

Szczepionka w profilaktyce i leczeniu zakażeń opryszczki

Herpes simplex virus vaccines in prophylaxis and treatment

Beata Szramka, Michał J. Kowalczyk, Ryszard Żaba

Katedra i Klinika Dermatologii Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu,
kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. n. med. Wojciech Silny

Post Dermatol Alergol 2008; XXV, 5: 235–238

Streszczenie

W artykule omówiono pokrótce podstawowe informacje dotyczące wirusa *Herpes simplex* (HSV), a w szczególności skoncentrowano się na strategiach przygotowania skutecznej szczepionki przeciwko temu patogenowi. Wirus HSV wywołuje opryszczkę w obrębie błon śluzowych genitaliów oraz okolic jamy ustnej, warg i oczu. Należy pamiętać, że opryszczka narządów płciowych jest najczęstszą chorobą przenoszoną drogą płciową i staje się coraz większym problemem w wymiarze społecznym, zdrowotnym i ekonomicznym. Obecnie w jej leczeniu stosuje się acyklowir, który wykazuje dużą skuteczność i bezpieczeństwo stosowania, jednak nie przeciwdziała rozprzestrzenianiu się wirusa w populacji. Skuteczna szczepionka stwarzałaby szanse na powstrzymanie tego procesu. Prace nad jej skonstruowaniem trwają już od bardzo dawna, niestety, jak dotąd kończą się niepowodzeniem w próbach klinicznych. Nowe strategie w podejściu do produkcji tego preparatu wykorzystujące najnowsze narzędzia biologii molekularnej pozwalają mieć nadzieję, że niedługo cel zostanie osiągnięty.

Słowa kluczowe: *Herpes simplex*, opryszczka, szczepionka.

Abstract

In the article general information concerning the *Herpes simplex* (HSV) virus is discussed, with particular attention to strategies of preparing an effective vaccine against this pathogen. HSV induces herpes within the mucous membranes of the genitals and regions of the oral cavity, lips and eyes. It is worth remembering that genital herpes is the most frequent sexually transmitted disease and is becoming an increasingly significant problem in social, health and economic dimensions. At present acyclovir is administered in curing herpes; it demonstrates great effectiveness and safety of taking, but is not counteracting the spread of the virus in the population. A potent vaccine would create a chance of stopping the process. There have been many attempts to develop one, which unfortunately, so far, have ended up with failures in clinical trials. New vaccine strategies, using the newest tools of molecular biology, give hope that soon the aim will be achieved.

Key words: *Herpes simplex*, herpes, vaccine.

Wstęp

Przedmiotem rozważań niniejszej pracy jest wirus wywołujący opryszczkę – *Herpes simplex* typu 1, zwany *Herpes labialis*, oraz typu 2 określane mianem *Herpes genitalis* [1]. Należy on do rodzaju *Simplexvirus* w podrodzynie *Alphaherpesvirinae* wyodrębnionej (obok *Betaherpesvirinae* oraz *Gammaherpesvirinae*) w rodzinie *Herpesviridae*, w rzędzie *Caudovirales*. Zgodnie z najnowszą systematyką, rodzina ta jest jedną z 20 wśród wszystkich rodzin wirusowych o genomie w postaci dwuniciowego DNA (dsDNA). Występują w niej także ludzkie patogeny, takie jak wirus ospy wietrznej czy cytomegalii [2].

Genom herpeswirusów o wielkości od 125 do ponad 240 kbp występuje w postaci liniowego DNA. Udało się zidentyfikować część białek kodowanych przez *Herpesviridae*. I tak, u wirusa *H. simplex* wykazano, że 6 białek buduje kapsyd, tegument zawiera ich co najmniej 30, a otoczka co najmniej 10. Wirusy zakwalifikowane do tej rodziny charakteryzują się zdolnością do przetrwania w formie utajonej w organizmie gospodarza [2, 3].

