

УДК 619:616-056.24.995.24.122.21. Ф:52.022

Зоценко В.М., канд. вет. наук, доцент, ©
Співак М.Я., докт. біол. наук, професор,
Ющишина О.А., лікар ветмедицини
Білоцерківський НАУ

ОСОБЛИВОСТІ ІНТЕРФЕРОНОВОГО ТА ЦИТОКІНОВОГО СТАТУСУ КОРІВ ЗА ФАСЦІОЛЬОЗУ

Встановлено, що фасціольоз корів супроводжується еритроцитопенією, еозинофілією, лейкоцитозом та зниженням кількості, нейтрофілів. Продукти життєдіяльності фасціол негативно впливають на здатність клітин периферійної крові продукувати прозапальні цитокіни. Отримані результати дозволяють ствержувати про домінування Т-хелперів 2 класу за фасціольозної інвазії корів.

Ключові слова: велика рогата худоба, фасціольоз, інтерферон, фактор некрозу пухлин.

Вступ. *Fasciola hepatica* – одна з екологічно поширених трематоди в Україні. Проникаючи в організм тварин вона викликає захворювання, яке характеризується хронічним або субклінічним перебігом і наносить значні економічні збитки скотарству [1].

Головною ланкою у системі заходів боротьби із фасціольозною інвазією залишається хіміотерапія, однак антгельмінтики, що використовуються при цьому не завжди можуть гарантувати знешкодження паразита в організмі дефінітивного господаря [2].

Перспективний напрямок у оптимізації існуючих лікувально-профілактичних заходів при фасціольозі – підвищення опірності організму до паразита шляхом активації механізмів вродженого і набутого імунітету. Реалізація такого напрямку потребує чіткого розуміння імунопатогенезу інвазії.

Імунна відповідь організму при фасціольозній інвазії характеризується супресією Т-хелперів 1 класу (Тх-1), відповідальних за синтез інтерлейкіну 2 (ІЛ-2), інтерферону- γ (ІФН- γ), які сприяють в основному розвитку природного клітинно-опосередкованого імунітету і забезпечують елімінацію збудника. Натомість *F. hepatica* активує Т-хелпери 2 класу (Тх-2), які продукують цитокіни (ІЛ-4, ІЛ-10, ІЛ-13), що гальмують імунну відповідь клітинного типу, пригнічують утворення ІЛ-10, фактора некрозу пухлин. (ФНП.) Домінування активації Тх-2 над Тх-1 дозволяє уникнути розпізнавання антигенів фасціоли імункомпетентними клітинами, що уповільнює їх знешкодження [3,4] та забезпечує можливість повторного інфікування [5].

Іншим важливим механізмом захисту *F. hepatica* від імунної системи є альтернативна активація ними макрофагів. Суть такого збудження полягає у

порушенні внутрішньоклітинного метаболізму L-аргініну. Альтернативно активні мононуклеари генерують менші рівні оксиду азоту, одночасно мають низьку, що знижує їх бактерицидну здатність. Продукт високих рівнів IL-10 блокує ІФН- γ [6] – важливого активатора макрофагів.

Імуномодельючі ефекти паразита можуть бути відповідальними за підвищену сприйнятливість тварин до бактеріальних інфекцій та інтерпретацію результатів їх діагностики. М'ясо отримане від інвазованих фасціолами тварин було більшою мірою контаміноване ентеральними формами кишкової палички, стафілококами, стрептококами і сальмонелами [7]. В умовах експерименту телята інфіковані метацеркаріями *F. hepatica* продемонстрували недостатню чутливість шкіряного туберкулінового тесту і тесту на ІФН- γ , використаних для діагностики туберкульозної конфекції [8].

Роль цитокінів у патогенезі фасціольозу великої рогатої худоби показана на експериментальних моделях [4,5,8], однак ми не зустріли наукових робіт, де процеси цитокіноутворення були досліджені у корів за перебігу інвазії в польових умовах.

Мета нашої роботи полягала у вивченні цитокінового та інтерферонового статусу корів за спонтанного хронічного фасціольозу.

