

На правах рукописи

**ГРИШИНА
Елена Анатольевна**

**ИММУНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ
ПАТОГЕНЕЗА КИШЕЧНЫХ НЕМАТОДОЗОВ**

03.02.11 – Паразитология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России»

Научный консультант:

Довгалёв Анатолий Семёнович

доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач РФ, заведующий кафедрой тропических, паразитарных болезней и дезинфекционного дела ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России»

Официальные оппоненты:

Новик Тамара Самуиловна

доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной терапии Всероссийского научно-исследовательского института фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений - филиала ФГБНУ «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И.Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН»

Кутырев Иван Александрович

доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории паразитологии и экологии гидробионтов ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения РАН»

Извекова Галина Игоревна

доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории экологической паразитологии ФГБУН «Институт биологии внутренних вод им.И.Д. Папанина РАН»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» (ФГБОУ ВО КемГМУ Минздрава России)

Защита состоится «___» _____ **2019 г.** в _____ ч. на заседании диссертационного совета Д 002.213.04 при ФГБУН «**Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н.Северцова РАН** по адресу: 119071, г.Москва, Ленинский проспект, д.33. Тел/факс:+7(495)952-73-24,e-mail: admin@sevin.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Отделения биологических наук РАН по адресу: 119071, г. Москва, Ленинский пр-т, д.33, на сайте ФГБУН ИПЭЭ РАН по адресу: <http://www.sev-in.ru/> и на сайте ВАК Минобрнауки РФ по адресу: <http://www.vak.minobrnauki.gov.ru/>.

Автореферат разослан «___» _____ **2019 г.**

Ученый секретарь диссертационного совета, к.б.н.

Т.А. Малютина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Физиологические основы становления паразитизма и функционирования паразитарных систем до сих пор недостаточно изучены, а проблема противопаразитарного иммунитета стоит в ряду одних из самых актуальных в современной биологии, медицине и ветеринарии. Это связано с широкой распространенностью гельминтозов [WHO, 2006, 2012], длительностью и тяжестью их течения, развитием и недостаточностью расшифрованных механизмов иммунных дисфункций, существующими трудностями в профилактике, диагностике и осложнениями при терапии.

Иммунитет при гельминтозах является уникальным примером эволюционной взаимной адаптации между паразитом и хозяином, в результате которой возбудители выработали не только многочисленные способы уклонения от защитной системы хозяина, но и различные механизмы манипуляции этой реакцией, которые обеспечивают стабильность паразитарной системы [Сергиев В.П., Филатов Н.Н., 2010 и др.]. Все имеющиеся научные данные свидетельствуют о таких особенностях иммунитета при гельминтозах как слабая напряженность, кратковременность, полиморфность и низкая специфичность. Поэтому его изучение представляет собой важное направление современной иммунологии и имеет общебиологическое значение.

Факторы патогенности паразита направлены на совместную эволюцию и сохранение паразита. Тем не менее, гельминты способны нарушать физиологию иммунной системы хозяина, продуцируя растворимые продукты, обладающие токсическим воздействием на иммунокомпетентные клетки и/или нарушающие их пролиферацию. Поэтому установление новых участвующих факторов, исследование регуляторных основ и дополнение существующих механизмов обеспечения существования одного организма внутри другого так важно, актуально и позволит в дальнейшем наиболее точно выбирать методы профилактики, диагностики, стратегию лечения этих заболеваний в медицинской и в ветеринарной практике.

В настоящее время научная литература располагает значительным теоретическим и экспериментальным материалом, характеризующим различные аспекты иммунной реакции хозяина на антигены гельминтов [Шуйкина Э. Е., 1987; Лейкина Е.С., 1987; Тумольская Н.И., 1992; Бережко В.К., 1996; Озерецковская Н.Н., 2000; Wilson M.S. et al., 2005; Tallima H. et al., 2017 и др.]. Однако остаются недостаточно изученными особенности проявления иммунопатологических реакций при гельминтозах, их зависимость от специфичности системы «паразит-хозяин». Выяснение этих вопросов позволит целенаправленно вести поиск путей повышения иммунореактивности животных и человека и создавать эффективные иммунопрофилактические и иммунодиагностические препараты.

Изучение роли окислительного стресса и апоптоза в развитии

патологии, участия про- и противовоспалительных цитокинов в иммунном и воспалительном ответе стало в последние годы одной из самых трудных и актуальных проблем в фундаментальной медико-биологической науке, поскольку эти факторы обеспечивают взаимодействие между различными типами клеток и стабильность тканей организма, а также определяют исход патологических процессов, что, несомненно, имеет огромное общемедицинское значение [Bilyu R., Stoika R.,2007; Dick S.A., Megeney L.A., 2013; Sulaiman A.A. et al.,2016; Liu Q. et al.,2017; Nono J.K. et al.,2017 и др.].

Дегельминтизация, как известно, не всегда приводит к полному восстановлению иммунного статуса. В лечении гельминтозов в настоящее время, как правило, используется моно - терапия антигельминтными препаратами, не учитывающая иммунные нарушения, вызванные инвазионным процессом. Поэтому усилия современной противопаразитарной терапии должны быть также направлены на коррекцию обще - патологических и иммунопатологических процессов с адекватной стимуляцией защитно-приспособительных реакций. Это позволит не только увеличить безопасность лечения, но и откорректировать дозу используемых противогельминтных средств, поэтому такие исследования также весьма актуальны и заслуживают особого внимания.

Практика показывает, что применение в медицинской и ветеринарной практике иммуно- модулирующих препаратов, которые нормализуют функции иммунной системы при гельминтозах, весьма ограничено [Ремизова С.Е., 2002; Архипов И.А., 2003, 2004; Никитина Т.Н., Авдеева Ж.И., 2006, 2007; Tallima H. et all., 2017 и др.]. Еще меньше имеется данных о необходимости использования в комплексе с антигельминтной терапией антиоксидантов [Фисинин В.И., Сурай П.Ф., 2011 и др.].

Таким образом, не снижающаяся заболеваемость животных и человека гельминтозами во всем мире, высокий риск развития осложненных острых и хронических форм болезни и перехода их в иммунопатологическую стадию, имеющиеся ограничения из-за токсичности стандартной терапии, выдвигают изучаемую проблему в число приоритетных и требуют установления новых дополнительных факторов и механизмов противогельминтного иммунитета.

Цель исследования

Установить роль малоизученных молекулярных и цитологических факторов в механизмах развития иммунных дисфункций при кишечных нематодозах животных и обосновать пути их коррекции комплексной терапией.

Задачи исследования

1. Провести оценку молекулярных показателей оксидативного стресса - продуктов окисления белков и липидов (АОРР, ПОЛ), баланса про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α), уровня про- и противо- апоптотических белков (Caspase-3, Bcl-2),

иммуноглобулинов (IgM, IgG, IgE, IgA), биохимических показателей крови (АсАТ, АлАТ, γ -ГТФ, ЩФ) на протяжении острой и хронической стадии кишечных гельминтозов.

2. Провести анализ количественных иммунологических сдвигов в формуле белой крови, морфологических признаков апоптоза лейкоцитов и микро - морфологических изменений в тканях и органах хозяина, свидетельствующих об иммунопатологии в острой и хронической стадиях кишечных гельминтозов.

3. Провести динамический контроль за показателями оксидативного стресса (АОРР, ПОЛ), балансом про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α), уровнем про- и противо- апоптотических белков (Caspase-3, Bcl-2), иммуноглобулинов (IgM, IgG, IgE, IgA), биохимических показателей крови (АсАТ, АлАТ, γ -ГТФ, ЩФ) при этиотропном и комбинированном лечении острой и хронической стадий кишечных гельминтозов.

4. Провести динамический контроль за количественными иммунологическими сдвигами в составе крови, за морфологическими признаками апоптоза лейкоцитов и микро- морфологическими изменениями в тканях и органах хозяина при этиотропном и комбинированном лечении острой и хронической стадий кишечных гельминтозов.

5. Провести корреляционный и регрессионный анализы по установлению взаимосвязей и их достоверности между всеми изучаемыми молекулярными и цитологическими параметрами для определения их роли в механизмах развития и регуляции иммунопатологии в острой и хронической стадиях кишечных гельминтозов;

6. Установить иницирующую роль, поэтапность активации, взаимозависимость, силу и достоверность связей между всеми молекулярными, цитологическими и гистологическими параметрами при развитии иммунопатологических процессов у хозяина на протяжении развития острой и хронической стадий кишечных гельминтозов.

7. Определить возможности современной антигельминтной моно - терапии и дать рекомендации по оптимизации и повышению её эффективности и безопасности за счет применения иммуно- модуляторов и антиоксидантов на основании выявленных изменений иммунного статуса и показателей оксидативного стресса.

Научная новизна

Впервые проведена динамическая комплексная оценка молекулярных, цитологических и гистологических показателей (оксидативного стресса, цитокинового статуса, уровня иммуноглобулинов, количественных показателей белой крови, структурных и функциональных показателей апоптоза лимфоцитов, особенностей биохимических и морфологических параметров тканей и органов) у экспериментальных животных при развитии кишечных нематодозов.

Впервые использована оценка взаимоотношений цитокинового профиля, количественного состава белой крови и показателей, характеризующих перекисные процессы и процессы запрограммированной гибели иммунокомпетентных клеток в организме, в установлении факта развития иммунопатологических реакций в острой и хронической стадиях гельминтозов.

