

Tadeusz Hubert Dzbeński

INTRYGUJĄCE ASPEKTY ODPORNOŚCI I ZAPOBIEGANIA W TOKSOPLAZMOZIE*

Zakład Parazytologii Lekarskiej Państwowego Zakładu Higieny
Kierownik: Tadeusz H Dzbeński

*Omówiono typ odporności powstającej w przebiegu zarażenia *Toxoplasma gondii* wskazując jej zalety i niedoskonałości, a następnie przedstawiono dotychczasowe próby uodporniania przeciw toksoplazmozie.*

*Słowa kluczowe: *Toxoplasma gondii*, odporność swoista, uodpornianie*

*Key words: *Toxoplasma gondii*, specific immunity, immunization*

Toxoplasma gondii należy do pasożytów bardzo rozpowszechnionych wśród ludzi oraz wśród zwierząt stałocieplnych należących do większości znanych gatunków. Ocenia się, że liczba zarażonych osób sięga jednej czwartej mieszkańców Ziemi, natomiast w Polsce szacuje się ją na 50% populacji kraju. Ten wspaniały sukces rozrodczy, nieosiągalny dla innych pasożytów, toksoplazma zawdzięcza trzem wyjątkowym cechom:

1. Jest pasożytem *par excellence* poliksenicznym, który nie wykazuje określonych preferencji w doborze żywiciela
2. W odróżnieniu od wielu pasożytów innych gatunków nie musi każdorazowo przechodzić przez naprzemienne cykle rozmnażania płciowego i bezpłciowego w organizmach żywicieli różnych gatunków, ale może się szerzyć na kolejnych żywicielach za pośrednictwem form pochodzących wyłącznie z rozrodu bezpłciowego, tj. tachyzoitów i postaci encystowanych
3. Jest patogenem oportunistycznym, który rzadko doprowadza żywiciela do śmierci oznaczającej zazwyczaj równoczesną zagładę pasożyta.

Wspomniany sukces rozrodczy toksoplazma uzyskała w zawrotnym jak na ewolucję tempie, ponieważ zgodnie z wynikami ostatnich badań zespołu dra Sibleya (1) trzy podstawowe warianty genetyczne poznanych dotąd szczepów *T. gondii* wywodzą się z jednej pary komórek rodzicielskich, które dały początek niezwykle korzystnej dla pasożyta kombinacji genów zaledwie 10 000 lat temu.

Reakcją obronną organizmu zarażonego *T. gondii* jest odpowiedź immunologiczna. Mechanizmy funkcjonującej obecnie odporności ewoluowały zapewne w ciągu minionych 10 000 lat wraz ze stymulującym je pasożytem, przekształcając się z prymitywnych w bardziej wyrafinowane i swoiste. Terazniejsza odporność przeciwtoksoplazmowa ma postać

* Referat wygłoszony na sympozjum „Parazytozy – problemy kliniczne” Białystok, 6 czerwca 2003

odporności śródzakaznej, zmuszającej pasożyta do mało aktywnego pobytu w organizmie żywicielskim, ale sprzyjającej jednocześnie toksoplazmowemu zachowywaniu cech właściwych patogenom oportunistycznym.

Patogeny oportunistyczne wyróżniają się właściwością wywoływania objawów chorobowych u żywicieli z obniżoną czynnością układu odpornościowego, natomiast konfrontowane z prawidłowo działającym układem immunologicznym zachowują się z reguły nieszkodliwie. Ponieważ u przytłaczającej większości potencjalnych żywicieli *T. gondii* układ immunologiczny funkcjonuje poprawnie, dlatego inwazje toksoplazmowe przebiegają zazwyczaj bezobjawowo. We wczesnym okresie zarażenia pasożyt intensywnie się namnaża jako tachyzoit, indukując jednocześnie powstawanie odporności swoistej, po czym osiedla się na stałe w tkankach pod postacią cyst. Cysty nie prowokują uchwytnych zmian chorobowych dopóty, dopóki pozostają nienaruszone w ukrywających je pozostałościach komórek żywicielskich. Do pęknięcia cyst *T. gondii* dochodzi spontanicznie, m. in. w okolicznościach dramatycznego obniżenia odporności organizmu żywicielskiego wywołanego chorobą lub podawaniem środków immunosupresyjnych, a także w sytuacji mechanicznego uszkodzenia otaczających tkanek albo ich gwałtownego rozrostu (2).

