

Andrzej Bernard SADZIKOWSKI, Jerzy Lech GUNDŁACH

**Odpowiedź humoralna i komórkowa
w przebiegu doświadczalnej fasciolozy królików**

Humoral and Cellular Response in the Course of Experimental Fascioliasis in Rabbits

Pomimo liczego piśmiennictwa dotyczącego zjawisk immunologicznych w układzie żywiciela – *Fasciola hepatica* wiele mechanizmów obronnych jest nadal niejasnych. Intepretację wyników badań utrudniają także różnice metodyczne (głównie przy uzyskiwaniu antygenów *F. hepatica*) oraz bardzo wyraźnie odmienny przebieg inwazji u poszczególnych żywicieli. Jakkolwiek immunologia układu królik – *F. hepatica* była przedmiotem wielu badań, to jednak nieliczne są doniesienia na temat odpowiedzi komórkowej u tego żywiciela.

Celem badań było określenie dynamiki odpowiedzi immunologicznej u doświadczalnie zarażonych motylicą królików, w zależności od fazy inwazji, przy użyciu jako antygenów ekstraktów somatycznego i metabolicznego *F. hepatica*.

MATERIAŁ I METODY

Materiał inwazyjny. Metacerkarie *Fasciola hepatica* uzyskano przy użyciu laboratoryjnej hodowli ślimaków *Galba truncatula*.

Zwierzęta. Do badań użyto 14 królików rasy szynszyl wagi 3,5 kg, klinicznie zdrowych, wolnych od inwazji pasożytów.

Układ doświadczenia. Króliki (w liczbie 10) zarażono motylicą podając każdemu *per os* po 50 metacerkarii, pozostałe 4 stanowiły kontrolę. Krew od królików zarażonych i kontrolnych do badań serologicznych pobierano z żyły usznej w odstępach tygodniowych. Od 40 dnia doświadczenia co 2 dni pobierano kał do badań parazytologicznych. Zarażone króliki uśmiercano parami 14, 35, 56, 76 i 105 dnia po zarażeniu, poddając je dokładnym badaniom sekcijnym i pobierając śledziony będące źródłem komórek do testu hamowania migracji. Dwa króliki kontrolne uśmiercono w momencie rozpoczęcia doświadczenia, a pozostałe dwa w momencie zakończenia, tj. 105 dnia.

Metody parazytologiczne. Badania kału metodą dekantacji oraz sekcję parazytologiczną wykonywano według ogólnie przyjętych zasad.

Antygeny. W badaniach posłużono się jako antygenami: odtłuszczonym ekstraktem somatycznym dojrzałych płciowo *F. hepatica* (EFh) oraz ekstraktem metabolicznym (ES) stanowiącym produkty przemiany materii żywych przywr. Ekstrakty uzyskano według procedury opisanej we wcześniejszych pracach (5, 6, 10).

Odczyny. W celu określenia dynamiki przeciwciał wykonano odczyn immunoelektroforezy (według ogólnie przyjętych zasad). Dynamikę odpowiedzi komórkowej określono testem zahamowania migracji komórek śledziona, testem jednostopniowym oraz dwustopniowym według techniki opisanej przez Pomorskiego (9).

WYNIKI

BADANIA PARAZYTOLOGICZNE

Badaniami koproskopowymi stwierdzono, że okres prepatentny inwazji *F. hepatica* u królików wynosił 56–60 dni. W wyniku badań sekcyjnych u wszystkich poddanych zarażeniu królików znaleziono w wątrobach motyle, a intensywność inwazji wahała się od 2 do 11 egzemplarzy, co stanowiło 4–22% podanych metacerkarii (tab. 1).

