

THE EFFECT OF CYSTICERCOSIS INVASION ON THE CELLULAR IMMUNITY OF RABBITS

Y. Duda, R. Shevchik, L. Kuneva

e-mail: dudajulia1976@gmail.com

Dnipro State Agrarian and Economic University

25, S. Efremov Str., Dnipro, 49000, Ukraine

One of the most important indicators characterizing the state of animal health is leukogram and cellular immunity. The goal of the work was to establish the effect of cysticercosis invasion on the leukoformula and cellular immunity of rabbits.

Rabbits were divided into two groups after visual identification of the presence of the larval cysts: healthy (control) and diseased (experimental). The number of lymphocytes was determined by the method of spontaneous rosetting with sheep erythrocytes.

*The intensity of invasion in experimental animals ranged from 2 to 10 of the larval cysts. The number of leukocytes in infected animals was higher by 9.64 %, (6.37 ± 0.25 G/l), than in healthy rabbits (5.81 ± 0.31 G/l). We observed eosinophilia in the leukoformul of diseased rabbits (5.71 ± 0.36 %, $p < 0.01$, compared with the control in 4.08 ± 0.50 %), and a high number of stab neutrophils by 1.55 times ($p < 0.01$), which indicates inflammatory processes as a result of parasitizing the pathogen *Cysticercus pisiformis*.*

We found that in the blood of infected animals, the percentage of total T-lymphocytes was significantly higher by 4.07 % ($p < 0.01$) and reached 59.81 ± 0.87 % compared with the control (55.74 ± 1.14 %). B-lymphocytes were high in experimental rabbits, both in percentage (36.10 ± 0.96 % against 23.52 ± 1.52 %, $p < 0.001$) and in absolute value (1.35 ± 0.07 G/l against 0.86 ± 0.09 G/l, $p < 0.001$), that is, 1.53 times and 1.57 times, respectively.

The number of T-helper cells in rabbits infected with cysticercosis was greater by 1.42 times ($p < 0.001$) compared with healthy ones. Similar changes in these cells were in percentage terms, T-helper were higher by 13.56 % ($p < 0.001$) than in healthy rabbits. We recorded a low rate of both absolute and percentage number of T-suppressors in the blood of the experimental animals against control. Their values respectively amounted to 0.42 ± 0.04 G/l against 0.67 ± 0.05 G/l ($p < 0.001$) and 11.29 ± 0.96 % against 19.17 ± 0.91 % ($p < 0.001$).

The number of O-lymphocytes in rabbits infected was significantly low by 4.46 times ($p < 0.001$), and the percentage – by 5.06 times ($p < 0.001$) than in healthy ones.

Thus, such quantitative changes in immune cells indicate activation of the immune system in response to invasion.

Key words: *cysticercosis invasion, leukoformula, T- and B-lymphocytes, Cysticercus pisiformis, rabbits.*

ПОКАЗНИКИ КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ КРОЛІВ ЗА ВПЛИВУ ЦИСТИЦЕРКОЗНОЇ ІНВАЗІЇ

Ю. В. Дуда, Р. С. Шевчик, Л. В. Кунєва

e-mail: dudajulia1976@gmail.com

Дніпровський державний аграрно-економічний університет

вул. С. Єфремова, 25, м. Дніпро, 49000, Україна

*Одними з найбільш важливих показників, що характеризують стан здоров'я тварин, є лейкограма та клітинний імунітет. У зв'язку з цим метою нашої роботи було визначення впливу збудника *Cysticercus pisiformis* на лейкоформулу та клітинний імунітет кролів.*

Після візуального визначення наявності цистицеркозних міхурів у кролів, їх поділили на дві групи: здорові (контрольна) та хворі (дослідна). Кількість лімфоцитів визначали методом спонтанного розеткоутворення з еритроцитами барана.

