

УДК: 571.27

DOI:

Поступила в редакцию: 11.06.2016

Принята в печать: 27.02.2017

Для цитирования:

Гришина Е. А. Исследование показателей апоптоза лимфоцитов крови животных при гельминтозах // Российский паразитологический журнал. – 2017. – Т.40.- Вып. 2. – С.

For citation:

Grishina E.A. Study of markers of blood lymphocytes apoptosis in animals at helminthiasis // Russian Journal of Parasitology, 2017, V.40, Iss.2, pp.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЖИВОТНЫХ ПРИ ГЕЛЬМИНТОЗАХ

Гришина Е. А.

ГБОУ ДПО Российская медицинская академия последипломного образования Минздрава России

125993, г. Москва, ул. Баррикадная, д.2/1, стр.1, gelana2010@yandex.ru

Реферат

Изучение роли апоптоза клеток крови позволяет наиболее точно определить механизмы развития иммунопатологии в целом, и иммуносупрессии – в частности. Целью исследований было изучить морфологические и молекулярные показатели апоптоза лимфоцитов периферической крови при трихоцефалезе мышей и пассалурозе кроликов для определения возможных механизмов развития вторичной иммунодепрессии при хронизации гельминтозного процесса.

Материалы и методы. В ходе эксперимента животные были подразделены на следующие группы: 1) интактные мыши (контрольная группа) – 15 шт.; 2) интактные кролики (контрольная группа) – 10 шт.; 3) мыши, зараженные *Trichocephalus muris* (Schrank, 1788) - 60 шт.; 4) кролики, зараженные *Passalurus ambiguus* (Rudolphi, 1819) – 30 шт.

Для приготовления мазков через 1, 2, 3 и 6, 7, 8 недель после заражения служила кровь из хвостовой вены мышей и из ушной вены кроликов. Определение лейкоцитарной формулы и исследование морфологических признаков апоптоза проводили методом световой микроскопии мазков крови, окрашенных по Романовскому [2].

Для молекулярных исследований мононуклеарные лейкоциты выделяли из цельной венозной крови путем центрифугирования на градиенте плотности Ficoll-Paque (=1,077 г/см³, «Pharmacia», Швеция) [12]. Концентрацию проапоптотического белка caspase-3 и антиапоптотического белка Bcl-2 определяли в лизате лимфоцитов методом иммуноферментного анализа с использованием наборов Human Caspase-3 instant ELISA и Human Bcl-2 ELISA фирмы «Bender MedSystems GmbH» (Вена, Австрия).

Результаты и обсуждение. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что при заражении животных гельминтами и в процессе хронизации гельминтозных процессов на протяжении 8 недель происходят достоверно значимые изменения в общем числе лейкоцитов, общем количестве лимфоцитов и количестве лимфоцитов с морфологическими признаками апоптоза, а также в уровнях проапоптотического белка caspase-3 и антиапоптотического белка Bcl-2.

В результате проведенного комплексного исследования достоверно показано, что у животных от начала заражения до хронической стадии гельминтозного процесса наблюдается постепенное и значительное повышение апоптотической активности лимфоцитов на рецепторном и клеточном уровнях. Это проявляется в повышении содержания количества лимфоцитов с морфологическими признаками апоптоза на фоне увеличения уровня проапоптотического белка caspase-3 и снижения уровня антиапоптотического белка Bcl-2.

Ключевые слова: гельминтозы, иммунитет, иммунодепрессия, апоптоз лимфоцитов, индукторы и ингибиторы апоптоза.

Введение

Изучение особенностей апоптоза клеток крови при развитии вторичной иммунодепрессии при гельминтозах в доступной литературе крайне немногочисленны и фрагментарны [3]. Уже установлено, что метаболиты некоторых гельминтов обуславливают апоптотическую активность как в соматических, так и в генеративных клетках хозяина [1, 5, 15]. Выявленные факты индукции апоптоза в иммунокомпетентных клетках совсем малочисленны, но еще более интересны, т.к. позволяют наиболее точно определить механизмы развития иммуносупрессии при хронизации гельминтозного процесса.

S.K. Lundy et al. [15] и др. [8, 10, 17] показали, что апоптоз CD4+ Т-лимфоцитов селезенки максимально возрастает в острую стадию шистосомоза (8 нед после заражения) и снижается в хроническую стадию заболевания (16 нед после заражения).