Матеріали і методи: Дослід був проведений у другій половині стійлового періоду на поголів'ї корів середньої вгодованості, чорно-рябої породи. За результатами попередньо проведених копроовоскопічних досліджень було сформовано дві групи корів: дослідна – тварини, у яких виявили яйця фасціол та контрольну – корови, у котрих інвазійні елементи гельмінтів були відсутні.

Кров для досліджень отримували з яремної вени. У якості антикоагулянта використовували гепарин. Дослідження морфологічного складу крові тварин включало у себе підрахунок еритроцитів, лейкоцитів, виведення лейкограми. Вміст гемоглобіну визначали гемоглобін-ціанідним методом. Кількість Т-клітин і В-лімфоцитів визначали у реакціях розеткоутворення загальноновизнаними методами.

Функціонально-метаболітичну активність фагоцитів периферійної крові здійснювали по результатам постановки НСТ-тесту [9] у спонтанному і стимульованому варіантах, а також вираховували показник резерву (ІР) – відношення відсотку фармазинопозитивних клітин у активованому варіанті до їх кількості у спонтанному.

Оцінку інтерферонового статусу [10] проводили за трьома показниками: а) рівнем циркулюючого у крові інтерферону (ІФН); б) рівнем продукованого ІФН – α лейкоцитами *in vitro* при індукції вірусом; в) рівнем продукування ІФН- γ лімфоцитами *in vitro* при індукції фітогемаглютиніном (ФГА); г) туберкуліном (ППД) і секреторно-екскреторним продуктом фасціол (СЕПФ) приготованого модифікованою нами методики [11]. Дорослі фасціоли збирали з жовчних протоків печінки отриманих на бойні. Після зберігання двуусток протягом 3-х годин у фізіологічному розчині при кімнатній температурі проводили центрифугування (3000 об/хв., 15 хвилин). Надоосадову

рідину стерелізували пропускаючи через фільтр (0,22 мкм). Отриманий продукт зберігали при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ і використовували у дозі 10 мкл на 1 мл живильного середовища.

Рівень фактору некрозу пухлин (ФНП) визначали мікрометодом за його вмістом у сироватці крові (біологічна активність), спонтанного та індукованого продукування клітинами периферійної крові. В якості індукторів використовували ліпосахарид *E.coli* (ЛПС). Титрування цитокину проводили на клітинах лінії L – 929. Показник, зворотній до останнього розведення досліджуваних рідин, де спостерігали загибель 50% клітин, вважали за титр ФНП [12].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили на персональному комп'ютері з використанням програми «Statistica»

Результати досліджень. У крові корів дослідної групи, при середній інтенсивності фасціольозної інвазії 10,2 яйця у 1 г фекалій, кількість еритроцитів, та вміст гемоглобіну були вірогідно нижчими порівняно з цими показниками у корів контрольної групи (табл. 1).

Таблиця 1.

Гематологічні показники крові корів хворих на фасціольоз (M ± m)

Показники		Одиниця виміру	Група корів		
			Дослідна (n=7)	Контрольна (n=7)	
Еритроцити		Т/л	5,2 ± 0,3 *	4,2 ± 0,2	
Гемоглобін		г/л	71,6 ± 2,6 ***	101,3 ± 4,2	
Лейкоцити		Т/л	11,2 ± 0,7 **	8,0 ± 0,6	
Лейкограма	Базофіли	%	–	0,4 ± 0,1	
	Еозінофіли	%	10,1 ± 0,6	5,9 ± 0,3	
	Моноцити	%	3,8 ± 0,4	5,0 ± 0,6	
	Нейтрофіли	Юні	%	–	–
		Паличкоядерні	%	1,4 ± 0,1	2,5 ± 0,2
		Сегментоядерні	%	17,7 ± 1,6	26,6 ± 2,7
Лімфоцити		%	67,0 ± 2,4	59,6 ± 3,5	

Примітка: у цій і наступній таблицях * – $< 0,05$; ** – $< 0,01$; *** – $< 0,001$.