Впервые проведен математический анализ и определены корреляционные связи между многочисленными параметрами патогенеза: продуктами ОС в сыворотке крови, параметрами цитокинового профиля, уровнем иммуноглобулинов, количеством фагоцитов, Т- и В-лимфоцитов и локальным уровнем молекулярных маркеров апоптоза в них, позволившие установить иницирующую роль, поэтапность активации, взаимозависимость этих показателей и уточнить механизмы иммунопатологии.

Впервые разработана научная концепция об иницирующей роли окислительного стресса в запуске иммунитета при гельминтозах, его связи с изменением цитокинового статуса, с процессом пролиферации лейкоцитов, сменой популяций иммуноглобулинов, запуском апоптоза иммунокомпетентных клеток, качественным и количественным изменением состава крови, с тканевой и органной патологией, приводящих к развитию иммунопатологических реакций (гиперчувствительности и иммуносупрессии) во время развития инвазий, позволившая установить недостающие звенья в представлениях о механизмах противогельминтного иммунитета и разработать практические рекомендации по изменению стратегии лечения гельминтозов.

Использованные новые подходы к контролю за состоянием больных животных при дегельминтизации позволили расширить и уточнить представления о механизмах терапевтического эффекта известных антигельминтных препаратов, а также предложить новую стратегию повышения безопасности этиотропной терапии в ветеринарной и медицинской практике за счет проведения комбинированного лечения, включающего одновременно иммуно- модуляцию и анти- оксидантную защиту.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты расширяют знания о взаимной адаптации в системе «паразит-хозяин» и позволяют на новом, более глубоком уровне определить особенности противогельминтного иммунитета и механизмы защиты кишечных нематод от иммунных реакций хозяина.

Теоретическая значимость данного исследования обусловлена тем, что разработана новая концепция в области иммунологии гельминтозов о механизмах развития иммунопатологии с участием в этом процессе малоизученных молекулярных и цитологических факторов.

Установлена сопряженность маркеров окислительного стресса (АОРР и ПОЛ) с уровнем про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1, IL-2, IL-4,

IL-5, IL-10, TNF- α) и их роль в запуске и развитии иммунологического ответа в острой и хронической фазе гельминтозов.

Выяснено, что в острой фазе гельминтозов повышение уровней провоспалительных цитокинов ассоциировано с усилением пролиферации Т- и В-лимфоцитов и эозинофилов, усилением продукции и сменой изотипов иммуноглобулинов с IgM и IgG на IgE, с постепенным повышением уровня V α 1-2 и усилением апоптотической активности лимфоцитов, что играет роль в прогрессировании некрозо - воспалительных повреждений тканей и органов и может свидетельствовать об усилении дисфункции иммунной системы по типу гиперчувствительности по мере прогрессирования инвазий.

Установлено, что в хронической фазе гельминтозов понижение уровней про- воспалительных цитокинов на фоне увеличения уровней IL-4 и IL-10, ассоциировано с подавлением пролиферации Т- и В-лимфоцитов, нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов, снижением продукции всех иммуноглобулинов, с постепенным снижением Caspase-3 и резким подъемом уровня V α 1-2, с активизацией апоптоза лимфоцитов за счет Т-популяции, что играет роль в затихании воспалительных повреждений тканей и органов и может свидетельствовать об усилении дисфункции иммунной системы по типу иммунодефицита.

Практическое использование полученных результатов позволило сформировать новый подход к определению стадии и тяжести инвазий, а также к выбору новых схем дегельминтизации. Разработанные новые подходы к контролю за состоянием больных животных на протяжении всего развития кишечных инвазий за счет новых молекулярных предикторов и критериев клинической безопасности этио- патогенетической терапии гельминтозов используются как доступные методы при динамичном наблюдении за больными животными в процессе лечения, что позволило существенно повысить эффективность и безопасность лечения гео- гельминтозов у животных и снизить побочные эффекты в условиях атипичного или затяжного развития инвазий.

Полученные результаты позволяют провести оптимизацию и совершенствование антигельминтной терапии в ветеринарной и медицинской практике за счет совместного применения антиоксидантов и иммуно - модуляторов и нормализации иммунных дисфункций. Это позволит также в дальнейшем разработать систему комплексных лечебно-профилактических мероприятий для оздоровления от гельминтозов животных в различных животноводческих хозяйствах и ветеринарных учреждениях.

Внедрение результатов исследования

Новые теоретические данные, основанные на материалах экспериментальных исследований диссертации и позволившие установить недостающие факторы и малоизвестные механизмы противогельминтного иммунитета, включены в соответствующие разделы учебников, учебных и учебно-методических пособий для высшего и дополнительного

профессионального образования, внедрены и используются в учебном процессе в курсе лекций и практических занятий для студентов учреждений высшего образования и для обучающихся в ординатуре и аспирантуре и на циклах профессиональной переподготовки и повышения квалификации в учреждениях дополнительного профессионального образования.

Новые подходы к контролю за состоянием больных животных на протяжении всего развития кишечных инвазий за счет новых молекулярных предикторов и критериев клинической безопасности этио- патогенетической терапии гельминтозов используются в ветеринарной практике как доступные методы при динамичном наблюдении за больными в процессе развития болезни и лечения. Это дало возможность их внедрения в практику и получения определенных положительных результатов, свидетельствующих о существенном сокращении времени лечения, уменьшении количества осложнений и сокращении сроков восстановительных процессов.

Практические рекомендации по мониторингу состояния за больными животными и комплексному подходу в лечении острой и хронической фазы кишечных гельминтозов с одновременным использованием иммуномодуляторов и антиоксидантов внедрены и применяются в учреждениях научно-исследовательского профиля и ветеринарной практики г. Москвы, Московской области и других городов России.

Степень достоверности и апробация работы

Основные результаты выполненной экспериментальной работы были изложены в 3 монографиях, 29 научных статьях и представлены в докладах и тезисах на многих научных конгрессах, конференциях и форумах: Всесоюзной научной конференции «Гельминтология сегодня: проблемы и перспективы», Москва, 1989; Всероссийской научно-практической конференции, Кемерово, 1996; Всероссийской научной конференции института паразитологии «Систематика, таксономия и фауна паразитов», Москва, 22-24 октября 1996 г.; Всероссийской научной конференции «Взаимоотношения паразита и хозяина», Москва, декабрь 1998; Всероссийской научной конференции, посвященной 120-летию со дня рождения акад. К.И. Скрыбина, 8-10 декабря 1998 г., Москва; Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 125-летию акад. К.И.Скрыбина, Москва, 2002; Международной научно-практической конференции «Современные проблемы общей, медицинской и ветеринарной паразитологии», Витебск, ВГМУ, 2004; Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы медицины XXI века» г. Уфа, РФ, 2014; IX Всероссийской научно-практической конференции «Инфекционные аспекты соматической патологии у детей», Москва, 18-19 мая 2016 г.; IX Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием. Москва, 27–29 марта 2017 г.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Окислительный стресс и накопление продуктов окисления белков - АОРР, активируемые инвазией, являются основным инициирующим фактором иммуногенеза в острой фазе гельминтозов, стимулируя выработку про- и противо- воспалительных цитокинов TNF- α , IL-1, IL-2, IL-5, IL-4 и IL-10, дисбаланс которых способствует развитию системного остро-фазного ответа за счет стимуляции лейкопоза, усиления пролиферации В-лимфоцитов и продукции иммуноглобулинов, развития эозинофилии, что является характерным признаком гиперчувствительности.

2. В конце острой фазы гельминтозов на фоне обнаруженного снижения уровня противо - апоптотического белка Bcl-2, существенного подъема значений Caspase-3 в лизате лимфоцитов и дальнейшего системного увеличения уровня TNF- α , регулирующего танатогенную программу, наблюдается смещение баланса апоптогенных факторов в сторону активизации запрограммированной гибели клеток в популяциях В- и Т-лимфоцитов.

3. Накопление продуктов окисления липидов - ПОЛ и снижение уровня продуктов окисления белков (АОРР) в хронической фазе служит основным инициирующим фактором смены событий иммуногенеза за счет подавления выработки цитокинов TNF- α , IL-1, IL-2, IL-5 и IL-10 и увеличения IL-4, что приводит к снижению пролиферации и дифференцировки лимфоцитов, эозинофилов, к угнетению лейкопоза, уменьшению продукции иммуноглобулинов, что приводит в конечном итоге к затуханию гиперчувствительности и прогрессированию иммуносупрессии.

4. Ослабление экспрессии факторов, предотвращающих развитие апоптоза (Bcl-2), и остающийся высоким уровень TNF- α во время хронической фазы приводит к увеличению дисбаланса между белковыми маркерами Caspase-3 и Bcl-2 и заметной активации процессов апоптоза лимфоцитов с выраженным разрушением Т-популяции, что вызывает дополнительное подавление лейкопоза, приводящее к развитию вторичной иммуносупрессии и формированию непродолжительного слабо-напряженного иммунитета.

5. Моно - терапия альбендазолом, мебендазолом, медамином и пирантелом памоатом, кроме левамизола, усиливает патологические реакции клеточного и гуморального звена иммунитета, вызванные инвазиями, в то время как комплексная терапия гельминтозов с одновременным применением антиоксиданта гамавита и иммуномодулятора ронколейкина полностью нормализует молекулярные показатели ОС, цитокиновый и иммуноглобулиновый профиль, ферментативный спектр сыворотки крови животных, лейкоцитарную формулу, баланс белков, регулирующих апоптоз, что приводит к улучшению морфологической структуры тканей и органов и повышению безопасности лечения.