При совместной культивации Т- лимфоцитов человека с живыми половозрелыми *Necator americanus*, а также с белковыми секреторно-экскреторными продуктами (СЭП) этого паразита, S.C. Chow et al. [6] установили, что происходит повышение уровня фрагментации ДНК этих клеток и рост числа апоптотических клеток среди них. Изменения находились в линейной зависимости от числа паразитов, концентрации белковых продуктов гельминтов и возрастали при их увеличении [6].

В 2004 г. P. Tato et al. [18] установили, что метацисты и цисты свиных цепней секретируют цистеин-протеазу, которая *in vitro* вызывает в CD4+ Т-лимфоцитах человека типичные для апоптоза нарушения (целостность клеточной мембраны, перетяжки и фрагментация ядра, хроматиновая конденсация, появление апоптотических тел и исчезновение микротрубочек).

Как известно, основными фигурантами эффекторной стадии апоптоза являются цистеиновые протеазы (каспазы). Каспазы расщепляют белки, являющиеся мишенями для их действия, весьма характерным для апоптоза образом – в местах расположения аспарагиновых оснований. К таким эффекторным каспазам – исполнителям апоптоза, относится каспаза-3. Одна из основных функций эффекторных каспаз заключается в прямом и опосредованном разрушении клеточных структур. Гидролизу подвергаются белки ядерной мембраны, разрушается цитоскелет, расщепляются белки, регулирующие клеточную адгезию.

В настоящее время каспазу-3 рассматривают как фермент, принадлежащий к группе апоптотических каспаз, передающих и реализующих сигнал клеточной гибели. Однако сейчас становится ясным, что некоторые протеиназы - не просто ферменты деградации, но и строго регулируемые сигнальные молекулы, контролирующие критические биологические процессы путем специфического ограниченного протеолиза. Мнение о том, что каспазы - не только убийцы [14], находит подтверждение в результатах, полученных в последние годы и свидетельствующих о том, что каспазы участвуют в различных неапоптотических клеточных физиологических процессах.

Так стало известно, что каспаза-3 принимает участие в регуляции клеточного цикла [19, 7] процессинге цитокинов [20], дифференцировке миоцитов [11]

пролиферации Т- лимфоцитов [4, 13]. Иными словами, каспаза-3 имеет плеiotропные функции [9, 16], далеко не ограничивающиеся участием в реализации внутриклеточной апоптотической программы.

Другой важной функцией эффекторных каспаз является инактивация белков, блокирующих апоптоз. К такой группе ингибиторов апоптоза принадлежат антиапоптотические белки семейства Bcl-2. Регуляция апоптоза белками семейства Bcl-2 осуществляется преимущественно на отрезке митохондриального сигнального пути, так как сигналы от рецепторов смерти в основном обходят контроль со стороны Bcl-2.

Предполагается, что для регуляции ответа клетки на сигналы смерти, имеет значение соотношение про- и антиапоптотических белков.

Целью исследования было изучить цитологические и молекулярные показатели апоптоза лимфоцитов периферической крови при трихоцефалезе мышей и пассалурозе кроликов для определения возможных механизмов развития вторичной иммунодепрессии.

Материалы и методы

В эксперименте использовались 75 белых мышей со средним весом тела 18-20 г и 40 кроликов со средним весом 2,5 кг. Мыши и кролики содержались в стандартных условиях вивария Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И.Скрябина. Животные были подразделены на следующие экспериментальные группы:

1. Интактные мыши (контрольная группа) – 15 шт.
2. Интактные кролики (контрольная группа) – 10 шт.
3. Мыши, зараженные *Trichocephalus muris* (Schrank, 1788) - 60 шт.
4. Кролики, зараженные *Passalurus ambiguus* (Rudolphi, 1819) – 30 шт.

В течение эксперимента мышей декапитировали через 1, 2, 3 и 6, 7, 8 недель после заражения под рауш- наркозом. Для приготовления мазков служила кровь из хвостовой вены мышей. У кроликов брали кровь из ушной вены без декапитации. Определение лейкоцитарной формулы и исследование морфологических признаков апоптоза проводили методом световой микроскопии мазков крови, окрашенных по Романовскому [2].

Лейкоцитарную формулу определяли на основании дифференциального подсчета 200 лейкоцитов в окрашенном мазке крови и последующего вычисления их процентного содержания.