Tab. 1. Wyniki badań parazytologicznych
Results of the parasitological investigations

Numer królika	Liczba podanych metacerkarii	Sekcja – dni po zarażeniu	Intensywność inwazji	Procent podanych metacerkarii
1	50	14	2	4
2	50	14	4	8
3	50	35	5	10
4	50	35	6	12
5	50	56	8	16
6	50	56	4	8
7	50	77	7	14
8	50	77	8	16
9	50	105	9	18
10	50	105	11	22
Kontrola	0	0	0	0
Kontrola	0	0	0	0
Kontrola	0	0	0	0
Kontrola	0	0	0	0

BADANIA IMMUNOLOGICZNE

Dynamikę odpowiedzi humoralnej wyrażającą się liczbą linii precypitacyjnych w odczynie immunoelektroforezy przedstawiono w tab. 2. Precypityny wykazano z obydwooma użytymi antygenami od 3 tygodnia po zarażeniu. Najwięcej linii stwierdzano w okresie patentnym inwazji. Więcej linii formował ekstrakt somatyczny *F. hepatica* niż ekstrakt metaboliczny.

Dynamika odpowiedzi komórkowej była podobna w obu stosowanych testach (jedno- lub dwustopniowy), ale jednocześnie różna dla użytych antygenów (tab. 3, ryc. 1). Populacje uczulonych komórek stwierdzono wcześniej



Tab. 2. Wyniki odczynu immunoelektroforezy
Results of the immunoelectrophoresis

Dzień inwazji	Liczba linii precypitacyjnych formowanych przez surowice poszczególnych królików z antygenami															
	EFh								ES							
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
28	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1
35	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
42	5	4	4	3	3	2			4	3	3	3	2	2		
49	6	5	5	4	3	3			4	4	4	3	3	2		
56	6	5	5	5	4	3			5	5	4	3	3	3		
63	6	5	5	5					5	5	5	4				
70	6	5	5	5					5	5	5	4				
77	6	5	5	4					5	5	5	4				
84	6	5							5	4						
91	6	5							4	4						
98	7	5							5	4						
105	7	6							5	4						
Kontrola	0	0	0	0					0	0	0	0				

Tab. 3. Wyniki testu zahamowania migracji
Results of the migration inhibition test

Numer królika	Dzień inwazji	Intensywność inwazji	Indeks migracji			
			EFh		ES	
			I°	II°	I°	II°
1	14	2	0,878	0,830	0,847	0,804
2	14	4	0,734	0,760	0,683	0,612
3	35	5	0,686	0,706	0,510	0,623
4	35	6	0,612	0,674	0,586	0,595
5	56	8	0,560	0,512	0,660	0,630
6	56	4	0,550	0,520	0,650	0,620
7	77	7	0,525	0,515	0,690	0,640
8	77	8	0,510	0,490	0,670	0,610
9	105	9	0,480	0,490	0,710	0,740
10	105	11	0,450	0,470	0,720	0,760
Kontrola		0	1,070	1,014	0,980	0,960
Kontrola		0	1,005	1,020	0,996	0,982
Kontrola		0	0,993	1,012	0,914	0,948
Kontrola		0	0,962	0,990	0,976	0,983

przy użyciu ekstraktu metabolicznego, a najniższy indeks migracji dla tego antygenu obserwowano 35 dnia inwazji. Natomiast w przypadku ekstraktu somatycznego notowano stopniowe obniżanie się indeksu migracji, a najniższe wartości uzyskano w 105 dniu doświadczenia.