Do dywergencji HSV obu typów z pierwotnego wirusa *H. simplex* doszło prawdopodobnie ok. 8–10 mln lat temu. Rozdzieleniu temu sprzyjała mikrobiologiczna rozdzielność obszarów genitalnych i ust, a specyfika

Adres do korespondencji: mgr inż. Beata Szramka, Katedra i Klinika Dermatologii Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań, e-mail: beataszramka@onet.eu

kontaktów (oralno-oralne i genitalno-genitalne) pozwalała minimalizować szanse na mieszanie się wyodrębniających się szczepów. Wirus HSV typu 1 zaadaptował się do obszaru okolic ust, a HSV typu 2 do obszaru narządów płciowych [4].

Podstawowe informacje

Cykl lityczny *H. simplex* trwa ok. 18 godz., a jego replikacja zachodzi we wszystkich komórkach, które są wrażliwe na zakażenie [5]. Działa on na nie cytotatycznie – powoduje destabilizację i degradację mRNA, co skutkuje zatrzymaniem procesu biosyntezy białka. Warto odnotować, że odpowiedź komórkowa z udziałem limfocytów T-pomocniczych i T-cytotoksycznych oraz cytokin odgrywa kluczową rolę w obronie organizmu przed zakażeniem *H. simplex*. Upośledzenie odpowiedzi komórkowej zwiększa częstość zakażeń reaktywowanych oraz wpływa na ich cięższy przebieg [4].

Wykryto wiele mechanizmów, dzięki którym HSV opiera się systemowi immunologicznemu gospodarza. Może on syntetyzować białka wpływające na obniżenie zdolności prezentacji antygenów wirusowych przez MHC klasy I, co negatywnie wpływa na ich rozpoznawanie przez limfocyty T-cytotoksyczne. Zdolny jest również do wytwarzania białek hamujących apoptozę komórek, a także białek wiążących składniki dopełniacza oraz fragment Fc IgG [6].

Po wywołaniu pierwotnego zakażenia wirus ten może pozostać w fazie latentnej, umiejscowiony w neuronach czuciowych. Wirusowy materiał genetyczny nie integruje z genomem gospodarza, lecz występuje w pozachromosomalnych elementach komórki. Tylko obszar genomu wirusowego, kodujący tzw. LAT (ang. *latency associated transcript*), pozostaje aktywny transkrypcyjnie, tworząc dwa transkrypty mRNA, których produkty białkowe prawdopodobnie biorą udział w zakażeniach reaktywowanych. Uważa się także, że LAT wpływa w znacznym stopniu na przeżywalność komórek nerwowych w czasie infekcji (dokładny mechanizm tego procesu nie został jeszcze poznany), a także na ustalenie się fazy latencji [7]. Reaktywację zakażenia może wywołać wiele czynników, takich jak stres, promienie słoneczne czy immunosupresja. W ponad 80% przypadków ostre zachorowania spowodowane przez HSV są następstwem latencji [5].

Herpes simplex poza organizmem gospodarza ginie szybko. Do zakażenia dochodzi na drodze bezpośredniego kontaktu, w obrębie nieciągłości tkanek, z wydzielinami osoby chorej lub nosiciela, u którego przebieg zakażenia jest bezobjawowy. Wirus *H. simplex* typu 1 jest bardzo rozpowszechniony w populacji, a do zakażenia nim często dochodzi w dzieciństwie [8]. Wywołuje zwykle zmiany na śluzówkach jamy ustnej, oczu i warg. Na skutek przeniesienia podczas kontaktów oralno-genitalnych bywa także przyczyną zmian w obrębie błon śluzowych narządów płciowych. Zmiany w tym obszarze wywoływane są jednak głównie przez HSV typu 2 (80% przypadków)