Wspomniane powyżej zjawisko pęknięcia cyst w trakcie inwazji przewlekłych ma olbrzymie znaczenie dla losu zarażonego żywiciela i dalszego przebiegu inwazji. Jeżeli występuje w organizmie żywiciela uodpornionego i immunologicznie kompetentnego, wówczas przyczynia się do podtrzymania istniejącej odporności swoistej, albowiem każda porcja antygeny uwalnianego z cysty działa na układ odpornościowy jak dawka przypominająca. Wokół pękniętych cyst rozwija się ponadto odczyn zapalny powodujący nieznaczne uszkodzenie tkanek, które wywołuje negatywne następstwa jedynie w przypadku ulokowania się pasożyta w siatkówce, gdzie niewielkiemu zniszczeniu tkanki odpowiada zazwyczaj istotny ubytek funkcji. Ten sam proces rozpadu cysty przebiega zupełnie inaczej w organizmie z obniżoną czynnością układu odpornościowego, prowadzi bowiem do niekontrolowanego uaktywnienia inwazji i rozwoju zmian chorobowych, które skupiają się głównie w mózgu, ponieważ w warunkach obniżającej się odporności organizm może tracić zdolności obronne w pierwszej kolejności (3). Kluczową rolę w kształtowaniu jakości stosunków między toksoplazmą a jej żywicielem wydaje się zatem odgrywać odporność swoista.

Jaki typ odporności reprezentują mechanizmy konstruowane w organizmie zarażonym *T. gondii*? Swoista odporność toksoplazmowa przypomina w dużej mierze odporność współtowarzyszącą (*concomitant immunity*), jaka powstaje w organizmach zarażonych przywrami krwi z rodzaju *Schistosoma* (4). Wspomniana odporność chroni przewlekle zarażonego żywiciela przed superinwazją przywr tego samego gatunku. Osobniki pochodzące z inwazji pierwotnej, wzbudzając odporność swoistą otaczają się w okresie dochodzenia do dojrzałości warstwą antygenów swoistych dla żywiciela, co chroni je przed konsekwencjami wytwarzanej odporności. Ofiarami mechanizmów odpornościowych, funkcjonujących na zasadzie cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał (angażującej eozynofile i IgG oraz makrofagi i przeciwciała klasy IgE), padają natomiast młode przywry kolejnych populacji inwazyjnych. Dorosłe przywry są, same w sobie, mało patogenne, składają jednak jaja, które po przedostaniu się do tkanek stają się przyczyną groźnych reakcji nadwrażliwości typu późnego. Podobieństwa odporności przeciwtoksoplazmowej i współtowarzyszącej polegają na tym, że oba typy odporności kontrolują liczebność populacji, nie doprowadzając jednak do usunięcia wszystkich pasożytów z organizmu żywicielskiego. Jak już wspomniano, mechanizmom odpornościowym nie poddają się dorosłe

postaci przywr zamaskowanych warstwą antygenów swoistych dla żywiciela oraz encystowane formy *T. gondii*, osłonięte błoną komórki żywicielskiej. Postaci pasożytów ekspozycyjnych na działanie mechanizmów obronnych, tj. trofozoity toksoplazm i jaja schistosom, powodują uszkodzenia tkanek, które goją się przez bliznowacenie i zapoczątkowują patologie narządowe. Główne różnice między omawianymi typami odporności wynikają ze zdecydowanie większego udziału odporności funkcjonalnej typu humoralnego w odpowiedzi na inwazję przywr, przy czym obniżenie czynności układu odpornościowego nie powoduje obostrzenia schistosomozy, przywry nie należą bowiem do patogenów oportunistycznych.