Разом з тим у інвазованих тварин встановлено вірогідне ($P < 0,01$) збільшення кількості лейкоцитів. У лейкограмі тварин дослідної групи відсоток паличкоядерних і сегментарних нейтрофілів був менший, а еозінофілів більшими за існуючу фізіологічну норму. Олігохроменію, еритроцитопенію, еозінофілію, нейтропенію, лейкоцитоз у великої рогатої худоби за фасціольозу спостерігали вітчизняні [13] і зарубіжні автори [14].

У таблиці 2 наведені дані результатів імунологічних досліджень, згідно з якими у корів дослідної групи кількість Т-лімфоцитів було вірогідно меншою ($P < 0,01$), а В-лімфоцитів більшою ($P < 0,05$) порівняно з коровами контрольної групи. Функціонально-метаболітична активність клітин периферійної крові у корів дослідної групи у спонтанному і стимульованому тесті була вірогідно нижчою ($P < 0,05$ і $P < 0,001$ відповідно). ПР у корів контрольної групи був 1,26 раза вищий порівняно з коровами дослідної групи.

Таблиця 2.

Імунологічні показники крові корів хворих на фасціольоз (M ±m)

Показники	Одиниця виміру	Група корів	
		Дослідна (n=7)	Контрольна (n=7)
T – лімфоцити	%	37,7 ± 1,69**	44,29 ± 1,21
B – лімфоцити	%	25,14 ± 1,5*	20,86 ± 1,14
НСТ – тест спонтанний	%	5,14 ± 0,74*	7,86 ± 0,96
НСТ – тест стимульований	%	27,86 ± 1,53***	55,29 ± 3,52
ПР		5,6	7,06

Вивчення показників інтерференового статусу корів за фасціольозу (табл. 3) показано вірогідне зниження здатності клітин крові продукувати ІФН – γ на індуктори різної природи. Рівень ІФН – γ у корів дослідної групи порівняно з контрольними був вірогідно меншим, як при використанні неспецифічного індуктора, так і специфічного ($P < 0,001$ і $P < 0,01$ відповідно). Рівень спонтанного та індукowanego ФНП у корів дослідної групи був вірогідно нижчим ніж у контрольних ($P < 0,001$ і $P < 0,01$ відповідно).

Таблиця 3.

Показники інтерференового та цитокинового статусу корів хворих на фасціольоз (M ±m, од/мл)

Показники	Група корів	
	Дослідна (n=7)	Контрольна (n=7)
Ендогенний	1,14 ± 1,38	1,71 ± 2,23
ІФН – α	141,71 ± 32,65	160,0 ± 36,28
ІФН – γ ; (ФГА)	22,86 ± 4,43***	100,57 ± 12,93
ІФН – γ – СЕПФ	9,14 ± 1,9**	59,43 ± 13,23
ФНП біологічний	–	–
ФНП спонтанний	3,71 ± 0,81***	22,86 ± 3,23
ФНП індукований	11,43 ± 3,75**	65,14 ± 13,11

Результати досліджень показують, що фасціоли мають потужні антизапальні властивості, тому викликана ними хвороба перебігає на фоні домінування Т-хелперів 2 класу. Підтвердженням такому положенню є низька здатність клітин периферійної крові тварин дослідної групи продукувати ІФН – γ і ФНП у відповідь на індуктори різної природи. Наявність еозинофілії свідчить про високий рівень ІЛ–5, який синтезується Т-х 2 і започатковує проліферацію еозинофілів. Збільшення кількості В–лімфоцитів є показником розвитку імунного захисту гуморального типу.

Висновки:

1. Фасціольозна інвазія у організмі корів супроводжується зменшенням кількості еритроцитів, нейтрофілів, вмісту гемоглобіну та зростаннями кількості лейкоцитів і еозинофілів.

2. Секреторно-екскреторні продукти фасціол зумовлюють зниження здатності клітин периферійної крові продукувати прозапальні цитокини (ІФН – γ і ФНП).

3. У організмі корів за фасціольозної інвазії знижується функціонально-метаболічна активність фагоцитів.