Для морфологического исследования апоптоза готовили мазки крови сразу после получения и в полученных мазках подсчитывали количество лимфоцитов с признаками апоптоза разной степени в процентах от доли лимфоцитов в общей лейкоцитарной формуле. Морфологические изменения лимфоцитов, характерные для апоптоза (уменьшение размеров клеток и их вакуолизация, уменьшение ядер с конденсацией и грануляцией хроматина), оценивали с помощью микроскопа МИКМЕД –2.

Для молекулярных исследований мононуклеарные лейкоциты выделяли из цельной венозной крови путем центрифугирования на градиенте плотности Ficoll-Paque (=1,077 г/см³, «Pharmacia», Швеция) [12]. Концентрацию проапоптотического белка caspase-3 и антиапоптотического белка Bcl-2 определяли в лизате лимфоцитов методом иммуноферментного анализа с использованием наборов Human Caspase-3 instant ELISA и Human Bcl-2 ELISA фирмы «Bender MedSystems GmbH» (Вена, Австрия). Исследование проводили в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Результаты ИФА оценивали на автоматическом микропланшетном спектрофотометре «Epoch BioTek Instruments» (США) при длине волны 450 нм.

Полученные данные были статистически обработаны с использованием критерия Стьюдента и с помощью программ STATISTICA (версия 8.0) для Windows и SPSS (версия 11.0).

Результаты и обсуждение

В ходе эксперимента нами было установлено изменение цитологических и молекулярных показателей периферической крови в процессе хронизации трихоцефалеза мышей и пассалуроза кроликов. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что при заражении животных геогельминтами и в процессе развития гельминтозных процессов на протяжении 8 недель происходят характерные изменения в общем числе лейкоцитов, общем количестве лимфоцитов и количестве лимфоцитов с морфологическими признаками апоптоза, а также в уровнях проапоптотического белка caspase-3 и антиапоптотического белка Bcl-2. (Табл.1, 2).

Таблица 1

Изменение цитологических и молекулярных показателей апоптоза в периферической крови мышей в процессе развития трихоцефалеза

Клеточные молекулярные показатели крови мышей	Контрольная группа мышей n=	Экспериментальная группа мышей, зараженных трихоцефалезом в разные сроки (нед) развития инвазии n=60					
		1 нед n=	2 нед n=	3 нед n=	6 нед n=	7 нед n=	8 нед n=
Общее число лейкоцитов (*10 ⁹ /л) ±m	9,5 0,338	11, 0,324	12, 0,136	13, 0,136	11, ± 0,309	9, 0,193	7,4 0,116
Количество лимфоцитов (*10 ⁹ /л) ±m	6,5 0,318	6,8 0,338	8,7 0,544	7,2 0,421	5, 0,238	5, 0,108	4,7 0,158
Количество лимфоцитов с признаками апоптоза (*10 ⁹ /л) ±m	1,0 0,038	2,2 0,038	3,4 0,068	7,3 0,064	9, 0,064	10, ± 0,042	10, 0,076
Уровень caspase-3 (мкг/мл)	2,4 0,021	3,5 0,019	4,4 0,017	5,6 0,013	7, 0,030	8, 0,034	9,6 0,042
Уровень Bcl-2 (нг/мл)	8,6 0,030	7,4 0,024	6,2 0,021	5,8 0,018	3, 0,014	3, 0,009	2,4 0,006

Таблица 2

Изменение цитологических и молекулярных показателей апоптоза в периферической крови кроликов в процессе развития пассалуроза

Клеточные молекулярные показатели крови кроликов	Контрольная группа кроликов n=	Экспериментальная группа кроликов, зараженных пассалурозом в разные сроки (нед) развития инвазии n=30					
		1 нед n=	2 нед n=	3 нед n=	6 нед n=	7 нед n=	8 нед n=
Общее число лейкоцитов (*10 ⁹ /л) ±m	7,61 0,318	9, 0,318	10, 0,132	12, 0,141	11, ± 0,320	10, ± 0,188	6,5 0,146
Количество лимфоцитов (*10 ⁹ /л) ±m	4,50 0,158	6, 0,316	5,7 0,364	4,2 0,371	3, 0,298	2, 0,138	1,7 0,218
Количество лимфоцитов с признаками апоптоза	59 % 0,31	74 % 0,015	54 % 0,023	34 % 0,034	28 % 0,041	11 % 0,037	84 % 0,048