Інтенсивність інвазії у хворих тварин склала від 2 до 10 міхурів в одній тварині. У інвазованих тварин відзначали збільшення кількості лейкоцитів на 9,64 % ($6,37 \pm 0,25$ Г/л), порівняно до показників у клінічно здорових кролів ($5,81 \pm 0,31$ Г/л). В лейкоформулі хворих кролів відзначали еозінофілію,

($5,71 \pm 0,36$ %, $p < 0,01$, проти показників у контролі – $4,08 \pm 0,50$ %), також реєстрували збільшення кількості паличкоядерних нейтрофілів у 1,55 раза ($p < 0,01$), що вказує на запальні процеси в результаті паразитування збудників *Cysticercus pisiformis*.

Нами встановлено, що в крові кролів, хворих на цистицеркоз, загальний відсоток Т-лімфоцитів був вірогідно вищим на 4,07 % ($p < 0,01$) і досягав $59,81 \pm 0,87$ % порівняно зі здоровими, у яких цей показник дорівнював $55,74 \pm 1,14$ %. Щодо іншої ланки імунної системи, яку складають В-лімфоцити, інвазовані тварини мали подібну до Т-лімфоцитів картину їх збільшення, як у відсотковому ($36,10 \pm 0,96$ % проти $23,52 \pm 1,52$ %, $p < 0,001$), так і в кількісному значенні ($1,35 \pm 0,07$ Г/л проти $0,86 \pm 0,09$ Г/л, $p < 0,001$), тобто в 1,53 раза та 1,57 раза відповідно.

Кількість Т-хелперів у заражених збудником *Cysticercus pisiformis* кролів була більше в 1,42 раза ($p < 0,001$) порівняно зі здоровими. Такі вірогідні зміни спостерігали і у відсотковому значенні цих клітин, які були вищі на 13,56 % ($p < 0,001$). Водночас, у крові дослідної групи реєстрували низький показник як абсолютної, так і відносної кількості Т-супресорів проти контрольної групи тварин. Їх значення, відповідно, становило $0,42 \pm 0,04$ Г/л проти $0,67 \pm 0,05$ Г/л ($p < 0,001$) та $11,29 \pm 0,96$ % проти $19,17 \pm 0,91$ % ($p < 0,001$).

У хворих кролів кількість О-лімфоцитів значно, низька в 4,46 раза менше ($p < 0,001$), а відсоток – в 5,06 раза ($p < 0,001$), ніж у здорових.

Таким чином, такі кількісні зміни імунних клітин свідчать про активізацію імунної системи у відповідь на інвазію.

Ключові слова: цистицеркозна інвазія, лейкоформула, Т- і В-лімфоцити, *Cysticercus pisiformis*, кролі.

Постановка проблеми

Однією з основних причин значних економічних збитків у кролівництві є гельмінтози кролів, які негативно впливають на продуктивність, якість одержуваної продукції, загальну резистентність організму [3, 5, 8].

Тому вивчення змін показників клітинного імунітету кролів, хворих на цистицеркоз, дозволить правильно та своєчасно призначити ефективне лікування, спрямоване не тільки на знешкодження збудника інвазії, але й на відновлення резистентності організму тварин.

Аналіз останніх досліджень і публікацій

Одним із поширених інвазійних захворювань у кролівництві є цистицеркоз пізіформний, збудником якого є *Cysticercus pisiformis*.

Вченими встановлено [1, 2], що цистицеркозом пізіформним уражено 41,6% кролів і 21,7% зайців. Інтенсивність інвазії у кролів коливається від 3 до 121, у зайців – від 7 до 48 [1, 3, 4], а навіть до 600 міхурів [6, 10].

Це захворювання негативно впливає на м'ясну продуктивність кролів [9, 11], призводячи до значних економічних збитків у кролівничих фермах [5, 8]. Щоб уникнути поширення хвороби, потрібно вчасно поставити діагноз.

Визначення клітинного імунітету є показовими, оскільки мають велике значення для діагностики багатьох захворювань [12, 13, 15].

Тому метою наших досліджень було вивчити вплив збудника *Cysticercus pisiformis* на показники клітинного імунітету кролів.