Публикации

Основные результаты исследований представлены в докладах и тезисах на 11 научных Всероссийских и международных конгрессах и конференциях, а также изложены в 32 научных печатных работах, из которых 3 – рецензируемые монографии и 16 статей опубликованы в рекомендованных ВАК РФ изданиях для докторских диссертаций.

Объем и структура диссертации

Текст диссертации изложен на 278 страницах и включает оглавление, список сокращений, введение, обзор литературы из 4-х глав, материалы и методы, собственные исследования из 5-и глав, обсуждение результатов, заключение и выводы, практические рекомендации, список литературы и перечень иллюстративного материала.

Список литературы включает 439 источников, из которых - 336 отечественных и 103 зарубежных авторов. Список иллюстративного материала включает 134 рисунка и 3 таблицы.

Приложение (в виде отдельного тома) содержит 166 страниц и включает оглавление, 80 таблиц, 86 рисунков и акты внедрения.

Личный вклад автора

Диссертационная работа является результатом многолетних исследований автора (1995-2018 г.г.), выполненных на базах животноводческих хозяйств и вивария ФГБНУ ВНИИ фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений им. К.И.Скрябина и Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И.Скрябина, а также при поддержке и помощи ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Института паразитологии РАН и НИИ МПиТМ им. Е.И.Марциновского, кафедры патологической анатомии и кафедры общей биологии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова и завершена в НИИ молекулярной и персонализированной медицины ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России.

Постановка целей и задач, разработка дизайна эксперимента для их решения, проведение экспериментальных исследований, сбор, систематизация, анализ полученных результатов и оформление диссертационной работы выполнялись автором лично.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Методология исследования

Предметом исследования является проблема уточнения основ патогенеза и механизмов иммунитета при гельминтозах за счет установления роли целого комплекса малоизученных факторов (молекулярных, цитологических и

гистологических) в формировании и регуляции иммунитета при гельминтозах, которые определяют направленность развития иммунных реакций хозяина в пользу паразита и развития на этой основе в организме хозяина иммунопатологических реакций (гиперчувствительности, иммуно- супрессии).

Теория построена на малоизученных и разрозненных фактах о роли паразитарных антигенов вызывать в организме хозяина иммунологические сдвиги за счет активации окислительного стресса, изменения цитокинового статуса, изменений выработки антител, активации процессов воспаления и индукции процессов апоптоза, нарушения качественного и количественного состава крови, а также за счет токсического влияния на все ткани, органы и системы хозяина.

Идея базируется на глубоком анализе динамических изменений всех изучаемых показателей, их математической обработке и состоит в определении достоверно значимых корреляционных связей между ними и установлении их роли в запуске и формировании возможных механизмов иммунопатологических процессов при кишечных гельминтозах в острой и хронической стадиях.

Изменения состава и биохимических показателей крови, нарушения в микроструктуре тканей и органов, исследованные при помощи световой и электронной микроскопии, позволили достоверно контролировать факт формирования иммунопатологии на протяжении всего инвазионного процесса от момента заражения до развития хронической стадии.

Проведенная моно- и комплексная терапия гельминтозов позволили не только подтвердить правильность установленных механизмов противогельминтного иммунитета, но и расширить и уточнить представления о механизмах терапевтического эффекта известных антигельминтных препаратов, а также предложить новую стратегию повышения безопасности этиотропной терапии за счет совместного использования иммуномодуляторов и антиоксидантов.

Материалы и методы исследования

Для выполнения поставленной цели был проведен тщательно продуманный по дизайну обширный эксперимент, включающий получение инвазионного материала, заражение животных, контроль за интенсивностью заражения и переходом острой стадии в хроническую, ежедневный и еженедельный мониторинг многочисленных молекулярных и цитологических показателей крови, состояния тканей и органов на протяжении 2,5 месяцев развития инвазий и проведения различных стратегий лечения.

Эксперимент проводился на лабораторных животных (мышьях, кроликах, цыплятах), которые были экспериментально или спонтанно заражены кишечными нематодами из 3-х подотрядов Oxiurata, Trichocephalata, Ascaridata. В эксперименте были использованы 3260 белых беспородных мышей со средним весом тела 18-20 г; 950 кроликов со средним весом 2,5 кг и 750 цыплят белой русской породы в возрасте 30-45 суток. Все исследования на

животных выполнялись в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом (ESF) и декларацией о гуманном отношении к животным.

Для экспериментального заражения мышей и кроликов яйца нематод получали из фекалий спонтанно зараженных животных методом Дарлинга, и/или помещением самок нематод в гипертонический солевой раствор для откладки яиц [Романенко Н.А. с соавт., 2000]. Яйца культивировали при 30-37°C до инвазионного состояния, готовили из них суспензию с содержанием яиц около 200 экз. в 1 мл физиологического раствора. Заражение животных проводили перорально с помощью пипетки взвесью по 0,5-1,0 мл, содержащей около 100 яиц на 1 животного.

Подтверждение факта заражения животных, а также переход личиночных форм гельминтов в половозрелую стадию устанавливали с помощью ово- копро- скопии до появления яиц в фекалиях. Процент незараженных животных по данной методике составлял не более 1-5 % и был исключен из эксперимента. Интенсивность заражения составляла 58-72 экз.

Животные были подразделены на следующие группы:

1. Интактные животные (контрольные группы);
2. Мыши, экспериментально зараженные *Syphacia obvelata* (Rudolphi, 1802), Seurat, 1916 из п/о Oxiurata;
3. Мыши, экспериментально зараженные *Trichocephalus muris* (Schrank, 1788) из п/о Trichocephalata;
4. Кролики, экспериментально зараженные *Passalurus ambiguus* (Rudolphi, 1819) из п/о Oxiurata;
5. Цыплята, спонтанно зараженные *Ascaridia galli* (Schrank, 1788) Freeborn, 1923 из п/о Ascaridata;
6. Цыплята, спонтанно зараженные *Heterakis gallinarum* (Gmelin, 1790) из п/о Oxiurata;
7. Зараженные животные, получавшие моно - терапию;
8. Зараженные животные, получавшие комплексную терапию;
9. Незараженные животные, получавшие моно - терапию;
10. Незараженные животные, получавшие комплексную терапию.

Из-за технических трудностей экспериментального заражения и раздельного содержания цыплят были использованы только спонтанно зараженные животные, которые были включены в исследования по проведению моно- и комбинированной терапии хронической стадии гельминтозов.

Этиотропную моно- терапию проводили путем однократного введения: *альбендазола* в терапевтической дозе 7 мг/кг на 3 сутки после заражения в острой фазе или на 10 сутки после заражения при хроническом течении ***сифациоза мышей***; *левамизола (декарис)* в терапевтической дозе 7,5 мг/кг на 7 сутки после заражения в острой стадии или на 35 сутки после заражения в хронической стадии ***трихоцефалеза мышей***; *мебендазола* в терапевтической дозе 15 мг/кг на 7 сутки после заражения в острой стадии или на 35 сутки

после заражения в хронической стадии *пассалуроза кроликов*; *медамина* в терапевтической дозе 100 мг/кг при хроническом течении *аскаридиоза цыплят*; *пирантела памоата* в терапевтической дозе 15 мг/кг при хроническом течении *гетеракидоза цыплят*.

Комплексная терапия проводилась при совместном однократном введении с антигельминтным препаратом иммуно- модулятора ронколейкина в дозе 0,05 мг/кг (5000 МЕ/кг) и антиоксиданта гамавита в дозе 0,3 см³/кг внутримышечно в те же сроки у всех экспериментальных групп животных.

Материалом для приготовления мазков и проведения молекулярных, биохимических и цитологических исследований в острой и хронической фазе гельминтозов служила кровь из хвостовой вены мышей и из ушной вены кроликов, взятой через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 17, 21 суток и 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 недель после заражения и на фоне терапии, а также кровь из гребней спонтанно зараженных цыплят, полученная через 1, 3, 7, 10, 14, 17, 21 суток после введения препаратов при моно- и комплексной терапии без декапитации.

Для проведения гистологических исследований в течение эксперимента мышей и кроликов декапитировали под рауш - наркозом через 1, 3, 7, 10, 14, 17, 21 суток и 6, 7, 8, 9, 10 недель после заражения и проведения терапии. Цыплят декапитировали через 1, 3, 7, 10, 14, 17, 21 суток после введения препаратов. Для исследования брали тонкий кишечник, печень, легкие, сердце, почки, селезенку, тимус и фиксировали в 10%-ном формалине.

Выделение Т- и В-лимфоцитов крови проводили методом дифференциального центрифугирования в градиенте различной плотности. Идентификация Т-лимфоцитов проводилась методом образования спонтанных розеток с эритроцитами барана (Е-РОК) (Wybran et al., 1972). Была проведена модификация метода путем обработки эритроцитов барана нейроаминидазой, «разрыхляющими» мембраны эритроцитов, что позволило увеличить чувствительность метода и выявить всю популяцию Т-клеток, сопоставимую с определением методом проточной цитометрии [Новиков Д.К., 2009]. В-лимфоциты выявляли реакцией комплементарного розетко - образования с эритроцитами барана, образующими иммунные комплексы с противозритроцитарными антителами и комплементом (ЕАС - розетки) по Е.Ф. Чернушенко, Л.С. Косогоровой (1981).