(*10 ⁹ /л) ±m							
Уровень caspase-3 (мкг/мл)	3,87±0,030	4,027	4,9019	5,2034	6,026	7,039	9,5041
Уровень Vcl (нг/мл)	10,0041	9,036	8,4025	7,3018	5,013	4,011	3,2009

В мазках периферической крови мышей, зараженных трихоцефалезом, а также в мазках периферической крови кроликов, зараженных пассалурозом, уже на первых неделях после заражения, было зафиксировано увеличение общего числа лейкоцитов по сравнению с контрольными группами (контроль: $9,51 \pm 0,338$, трихоцефалез: $11,35 \pm 0,324$; контроль: $7,61 \pm 0,318$, пассалуроз: $9,25 \pm 0,318$ (*10⁹/л) ±m) и резкое снижение числа лейкоцитов к 6-ой-8-ой неделе после заражения, что явно свидетельствует о развитии иммунодепрессии: (трихоцефалез: до $7,43 \pm 0,116$; пассалуроз: до $6,53 \pm 0,146$ (*10⁹/л) ±m) . При этом происходит уменьшение общего количества лимфоцитов (контроль: $6,50 \pm 0,318$, трихоцефалез: до $4,78 \pm 0,158$; контроль: $4,50 \pm 0,158$, пассалуроз: до $1,78 \pm 0,218$ (*10⁹/л) ±m)); и повышение количества лимфоцитов с морфологическими признаками апоптоза (контроль: $1,05 \pm 0,038$, трихоцефалез: $10,30 \pm 0,076$; контроль: $0,31 \pm 0,013$, пассалуроз: $1,50 \pm 0,048$ (*10⁹/л) ±m). У таких клеток наблюдалась деградация ядерного материала, происходила грануляция хроматина и его фрагментация на несколько частей.

Количество caspase-3 антиапоптотического белка в контрольной группе мышей составило $2,41 \pm 0,021$ мкг/мл. Развитие трихоцефалеза на первых этапах (1-3 нед) уже приводило к значимым изменениям исследуемого параметра от $3,53 \pm 0,019$ до $5,61 \pm 0,013$ мкг/мл, однако в условиях хронизации гельминтозного процесса наблюдалось более значительное увеличение уровня проапоптотического белка – от $7,39 \pm 0,030$ до $9,61 \pm 0,042$ мкг/мл ($p < 0,05$) (табл. 1).

Количество caspase-3 антиапоптотического белка в контрольной группе кроликов составило $3,87 \pm 0,030$ мкг/мл. Развитие пассалуроза на первых этапах (1-3 нед) также приводило к значимым изменениям исследуемого параметра от $4,41 \pm 0,027$ до $5,27 \pm 0,034$ мкг/мл, а в условиях хронизации гельминтозного процесса наблюдалось еще более значительное увеличение уровня проапоптотического белка – от $6,83 \pm 0,026$ до $9,53 \pm 0,041$ мкг/мл ($p < 0,05$) (табл. 2).

Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что в организме в условиях хронического трихоцефалеза и пассалуроза на иммунокомпетентные клетки может оказывать токсическое действие не столько сами гельминты, а их активные метаболиты, в частности активные формы кислорода, являющиеся следствием оксидативного стресса.

Уровень Vcl-2 в лимфоцитах периферической крови контрольной группы мышей составил $8,63 \pm 0,030$ нг/мл. Развитие гельминтозного процесса - трихоцефалеза и его хронизация приводили к достоверному снижению количества антиапоптотического белка – от $7,40 \pm 0,024$ до $2,46 \pm 0,006$ нг/мл (табл. 1).

Уровень Vcl-2 в лимфоцитах периферической крови контрольной группы кроликов составил $10,01 \pm 0,041$ нг/мл. Развитие пассалуроза и его хронизация приводили к достоверному снижению количества антиапоптотического белка – от $9,31 \pm 0,036$ до $3,28 \pm 0,009$ нг/мл (табл. 2).

Заключение

Таким образом, длительное развитие инвазионного процесса вызывает активацию проапоптотического белка caspase-3 и снижение экспрессии Vcl-2 в лимфоцитах животных. Выявленные нами данные свидетельствуют о том, что в условиях возможного окислительного стресса наблюдается индукция апоптоза лимфоцитов, что выражается в значительном увеличении уровня caspase-3, повышении доли клеток с

морфологическими признаками апоптоза и снижении уровня антиапоптотического белка Bcl-2.