Мета, завдання та методика досліджень

Робота виконувалась впродовж 2016 року. Дослідження проведено на кролях-самцях 3–4 місячного віку, каліфорнійської породи, масою тіла 3,5–4,0 кг відібраних за принципом аналогів у кролівницькому господарстві ТОВ «Олбест» Дніпропетровської області. Зразки крові у кролів відбирали вранці, з крайової вушної вени. Після взяття крові проводили забій та візуально визначали наявність цистицеркозних міхурів у продуктах забою, після цього кролів поділили на дві групи: здорові тварини (контрольна група) та хворі тварини (дослідна група). Тварини отримували збалансований стандартний гранульований комбікорм, сіно і воду без обмеження. Тварин утримували в сітчастих клітках у приміщенні, згідно з чинними ветеринарно-санітарними нормами.

Лабораторні дослідження проводили в лабораторії кафедри паразитології та ветсанекспертизи Дніпровського державного аграрно-економічного університету.

Загальну кількість Т-лімфоцитів визначали методом спонтанного розеткоутворення з

еритроцитами барана [6, 7, 14]. Число Т-клітин з переважно супресорною активністю (ТФЧ) шляхом віднімання числа теофілінрезистентних Т-клітин (ТФР) від загального числа Т-лімфоцитів. Імунорегуляторний індекс (ІРІ) розраховували як співвідношення теофілінрезистентних Т-клітин до теофілінчутливих. Визначення кількості В-лімфоцитів проводили методом комплементарного розеткоутворення [14]. Число О-клітин підраховували відніманням від 100%-ої суми загальної кількості Т-лімфоцитів та В-лімфоцитів. На початку досліджу готували індикаторну (маркерну) систему для реакцій Е-РУК та ЕАС-РУК. Для цього використовували еритроцити барана. Еритроцитарну масу взятої крові (2 мл) тричі відмивали 0,9%-им розчином NaCl і центрифугували в режимі 1500 об/хв. впродовж 15 хвилин. Для індикаторної системи Е-РУК готували 1%-у суспензію еритроцитів барана (до 0,1 мл еритроцитів додавали до 10 мл трис-буферу), а для ЕАС-РУК 2,5%-у еритроцитарну суспензію (до 0,25 мл еритроцитів додавали до 10 мл трис-буферу), яку обробляли гемолітичною сироваткою, що була попередньо розведена (0,02 мл гемолітичної сироватки у титрі 1:1200, додаючи до 8 мл трис-буферу), у співвідношенні 2:2 і в подальшому інкубували 30 хвилин у термостаті при 37°C. Після інкубації гемсистему двічі відмивали трис-буфером. Потім додавали до суспензії еритроцитів комплемент морської свинки після його попереднього розрідження 2 мл фізіологічного розчину та 20-хвилинної експозиційної витримки за кімнатної температури; у подальшому інкубували 30 хвилин у термостаті за 37°C. Після інкубації гемсистему тричі відмивали трис-буфером і доводили ним до 10 мл.

Проби крові (по 4,5 мл) відбирали від дослідних тварин і стабілізували 5%-им розчином трилону Б на фізрозчині у розрахунку 1:9. Виділення фракції лімфоцитів проводили шляхом центрифугування крові, попередньо розведеної 1:1 і нашарованої на градієнт щільності верографіну (1,077). Центрифугування проводили впродовж 30 хвилин в режимі 1500 об/хв. Після цього проходило розшарування крові з утворенням червоного осаду (еритроцитів та гранулоцитів), білого кільця на межі середовищ (суспензії лімфоцитів) та надосадової рідини (верографіну). Розшаровану суспензію лімфоцитів відбирали пастерівською піпеткою і ресуспендували в 5 мл трис-буферу, після чого двічі відмивали у

центрифужному режимі 1500 об/хв впродовж 10 хвилин. Після оцінки життєздатності відмитих лімфоцитів (фарбування 0,1%-им еозином) їх стандартизували до концентрації $2 \cdot 10^6$ в 1 мл.