Kolejnym typem odporności przeciw pasożytnej przypominającej tę, która rozwija się w toksoplazmozie jest premunicja wykształcana w przebiegu malarii (5). Premunicja występuje u ludności zamieszkującej tereny endemiczne malarii w następstwie wieloletniej ekspozycji na zarażenie. Dzieci rodzą się tutaj z przeciwciałami nabytymi biernie od matki, które chronią je przed zarażeniem przez kilka pierwszych miesięcy życia. Po ukończeniu pierwszego roku życia dzieci stają się już w pełni podatne na zarażenie chorując z powodu powtarzających się napadów gorączki wywołanej wysoką parazytemią. Pierwsze przejawy nabytej odporności obserwuje się dopiero około piątego roku życia. Stopniowo wydłużają się okresy bezgorączkowe, parazytemia traci intensywność, po czym opada do poziomu submikroskopowego. Po kilkunastu latach ekspozycji na zarażenie organizm nabywa pełnej odporności śródzakaznej, skutecznie chroniącej przed zachorowaniem, która nie utrzymuje się jednak dożywno, zanika bowiem bez powtarzających się reinwazji. Obserwuje się również przejściowe obniżenie premunicji u kobiet afrykańskich w drugiej połowie ciąży, u których parazytemia wzrasta do poziomu wykrywalnego badaniem mikroskopowym, wznawiając napady gorączki.

Rekapitulując uwagi o odporności malarycznej należy podkreślić, że premunicja analogicznie do odporności toksoplazmowej, ogranicza liczebność pasożyta w organizmie, formuje się jednak znacznie wolniej, początkowo jako odporność swoista szczepowo, później gatunkowo swoista. Premunicja zanika wobec braku reinwazji i wydaje się funkcjonować niezależnie od nabytego upośledzenia odporności, ponieważ u chorych z AIDS nie obserwowano zaostrzenia przebiegu malarii. Z przytoczonych powyżej spostrzeżeń i obserwacji wynika, że odporność śródzakazna, aczkolwiek formowana w przebiegu wielu inwazji, wykazuje jednak szereg cech i osobliwości spotykanych tylko w ściśle określonym rodzaju inwazji.

Do niedawna utrzymywało się przekonanie, że odporność wytwarzana w przebiegu toksoplazmozy zabezpiecza dożywno żywiciela przed superinwazją innym szczepem *T. gondii*. Przeprowadzone ostatnio badania na modelu doświadczalnie zarażonych myszy ujawniły jednak możliwość superinwazji pod warunkiem użycia pasożytów należących do szczepu o większym potencjale wywołania choroby i zmian tkankowych (6). Po raz pierwszy wykazano, że w mózgu zarażonych zwierząt mogą rezydować cysty należące do co najmniej dwóch szczepów *T. gondii*. Na możliwość superinwazji wskazywały również ostatnie publikacje dotyczące rozwoju toksoplazmozy u kobiet w ciąży, mimo odporności wytworzonej w okresie poprzedzającym poczęcie.

Opisana ułomność odporności przeciw toksoplazmowej wyjaśnia intrygującą od dawna zagadkę, dlaczego toksoplazmozowe zapalenie mózgu (*toxoplasmic encephalitis* – TE) rozwija się tylko u niektórych pacjentów z przewlekłą toksoplazmozą i zespołem nabytego upośledzenia odporności – zespół TE może powstać oczywiście tylko u osób zarażonych,

pierwotnie lub wtórnie, szczepem posiadającym właściwość wywoływania zapalenia mózgu. Owa niedoskonałość odporności toksoplazmowej jest niepokojąca dla ciężarnych, ponieważ implikuje możliwość zarażenia się szczepem zdolnym do przełamywania istniejącej już bariery immunologicznej i przenikania poprzez łożysko do płodu. Okolicznością łagodzącą wspomniane niepokoje jest niewielki, jak się obecnie wydaje, zasięg zjawiska superinwazji szczepów wirulentnych u kobiet w ciąży. W powyższej sytuacji nie ma potrzeby, aby przekształcać dotychczasowe programy zapobiegania toksoplazmozie wrodzonej, obejmując ciężarne z przewlekłą postacią toksoplazmozy takimi zaleceniami, jakie opracowano dla kobiet z grupy podwyższonego ryzyka. Trzeba na koniec zaznaczyć, że konsekwencją zjawiska superinwazji w przebiegu toksoplazmozy jest konieczność dokonania zmian w przytoczonej na wstępie tezie o odporności jako czynniku kształtującym jakość relacji między toksoplazmą a jej żywicielem – wspomniana jakość zależy w równej mierze od odporności swoistej żywiciela, co właściwości szczepu pasożyta.