В результате проведенного комплексного исследования достоверно показано, что у животных, находящихся в хронической стадии гельминтозного процесса, наблюдается повышенная апоптотическая активность лимфоцитов на рецепторном и клеточном уровнях, проявляющаяся в повышении содержания лимфоцитов с морфологическими признаками апоптоза на фоне увеличения уровня проапоптотического белка caspase-3 и снижения уровня антиапоптотического белка Bcl-2.

Литература

1. Бекиш В.Я., Дурнев А.Д. Генотоксическое и цито-токсическое воздействия белковых соматических продуктов гельминтов на лимфоциты крови доноров *in vitro* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2004. - Т. 138, № 8. - С. 198-201.
2. Рябыкина Н. В. Исследование апоптоза клеток белой крови и изменение лейкоцитарной формулы у старых самцов мышей при действии гипогидратационного стресса и α -токоферолацетата // Молодой ученый. — 2010. — №12. Т.1. — С. 57-59.
3. Фильченков, А.А. Апоптоз и рак / А.А. Фильченков, Р.С. Стойка // Киев: Морион. 1999. - 184 с.
4. Ярилин А.А. Иммунология: учебник. 2010. - 752 с.: ил.
5. Alam M. S., Chowdhury M. A. Z., Khaliq Q. A., Yasmin S. Stability analysis for seed yield and its components in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Annals of Bangladesh Agriculture*, 1999, no. 9, pp. 43-48.
6. Bekish V.J. The alterations in genetic apparatus of somatic and generative cells of the host caused by helminthes metabolites. *Wiadomosci Parazytologiczne (Poland)*, 2001, vol. 47, no. 4, pp. 891-896.
7. Chow S.C., Brown A., Pritchard D. The human hookworm pathogen *Necator americanus* induces apoptosis in T lymphocytes. *Parasite Immunology*, 2000, vol. 22, pp. 29-37.
8. Eymin B., Claverie P. Salon C. PI4arf Triggers G2 Arrest through. *Oncogene*, 1999, vol. 18, pp. 1411-1418.
9. Estaquier J., Marguerite M., Sahuc F. Interleukin 10-mediated T cell apoptosis during the T helper type 2 cytokine response in murine *Schistosoma mansoni* parasite infection. *Eur. Cytokine Netw.*, 1997, vol. 8, pp. 153-160.
10. Fadeel, B., Orrenius S., Zhivotovsky B. Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? // *Biochem Biophys Res Commun.*, 1999, vol. 266, no.3, pp. 699-717.
11. Fallon P.G., Smith P., Dunne D.W. Type 1 type 2 cytokine producing mouse CD4+ and CD8+ cells in acute *Schistosoma mansoni* infection. *Eur. J. Immunol.*, 1998, vol. 28, pp. 1408-1416.
12. Fernando H.C., Luketich J.D., Christie N.A., Ikramuddin S., Schauer P.R. Outcomes of laparoscopic Toupet compared to laparoscopic Nissen fundoplication. *Surg. Endosc.*, 2002, vol.1, pp. 905-908.
13. Gondal, M.A., Laser photoacoustic spectrometer for remote monitoring of atmospheric pollutants, *Applied Optics*, 1997, vol. 36, no. 15 ISSN: 1559-128X (print) ISSN: 2155-3165 (online)
14. Kennedy P. M., Lowry, J. B., Conlan, L. L., Isolation of grass cell walls as neutral detergent fibre increases their fermentability for rumen micro-organisms. *J. Sci. Food Agric.*, 1999, vol. 79, no. 4, pp. 544-548.
15. Los M., Stroh C., Jänicke R.U. Caspases: more than just killers? *Trends Immunol.*, 2001, vol. 22, no. 1, pp. 31-34.

16. Lundy S.K., Lerman S.P., Boros D.L. Soluble egg antigen-stimulated T helper lymphocyte apoptosis and evidence for cell death mediated by FasL+ T and B cells during murine *Schistosoma mansoni* infection. *Infection and Immunity*, 2001, vol. 69, no. 1, pp. 271-280.
17. Robertson J.D., Orrenius S., Zhivotovsky B.J. *Struct. Biol.*, 2000, no.129, pp. 346–358.
18. Rumbley C.A., Zekavat S.A., Sugaya H. The schistosome granuloma: characterization of lymphocyte migration, activation and cytokine production. *J. Immunol.* 1998, vol. 161, pp. 4129- 4137.
19. Tato P., Fernandez A.M., Solano S. A cysteine protease from *Taenia solium* metacestodes induce apoptosis in human CD4+ T-cells. *Parasitol. Res.*, 2004, vol. 92, no. 3, pp. 197-204.
20. Zhou D., Lambert, S., Malen P.L., Carpenter S., Boland L.M., Bennett V. J. *Cell Biol.*, 1998, no. 143, pp.1295-1304.
21. Zhang J, Rosenberg HF, Nei M. Positive Darwinian selection after gene duplication in primate ribonuclease genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 1998, no. 95, pp. 3708-3713.