[3, 9]. Zakażenie *H. simplex* obu typów jest najczęstszą chorobą przenoszoną płciowo. Zainfekowane są jednak głównie kobiety, co jest najprawdopodobniej wynikiem większej powierzchni błon śluzowych w obrębie genitaliów [3]. Szczególnie niebezpieczne może być zakażenie HSV dla kobiet w ciąży – śmiertelność matki i dziecka jest bliska 50%. Przeniesienie wirusa z matki na dziecko może wystąpić w czasie ciąży (5–8%), akcji porodowej (75–85%) lub bezpośrednio po niej (8–10%) [9–11]. Może ono doprowadzić do opóźnienia rozwoju płodu, jego zakażenia lub też przedwczesnego porodu. Zakażenie dzieci na tak wczesnym etapie życia może powodować patologiczne zmiany, takie jak opryszczkowe zapalenie skóry, oczu, jamy ustnej, zapalenie mózgu, lub też może przybrać postać wielonarządową [1]. Obecnie w leczeniu opryszczki standardowo używa się acyklowiru ze względu na dużą skuteczność i bezpieczeństwo stosowania. Działa on przez hamowanie syntezy wirusowego DNA. Powikłania w zakażeniu opryszczką występują rzadko, może jednak dojść do zapalenia mózgu i opon mózgowo-rdzeniowych [1].

Seropozytywność względem wirusa *H. simplex* typu 2 okazuje się zróżnicowana w różnych częściach świata, jednak – uogólniając – można stwierdzić, że jest ona wyższa w Ameryce Północnej niż w Europie. W obrębie Starego Kontynentu także występuje spore zróżnicowanie – w krajach północnych zakażenia wirusem HSV typu 2 są powszechniejsze niż w krajach południowo-europejskich. Wart odnotowania jest także fakt, że liczba infekcji gwałtownie wzrasta we wczesnej dorosłości, co powinno zostać uwzględnione w działaniach profilaktycznych obok zjawiska wydzielenia wirusa przez nosicieli bezobjawowych [3, 10].

Tylko w samych Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej przybywa rocznie milion nowych zakażeń wirusem HSV typu 2 [12]. Opryszczka narządów płciowych jest obciążeniem zarówno w wymiarze społecznym, zdrowotnym, jak i ekonomicznym [10]. Mimo dużej skuteczności terapii acyklowirem nie zapewnia on powstrzymania rozprzestrzeniania się wirusa w populacji. Dlatego też szczepionka przeciw HSV jest produktem tak bardzo pożądanym.

Szczepionki przeciw HSV

Prace nad skuteczną szczepionką przeciwko *H. simplex* trwają już od lat 20. poprzedniego stulecia. Cele stawiane temu preparatowi są nieco inne od standardowych. Wymaga się bowiem, aby nie tylko zabezpieczał przed pierwotnym zakażeniem, ale także skutecznie stabilizował stan latencji, zapobiegając zakażeniom reaktywowanym, oraz zapobiegał wydzieleniu wirusa przez nosicieli bezobjawowych [12]. Idealne byłoby uzyskanie szczepionki, która powodowałaby taką immunizację organizmu, dzięki której wirus eliminowany byłby po zeknięciu z błoną śluzową, zanim rozpocząłby proces replikacji oraz przed wtargnięciem do wnętrza organizmu. Wydaje się jednak, że wyprodukowanie takiego prepara-

tu jest jeszcze poza zasięgiem możliwości współczesnej nauki. Dlatego w praktyce skonstruowanie preparatu, który zmniejszałby liczbę i ostrość zmian, a także wydzielenie wirusa oraz skracał czas leczenia byłoby niewątpliwie wielkim sukcesem. Nie można – oczywiście – pominąć faktu, że bezpieczeństwo stosowania musi być celem nadrzędnym [13].

Początkowo starano się wyprodukować szczepionki z całego wirusa inaktywowanego promieniowaniem ultrafioletowym, wysoką temperaturą lub środkami chemicznymi. Okazywały się one jednak nieskuteczne lub immunizowały ludzki organizm w niewielkim stopniu. Współczesne szczepionki przeciw HSV, nawet jeśli mają potwierdzoną skuteczność w testach na zwierzętach, nie są efektywne w przypadku człowieka [13].

W przygotowywaniu szczepionek można wyróżnić poniższe strategie.