Szczegółowa analiza mechanizmów funkcjonujących w rozwiniętej odporności toksoplazmowej nie jest przedmiotem niniejszego opracowania, jednak dla klarowności wywodów dotyczących możliwości uodpornienia przeciw inwazji należy nadmienić, że w toku zarażenia rozwija się zarówno swoista odporność humoralna jak i komórkowa. Przeciwciała powstające w następstwie inwazji mają nieocenioną wartość diagnostyczną, ponieważ na wykrywanie ich obecności oraz oznaczaniu miana i klasy opiera się rozpoznawanie laboratoryjne toksoplazmozy, jednak w procesach obrony przed zarażeniem odgrywają dużo mniejszą rolę. Niewielka rola odporności humoralnej jest następstwem wewnątrzkomórkowego sposobu bytowania pasożyta, co chroni go przed dostępem przeciwciał. Zwierzęta z obniżoną produkcją przeciwciał wykazują tylko nieznacznie wyższą śmiertelność w porównaniu do zwierząt z prawidłową czynnością układu odpornościowego, a przetoczenie surowicy odpornościowej nie zabezpiecza je przed zarażeniem (7, 8).

Zasadniczy udział w tworzeniu odporności przeciwtoksoplazmowej ma odporność komórkowa. Uczestniczą w niej limfocyty Th1 CD4⁺ i CD8⁺, komórki NK oraz makrofagi, główną zaś cytokiną uformowanej odporności jest interferon- γ (IFN- γ), który aktywuje makrofagi, przekształcając je z komórek żywicielskich w komórki zabijające pasożyta. Podwyższenie poziomu IFN- γ w surowicy krwi immunokompetentnych osób obserwuje się nierzadko przez kilka miesięcy od początku inwazji, natomiast jego obniżenie stwierdza się u osób zakażonych HIV i z jednoczesną toksoplazmą objawową. Zablockowanie produkcji IFN- γ u doświadczalnie zarażonych zwierząt prowadzi do znacznego wzrostu śmiertelności w przebiegu inwazji ostrej lub reaktywacji zarażeń przewlekłych (9).

Przedstawione powyżej informacje o odporności przeciwtoksoplazmowej oraz mechanizmach jej funkcjonowania pochodzą z obserwacji przeprowadzanych w przebiegu zarażeń naturalnych bądź doświadczalnych. Nie próbowano natomiast analizować szczegółowo mechanizmów odporności poszczepiennej, aczkolwiek historia uodporniania przeciw toksoplazmozie obejmuje już kilkadziesiąt lat i setki doświadczeń. Dotychczasowe próby uodporniania polegały albo na używaniu pełnego antygenu zabitych pasożytów, wybranych komponentów antygenowych, DNA *T. gondii*, albo na immunizacji za pomocą żywych, atenuowanych pasożytów. Spośród doświadczeń pierwszej grupy można wymienić próby uodpornienia preparatami zabitych pasożytów, izolowanymi lub w połączeniu z adiuwantem (10), preparatami zawierającymi główny antygen powierzchniowy *T. gondii* SAG1 (11), szczepionką skonstruowaną z plazmidów zawierających DNA kodujące antygeny po-

wierzchni pasożyta lub wydalniczo-wydzielnicze GRA1, GRA2, GRA7, ROP2 (12, 13). Jako adiuwantów używano toksoidu przecinkowca cholery, DNA kodującego IL-12 lub DNA dla czynnika GM-CSF. Efektem immunizacji było znamienne zazwyczaj obniżenie śmiertelności uodpornionych zwierząt po doświadczalnym zarażeniu wirulentnymi szczepami pasożyta, jednak wytworzona odporność nie zabezpieczała wszystkich szczepionych zwierząt i utrzymywała się zazwyczaj tylko przez kilka tygodni.