References:

1. Bekish V.Ya., Durnev A.D. In vitro genotoxic and cytotoxic effects of protein somatic Products from helminths on donor blood. *Byulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny [Bull. exp. biol. and med.]*, 2004, vol. 138, no. 8, pp. 198-201. (In Russian)
2. Ryabykina N. V. The study of apoptosis of white blood cells and changes in leukocyte formula in older male mice under the influence of hypohydration stress and α -tocopherol acetate. *Molodoy uchenyj [Young Scientist]*, 2010, no.12, vol.1, pp. 57-59. (In Russian)
3. Fil'chenkov A.A., Stoyka R.S. *Apoptoz i rak [Apoptosis in cancer]*. Kiev, Morion, 1999. 184 p. (In Russian)
4. Yarilin A.A. *Immunologiya: uchebnik [Immunology. Textbook]*, 2010. 752 p. (In Russian)
5. Alam M. S., Chowdhury M. A. Z., Khaliq Q. A., Yasmin S. Stability analysis for seed yield and its components in soybean (*Glycine max (L.) Merrill*). *Annals of Bangladesh Agriculture*, 1999, no. 9, pp. 43-48.
6. Bekish V.J. The alterations in genetic apparatus of somatic and generative cells of the host caused by helminthes metabolites. *Wiadomosci Parazytologiczne (Poland)*, 2001, vol. 47, no. 4, pp. 891-896.
7. Chow S.C., Brown A., Pritchard D. The human hookworm pathogen *Necator americanus* induces apoptosis in T lymphocytes. *Parasite Immunology*, 2000, vol. 22, pp. 29-37.
8. Eymin B., Claverie P. Salon C. PI4arf Triggers G2 Arrest through. *Oncogene*, 1999, vol. 18, pp. 1411-1418.
9. Estaquier J., Marguerite M., Sahuc F. Interleukin 10-mediated T cell apoptosis during the T helper type 2 cytokine response in murine *Schistosoma mansoni* parasite infection. *Eur. Cytokine Netw.*, 1997, vol. 8, pp. 153-160.
10. Fadeel, B., Orrenius S., Zhivotovsky B. Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony?" *Biochem Biophys Res Commun.*, 1999, vol. 266, no.3, pp. 699-717.

11. Fallon P.G., Smith P., Dunne D.W. Type 1 type 2 cytokine producing mouse CD4+ and CD8+ cells in acute *Schistosoma mansoni* infection. *Eur. J. Immunol.*, 1998, vol. 28, pp. 1408-1416.
12. Fernando H.C., Luketich J.D., Christie N.A., Ikramuddin S., Schauer P.R. Outcomes of laparoscopic Toupet compared to laparoscopic Nissen fundoplication. *Surg. Endosc.*, 2002, vol.1, pp. 905-908.
13. Gondal, M.A., Laser photoacoustic spectrometer for remote monitoring of atmospheric pollutants, *Applied Optics*, 1997, vol. 36, no. 15ISSN: 1559-128X (print) ISSN: 2155-3165 (online)
14. Kennedy P. M., Lowry, J. B., Conlan, L. L., Isolation of grass cell walls as neutral detergent fibre increases their fermentability for rumen micro-organisms. *J. Sci. Food Agric.*, 1999, vol. 79, no. 4, pp. 544-548.
15. Los M., Stroh C., Jänicke R.U. Caspases: more than just killers? *Trends Immunol.*, 2001, vol. 22, no. 1, pp. 31-34.
16. Lundy S.K., Lerman S.P., Boros D.L. Soluble egg antigen-stimulated T helper lymphocyte apoptosis and evidence for cell death mediated by FasL+ T and B cells during murine *Schistosoma mansoni* infection. *Infection and Immunity*, 2001, vol. 69, no. 1, pp. 271-280.
17. Robertson J.D., Orrenius S., Zhivotovsky B.J. *Struct. Biol.*, 2000, no.129, pp. 346–358.
18. Rumbley C.A., Zekavat S.A., Sugaya H. The schistosome granulema: characterization of lymphocyte migration, activation and cytokine production. *J. Immunol.* 1998, vol. 161, pp. 4129- 4137.
19. Tato P., Fernandez A.M., Solano S. A cysteine protease from *Taenia solium* metacestodes induce apoptosis in human CD4+ T-cells. *Parasitol. Res.*, 2004, vol. 92, no. 3, pp. 197-204.
20. Zhou D., Lambert, S., Malen P.L., Carpenter S., Boland L.M., Bennett V. J. *Cell Biol.*, 1998, no. 143, pp.1295-1304.
21. Zhang J, Rosenberg HF, Nei M. Positive Darwinian selection after gene duplication in primate ribonuclease genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 1998, no. 95, pp. 3708-3713.