Реакцію спонтанного розеткоутворення (Е акт-РУК) ставили шляхом змішування 0,1 мл лімфоцитарної маси з 0,1 мл 1%-вою суспензією еритроцитів з наступним центрифугуванням (5 хвилин при 1000 об/хв). Реакцію Е-РУК проводили шляхом 10 хвилинної витримки (при 37°C) 0,1 мл лімфоцитарної маси в суміші з 0,1 мл 1%-ою суспензією еритроцитів та 0,1 мл трис-буферу, яку після центрифугування (5 хвилин при 1000 об/хв) інкубували у холодильнику при 4°C впродовж 1 години. Реакція ЕАС-РУК проходила в умовах 30 хвилинної інкубації в термостаті (за 37°C), з наступним 5-и хвилинним центрифугуванням (1000 об/хв). Реакція Е-РУК з теофіліном проходила в умовах ступінчатої інкубації в термостаті 30 хвилин при 37°C, з наступним центрифугуванням (5 хвилин при 1000 об/хв) і додаванням 0,1 мл 1%-ої суспензії еритроцитів (10 хвилин при 37°C), а потім після центрифугування (5 хвилин при 1000 об/хв) інкубували у холодильнику 1 годину за 4°C.

Розетки, які утворилися в процесі реакцій, фіксували 0,06%-им глютаровим альдегідом (20–30 хвилин), а потім на предметних скельцях готували мазки. Готові мікропрепарати фіксували етанолом (10 хвилин) та забрвлювати за Романовським-Гімзою (5–7 хвилин).

Результати реакцій оцінювали шляхом підрахунку під мікроскопом 200 лімфоцитів. За розетку рахували лімфоцит, що приєднав 3 і більше еритроцитів.

При роботі з тваринами дотримувалися вимог «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експерименті та інших наукових цілях» (Страсбург, 18.03.1986р.). Статистичну обробку експериментальних результатів для визначення біометричних показників (середні значення та їх похибки, порівняння середніх значень за критерієм Стьюдента) здійснювали з використанням програми Microsoft Excel-07.

Результати досліджень

Рівень ураженості кролів визначали візуально після забою за кількістю цистицеркозних міхурів на тазовій частині прямої кишки. Інтенсивність інвазії у хворих тварин складала від 2 до 10 міхурів в одній тварині. За результатами проведених досліджень встановлено, що за паразитування *Cysticercus*

Cysticercus pisiformis в організмі кролів відбуваються певні зміни морфологічних показників крові (рис.1). Так, у інвазованих тварин відзначали збільшення

кількості лейкоцитів на 9,64 % ($6,37 \pm 0,25$ Г/л), порівняно до показників у клінічно здорових кролів $5,81 \pm 0,31$ Г/л), що свідчить про запалення.

