

Porównanie odpowiedzi immunologicznej szczurów immunizowanych doustnie bądź domięśniowo cDNA i białkiem zrekombinowanej transferazy S-glutationowej *Fasciola hepatica*

Luiza Jedlina Panasiuk

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej (Pracownia Parazytologii Molekularnej) Instytutu Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN, obroniona 24.02.2004 r.

Promotor: Prof. dr hab. Halina Wędrychowicz
Recenzenci: Doc. dr hab. Bożena Moskwa
Doc. dr hab. Anna Winnicka

Streszczenie

Fascioloza stanowi poważny problem w hodowli przeżuwaczy, gdyż jest przyczyną dużych strat ekonomicznych zarówno w Polsce jak i na świecie. Zwiększa się również zagrożenie inwazjami *Fasciola hepatica* u ludzi. Szerokie zastosowanie chemioterapii w zwalczaniu tej przywry prowadzi do zanieczyszczeń środowiska oraz do powstania lekooporności pasożyta na najczęściej stosowane leki.

W świetle tych spostrzeżeń od wielu lat podejmowane są próby immunoprophylaktyki fasciolozy. W chwili obecnej nie ma skutecznej szczepionki przeciwko chorobie motyliczej mimo testowania wielu rodzajów antygenów izolowanych głównie z produktów ekskrecyjno-sekrecyjnych lub białek somatycznych przywry.

W ostatnich latach coraz częściej korzysta się z metod biologii molekularnej do otrzymywania antygenów pasożytniczych oraz wykorzystania ich jako szczepionek w formie cDNA wklonowanego w eukariotyczne wektory ekspresyjne. Mogą one być podawane domięśniowo, podskórną, śródskórną, donosowo, a droga wprowadzenia konstruktów szczepionkowych ma wpływ na rodzaj i poziom wywoływanej odpowiedzi immunologicznej szczepionego organizmu.

Celem podjętych badań było sprawdzenie wpływu formy zrekombinowanego antygeny, jego dawki, miejsca podania oraz procedury immunizacji na odpowiedź immunologiczną szczepionych zwierząt po zarażeniu *F. hepatica*.

Badania przeprowadzono na szczurach, będących laboratoryjnym żywicielem modelowym wykorzystywanym do badań odpowiedzi immunologicznej bydła na inwazję motylicy wątrobowej.

W doświadczeniu, jako antygen wykorzystano zrekombinowaną transferazę-S-glutationową (GST) *F. hepatica* w formie białka oraz cDNA.

Eksperyment przeprowadzono na szczurach wsobnego szczepu Spraque Dawley, podzielonych na 8 grup doświadczalnych. Przeprowadzono immunizację drogą pokarmową (grupa II), donosową (grupa VI) oraz domięśniową (grupy I, III, IV, V), stosując jednorazowy lub dwukrotny schemat szczepienia szczurów cDNA enzymu (grupy IV-V), jak również zmianę formy antygeny w kolejnych immunizacjach (grupy I i III). Drugą dawkę antygeny podawano po upływie 28 dni od pierwszej immunizacji. W miesiąc po ostatniej immunizacji szczury zarażano dożołądkowo dawką 30 metacerkarii *F. hepatica*. Kontrolę eksperymentu stanowiły 2 grupy szczurów (VII i VIII) nie immunizowanych, z których jedna (VII) została zarażona taką samą dawką metacerkarii i w tym samym czasie jak szczury immunizowane.

Badania sekcyjne przeprowadzono w 1, 5 i 9 tygodniu po zarażeniu. W grupie I stwierdzono statystycznie istotne zmniejszenie liczby przywr o 62,1%.

W grupie szczurów szczepionych dwukrotnie, doustnie białkiem GST po 0,3 mg na szczura zaobserwowano redukcję liczby przywr o 33,8% w porównaniu z kontrolą. W grupie szczurów szczepionych dwukrotnie, domięśniowo 50 µg białka GST podczas pierwszej immunizacji oraz 50 µg cDNA GST podczas drugiego podania antygeny, otrzymano najwyższy w całym doświadczeniu poziom protekcji – 71%. Nie występowały istotne różnice w liczbie przywr w wątrobie pomiędzy grupami szczurów szczepionych cDNA (grupa IV i V), ale nastąpiło zmniejszenie populacji przywr o 49-55%, analogicznie. Analiza uzyskanych wyników wykazała, że poziom odporności szczurów na inwazję *F. hepatica* zależał przede wszystkim od formy antygeny i drogi podania. Najwyższy poziom odporności na zarażenie wykazywały szczury, którym podano domięśniowo białko GST jako pierwszą dawkę immunizacyjną a następnie rekombinowany wektor ekspresyjny, niosący cDNA tego enzymu. Immunizacja dojelitowa białkową formą GST zapewnia istotnie statystycznie zmniejszenie liczebności przywr, jednakże poziom odporności wywołany tą drogą jest znacząco niższy niż po szczepieniu domięśniowym. Inwazja metacerkarii *F. hepatica* wywoływała eozynofilię we krwi i płynie otrzewnowym szczurów szczepionych i kontrolnych. We krwi i płynie otrzewnowym szczurów szczepionych domięśniowo w odpowiedzi na inwazję *F. hepatica* następowało podwyższenie odsetka monocytów. Podanie pierwszej dawki antygeny w formie cDNA a drugiej w postaci białka stymulowało wyższą odpowiedź otrzewnowych limfocytów T cytotoksycznych (CD8+) i predystynowało szczury do silnej odpowiedzi przeciwciał IgG1 oraz IgG2a. Wyraźną odpowiedź przeciwciał zależnych od limfocytów Th1 (IgG2b) obserwowano w grupach immunizowanych domięśniowo cDNA a następnie białkiem GST lub dojelitowo, białkiem enzymu. Najsilniejszą odpowiedź przeciwciał IgE wytwarzały szczury immunizowane domięśniowo pojedynczą dawką 50 µg DNA. U szczurów najbardziej odpornych na inwazję *F. hepatica* (grupa III i I) występowała najsilniejsza ekspresja mRNA interleukiny 4, zarówno w komórkach węzłów chłonnych jak i w płynie otrzewnowym a jednocześnie słabsza niż u szczurów wrażliwych na inwazję ekspresja IL2 w krezkowych węzłach chłonnych.