Russian Journal of Parasitology, 2017, V.40, Iss.2

DOI:

Received: 11.06.2016

Accepted: 27.02.2017

STUDY OF MARKERS OF BLOOD LYMPHOCYTES APOPTOSIS IN ANIMALS AT HELMINTHIASES

Grishina E.A.

Medical Academy of Postgraduate Education, Ministry of Health of the Russian Federation, 125993 Moscow, Barrikadnaya St. 2/1, Build. 1, e-mail: gelana2010@yandex.ru

Abstract

Studying the role of apoptosis of blood cells allows to determine more precisely the mechanisms of immunopathology in general, and immunosuppression - in particular. The aim of that research was to study morphological and molecular indicators of apoptosis of peripheral blood lymphocytes in mice infected with *Trichocephalus muris* and rabbits infected with *Passalurus ambiguus* to determine possible mechanisms of secondary immunosuppression development under chronisation of helminthiasis.

Materials and methods. During the experiment, the animals were divided into the following groups: 1) intact mice (control group) - 15 ind.; 2) intact rabbits (control group) - 10 ind.; 3) mice infected with *Trichocephalus muris* (Schrank, 1788) – 60 ind.; 4) rabbits infected with *Passalurus ambiguus* (Rudolphi, 1819) - 30 ind. Blood from the tail vein of mice, and the ear vein of rabbits was used to prepare smears 1, 2, 3, 6, 7, 8 weeks after infestation. Light microscopy of blood smears stained by Romanovsky's method [2] was applied for leucogram determination and investigation of morphological indicators of apoptosis. For molecular studies, mononuclear leukocytes were isolated from venous whole blood by density gradient centrifugation using Ficoll-Paque media (= 1,077 g / cm³, «Pharmacia», Sweden) [12]. The concentration of the pro-apoptotic protein caspase-3 and anti-apoptotic protein Bcl-2 was determined in lysates of lymphocytes by ELISA using kits Human Caspase-3 instant ELISA and the Human Bcl-2 ELISA of the company «Bender MedSystems GmbH» (Vienna, Austria).

Results and discussion. The analysis of obtained data shows that at helminth infection of animals and under chronisation of helminthiasis, statistically significant changes occur within 8 weeks in the total number of leukocytes, the total number of lymphocytes and lymphocytes with morphological signs of apoptosis, as well as in pro-apoptotic protein caspase-3 and anti-apoptotic Bcl-2 protein.

This comprehensive study convincingly shown that a gradual and significant increase in apoptotic activity of lymphocytes on the receptor and cellular levels is observed in animals in the period from the beginning of infestation up to the chronic stage of helminthiasis. This is manifested in the increased number of lymphocytes with morphological features of apoptosis against the background of the increased level of pro-apoptotic protein caspase-3, and the reduced level of anti-apoptotic protein Bcl-2.

Key words: helminthiasis, immunity, immunosuppression, apoptosis of lymphocytes, inductors and inhibitors of apoptosis.

© 2017 The Author(s). Published by All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants named after K.I. Skryabin. This is an open access article under the Agreement of 02.07.2014 (Russian Science Citation Index (RSCI)http://elibrary.ru/projects/citation/cit_index.asp) and the Agreement of 12.06.2014 (CABI.org/Human Sciences section: <http://www.cabi.org/Uploads/CABI/publishing/fulltext-products/cabi-fulltext-material-from-journals-by-subject-area.pdf>)