Маркеры окислительного стресса (ОС) - суммарный уровень продуктов глубокого окисления белков (АОРР) и суммарный уровень пероксидов липидов (ПОЛ, ОхуStat) в плазме крови, *содержание цитокинов* (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α), *уровень иммуноглобулинов* (IgM, IgG, IgE, IgA) в плазме крови, *концентрацию* про- апоптотического белка *Caspase-3* и анти- апоптотического белка *Bcl-2* в лизате лимфоцитов оценивали методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием соответствующих тест-систем.

Выявление активности ферментов (аспартат- аминотрансферазы (АсАТ), аланин- аминотрансферазы (АлАТ), γ –глутамилтрансферазы (γ -ГТФ)

и щелочной фосфатазы (ЩФ)) в плазме крови проводили кинетическим методом IFCC.

Гистологические исследования проводили с помощью световой и электронной микроскопии.

Математический анализ данных проводился с использованием языка программирования для статистической обработки данных R 3.4.0 (<http://cran.r-project.org/>). Для установления взаимосвязи между индикативными показателями и ее достоверности были проведены корреляционный и регрессионный анализ путем вычисления ранговых коэффициентов корреляций Спирмена (Spearman rank, R) или Пирсона и коэффициента регрессии (p-value, p) [Флетчер Р., 2004; Трухачева Н.В., 2012 и др.].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Молекулярные и цитологические изменения в патогенезе острой фазы гельминтозов

Выбранные молекулярные предикторы активности окислительного стресса (ОС) - АОРР и ПОЛ показали значительный подъем своих значений уже на ранних сроках развития инвазий сразу после экспериментального заражения - через 1-3 суток - при сифациозе мышей, через 3-7 суток - при трихоцефалезе мышей и при пассалурозе кроликов. При этом в крови начинали значительно преобладать продукты перекисного окисления белков (АОРР) над продуктами окисления липидов (ПОЛ). Увеличение уровня ПОЛ заметно отставало от скорости нарастания уровня АОРР (Рис.1).

Тем самым, можно заключить, что продукты жизнедеятельности личинок гельминтов после выхода из яиц в организме хозяина начинают формировать дисбаланс между накоплением и дезактивацией свободных радикалов, продуктами окисления с преобладанием образующихся АОРР над ПОЛ, что индуцирует в начале развития инвазии окислительный стресс, который и запускает все дальнейшие события иммуно- и патогенеза.

Иницирующая роль окислительного стресса в иммуногенезе при гельминтозах подтверждается еще и тем, что его активность резко возрастает раньше всех остальных параметров (цитокины, иммуноглобулины, белки апоптоза, лейкоциты и др.), т.е. в первые сутки развития инвазии, и очень быстро снижается, что свидетельствует об ограниченном времени его развития (7-10-14 суток). После этого активно начинают реагировать и изменяться другие молекулярные и цитологические показатели иммуногенеза.

Таким образом, иммунная система использует окислительный стресс для инициации борьбы с патогенами в острой фазе гельминтозов, при этом некоторые реактивные формы кислорода, по-видимому, могут служить медиаторами в клеточных сигнальных путях.

Рисунок 1. Изменение показателей оксидативного стресса (ОС) в периферической крови мышей в острой фазе пассалуроза

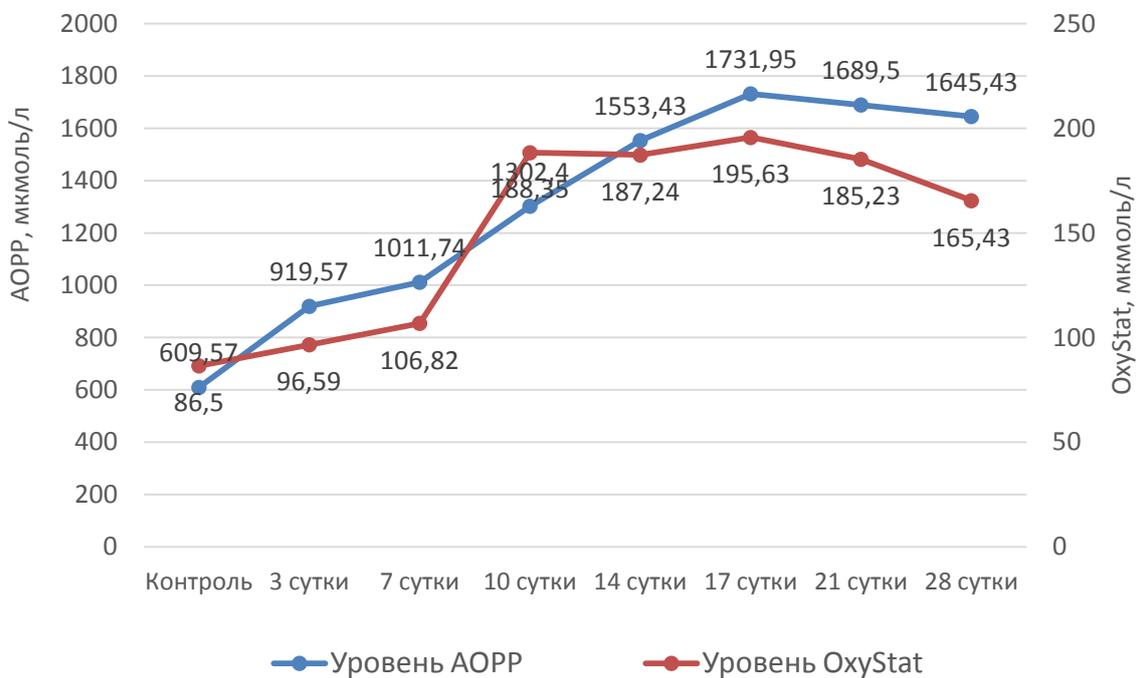
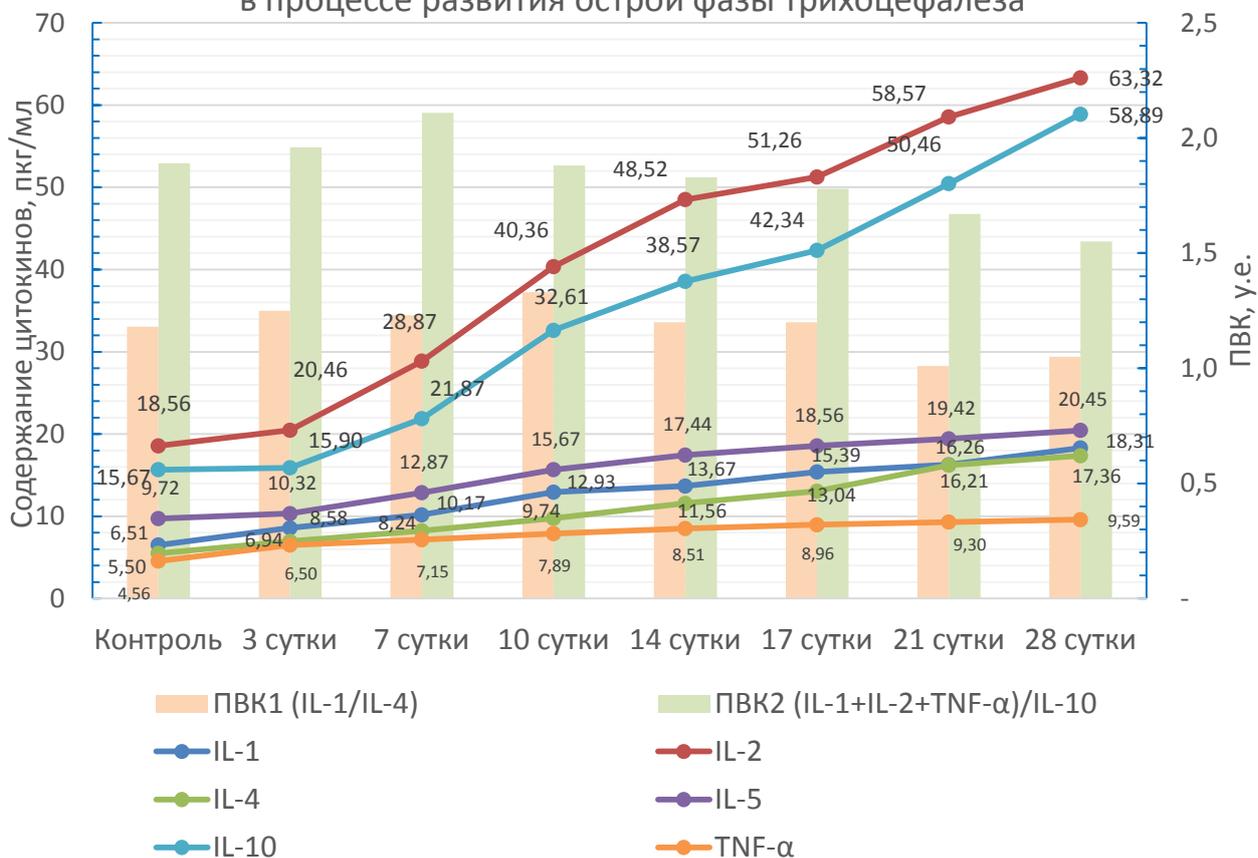


Рисунок 2. Динамика содержания цитокинов в крови мышей в процессе развития острой фазы трихоцефалеза



Затем антигенная (АГ) стимуляция со стороны личинок гельминтов приводит к усилению секреции цитокинов «первого эшелона» – IL-1, TNF- α , которые активируют биосинтез центрального регуляторного цитокина IL-2, а также IL-5 и др., что согласуется с другими научными данными [Steinke J.W., 2002; Громова А.Ю., 2005; Литвинова Л.С. с соавт., 2005; Aggarwal V.V., 2012 и др.].