OMÓWIENIE

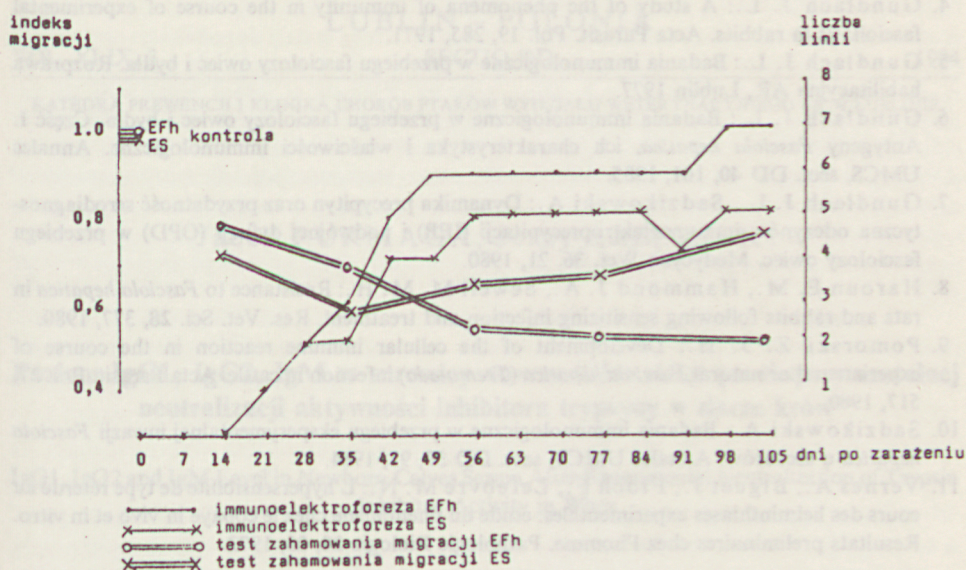
W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że układ immunologiczny królika reaguje na inwazję *F. hepatica* powstaniem i rozwojem odpowiedzi humoralnej i komórkowej, których dynamika kształtuje się odmiennie.

W przypadku odpowiedzi humoralnej antygeny obydwu użytych ekstraktów były podobnie aktywne w początkowej fazie inwazji, natomiast od 12 tygodnia więcej linii precypitacyjnych obserwowano dla antygeny somatycznego. Powyższe obserwacje dotyczące dynamiki precypityn i aktywności użytych antygenów w przebiegu inwazji motylicy u królików są zgodne z wcześniejszymi badaniami własnymi i danymi z piśmiennictwa (2, 4). Dynamika przeciwciał przeciwmotyliczych u królików jest odmienna od stwierdzonej u zwierząt innych gatunków, bowiem u owiec, bydła i szczurów po osiągnięciu maksymalnego poziomu pod koniec okresu prepatentnego, w okresie patentnym następuje ewidentny spadek poziomu przeciwciał (5, 7, 10).

U zarażonych królików obserwowano pojawienie się uczulonej populacji komórek już 14 dnia inwazji, a uzyskane indeksy migracji wskazują na wyższą aktywność w tym czasie antygenów metabolicznych. Na uwagę zasługuje fakt, że w surowicach badanych zwierząt nie wykazano wtedy obecności przeciwciał precypitujących. Podobnie wczesne pojawienie się uczulonej populacji komórek obserwowali Vernes i wsp. (11), którzy w przebiegu doświadczalnej inwazji *F. hepatica* u świnek morskich stwierdzali hamowanie migracji 15 dnia po zarażeniu. Znacznie później hamowanie migracji obserwowano w przebiegu doświadczalnej inwazji u żywicieli innych gatunków, cieląt i szczurów (1, 9, 10).

U badanych królików od 35 dnia stwierdzano obniżenie się indeksów migracji wskazujące na rozwój odpowiedzi komórkowej, a uzyskane niższe wartości indeksów dla antygenów ekstraktu metabolicznego sugerują istotną rolę produktów przemiany materii w procesie indukcji tego typu odpowiedzi immunologicznej. Od 56 dnia inwazji obserwowano stopniowy wzrost indeksów migracji komórek w obecności antygenów metabolicznych, któremu towarzyszyło obniżanie się indeksów migracji dla antygenów ekstraktu somatycznego.

Z porównania indeksów migracji oraz wyników odczynu immunoelektroforezy z dwoma ekstraktami wynika, że w początkowej fazie inwazji odpowiedź immunologiczna jest indukowana głównie produktami przemiany materii pasożyta, natomiast w fazie późniejszej wyższą aktywność wykazuje ekstrakt somatyczny (ryc. 1).



