMITH D. M., WELLDE B. T., SCHULTHEISS P., WARE L. A., KAUFFMAN E. B., WIRTZ R. A., DE TAISNE C., HUI G. S. N., CHANG S. P., CHURCH P., HOLLINGDALE M. R., KASLOW D. C., HOFFMAN S., GUITO K. P., RIPLEY BALLOU W., SADOFF J. C., PAOLETTI E., 1996. *NYVAC-Pf7: a poxvirus-vectored, multiantigen, multistage vaccine candidate for Plasmodium falciparum malaria*. Inf. Immunol. 64, 3833-3844.
- TORT J., BRIDLEY P. J., KNOX D., WOLFE K. H., DALTON J. P., 1999. *Proteinases and associated genes of parasitic helminths*. Adv. Parasitol. 43, 161-265.
- TSUJI N., SUZUKI K., KASUGA-AOKI H., ISOBE T., ARAKAWA T., MATSUMOTO Y., 2003. *Mice intranasally immunized with a recombinant 16-kilodalton antigen from roundworm Ascaris parasites are protected against larval migration of Ascaris suum*. Inf. Immunity 71, 5314-5323.
- WĘDRYCHOWICZ H., KLOCKIEWICZ M., 1994. *Protective and diagnostic molecules of Fasciola hepatica*. Acta Parasitol. 39, 173-8.
- WĘDRYCHOWICZ H., SZYMAŃSKI P., JEDLINA-PANASIUK L., BIENKOWSKA-SZEWczyk K., 2002. *Humoral immune response of rats vaccinated with cDNA or protein form of glutathione-S-transferase of Fasciola hepatica to infection with metacercariae of the fluke*. Helminthologia 39, 127-133.
- WĘDRYCHOWICZ H., LAMPARSKA M., KĘSIK M., KOTOMSKI G., MIESZCZANEK J., JEDLINA-PANASIUK L., PLUCIENNICZAK A., 2003. *The immune response of rats to vaccination with the cDNA or protein forms of the cysteine proteinase of Fasciola hepatica*. Veterinary Immunol. Immunopathol. 94, 83-93.
- WĘDRYCHOWICZ H., WIŚNIEWSKI M., 2003. *Progress in development of vaccines against most important gastrointestinal helminth parasites of humans and animals*. Acta Parasitol. 48, 238-245.
- XU D., LIEW F. Y., 1994. *Genetic vaccination against leishmaniasis*. Vaccine 12, 1534-1536.
- YAG W., WAINE G. J., MCMANUS D. P., 1995. *Antibodies to Schistosoma japonicum (asian bloodfluke) paramyosin induced by nucleic acid vaccination*. Bioch. Biophys. Res. of Comm. 212, 1029-1039.