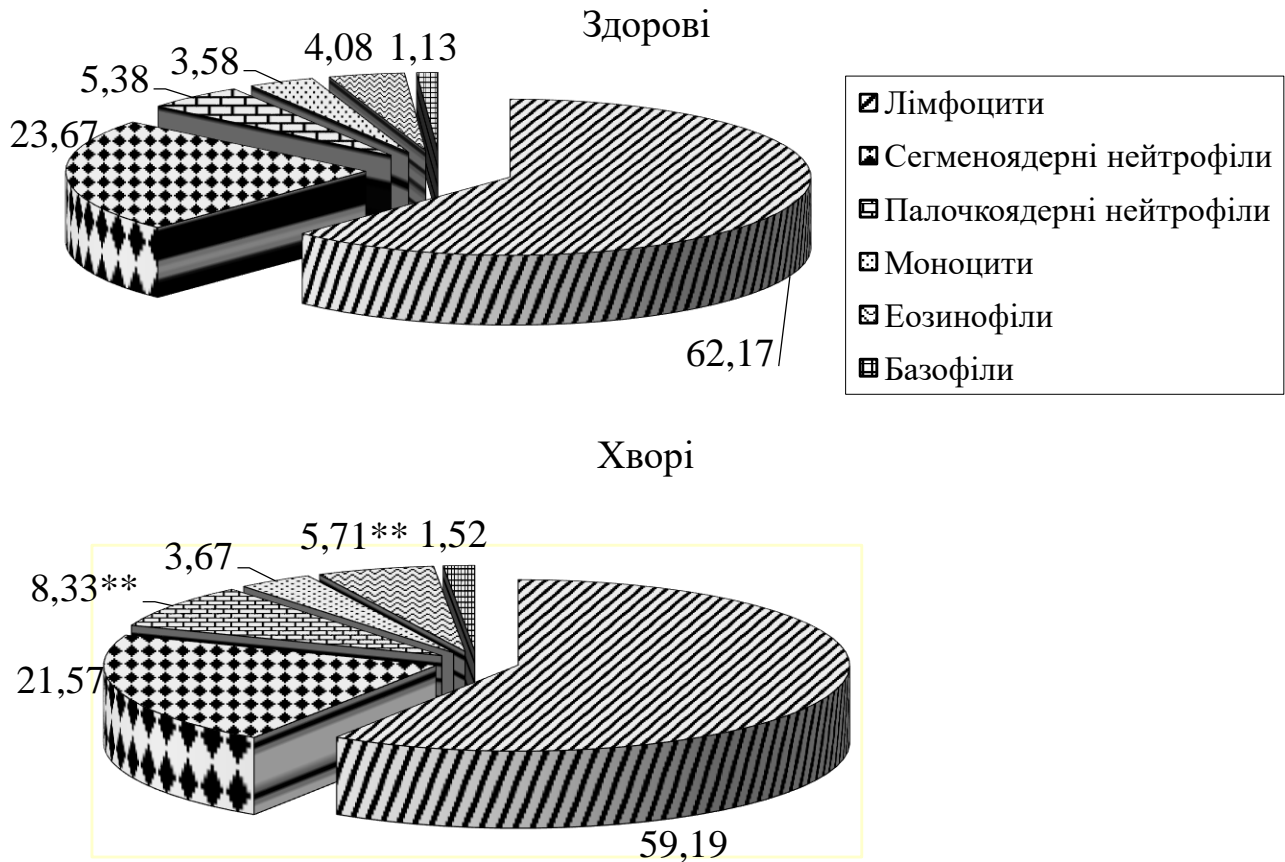


Рис. 1. Лейкограма кролів за цистицеркозу

В лейкоформулі інвазованих кролів відзначали еозинофілію, ($5,71 \pm 0,36$ %, $p < 0,01$, проти показників у контролі – $4,08 \pm 0,50$ %), також реєстрували збільшення кількості паличкоядерних нейтрофілів у 1,55 раза ($p < 0,01$), що вказує на запальні процеси в результаті паразитування збудників *Cysticercus pisiformis*.

Нашими дослідженнями встановлено, що у спонтанно заражених цистицеркозом кролів відбуваються істотні зміни показників клітинного імунітету, зокрема кількості популяцій Т- і В-лімфоцитів (таблиця 2).

Нами встановлено, що у периферійному руслі крові кролів, хворих на цистицеркоз, загальний відсоток Т-лімфоцитів був вірогідно вищим на 4,07 % ($p < 0,01$) і досягав до $59,81 \pm 0,87$ % порівняно зі здоровими, у яких цей показник дорівнював $55,74 \pm 1,14$ %. Щодо другої ланки імунної системи, яку складають В-лімфоцити, то інвазовані тварини мали подібну до Т-лімфоцитів картину збільшення, як у