Ryc. 1. Wyniki odczynu immunoelektroforezy i testu zahamowania migracji
Results of the immunoelectrophoresis and the migration inhibition test

Pomimo silnie wyrażonej odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko *F. hepatica* u królików stwierdza się zwykle niską odporność na reinwazję lub superinwazję (3, 8). Niektórzy autorzy sugerują, że przeciwciała indukowane przez przywry, pomimo ich wysokiego poziomu, są nie protektywne. Nie do końca jest wyjaśniony problem, dlaczego tak silnie wyrażona odpowiedź komórkowa nie chroni królików przed zarażeniem. Być może u innych żywicieli, u których obserwuje się silną odporność na reinwazję lub superinwazję, takich jak bydło i szczury, obrona koncentruje się w miejscach zapewniających skuteczną eliminację przywr, np. w ścianie jelita i jamie otrzewnowej. Możliwe, że u tych żywicieli w ograniczaniu inwazji motylicy biorą udział nieznane jeszcze czynniki nieswoiste.

PIŚMIENNICTWO

1. Aalund O., Nansen P.: Migration inhibition testing on peripheral leukocytes from liver fluke infected rabbits. *Acta Vet. Scand.* 13, 591, 1972.
2. Biguet J., Rose G., Capron A.: Le diagnostic de la distomatose à *Fasciola hepatica* par le reaction d'hémagglutination. Comparaison avec les résultats de l'immunoélectrophorese et de la réaction d'hémolyse. *Bull. Soc. Path. Exot.* 58, 866, 1965.
3. Bolbol A. S., Hammonod J. A., Sewell M. M. H.: The response of rabbits to repeated infections with *Fasciola hepatica*. *Vet. Sci. Comm.* 2, 231, 1978.

4. Gundlach J. L.: A study of the phenomena of immunity in the course of experimental fascioliasis in rabbits. *Acta Parasit. Pol.* **19**, 285, 1971.
5. Gundlach J. L.: Badania immunologiczne w przebiegu fasciozy owiec i bydła. Rozprawa habilitacyjna AR, Lublin 1977.
6. Gundlach J. L.: Badania immunologiczne w przebiegu fasciozy owiec i bydła. Część I. Antygeny *Fasciola hepatica*, ich charakterystyka i właściwości immunologiczne. *Annales UMCS, sect. DD* **40**, 101, 1985.
7. Gundlach J. L., Sadzikowski A.: Dynamika precypityn oraz przydatność serodiagnostyczna odczynów immunoelektroprecypitacji (IEP) i podwójnej dyfuzji (OPD) w przebiegu fasciozy owiec. *Medycyna Wet.* **36**, 21, 1980.
8. Haroun E. M., Hammond J. A., Sewell M. M. H.: Resistance to *Fasciola hepatica* in rats and rabbits following sensitizing infection and treatment. *Res. Vet. Sci.* **28**, 377, 1980.
9. Pomorski Z. J. H.: Development of the cellular immune reaction in the course of experimental or natural *Fasciola hepatica* (Trematoda) infection in cattle. *Acta Parasit. Pol.* **27**, 517, 1980.
10. Sadzikowski A.: Badania immunologiczne w przebiegu eksperymentalnej inwazji *Fasciola hepatica* u szczurów. *Annales UMCS, sect. DD* **39**, 91, 1984.
11. Vernes A., Biguet J., Floch F., Lefebvre M. N.: L'hypersensibilite de type reterde au cours des helminthiases experimentales: etude du phenomene chez le cobaye in vivo et in vitro. Resultats preliminaires chez l'homme. *Pathologie Biologie* **20**, 23, 1972.

SUMMARY

In chinchilla rabbits experimentally invaded with 50 metacercariae of *Fasciola hepatica* humoral response was determined immunoelectrophoretically and cellular response by the one and two step test of inhibition of spleen cells migration using somatic and metabolic antigens. Precipitins have appeared since 21st day after invasion and the highest number of precipitin arcs appeared from 7-8 weeks up to the end of observations i.e. to the 105th day. A decrease in migration indices pointing to development of cellular response was noted since the 14th day after invasion. The lowest values of these indices were obtained for somatic extracts of *F. hepatica*. Comparison of migration indices and immunoelectrophoretic analysis showed that in early phase of fascioliasis in rabbits an immune response is induced mainly by *F. hepatica* metabolites and in patent phase of invasion somatic antigens are more active.