Zdecydowanie lepsze wyniki uzyskiwano przy użyciu szczepionek zawierających żywe, atenuowane pasożyty. Do pierwszej szczepionki tego typu wykorzystano trofozoity temperaturowrażliwego, nie tworzącego cyst szczepu ts-4 (14). Szczepionka powodowała wytworzenie odporności utrzymującej się u immunizowanych zwierząt przez kilka miesięcy. Do kolejnej z opracowywanych tą drogą szczepionek użyto trofozoitów szczepu S48, który wyizolowano od zarażonej owcy, po czym atenuowano przez wielokrotne pasażowanie na myszach, w następstwie czego utracił właściwości wytwarzania cyst i oocyst. Szczepionka skonstruowana z S48 (Toxovax) zabezpiecza owce przed ronieniem, wzbudzając odporność utrzymującą się przez kilka lat (15). Analogiczny typ szczepionki reprezentuje preparat z atenuowanych bradyzoitów szczepu T-263, który przez inkubację ze związkami mutagennymi utracił właściwość tworzenia oocyst (16). Wspomniana szczepionka nadaje się do immunizacji kotów, zapobiega bowiem wydalaniu oocyst do środowiska przerywając łańcuch transmisji zarażeń. Niezwykle interesującym sposobem uzyskiwania materiału szczepionkowego okazały się manipulacje genetyczne ukierunkowane na pozbawienie tachyzoitów *T. gondii* właściwości syntetyzowania zasad pirymidynowych (17). Po zaszczepieniu, zmodyfikowane genetycznie tachyzoity są zmuszone do korzystania z ograniczonych zasobów wolnego uracylu organizmu żywicielskiego, co uniemożliwia im swobodną proliferację i łagodzi przebieg inwazji, która uodparnia jednak na zarażenie szczepem o pełnej wirulencji.

Żadna ze szczepionek atenuowanych nie może być obecnie stosowana w zapobieganiu toksoplazmozie u ludzi ze względu na nie sprecyzowane – jak dotąd – ryzyko wprowadzenia zmodyfikowanych toksoplazm do organizmu człowieka.

Wobec oczywistych różnic w efektach uodporniania między szczepionkami atenuowanymi, a skonstruowanymi z wyselekcjonowanych komponentów struktury pasożyta rodzi się pytanie, jakim czynnikiem lub mechanizmom stymulowanej odporności szczepionki atenuowane zawdzięczają swoją przewagę nad pozostałymi. Aby odpowiedzieć na powyższe pytanie przeprowadzono badania ilości IFN- γ uwalnianego *in vitro* przez limfocyty śledzionowe myszy immunizowanych pełnym antygenem zabitych pasożytów, antygenem połączonym z kompletnym lub niekompletnym adiuwantem Freund'a oraz limfocyty zwierząt zarażonych *T. gondii* (18). Okazało się, że największe ilości oznaczanej cytokiny uwalniały limfocyty zwierząt zarażonych *T. gondii*, znamienne niższe ilości stymulował antygen połączony z kompletnym adiuwantem Freund'a, pozostałe zaś szczepionki nie powodowały istotnego wzrostu IFN- γ . Ponieważ uzyskane wyniki sugerowały, że efektywność szczepionki może polegać na właściwości wzbudzania IFN- γ zaproponowano, aby metodę oznaczania IFN- γ *in vitro* włączyć do procedury oceny przedklinicznej preparatów szczepionkowych.

Reasumując uwagi dotyczące odporności i zapobiegania toksoplazmozie na drodze szczepień trzeba podkreślić, że następstwem osobliwej natury odporności śródzakaznej, jaka rozwija się w przebiegu zarażenia, są trudności w skonstruowaniu szczepionki zabezpieczającej w pełni przed inwazją, szczególnie u ludzi. Ponieważ odporność powstająca

w naturalnych inwazjach toksoplazmowych nie doprowadza do eliminacji wszystkich osobników populacji inwadującej, możliwość wytworzenia takiej odporności (*sterile immunity*) na drodze szczepień ochronnych wydaje się co najmniej wątpliwa.