Szczepionki pozyskane z wirusów o inaktywowanym wirionie

Szczepionki uzyskiwane zgodnie z tą strategią powstają przez deaktywację wirusa otrzymanego z hodowli komórkowej. Były one już wielokrotnie badane na zwierzętach z bardzo dobrymi rezultatami. Zawodzą jednak w badaniach klinicznych, nie wykazując skuteczności w immunizacji. Oprócz kłopotów z uzyskaniem efektywnej szczepionki, trzeba zmierzyć się z problemami, takimi jak trudności w uzyskaniu zgodnej koncentracji immunogenów oraz wysokie koszty produkcji. Obecnie ten kierunek tworzenia szczepionki przeciw HSV nie jest rozwijany przez żadną z wiodących firm ze Stanów Zjednoczonych czy też Europy Zachodniej [13].

Szczepionki skonstruowane z podjednostek wirusowych

Rozwój badań w tym kierunku miał na celu eliminację wprowadzenia do organizmu człowieka wirusowego DNA oraz eliminację ewentualnego zanieczyszczenia preparatu żywymi wirusami. Do niewątpliwych zalet szczepionek skonstruowanych z podjednostek należy bezpieczeństwo stosowania, selektywność oraz niskie koszty produkcji, do wad natomiast mniejsza liczba antygenów w porównaniu z preparatami zawierającymi całe cząstki wirusowe, a także indukowanie mniejszej odpowiedzi komórkowej. Wiele szczepionek przygotowanych zgodnie z tą strategią potwierdziło skuteczność w badaniach przeprowadzonych na zwierzętach. Większość z nich wykorzystuje powierzchniowe glikoproteiny jako immunogeny, ponieważ przeciw nim głównie produkowane są przeciwciała. Glikoproteiny B i D wykazują bardzo duże podobieństwo zarówno w HSV typu 1, jak i 2, więc mogą wywoływać ochronny efekt wobec *H. simplex* obu typów [12, 13].

Korporacje Chiron oraz SmithKline Beecham Biologicals prowadziły intensywne badania w celu stworzenia własnej szczepionki z podjednostek. Pierwsza z nich w konstrukcji preparatu użyła mieszanki glikoprotein B i D z adjuwantem MF59, a druga tylko glikoproteiny D z adjuwantem MPL (ang. *monophosphoryl lipid A*). Obie uzyskiwały bardzo dobre wyniki w testach na świnkach morskich, jednak zawodziły w testach klinicznych u ludzi [14]. W innych badaniach na modelach zwierzęcych szczepionki okazywały się skuteczne w przeciwdziałaniu widocznym objawom zakażenia, jednak nie chroniły przed zainfekowaniem. Wyniki badań wskazują na duży wpływ adjuwantów na skuteczność szczepionek tego typu. Ze względu na niemożność uzyskania zgodnie z tą strategią szczepionki, która zarówno leczyłaby chorobę, jak i chroniła przed infekcją, dalsze badania w tej dziedzinie będą skupiały się na osiągnięciu tych celów oddzielnie, ze szczególnym uwzględnieniem ochrony przed zainfekowaniem [15, 16].

Szczepionki z wirusów atenuowanych genetycznie

Szczepionki zawierające wirusy atenuowane są bardzo powszechne. Jednak w przypadku HSV ich otrzymanie jest niezwykle trudne ze względu na problemy z uzyskaniem stałego efektu osłabienia zjadliwości. Dlatego starano się stworzyć mutanta pozbawionego genów zaangażowanych w wirulencję, utrzymywanie stanu latencji i reaktywację. Obecnie naukowcy skupiają się na stworzeniu mutantu pozbawionego genu gamma 34.5, uważanego za jeden z determinujących wirulencję. Przymuszczenie delekcja powyższego genu nie będzie jednak pozbawiać zdolności do przejścia w fazę latencji i późniejszej reaktywacji, chociaż badania na zwierzętach wykazały efektywność tak skonstruowanego preparatu oraz bezpieczeństwo stosowania [13, 17].