В наших исследованиях установлено (Рис.2), что про-воспалительные цитокины (IL-1, IL-2, TNF- α), регуляторный цитокин (IL-5) и противовоспалительные цитокины (IL-4, IL-10) уже на ранней стадии инвазии участвуют в запуске иммунного ответа и в его эффекторной фазе – воспалительном ответе.

Цитокин IL-1 вместе с TNF- α входит в группу цитокинов с перекрывающимися свойствами: способностью стимулировать Т- и В-лимфоциты, усиливать их клеточную пролиферацию, инициировать или подавлять экспрессию определенных генов. Достоверное повышение содержания IL-1 и TNF- α в сыворотке крови у зараженных гельминтами животных в нашем эксперименте свидетельствует о важной роли указанных цитокинов в реализации механизмов противопаразитарной защиты, что согласуется с данными литературы о том, что TNF- α и IL-1 являются основными медиаторами воспалительных процессов и клеточных иммунных реакций [Данилов Л.Н., 2003; Davies S.J. et al., 2004 и др.].

В нашем эксперименте было показано (Рис.2), что уровень IL-1 резко повышался вплоть до конца острой фазы сифациоза и трихоцефалеза мышей (в 2-2,5 раза) и более плавно возрастал при пассалурозе кроликов (в 1,5 раза).

Известно, что основными продуцентами TNF- α являются моноциты и макрофаги, но есть и другие продуценты: лимфоциты крови, НК, гранулоциты крови, Т-лимфоцитарные клеточные линии. Роль индукторов могут взять на себя и другие цитокины: IL-1, IL-2, IFN [Aggarwal V.V., 2012 и др.]. Считалось, что синтез TNF- α применяется хозяином как защитный механизм при большинстве гельминтозов, направленный на индукцию апоптоза в тканях паразита [Candolfi M. et al. 2002 и др.]. Но оказалось, гельминты сами могут стимулировать продукцию TNF- α в организме хозяина [Adewusi O.I. et al., 1996 и др.].

Поэтому, вполне закономерно, что в начале нашего эксперимента наблюдался заметный рост (почти в 2 раза) уровня концентрации TNF- α у мышей, зараженных сифациозом или трихоцефалезом (Рис.2), свидетельствующий о развитии острого воспаления. При пассалурозе кроликов уровень TNF- α к концу острой фазы несколько снижался.

В ответ на усиление продукции цитокинов IL-1 и TNF- α концентрация сывороточного IL-2 в период обострения сифациоза (1-7-е сутки), трихоцефалеза мышей (7-21-е сутки) и пассалуроза кроликов (1-14-е сутки), также резко возрастала в 2-3 раза. Это свидетельствует о том, что в этот период начинается активная регуляция выживания/гибели иммунокомпетентных клеток, поскольку IL-2 является одним из ведущих цитокинов,

определяющих жизнедеятельность иммунных клеток.

Избыточная био- активность IL-2 в острой фазе гельминтозов, как фактора роста Т-клеток, в свою очередь активизирует пролиферацию Т- и В-лимфоцитов, что характеризуется в итоге выраженным лимфоцитозом [Лебедев Л.Р., 2007 и др.].

К настоящему времени уже установлено модулирующее влияние IL-2 на танатогенную программу. Указанный цитокин вызывает повышение чувствительности Т-лимфоцитов к апоптозу. Исход жизни клетки в этом случае зависит от уровня антигенного и ко- стимулирующего воздействия. В случае его отсутствия, экспрессия IL-2 и его клеточного рецептора угнетается. В результате этого клетки подвергаются апоптозу, связанному с нехваткой цитокина [Bergqvist A., 2001; Jerome K.R., 2008].

Ранее было доказано, что очень высокие концентрации TNF- α также способствуют замене программы некроза клеток на программу апоптоза [Morgan M.J. et al., 2010 и др.]. При избытке антигенного воздействия может наступить антиген - индуцированный апоптоз Т-клеток, обусловленный связыванием антигена с рецептором и опосредованный воздействием на активированный Т-лимфоцит Fas- лиганда и фактора некроза опухоли – TNF- α [Gaur U. et al., 2003].

Как известно, противопаразитарный иммунитет протекает по Th2-пути [Nair M.G. et al. 2016; Chung E.J. et al., 2017 и др.]. В этом случае В-лимфоциты сами распознают антигены без участия дендритных клеток и затем презентуют пептиды Th2-клеткам, получая активационные сигналы через цитокин IL-4 (фактор роста В-клеток). Это вызывает сначала пролиферацию активированных В-лимфоцитов, а затем их дифференцировку в антитело-образующие клетки – плазмциты, которые впоследствии секретируют растворимые антитела-иммуноглобулины. Это также можно было наблюдать в эксперименте: как заметно увеличивается уровень Ig и параллельно начинается переключение изотипов секретируемых иммуноглобулинов с IgM на IgG, IgA, IgE (Рис.3).

Многочисленные исследования показывают, что IgE активируют высвобождение медиаторов из тучных клеток, которые способны действовать либо непосредственно на паразита и/или, увеличивая выделение эозинофильного хемотаксического фактора, могут вести к накоплению необходимых антител (IgG) и клеток, напрямую воздействующих на паразита. Все эти явления, как известно, характеризуют развитие в острой фазе гельминтозов реакций гиперчувствительности немедленного типа [Simon D. et al., 2007; Новиков Д.К., 2009; Соловьева О.Г. и др., 2010 и др.].

Регуляторный цитокин IL-5, который секретируется Th2- клетками и может стимулировать процесс пролиферации В-лимфоцитов, показал рост концентрации почти в 2 раза при всех изученных гельминтозах (сифациозе мышей, трихоцефалезе мышей, пассалурозе кроликов) (Рис.2). При этом известно, что стимуляция В-лимфоцитов происходит путем усиления в них экспрессии гена, кодирующего рецептор для IL-2. В итоге, В-лимфоцит

становится более чувствительным к главному ростовому для него фактору – IL-2. Кроме того, наряду с косвенным ростовым эффектом на В-лимфоциты, IL-5 стимулирует продукцию иммуноглобулинов активированными В-лимфоцитами и их потомками – плазматическими клетками (в наибольшей степени – продукцию в плазматических клетках секреторного IgA [Mordvinov V.A. et al., 2001; Steinke J.W., 2002 и др.]. Все это согласуется с развивающейся эозинофилией и дальнейшими событиями иммуногенеза, обсуждаемыми ниже.

Группа против- воспалительных цитокинов IL-4 и IL-10 показала плавный подъем концентраций в острой фазе сифациоза мышей, трихоцефалеза мышей и пассалуроза кроликов (Рис.2).

Поскольку IL-4 продуцируется преимущественно Т-лимфоцитами, относящимися к суб- популяции Th2, то перед усилением продукции IL-4 уже произошел выбор стратегического пути иммунного ответа - Th1 или Th2. По-видимому, эта стратегия была определена предшествующей продукцией и изменением баланса других цитокинов: TNF- α , IL-2, IL-5, IL-10. Кроме того, IL-4 блокирует продукцию супер- оксидных радикалов, но стимулирует продукцию тромбоцит- активирующего фактора (PAF) [Петерс Я.Х. и др., 1996 и др.], что согласуется с «затуханием» процессов ОС в нашем эксперименте на фоне повышения уровня IL-4.

Как известно, одним из основных патогенетических механизмов аллергического воспаления при паразитарных инвазиях является нарушение регуляции синтеза IgE на уровне продукции IL-4, что было положено в основу концепции о дисбалансе продукции цитокинов Th1 и Th2 в патогенезе аллергии, во время которой происходит увеличение экспрессии генов IL-4, IL-5, IL-13 и усиление активности В-лимфоцитов [Литвинова Л.С. и др., 2005; Nono J.K. et al., 2017 и др.].

IL-10, продуцируемый макрофагами, моноцитами и Th2-клетками, может рассматриваться как антагонист ряда цитокинов. Так, IL-10 тормозит пролиферативный ответ Т-клеток на АГ и митогены, а также подавляет секрецию активированными моноцитами IL-1 β , IL-6 и TNF [Серебренникова С.Н. и др., 2016 и др.].

Известно, что течение и исход любого заболевания определяется не просто повышением или снижением уровней цитокинов, а их балансом, поэтому представляло интерес оценить соотношение их концентраций, т.е. рассчитать противовоспалительные коэффициенты (ПВК).

В острой фазе гельминтозов сначала преобладала продукция TNF- α , а затем продукция IL-10 преобладала над синтезом TNF- α , в связи с чем отмечалось снижение коэффициента ПВК2(IL-1+IL-2+TNF- α)/IL-10 к концу эксперимента после некоторого подъема в середине острой фазы (на 4-е сутки – при сифациозе мышей, на 7-е сутки – при трихоцефалезе мышей, на 14-е сутки- при пассалурозе кроликов) (Рис.2).

Похожая картина наблюдалась и для коэффициента ПВК1(IL-1/IL-4): сначала- подъем, а затем- снижение, с небольшим исключением при

Рисунок 3. Уровень иммуноглобулинов в крови мышей в процессе развития острой фазы сифациоза

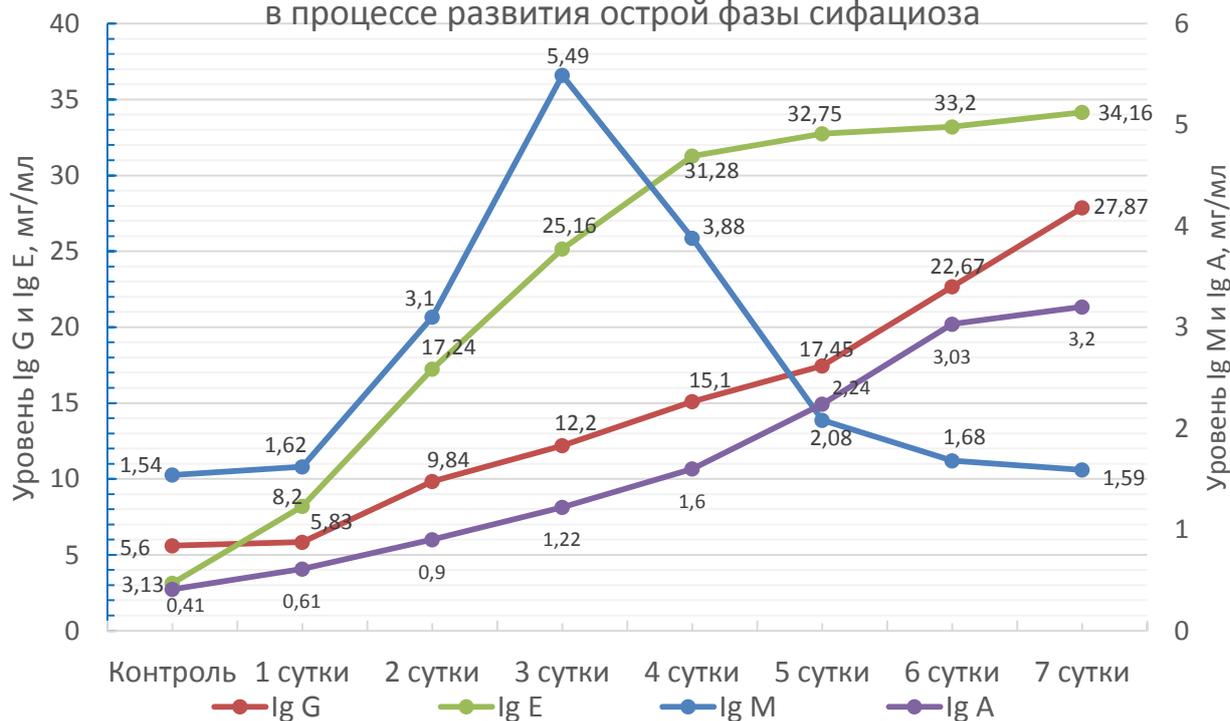
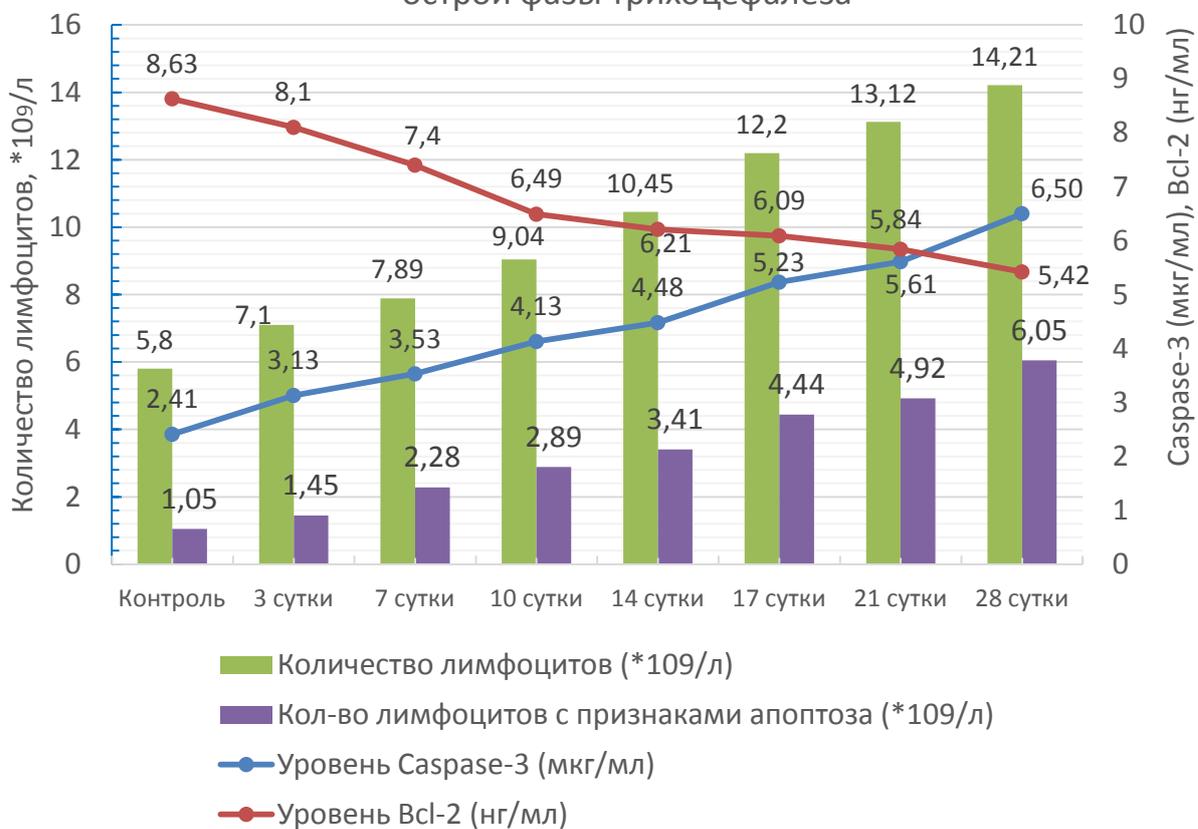


Рисунок 4. Изменение молекулярных и цитологических показателей апоптоза в крови мышей в процессе развития острой фазы трихоцефалеза



сифациозе мышей. Это указывает на преобладание иммунного ответа с ограничением экспансии Т-лимфоцитов при начальном развитии инвазии.

Как показали наши исследования, еще одним важнейшим фактором иммуно- и патогенеза при гельминтозах является апоптоз иммунокомпетентных клеток хозяина. Ранее уже было установлено, что метаболиты гельминтов обуславливают апоптотическую активность в соматических и в генеративных клетках хозяина [Lundy S.K. et al.,2001; Bekish V.J.,2001,2010 и др.], в то время как апоптоз клеток крови при развитии иммунопатологии при гельминтозах не был описан. В исследованиях Chow S.C. et al. (2000), рост числа апоптотических клеток и повышение уровня фрагментации ДНК в них находились в линейной зависимости от числа паразитов, концентрации белковых продуктов гельминтов и возрастал при их увеличении.

Предполагается, что для регуляции ответа клетки на сигналы смерти имеет значение соотношение про- и анти- апоптозных белков, например, Caspase-3 и Bcl-2. В настоящее время Caspase-3 рассматривают как фермент - основной исполнитель апоптоза, который напрямую или опосредованно разрушает клеточные структуры (подвергает гидролизу белки ядерной мембраны, разрушает цитоскелет, расщепляет белки, регулирующие клеточную адгезию, и др.), передает и реализует сигнал клеточной гибели, участвует в регуляции клеточного цикла и др. [Los M. et al., 2001 и др.].

Наш эксперимент показал (Рис.4), что уровень белка Caspase-3 в лизате лимфоцитов крови животных резко увеличивался к концу острой фазы почти в 2 раза - у мышей, зараженных сифациозом, в 3 раза – у мышей, зараженных трихоцефалезом, и в 1,5 раза- у кроликов, зараженных пассалурозом. Все это свидетельствует об активизации программы апоптоза лимфоцитов на системном уровне в конце острой фазы и перед началом хронической фазы гельминтозов.

Регуляция апоптоза белками большого семейства Bcl-2 (Bax и Bad), которые являются ингибиторами апоптоза, как известно, осуществляется преимущественно на последней стадии специфической деградации ДНК, в результате чего и наступает гибель клетки. Эта фаза является переходом к необратимой - терминальной стадии апоптоза и является универсальной для большинства клеток [Bilyu R. et al.,2007; Сазонова Е.В., 2010].

Для переключения клетки в режим апоптоза необходимо связывание Bcl-2 любым из про- апоптотических факторов, что нейтрализует его ингибирующее действие. В результате увеличивается проницаемость мембраны митохондрий, происходит высвобождение цитохрома С в цитоплазму, что приводит к активации каспазы-9, которая в свою очередь активирует каспазу-3 [Спор М. et al.,2005].

В эксперименте было выявлено (Рис.4), что уровень Bcl-2 в лизате лимфоцитов к концу острой фазы сифациоза мышей, трихоцефалеза мышей и пассалуроза кроликов плавно снижается на несколько нг/мл. На фоне существенного подъема значений Caspase-3 это явно свидетельствует о смещении баланса про- и против- апоптотических факторов в сторону

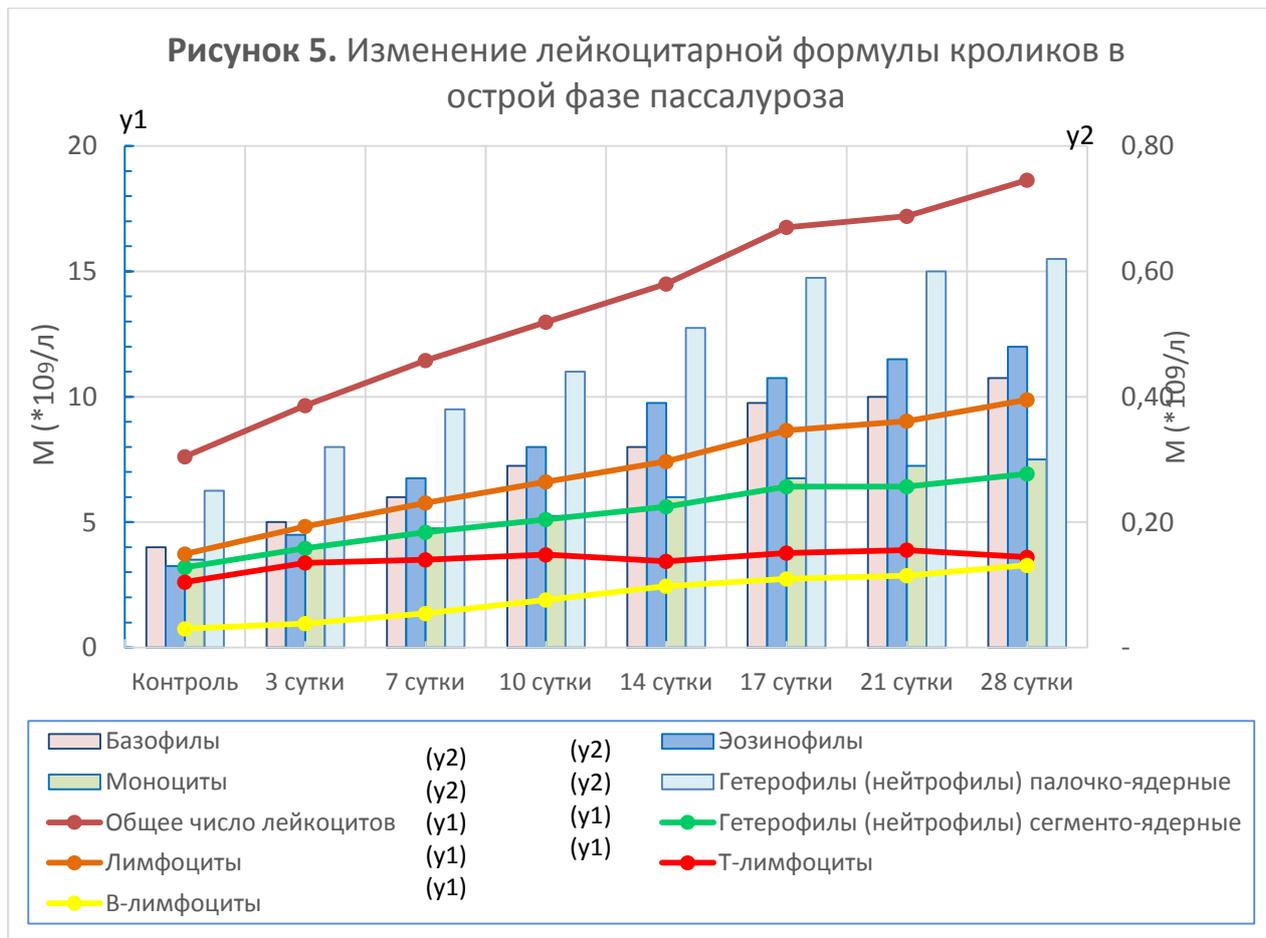
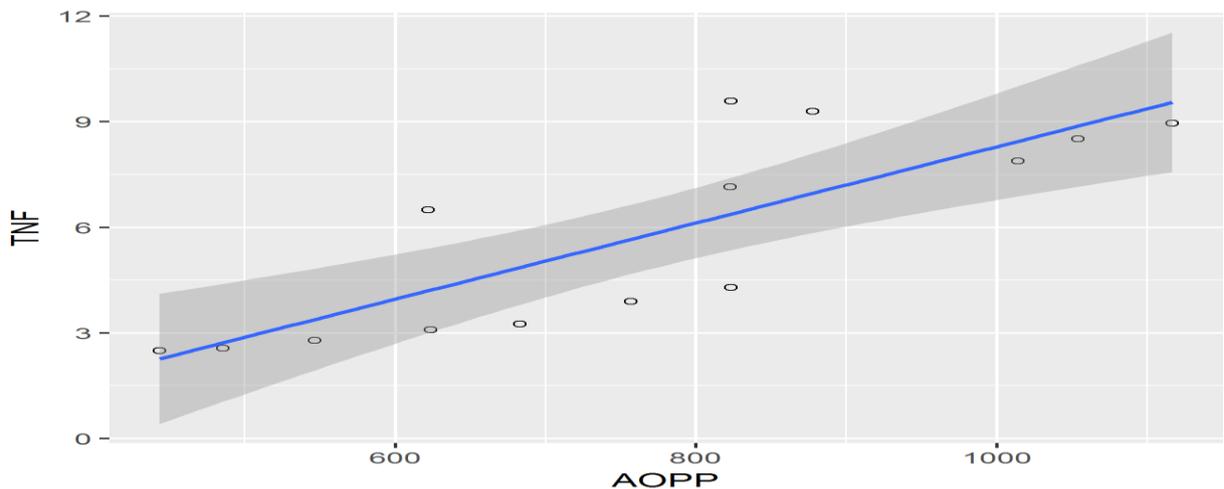


Рисунок 6. График модели линейной регрессии, демонстрирующей влияние показателя "AOPP" на "TNF"



Характеристика модели:

Уравнение линейной регрессии вида $y = a + b \cdot x$:

$$TNF = -2,537 + 0,011 \cdot AOPP$$

p-value для коэффициента "a" = 0,177

p-value для коэффициента "b" = 0,000

Коэффициент детерминации (R-квадрат) = 0.660932311726465

Коэффициент корреляции R (тест Спирмена) = 0,862 (p = <0,001)

активизации программы гибели клеток к концу острой и началу хронической фазы гельминтозов.

Гематологические исследования подтвердили факт активизации разрушения лимфоцитов, а микро - морфологические исследования позволили установить в них признаки апоптоза (Рис.4,5). Так, при всех трех гельминтозах в мазках крови на фоне увеличения общего числа лимфоцитов заметно увеличивалось количество лимфоцитов с признаками апоптоза (пикноз, фрагментация и вакуолизация ядер, образование фагоцитируемых апоптозных тел и др.) [Рябыкина Н.В., 2010].

В острой стадии при всех гельминтозах заметно возрастает (в несколько раз) общее количество лейкоцитов (Рис.5). Изменяется и процентное соотношение клеток в лейкоцитарной формуле: значительно увеличивается по сравнению с контролем абсолютное число и процент эозинофилов, палочко - ядерных гетерофилов, лимфоцитов, моноцитов, и в меньшей степени – базофилов и сегменто- ядерных гетерофилов. То есть, гельминтозы в острой стадии вызывают выраженный общий лейкоцитоз, сопровождающийся заметной эозинофилией и лимфоцитозом, менее выраженным увеличением моноцитов, базофилов и гетерофилов (нейтрофилов), что согласуется с данными ряда авторов [Simon D. et al.,2007].

При этом увеличение количества гетерофилов происходило более интенсивно за счет популяции палочко- ядерных форм, а лимфоцитов- за счет В-популяции. Количество Т-лимфоцитов устойчиво сохранялось около контрольных значений, несмотря на некоторую активизацию апоптоза этой популяции клеток, по-видимому, из-за усиления пролиферативных процессов.

При изучении корреляционных взаимосвязей между исследуемыми молекулярными и цитологическими параметрами и определении их достоверности нами установлено, что наиболее сильная зависимость ($R \geq 0,7$) и статистически значимое влияние наблюдались между AOPP и TNF- α (Рис.6), Caspase-3, между TNF- α и Bcl-2, между всеми этими показателями – и L,LT,LB. Между уровнем окисления липидов (ПОЛ) и концентрациями этих цитокинов такие связи не прослеживались.

В свою очередь, снижение уровня Bcl-2 имело прямую сильную корреляцию и статистически значимое влияние с продуктами ОС, воспалительным цитокином TNF- α , общим лейкоцитозом (L) и лимфоцитозом (LB,LT).

В ходе эксперимента также установлено, что самые сильные прямые корреляционные связи и статистически достоверное влияние уровня IL-1 обнаруживаются с уровнем IL-2 ($r = 0,962$, $p < 0,001$) и с уровнем IL-5 ($r = 0,751$, $p = 0,002$), и - средней силы связь- с уровнем TNF- α ($r = 0,648$).

Таким образом, продукты окисления белков (AOPP) при развивающемся окислительном стрессе и активация продукции TNF- α , IL-1, IL-2 и IL-5 запускают и модулируют дальнейшие процессы изменения баланса про- и противовоспалительных цитокинов, выработку антител, пролиферацию иммуно- компетентных клеток, апоптоз лимфоцитов и развитие пато-

морфологии в органах. Повышение уровней ферментов АсАТ, АлАТ, γ -ГТФ и ЩФ также подтверждают факт вовлечения в этот процесс гепато- билиарной системы.