відсотковому ($36,10 \pm 0,96$ % проти $23,52 \pm 1,52$ %, $p < 0,001$), так і в кількісному значенні ($1,35 \pm 0,07$ Г/л проти $0,86 \pm 0,09$ Г/л, $p < 0,001$), тобто в 1,53 раза та 1,57 раза, відповідно. Значні зміни відбувалися серед Т-хелперів, основна функція яких полягає у стимулюванні трансформації В-лімфоцитів у клітини плазматичного ряду [14]. Кількість Т-хелперів у заражених збудником *Cysticercus pisiformis* кролів була більше в 1,42 раза ($p < 0,001$) порівняно зі здоровими. Такі вірогідні зміни спостерігали і у відсотковому значенні цих клітин, які були вищі на 13,56% ($p < 0,001$). Водночас, у крові дослідної групи реєстрували низький показник як абсолютної, так і відносної кількості Т-супресорів проти контрольної групи тварин. Їх значення, відповідно, становило $0,42 \pm 0,04$ Г/л проти $0,67 \pm 0,05$ Г/л ($p < 0,001$) та $11,29 \pm 0,96$ % проти $19,17 \pm 0,91$ % ($p < 0,001$)

Таблиця 2. Показники клітинного імунітету кролів за впливу збудника *Cysticercus pisiformis* (M ± m)

Показники		Групи тварин	
		здорові (контроль), n=24	хворі (дослід), n=21
Т-лімфоцити	Г/л	1,99±0,14	2,32±0,11
	%	55,74±1,14	59,81±0,87**
В-лімфоцити	Г/л	0,86±0,09	1,35±0,07***
	%	23,52±1,52	36,10±0,96***
Т-хелпери	Г/л	1,28±0,12	1,82±0,09***
	%	34,96±1,91	48,52±1,22***
Т-супресори	Г/л	0,67±0,05	0,42±0,04***
	%	19,17±0,91	11,29±0,96***
ІРІ		1,98±0,19	5,29±0,66***
Т-активні	Г/л	2,50±0,12	2,96±0,12
	%	45,13±2,29	46,67±1,19
О-лімфоцити	Г/л	0,71±0,10	0,16±0,02***
	%	20,74±2,41	4,10±0,48***

Примітка: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 порівняно із здоровими тваринами.

У хворих кролів кількість О-лімфоцитів значно низька в 4,46 раза (p<0,001), відсоток – у 5,06 раза (p<0,001), ніж у здорових

Такий перерозподіл лімфоцитів, як збільшення кількості Т- і В-лімфоцитів та функціонально спеціалізованих клітинних популяцій (Т-хелперів) на фоні низької кількості О-лімфоцитів та Т-супресорів, свідчить про активізацію імунної системи кролів у відповідь на інвазію.

Висновки та перспективи подальших досліджень

За результатами проведених досліджень встановлено, що за спонтанної цистицеркозної інвазії у кролів-самців відбуваються певні зміни морфологічних показників крові. В лейкоформулі інвазованих кролів відзначали еозинофілію, також реєстрували збільшення кількості паличкоядерних нейтрофілів, що вказує на запальний процес в результаті паразитування збудників *Cysticercus pisiformis*.

Спонтанна цистицеркозна інвазія у кролів-самців спричинила зміни показників клітинного імунітету. Отримані нами дані свідчать про інтенсивний розвиток імунної відповіді на пошкодження тканин під час міграції збудника *Cysticercus pisiformis*. Передусім, у заражених тварин ми спостерігали високу кількість Т-, В-

лімфоцитів і Т-хелперів, особливо двох останніх показників, які були вищі на тлі низької кількості Т-супресорів і О-лімфоцитів.

Перспективним напрямом подальших досліджень є вивчення протеїнового обміну та імунної реактивності за цистицеркозної інвазії кролів на фоні антигельмінтної терапії з застосуванням різних продуктів переробки амаранту.