TH Dzbeński

PUZZLING ASPECTS OF IMMUNITY AND IMMUNIZATION
AGAINST TOXOPLASMOSIS

SUMMARY

The immunity developing in the course of infection with *Toxoplasma gondii* was discussed, pointing out its advantages and shortcomings, then the attempts at immunization against toxoplasmosis were presented.

PIŚMIENNICTWO

1. Su C, Evans D, Cole RH, i in. Recent expansion of *Toxoplasma* through enhanced oral transmission. *Science* 2003;299:414–6.
2. Dzbeński TH. Patogeneza i zmiany histopatologiczne w toksoplazmozio. W: Milewska-Bobula B, red. Toksoplazmoza. Warszawa: Biuro Gamma, Chris Comp; 1999:24–30.
3. Frenkel JK. Toxoplasmosis. W: Connor DH, Chandler FW, Schwartz DA, red. Pathology of Infectious Diseases vol. II. Stanford: Appleton & Lange; 1997:1261–77.
4. Davis A. Schistosomiasis. W: Mansons Tropical Diseases. London: WB Saunders Co; 1996: 1413–56.
5. World Health Organization techn. Rep. Ser. No 537. Malaria control in countries where time-limited eradication is impracticable at present. Geneva: WHO; 1974.
6. Araujo F, Slifer T, Kim S. Chronic infection with *Toxoplasma gondii* does not prevent acute disease or colonization of the brain with tissue cysts following reinfection with different strains of the parasite. *J Parasitol* 1997;83:521–2.
7. Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microb Rev* 1998;11:569–88.
8. Wilson CB. Developmental immunology and role of host defences in neonatal susceptibility. W: Remington JS, Klein JO, red. Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant, 3rd ed. Philadelphia, London: WB Saunders; 1990:17–67.
9. Suzuki Y, Orella MA, Schreiber RD, Remington JS. Interferon- γ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 1988;240:516–8.
10. Ruskin J, Remington JS. Resistance to intracellular infection in mice immunized with *Toxoplasma gondii* vaccine and adjuvant. *J Reticuloendoth Soc* 1971;9:465–79.
11. Velge-Roussel F, Marcelo P, Lepage AC, i in. Intranasal immunization with *Toxoplasma gondii* SAG1 induces protection cells into both NALT and GALT compartments. *Infec Immun* 2000;68: 969–72.
12. Prigione I, Facchetti P, Lecordier L i in. T cells clones raised from chronically infected healthy humans by stimulation with *Toxoplasma gondii* excretory-secretory antigens cross-react with live tachyzoites: characterization of the fine antigenic specificity of the clones and implications for vaccine development. *J Immunol.* 2000;164:3741–8.
13. Vercammen M., Scorza T, Huygen K, i in. DNA vaccination with genes encoding *Toxoplasma gondii* antigens GRA1, GRA7, ROP2 induces partially protective immunity against lethal challenge in mice. *Infec Immun* 2000;68:38–45.
14. Pfeffercorn ER, Pfeffercorn LC. *Toxoplasma gondii*: isolation and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants. *Exp Parasitol* 1976;39:365–9.

15. Buxton D, Innes EA. A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitology* 1995;110: S11–16.
16. Choromanski L, Freyre A, Popiel R, i in. Safety and efficacy of modified live feline *Toxoplasma gondii* vaccine. *Dev Biol Stand Basel Karger* 1995;84:269–81.
17. Sibley LD. Parasites: no more free lunch. *Nature* 2002;415:843–4.
18. Konopka E. Zastosowanie metod badania komórek układu immunologicznego in vitro do oceny odporności przeciw *Toxoplasma gondii* powstającej w przebiegu zarażenia i immunizacji. Rozprawa doktorska. Warszawa: PZH; 2002.

Adres autora:

Tadeusz H Dzbeński
Zakład Parazytologii Lekarskiej
Państwowego Zakładu Higieny
ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa