

# Rola hypodermin w przystosowaniu larw gzów bydlęcych do pasożytniczego trybu życia

TOMASZ CENCEK, JACEK KARAMON, JACEK SROKA, JOLANTA ZDYBEL

Zakład Parazytologii i Chorób Inwazyjnych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego  
– Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Cencek T., Karamon J., Sroka J., Zdybel J.

## Role of hypodermins in the adaptation of *Hypoderma bovis* larvae to the parasitic mode of life

### Summary

The article is a review of the results of investigations concerning digestive enzymes of warble flies (*Hypoderma lineatum*, *H. bovis*), called hypodermins. Special attention was paid to their antigenic, immunogenic and immunosuppressing properties and the relation of these features with enzymatic properties. It was proved that the elimination of the enzymatic activity of hypodermins may increase their immunogenicity, which opens opportunities for creating more effective vaccines against hypodermosis.

**Keywords:** *Hypoderma*, digestive enzymes, immunomodulation

Gzawica bydła – hypodermozja jest chorobą inwazyjną wywołaną przez larwy muchówek z gatunku *Hypoderma bovis* i *Hypoderma lineatum*. Owady te należą do rzędu *Diptera*, podrzędu *Brachycera*, rodziny *Oestridae*, podrodziny *Hypodermatinae*. Są one wyspecjalizowanymi, specyficznymi pasożytami bydła domowego i blisko filogenetycznie spokrewnionych gatunków, np. bizonów, jaków, zebu czy bawołów. Przypadkowo mogą atakować także inne gatunki zwierząt, np. konie, owce i kozy. Człowiek także może być przypadkowym żywicielem larw gzów bydlęcych. Gzy bydlęce występują powszechnie niemal w całej holarktyce, między 25. a 66. stopniem szerokości geograficznej północnej. Ekstensywność inwazji u bydła w różnych regionach waha się od kilku do kilkudziesięciu procent. Badania własne (22) prowadzone w latach 90. ubiegłego wieku wskazywały, że po ok. 14 latach od zakończenia zorganizowanych akcji zwalczania gzów ekstensywność tej inwazji w Polsce powróciła do poziomu stwierdzanego przed tymi akcjami.

### Cykl rozwojowy

Cykl rozwojowy gzów bydlęcych jest bardzo skomplikowany. Owady dojrzałe ze względu na zredukowany aparat gębowy nie pobierają pokarmu, a rola ich ogranicza się jedynie do reprodukcji. Samice gzów w porze letniej składają jaja na sierści bydła. Z jaj wykluwają się robakowatego kształtu larwy pierwszego stadium (L1), które przenikają przez skórę i zaczynają drążyć kanały w tkankach zarażonych zwierząt. Kilumiesięczna wędrówka tych larw wiedzie poprzez

skórę kończyn lub dolnych partii piersi i brzucha do powięzi i nerwów, a następnie wzdłuż nich do kanału kręgowego (*H. bovis*) lub błony podśluzowej przełyku (*H. lineatum*). Stąd wywędrowują pod skórę grzbietu, w której tworzą charakterystyczne guzy gzowe. Każdy guz gzowy ma na swoim szczycie otwór umożliwiający larwom drugiego i trzeciego stadium (L2 i L3) oddychanie powietrzem atmosferycznym. Po wypadnięciu przez wytworzone w skórze otwory oddechowate, dojrzałe larwy L3 przepoczwarczają się w glebie.

Tryb życia poszczególnych stadiów larwalnych jest odmienny. Larwy L1 odbywają długotrwałe wędrówki w tkankach, natomiast larwy L2 i L3 osiedlają się pod skórą i przebywają tam stosunkowo krótko. Te różnice w trybie życia znajdują odzwierciedlenie również w morfologii larw.

### Morfologia larw

Larwy L1 są kształtu wydłużonego, robakowatego, długości początkowo ok. 0,5-1 mm, a przed linieniem ok. 1-2 cm. Ich ciało składa się z 12 segmentów (pseuodocefalonu, 3 segmentów tułowiowych i 8 odwłokowych). Pseuodocefalon jest mały i nieruchomy, a znajdujące się na nim narządy zmysłów w postaci 3 niepigmentowanych pierścieni są słabo widoczne. Część gębowa pseuodocefalonu zawiera 2 haki i ostrze środkowe. Na przednich krawędziach segmentów znajduje się po kilka rzędów małych kolców. Haki gębowe, ostrze środkowe i rzędy kolców na krawędziach segmentów składają się na zespół narządów umożliwiających larwom przemieszczanie się. Kolce nie ros-

ną wraz ze wzrostem larw i dlatego przyjmuje się, że spełniają one swoją rolę jedynie w okresie przenikania nowo wyklutych larw przez skórę, później zaś ich znaczenie maleje.

Larwy L2 i L3 są znacznie większe (przede wszystkim szersze) od L1. Wzrost objętości i masy pomiędzy nowo wyklutą larwą L1 a dojrzałą larwą L3 może sięgać nawet kilkunastu tysięcy razy. Ciało larw L2 i L3 jest krępe, na przekroju owalne. U L3 stosunek szerokości do długości wynosi 1 : 1,5. Narządy, które umożliwiały nowo wyklutym larwom L1 przemieszczanie się, u L2 i L3 są w stanie zaniku. Zredukowana jest część oralna aparatu gębowego. Charakteryzuje się ona silnym uwstecznieniem haków i brakiem ostrza środkowego. U L3 pseudocefalon przesunięty jest lekko na stronę brzuszną. Kolce na przednich brzegach segmentów (zarówno po stronie grzbietowej, jak i brzusznej) są małe i niezbyt liczne. Natomiast dobrze rozwinięte są kolce tworzące wieńce wokół tylnych przetchlinek. Tylnie przetchlinki zwrócone są w stronę otworu oddechowego w skórze. Obecność kolców w tym miejscu stanowi więc dla larw zabezpieczenie przed przypadkowym usunięciem ich z guza gżowego.

### Charakterystyka enzymów trawiennych larw gzów bydlęcych

Kwestią zasadniczą dla larw L1 jest możliwość przemieszczania się w tkankach żywiciela. Narządy czepne znajdujące się na pseudocefalonie i segmentach ciała nie są wystarczająco rozwinięte, aby zapewnić larwom odpowiednią mobilność w tym środowisku. Dlatego też migracja larw warunkowana jest nie tyle wykształceniem sprawnych narządów ruchu, ile przystosowaniami chemicznymi. Najważniejszą rolę pełnią tu proteolityczne enzymy trawienne gzów produkowane w dużych ilościach przez ślinianki. O wielkości tej produkcji świadczy fakt, że nagromadzone w śliniankach i przewodzie pokarmowym enzymy nadają niemal przezroczystej larwie seledynowe zabarwienie (o intensywności zależnej od stopnia wypełnienia enzymami). Enzymy te wydalane są na zewnątrz, gdzie rozpuszczają otaczającą larwę tkanki żywiciela. Następnie pasożyt wchłania płynną substancję, uzyskując składniki odżywcze (jest to tak zwane trawienie zewnętrzne) i jednocześnie tworzy sobie wolną przestrzeń do przemieszczenia się. Kanałki wytrawione przez larwy w tkankach żywiciela są dobrze widoczne (szczególnie w tkance tłuszczowej okołordzeniowej). Otaczające je tkanki są bowiem na skutek działania enzymów trawiennych larw najczęściej zabarwione na kolor jasnozielony.

Z enzymów trawiennych larw gzów najważniejszymi są proteazy serynowe, tzw. hypoderminy (zostały one dokładnie opisane u gzów z gatunku *H. lineatum*). Należą do nich: trypsynopodobna hypodermina A (HyA) i hypodermina B (HyB) oraz kolagenaza – hypodermina C (HyC). Są to białka o zbliżonych masach cząs-

teczkowych: HyA ma masę cząsteczkową ok. 27 kDa (21), hypodermina B ok. 23 kDa (14), a kolagenaza (HyC) ok. 24 kDa (13). Wykazano, że białka te są dość podobne, jeżeli chodzi o strukturę aminokwasową, różnią się jednak ładunkiem elektrycznym i, co za tym idzie, rozdziałem w elektroforezie natywnej (14). Inną różnicą jest liczba mostków dwusiarczkowych – w HyA i HyB występują dwa takie mostki, podczas gdy w HyC trzy. Wszystkie te enzymy są inaktywowane przez diizopropylodifluorofosforan (DFP). Ponadto HyA i HyB są inaktywowane przez keton chlorometylowy N-toluenosulfonylolizyny, trzustkowy inhibitor trypsyny (BPTI) i inhibitor trypsyny z soi (STI), a HyA również przez owomukoid. Hypoderminy A i B rozkładają syntetyczne substraty właściwe dla trypsyny, takie jak Bz-Arg-Oet i Bz-Arg-Nan, ale nie rozkładają substratów właściwych dla chymotrypsyny, takich jak Bz-Tyr-Oet i Ac-Tyr-Nan oraz nie rozkładają kolagenu. Hypodermina C nie rozkłada żadnego z wyżej wymienionych substratów, rozkłada natomiast kolagen. Najwyższą aktywność proteolityczną hypoderminy wykazują w środowisku zasadowym przy pH ok. 8-9 – podobnie jak inne proteolityczne enzymy trawienne larw owadów. Aktywność ta ulega całkowitemu, lecz odwracalnemu zablokowaniu w pH 4,5. Hypoderminy są dość odporne na działanie temperatury i nieodwracalnej inaktywacji ulegają dopiero w temperaturze 60-80°C (6, 14). Ponadto ustalono, że optymalna temperatura ich działania jest nieco wyższa od ciepłoty ciała specyficznego żywiciela i wynosi ok. 45-50°C (6).

Niewiele jest badań nad enzymami *Hypoderma bovis*. Stwierdzono jednak, że u tego gatunku występują enzymy proteolityczne bardzo zbliżone do hypodermin izolowanych z *H. lineatum*, mające podobną budowę antygenową.

### Działanie immunomodulacyjne hypodermin

Okazuje się jednak, że skuteczne trawienie otaczających tkanek nie jest jedynym zadaniem enzymów trawiennych larw gzów bydlęcych. Nie mniej ważną ich funkcją jest oddziaływanie na układ immunologiczny żywiciela. Już dawno zaobserwowano, że wokół wędrujących larw (szczególnie przy pierwszym zarażeniu) nie tworzy się odczyn zapalny. Jest to szczególnie zastanawiające, gdy weźmie się pod uwagę wielkość larw w tkankach i ilości produkowanych przez nie wydalin. Na przykład stosunkowo duże już larwy gzów (długości ok. 1-1,5 cm) przebywają przez okres od jednego do dwóch miesięcy w odcinku piersiowym i lędźwiowym kanału kręgowego zarażonego bydła, w bezpośredniej bliskości rdzenia kręgowego, jego korzeni grzbietowych i brzusznych oraz gałęzi grzbietowych i brzusznych ważnych nerwów rdzeniowych. Ich obecność nie bywa na ogół przyczyną żadnych objawów ze strony układu nerwowego. Dopiero zastosowanie u zwierząt w tym okresie insektycydów systemowych może stać się przyczyną poważnych objawów w postaci porażań, niedowładów tylnych

kończyn, a w przypadku inwazji *H. lineatum* porażen przełyku. Dzieje się tak z powodu gwałtownego rozwoju odczynu zapalnego wokół zamarych larw obejmującego otaczające tkanki, w tym także tkankę nerwową.

Przyczyną braku odczynu zapalnego wokół wędrujących larw jest, z jednej strony, słaba antygenowość żywych larw, z drugiej zaś – silne działanie immunosupresyjne enzymów trawiennych larw – hypodermin. Istotny jest fakt, że antygeny larw nie są związane ze strukturami powierzchniowymi ich ciała, lecz w większości z ich enzymami trawiennymi (15). Hypoderminy również nie należą do silnych antygenów. Odpowiedź układu immunologicznego żywiciela na wniknięcie larw jest stosunkowo słaba. Wzrost poziomu przeciwciał u bydła w przebiegu hypodermozji jest bardzo powolny (4, 5, 16), a diagnostycznie istotne miana pojawiają się dopiero po ok. 2-4 miesiącach inwazji (5).

Immunosupresyjne działanie hypodermin jest wielokierunkowe i dotyczy blokowania zarówno specyficznych, jak i niespecyficznych mechanizmów odpornościowych. Stwierdzono, że zasadnicze działanie immunosupresyjne wykazują hypodermina A i B. Jednym z wcześniej poznanych mechanizmów takiego oddziaływania było stwierdzenie udziału tych enzymów w rozkładaniu łańcucha  $\alpha$  i  $\beta$  fragmentu C3 dopełniacza. Reakcja ta jest prawdopodobnie odpowiedzialna za hamowanie odczynu zapalnego w czasie pierwszego kontaktu zwierząt z gzami.

W syntetycznym ujęciu Otranto (17) przeanalizował wyniki uzyskane przez różnych autorów i stwierdził, że immunosupresyjne działanie hypodermin wiąże się z ich właściwościami enzymatycznymi i przejawia się głównie w:

- rozkładowi łańcucha  $\alpha$  i  $\beta$  fragmentu C3 dopełniacza przez HyA i HyB,
- hamowaniu przez HyA proliferacji limfocytów u zwierząt zarażonych,
- hamowaniu proliferacji limfocytów indukowanej fitohemaglutyniną *in vitro* i *in vivo*,
- uszkodzeniu przez HyA receptorów powierzchniowych niepobudzonych jednojądrzastych krwinek białych,
- rozkładowi przez HyA bydłych immunoglobulin klasy G.

Według większości autorów, hypodermina C nie wywiera istotnego wpływu immunosupresyjnego. Chabaudie i Boulard (8) wskazują jednak, że u cieląt nie mających wcześniejszego kontaktu z antygenami *Hypoderma* spp. również ten enzym powoduje obniżenie wrażliwości limfocytów na działanie fitohemaglutyniny. Te właściwości hypodermin wywołały ostatnio zainteresowanie medycyny ludzkiej. Podejmowane są próby zastosowania hypoderminy A jako immunosupresora zapobiegającego odrzucaniu przeszczepów (20).

Hypoderminy wykazują jednak nie tylko działanie immunosupresyjne, ale również immunogenne. W trak-

cie wędrowki larwy L1, w organizmie zarażonego zwierzęcia wytwarzane są swoiste przeciwciała dla tych antygenów. Dzięki temu możliwe jest m.in. serologiczne diagnozowanie inwazji już w trakcie wędrowki larw L1, czyli w okresie, gdy brak jest specyficznych objawów klinicznych choroby. Do diagnozowania hypodermozji bydła stosowano testy serologiczne: test biernej hemaglutynacji, różne warianty testu ELISA oparte na pełnym antygenie *H. lineatum*, jak również na antygenie zawierającym hypoderminę A lub C. Testy te stosowane były do poszukiwania swoistych przeciwciał w surowicy i mleku. Większość autorów skłania się ku stwierdzeniu, że hypodermina C jest antygenem bardziej specyficznym, umożliwiającym wykrycie inwazji obu gatunków gzów bydłowych. Stwierdzono również, że bydło, które było zarażone gzami bydłowymi w następnych sezonach jest już mniej wrażliwe na tę inwazję, i że zjawisko to ma podłoże immunologiczne (10, 12). Jednocześnie jednak Baron i Weintraub (3) wykazali, że dopiero kilkakrotne przebycie inwazji pozwala zwierzętom na osiągnięcie wysokiej odporności przeciwinwazyjnej. Podobnie Ziomko i Cencek (22) stwierdzili najniższą intensywność inwazji *H. bovis* u bydła 6-letniego, wcześniej kilkakrotnie zarażonego gzami. Wskazuje to na stosunkowo słabą immunogenność naturalnych antygenów gzów bydłowych.

### Wykorzystanie hypodermin do immunizacji bydła

Wiedza o zdolności bydła do wytwarzania swoistych przeciwciał oraz fakt, że starsze krowy są zazwyczaj w mniejszym stopniu zarażone gzami niż zwierzęta młode, skłoniła wielu badaczy do podjęcia prób immunizacji krów przeciw hypodermozji. Pierwsze takie badania przeprowadzono już ok. 30-50 lat temu. W następnych latach podejmowano liczne próby uodporniania bydła szczepionkami opartymi na pełnym antygenie larw L1 gzów, jak również szczepionkami zawierającymi wyizolowane hypoderminy, a także hypoderminami uzyskanymi na drodze inżynierii genetycznej. Różna była skuteczność przeprowadzanych szczepień. Ogólnie, według badaczy amerykańskich i kanadyjskich, szczepienia młodego bydła mają znaczący wpływ na odporność przeciw inwazji gzów (1, 2, 11, 18, 19). Jednocześnie jednak wskazują oni, że siła odpowiedzi na antygeny gzów może znacznie się wahać u poszczególnych zwierząt (11), a ze względu na stosunkowo słabą immunogenność antygenów ważna jest metoda szczepienia i zastosowane adiuwanty (1, 19). Z cytowanych prac wynika jednocześnie, że decydujący efekt ochronny wykazuje odporność komórkowa, a nie humoralna. Odmienne wyniki uzyskali natomiast naukowcy francuscy (9), którzy nie stwierdzili istotnego wpływu immunizacji na liczbę larw kończących cykl rozwojowy.

Różne opinie wyżej wymienionych autorów na temat skuteczności i zasadności szczepień bydła prze-

ciw gzwawicy mają jeden punkt wspólny – skuteczność szczepień w żadnym z badań nie była pełna. Podkreśla się w związku z tym słabą immunogenność stosowanych antygenów. W badaniach tych nie uwzględniano natomiast aktywności enzymatycznej stosowanych antygenów. Niezależnie od przyjętego sposobu szczepienia i wybranej frakcji antygeny, białka w nim zawarte – hypoderminy, we wszystkich doświadczeniach były aktywnymi enzymami. Zastanawiające jest, że w licznych publikacjach, często będących dziełem tych samych autorów, podkreśla się, że aktywność proteolityczna hypodermin ma istotny wpływ na układ immunologiczny żywiciela poprzez rozkładanie: immunoglobulin IgG, fragmentu C3 dopełniacza oraz receptorów powierzchniowych jednojądrzastych krwinek białych i w efekcie hamowanie ich proliferacji. Większość dostępnych publikacji traktuje jednak zagadnienia immunosupresyjnego wpływu hypodermin i ich immunogenności oddzielnie i nie daje odpowiedzi odnośnie do sumarycznego efektu tych oddziaływań. W badaniach własnych (7) wykazano szybsze pojawianie się swoistych przeciwciał i wyższe ich miana u królików immunizowanych antygenem, w którym aktywność enzymatyczna tworzących go hypodermin została zablokowana, niż u królików immunizowanych aktywnymi enzymatycznie hypoderminami. Należy zaznaczyć, że różnice wyników uzyskanych w obu grupach były wysoce istotne statystycznie. Stwierdzono również, że surowice królików immunizowanych antygenem *H. bovis* wpływały neutralizująco na aktywność enzymatyczną proteaz zawartych w tym antygenie.

W świetle obecnych danych wydaje się, że prowadzone w licznych ośrodkach naukowych badania nad właściwościami enzymów proteolitycznych larw gźów bydłych dają nadzieję na skonstruowanie skutecznej szczepionki.

## Piśmiennictwo

1. Baron R. W., Colwell D. D.: Enhanced resistance to cattle grub infestation (*Hypoderma lineatum* de Vill.) in calves immunized with purified hypodermin A, B and C plus monophosphoryl lipid A (MPL). *Vet. Parasitol.* 1991, 38, 185-197.
2. Baron R. W., Weintraub J.: Immunization of cattle against hypodermatitis (*Hypoderma lineatum* (de Vill.) and *H. bovis* (L.)) using *H. lineatum* antigens. *Vet. Parasitol.* 1986, 21, 43-50.
3. Baron R. W., Weintraub J.: Lymphocyte responsiveness in cattle previously infested and uninfested with *Hypoderma lineatum* (de Vill.) and *H. bovis* (L.) (Diptera: Oestridae). *Vet. Parasitol.* 1987, 24, 285-296.
4. Caringella M. P., Scaltrito D., Daniele R., Puccini A., Giangaspero A.: *Hypoderma* infection in cattle. Study of antibody kinetics. *Ob. Doc. Vet.* 1995, 16, 69-72.
5. Cencek T.: Ocena metod serologicznych w rozpoznawaniu hypodermozji bydła. Praca dokt. PIWet, Puławy 1994.
6. Cencek T.: Thermostability of *Hypoderma bovis* antigen. *Bull. Vet. Inst. Puławy* 2003, 47, 121-131.
7. Cencek T.: Wpływ aktywności enzymatycznej białek zawartych w antygenie *Hypoderma bovis* na jego immunogenność. Praca hab. PIWet-PIB, Puławy 2006.
8. Chabaudie N., Boulard C.: In vitro and ex vivo responses of bovine lymphocytes to hypodermin C, an enzyme secreted by *Hypoderma lineatum* (Insecta Oestridae). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1993, 36, 153-162.
9. Chabaudie N., Villejoubert C., Boulard C.: The response of cattle vaccinated with hypodermin A to a natural infestation of *Hypoderma bovis* and *Hypoderma lineatum*. *Int. J. Parasitol.* 1991, 21, 859-862.
10. Evstaf'ev M. N.: Rol immuniteta pri gipodermatoze krupnogo rogatego skota. *Parazitologija* 1980, 14, 197-205.
11. Fisher W. F., Pruett J. H., Howard V. M., Scholl P. J.: Antigen-specific lymphocyte proliferative responses in vaccinated and *Hypoderma lineatum*-infested calves. *Vet. Parasitol.* 1991, 40, 135-145.
12. Gingrich R. E.: Differentiation of resistance in cattle to larval *Hypoderma lineatum*. *Vet. Parasitol.* 1980, 7, 243-254.
13. Lecroisey A., Boulard C., Keil B.: Chemical and enzymatic characterization of the collagenase from the insect *Hypoderma lineatum*. *Eur. J. Biochem.* 1980, 101, 385-393.
14. Lecroisey A., Tong N. T., Keil B.: Hypodermin B, a trypsin-related enzyme from the insect *Hypoderma lineatum*. Comparison with hypodermin A and *Hypoderma* collagenase, two serine proteinases from the same source. *Eur. J. Biochem.* 1983, 134, 261-267.
15. Martinez Moreno F. J., Wassall D. A., Becerra Martell C., Hernandez Rodriguez S.: Comparison of the use of secretory and somatic antigens in an ELISA for the serodiagnosis of hypodermosis. *Vet. Parasitol.* 1994, 52, 321-329.
16. Martinez Moreno J., Reina D., Navarrete I., Jimenez V., Martinez Moreno A., Hernandez S.: Epidemiological survey of hypodermosis in western Spain. *Vet. Rec.* 1996, 139, 340-343.
17. Otranto D.: The immunology of myiasis: parasite survival and host defense strategies. *Trends Parasitol.* 2001, 17, 176-182.
18. Pruett J. H., Fisher W. F., Temeyer K. B.: Evaluation of purified proteins of *Hypoderma lineatum* as candidate immunogens for a vaccine against bovine hypodermomyiasis. *Southwest. Entomol.* 1989, 14, 363-373.
19. Pruett J. H., Stromberg P.: Effects of adjuvants on bovine humoral and cellular responses to hypodermin A. *Vet. Parasitol.* 1995, 58, 143-153.
20. Regimbeau J. M., Malassagne B., Taboit F., Boulard C., Houssin D., Weill B.: Mise au point d'un modèle de coeur isolé perfusé. Application à l'étude de l'hypodermine A dans la prévention du rejet suraigu xénogénique. *Ann. Chir.* 2001, 126, 1007-1015.
21. Tong N. T., Imhoff J. M., Lecroisey A., Keil B.: Hypodermin A, a trypsin-like neutral proteinase from the insect *Hypoderma lineatum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1981, 658, 209-219.
22. Ziomko I., Cencek T.: Prevalence of warbles in enzootic hypodermosis foci in eastern Poland. *Acta Parasitol.* 1994, 39, 208-210.

Adres autora: doc. dr hab. Tomasz Cencek, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: tcencek@piwet.pulawy.pl