References

1. Dubina, I. N. (2002). Tsistitserkoz piziformnyy krolikov (epizootologiya, patogenez, simptomatika i mery borby) [Pisiformis cysticercosis of rabbits (epizootology, pathogenesis, symptomatology and measures of struggle)] (Avtoreferat dissertatsii kandidata veterinarnykh nauk). Belorusskiy nauchno-issledovatel'skiy institut eksperimental'noy veterinarii im. S. N. Vyshesl'skogo, Vitebsk [in Russian].
2. Dubina, I. N. & Subbotin, A. M. (2000). Epizootologiya Taenia pisiformis i eye lichinochnoy stadii Cysticercus pisiformis [Epizootology of Taenia pisiformis and its larval stage Cysticercus pisiformis]. *Vesti akademii agrarnykh nauk Respubliki Belarus*, 1, 71–74 [in Russian].
3. Duda, Yu. V., Prus, M. P., Kunieva, L. V. & Shevchyk, R. S. (2018). Vplyv tsystitserkoznoi invazii na stan vnutrishnikh orhaniv i miasnu produktivnist kroliv [Influence of cysticercosis

infection on the state of internal organs and meat productivity of rabbits]. *Veterynarna biotekhnolohiia*, 33, 31–38 [in Ukrainian].

4. Zaritska, A. O. (2014). Patomorfologichni zminy za tsystytskerkozu kroliv [Pathomorphological changes in cysticercosis of rabbits]. *Materialy naukovo-praktychnoi konf. profesorsko-vykladatskoho skladu Poltavskoi derzhavnoi ahrarnoi akademii* (pp. 89–91). Poltava [in Ukrainian].

5. Kotsiubenko, H. A. (2013). Naukovo-praktychni metody pidvyshchennia produktyvnosti kroliv [Scientific and practical methods for raising the productivity of rabbits]. Mykolaiv : MNAU [in Ukrainian].

6. Vlizlo, V. V., Fedoruk, R. S., Ratych, I. B. & Simonov, M. R. (2012). Laboratorni metody doslidzhen u biologii, tvarynnytstvi ta veterynarii medytsyni [Laboratory methods of research in biology, livestock and veterinary medicine]. Lviv : Spolom [in Ukrainian].

7. Klaus, Dzh. (Ed.) (1990). Limfotsity: Metody [Lymphocytes: methods]. Moskva : Mir [in Russian].

8. Luchyn, I. S. (2017). Teoretychni osnovy ta praktychne obgruntuvannia tekhnolohii intensyvnoho vyrobnytstva kroliatyny [Theoretical bases and practical substantiation of the technology of intensive production of rabbit meat] (Avtoreferat dysertatsii doktora silskohospodarskykh nauk). Natsionalnyi universytet bioresursiv i pryrodokorystuvannia Ukrainy, Kyiv [in Ukrainian].

9. Mazzone, G., Vignola, G., Giammarco, M., Manetta, A. C. & Lambertini, L. (2010). Effects of loading methods on rabbit welfare and meat quality. *Meat Sci.*, 85, 33–39.

10. Melillo, A. (2007). Rabbit clinical pathology. *J. Exot. Pet. Med.*, 16 (3), 135–145.

11. Osman, A. M. (1991). Effect of reducing feeding time on the growth performance, carcass traits and meat quality of growing rabbits. *Arch. Geflügelk.*, 55, 196–200.

12. Sapin, M. R. & Nikityuk, D. B. (2000). Immunnaya sistema. stress i immunodefitsit [Immune system, stress and immunodeficiency]. Moskva: Dzhangar [in Russian].

13. Stybel, V. V., Pryima, O. B. & Ponomar, S. I. (2014). Doslidzhennia kilkosti T- i V-limfotsytiv za dii invazii *Toxocara canis* [The study of the number of T-and B-lymphocytes for the action of invasion *Toxocara canis*]. *Naukovyi visnyk Lvivskoho natsionalnoho universytetu veterynarnoi medytsyny ta biotekhnolohii im. S. Z. Hzhyskoho*, 16 (3), 330–334 [in Ukrainian].

14. Cheredeyev, A. N. (1976). Kolichestvennaya i funktsionalnaya otsenka T- i V-sistem immuniteta u cheloveka [Quantitative and functional assessment of T-and B-systems of human immunity]. *Obshchiye voprosy patologii*, 4, 124–160 [in Russian].

15. Waqar, A., Saad, A., Khalid, A., Haleema, S., Tariq, R. & Luqman, M. (2004). Diagnostic significance of serum protein electrophoresis. *Biomedica*, 20, 40–44.