Szczepionki zawierające mutanty o ograniczonej replikacji

Szczepionki tego typu uzyskuje się w drodze mutacji genu wirusa, który jest niezbędny do prawidłowego zajścia procesu replikacji. Wprowadzenie takich mutantów do organizmu zwierzęcego nie powoduje infekcji (wirus nie jest zdolny do namnażania), ale wywołuje odpowiedź humoralną i komórkową. Próby kliniczne przeprowadzone na ochotnikach wskazywały na bezpieczeństwo i immunogenność takich preparatów. Szczególnie obiecujące wydają się wyniki badań na myszach z użyciem mutantu HSV 2 dl 5-29. Ten wirus o limitowanej replikacji okazał się skuteczny zarówno w profilaktyce, jak i leczeniu infekcji – zmniejszał ilości latentnego wirusa oraz chronił przed zmianami na śluzówkach. Konieczne jednak są dalsze badania kliniczne, które potwierdzą skuteczność preparatu na organizmie ludzkim oraz bezpieczeństwo stosowania [18].

Szczepionki wykorzystujące żywe wektory

Szczepionki te konstruowane są przez wprowadzenie genu kodującego odpowiednio dobrany gen wirusowy do niepatogenicznego wektora. W wektorze gen ten ulega ekspresji, wywołując odpowiedź humoralną i komórkową. Nie wiadomo, czy szczepionki te będą stosowane, ze względu na bezpieczeństwo [13, 19, 20].

Szczepionki z nagiego DNA

Pomysł szczepionki DNA jest jednym z najnowszych, wykreowanych przez naukowców. W 1992 r. Tag i Johnson donieśli, że wprowadzenie do organizmu myszy genu ludzkiego hormonu wzrostu w kasecie ekspresyjnej skutkowało produkcją tego hormonu na wykrywalnym poziomie. U zwierząt poddanych eksperymentowi pojawiła się ponadto odpowiedź immunologiczna [19]. Pomysł tej immunizacji genetycznej został wykorzystany przy konstruowaniu szczepionek. Polega on na wszczępieniu, najczęściej domięśniowo, plazmidu zawierającego geny kodujące antygeny HSV. W organizmie człowieka dochodzi do ekspresji pożądanego białka (w tym wypadku antygenów), które powodowałyby powstanie odpowiedzi humoralnej i komórkowej. Niewątpliwą zaletą szczepionek tego typu jest ich trwałość, prostota konstrukcji, brak konieczności dodawania adjuwantów oraz wywoływanie silnej odpowiedzi immunologicznej. Niestety, istnieją pewne zagrożenia dotyczące bezpieczeństwa stosowania. Występuje ryzyko integracji plazmidu z genomem gospodarza. Badania przeprowadzone na świnkach morskich dowodzą, że szczepionki DNA były skuteczne zarówno w ochronie przed chorobą, jak i zmniejszyły liczbę wirusa w stanie latencji [19].

Podsumowanie

Przyglądając się powyższym strategiom przygotowywania szczepionek, można zapytać, dlaczego nie udało się stworzyć w pełni skutecznego preparatu? Należy pamiętać, że *H. simplex* nie tylko wykazuje bierny stan latencji, ale także w sposób czynny umyka odpowiedzi immunologicznej. Stosuje różne mechanizmy, takie jak inhibicja prezentacji antygenów czy też uniemożliwienie wywołania odpowiedzi przy udziale interferonu (choć jest na niego bardzo wrażliwy). Zebrane przez naukowców dowody wskazują także, że w skutecznej ochronie przed HSV pośredniczy odpowiedź komórkowa, a nie tylko humoralna. Poznanie dokładnych wyznaczników mechanizmów obronnych wydaje się być niezbędne dla stworzenia skutecznej szczepionki [21, 22].

Mimo rozczarowujących wyników – testowane na ludziach szczepionki powodują zmiany w układzie immunologicznym, skutkujące produkcją dużej liczby przeciwciał, które jednak nie przekładają się na efekt ochronny przeciw HSV – należy spojrzeć na tworzenie efektywnego preparatu z dużym optymizmem. Trwają wciąż badania z zastosowaniem nowych strategii, a wiele z nich wydaje się obiecujących. Wiele rezultatów badawczych wskazuje także na znaczącą rolę adjuwantów w wyzwoleniu odpowied-

niej immunizacji organizmu. Być może jesteśmy już o krok od przełomowego momentu w walce z HSV [21, 22].

Piśmiennictwo

- Figlerowicz M. Pierwotne i wtórne zakażenia wirusami *Herpes simplex* – problemy kliniczne i terapia. *Zakażenia* 2004; 6: 64-7.
- Van Regenmortel MH, Fauquet CM, Bishop DH, et al (red.). *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses 2000*. New York, San Diego: Academic Press. Available at: www.virustaxonomyonline.com.
- Wysocki J, Salamon-Stowińska D. Zakażenia wirusami *Herpes simplex* – postaci kliniczne i ich leczenie. *Zakażenia* 2003; 3: 62-7.
- Walkowiak B, Namysł J, Prokop J, Żaba R. Opryszczka narządów płciowych – klinika i epidemiologia. *Post Dermatol Alergol* 2007; 24: 194-201.
- Szaradkiewicz A, Jopek A, Bogaczyńska-Staniewicz. Aterogenność herpeswirusów. *Nowiny Lekarskie* 1997; 66: 32-7.
- Młynarczyk B, Majewski S. Zakażenia wirusami *Herpes simplex* i *Varicella zoster* – patogenеза i leczenie. *Przegl Dermatol* 2002; 2: 133-8.
- Kent JR, Kang W, Miller CG, Fraser NW. *Herpes simplex virus latency-associated transcript gene function*. *J Neurovirol* 2003; 9: 285-9.
- Umene K, Kawana T. Molecular epidemiology of *Herpes simplex virus type 1* genital infection in association with clinical manifestations. *Arch Virol* 2000; 145: 505-22.
- Rostalski T, Kaszuba A, Seneczko M i wsp. Etiologia i klinika nierzęzączkowych zapaleń narządu moczowo-płciowego. *Nowa Klinika* 2003; 10: 1175-81.
- Trzcińska A. Zakażenie seksualne i wrodzone wywołane przez herpeswirusy. *Przegl Epidemiol* 2001; 55 (Supl. 1): 41-6.
- Malkin JE. Epidemiology of genital *Herpes simplex virus* infection in developed countries. *Herpes* 2004; 11 (Supl 1): 2A-23A.
- Hosken NA. Development of a therapeutic vaccine for HSV-2. *Vaccine* 2005; 23: 2395-8.
- Bernstein DI, Stanberry LR. *Herpes simplex virus vaccines*. *Vaccine* 1999; 17: 1681-9.
- Cunningham AL, Mikloska Z. The holy grail: immune control of human *Herpes simplex virus* infection and disease. *Herpes* 2001; 8 (Supl 1): 6A-10A.
- Aurelian L. *Herpes simplex virus type 2 vaccines: new ground for optimism?* *Clin Diag Lab Immunol* 2004; 11: 437-45.
- Brittle EE, Friedman HM. Current *Herpes simplex virus* vaccine approaches – a short review. *US Infectious disease* 2006; 13-16.
- Whitley RJ, Roizman B. *Herpes simplex viruses: is a vaccine tenable?* *J Clin Invest* 2002; 110: 145-51.
- van Lint AL, Torres-Lopez E, Knipe DM. Immunization with a replication-defective *Herpes simplex virus 2* mutant reduces *Herpes simplex virus 1* infection and prevent ocular diseases. *Virology* 2007; 368: 227-31.
- Rajčani J, Moško T, Režuchová I. Current developments in viral DNA vaccines: shall they solve the unsolved? *Rev Med Virol* 2005; 15: 303-25.
- Koprowski H, Weiner DB (red.). *DNA Vaccination/Genetic Vaccination. Current Topics in Microbiology and Immunology Series 1998*, 226. Heidelberg: Springer-Verlag.
- Rajčani J, Ďurmanová V. Development in *Herpes simplex virus* vaccines: old problems and new challenges. *Folia Microbiol* 2006; 51: 67-85.
- Stanberry LR. Clinical trials of prophylactic and therapeutic *Herpes simplex virus* vaccines. *Herpes* 2004; 11 (Supl 3): 161A-9A.