Література

1. Березовський Андрій. Особливості терапії фасціольозу у жуйних / Андрій Березовський // Ветеринарна медицина України. – 2000. – №1. – С.44–45.
2. Березовський Андрій/ Новий погляд на тактику фармакотерапії фасціольозу та оптимальні терміни дегельмінтизації худоби. / Андрій Березовський // Ветеринарна медицина України. – 2004. – №11. – С. 19–21.
3. 3. Maizls P.M. Requylation of patogenesis and immunity in helminth infectious. / P.M. Maizls, E.J. Pearce Artis D [and others] // JEM. – 2009. – Vol. 62, №10. – P. 2059–2066.
4. Ingole S.L. Interferon – gamma and interleukin – 4 expresion during Fasciola gigantica primary infection in crossbred bovine calves as dedetermined by real-time RCR / S.L. Ingole, P. Sinqh, O.K. Raina [et al.] // Vet. Parasit. – 2008. – Vol. 152, №1–2. – P. 158–161.
5. Glery D. Immune responses of chronically infected adult cattle to Fasciola hepatica / D. Glery, P. Torgerson, G. Mulcahy // Vet. Parasit. – 1996. – Vol. 62, №1–2. – P. 71–82.
6. Flynn R.J. Posible Role for Toll– like Receptors in interaction of Fasciola hepatica excretory / Flynn R.J. Mylcahy G.// secretory Products with Bovine Macrophages / Inf. Immun. – 2008. – Vol. 76, №2. – P. 678–684.
7. Паюк Василь Бактеріологічні дослідження туш і внутрішніх органів, уражених фасціолами. / Василь Паюк, Петро Роговський // Ветеринарна медицина України. – 2001. – № 11. – С.32–33.
8. Flynn R.J. Co-infection of cattle with Fasciola hepatica and Micobacterium bovis-immunoloqical consegnences / R.J. Flynn, G. Mulcahy, M. Welsh [et al.] // Transbound. Etnerq. Dis. – 2009. – Vol. 56, № 5–6. – P. 269–274.
9. Пахмутов И.А. Оценка функциональной активности крови животных./ И.А Пахмутов., М.С. Ульянова // Ветеринария – 1984. – №3. – С. 68–69.
10. Зоценко В.М. Визначення інтерферонового статусу у пробах цільної крові великої рогатої худоби / В.М. Зоценко // Вісн. Білоцерків. ДАУ. – 1996. – Вип.1. – С.26–29.
11. Woldvogel A.S. Expresion of interleukin 4, interleukin 4 splice variats and interferon gamma mRNA in colves experimentally infected with Fasciola hepatica. / A.S. Woldvogel, M.F. Lepage, M.P.Zakher [et al.] // Vet. Immunol. Immunopat. – 2004. – Vol. 97, №1–2. – P. 53–63.
12. Meager A. Tumor necrosis factor (TNF) / A. Meager, H. Lennq, C. Walley // J. Immunol. Meth. – 1989. – Vol. 116, №1. – P.1–17.
13. Довгій А.Ю. Терапевтична оцінка комбітрему при фасціольозі та вплив його на гемолітичні і біохімічні показники великої рогатої худоби / А.Ю. Довгій, А.В. Березовський, Г.П. Гришук [та ін.] // Вісник сумського НАУ. – Суми, 2004. – № 2. – С.41–44.

14. Hareum E.M. Clinico-pathological studies an naturally-occurring bovine fascioliasis in the sudan / E.M. Hareum, M.F.Unssein //J. Helminthol. – 1975– Vol. 49, №3. – P. 143–152.

Summary

Chaeacteristics of interferon and cytokine state in cows infected by fascioias. Zotsenko V.M. DPh.vet. med. senior lecturer. Spivak M. DSc vet. med. professor. Yuschishina O. vet. med. Bila Tsrkva State University.

It is determined, that bovine fasciolosis is associated with erythrocytopenia, eosinofilia, leukocytosis reducing the number of, neutrofiles. Products of vital activity of fasciols negatively effect on abilitu of peripheral blood cells to produce pro inflammation cytokines.Obtained results demonstrate that 2 class T–helpers are dominated during bovine fasciola invasion.

Стаття надійшла до редакції 6.03.2010