2. Молекулярные и цитологические изменения в патогенезе хронической фазы гельминтозов

В ходе эксперимента было установлено, что в хронической фазе инвазий молекулярные маркеры активности окислительного стресса (ОС) - АОРР и ПОЛ показали свое дальнейшее участие в развитии процессов иммуногенеза (Рис.7). У АОРР наблюдалось продолжение тенденции к снижению своих значений, которое длилось до конца эксперимента при сифациозе мышей, при трихоцефалезе мышей, при пассалурозе кроликов, в то время как уровень ПОЛ через некоторое время начинал плавно возрастать (через 4 нед – при сифациозе мышей, через 5-6 нед – при трихоцефалезе мышей и пассалурозе кроликов), и к концу эксперимента дисбаланс между АОРР и ПОЛ достигал максимального значения.

Продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ), активируясь в хронической фазе гельминтозов, по-видимому, могут оказывать прямое цитотоксическое действие и способствовать угнетению иммунных механизмов, опосредованных про- воспалительными цитокинами, наиболее выраженных на ранних стадиях развития гельминтозов.

Активность почти всех изучаемых цитокинов (IL-1, IL-2, IL-5, IL-10) постепенно снижалась к концу эксперимента в хронической фазе гельминтозов, кроме IL-4 (Рис.8). Аналогичная тенденция наблюдалась как при экспериментальных заражениях (сифациоз мышей, пассалуроз кроликов), так и при спонтанном заражении животных (аскаридоз и гетеракидоз цыплят).

Заметное снижение уровней медиаторов воспаления IL-1, TNF- α и IL-2 на фоне плавного уменьшения концентрации IL-10 и продолжающегося увеличения IL-4 опосредует затухание системного остро-фазного ответа, с которым в острой фазе гельминтозов были сопряжены лихорадка, лейкоцитоз, эозинофилия, нейтрофилия, повышенный синтез остро-фазных белков и др.

Падение уровня IL-5, который продуцируется Т-лимфоцитами и эозинофилами при нормальном гемопоэзе, явно свидетельствует об изменении лейкопоэза и нарушении баланса иммуно- компетентных клеток. Снижение выработки IL-5, наблюдаемое в хронической стадии гельминтозов, уменьшает пролиферацию клеток-предшественниц эозинофилов, не поддерживает их выживание и не активирует синтез белков гранул. При этом происходит также снижение пролиферации базофилов, уменьшается выброс гистамина, снижается экспрессия рецептора к IL-2 на Т- клетках и секреция IgM и IgA периферическими зрелыми В-лимфоцитами.

IL-4, играющий ключевую роль в подготовке аллергических процессов (синтез IgE, развитие тучных клеток), на этапе поздних проявлений играет

Рисунок 7. Изменение показателей оксидативного стресса (ОС) в крови мышей в процессе развития хронической фазы трихоцефалеза

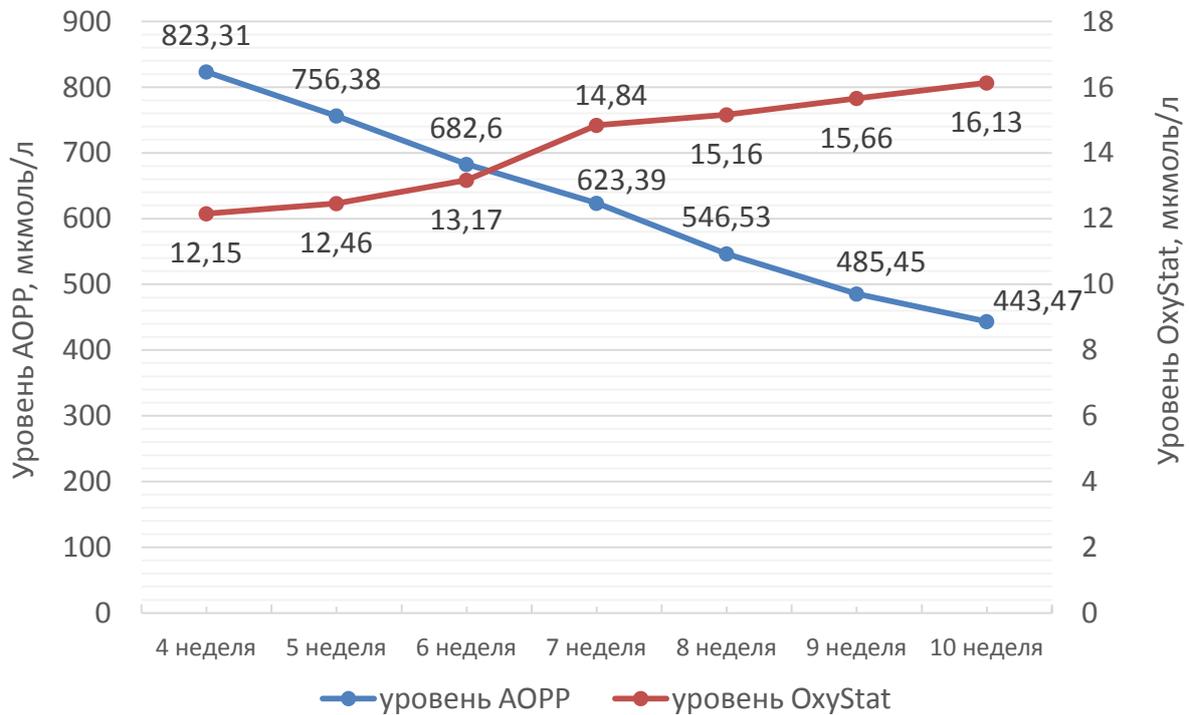
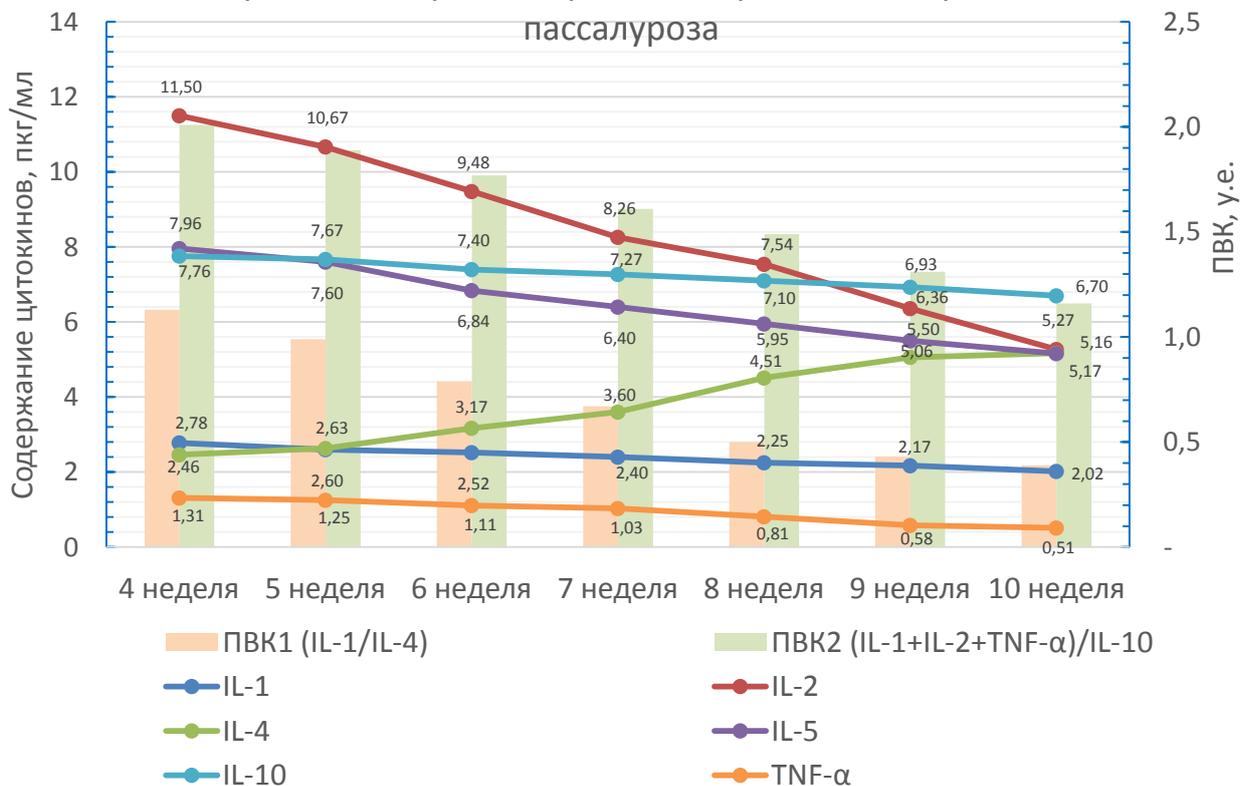


Рисунок 8. Динамика содержания цитокинов в крови кроликов в процессе развития хронической фазы пассалуроза



меньшую роль, участвуя в ремоделировании слизистых оболочек.

Эксперимент показал, что продолжающееся увеличение уровня IL-4 на фоне снижения уровня IL-10 и других цитокинов способствует ослаблению эозинофилии, накоплению тучных клеток и угасанию реакций гиперчувствительности немедленного типа.

Выявленные нами факты инициации апоптоза в лимфоцитах позволили уточнить механизмы развития иммуносупрессии при хронизации гельминтозов. В результате эксперимента было установлено, что в хронической фазе гельминтозов заметно снижаются проявления системной воспалительной реакции, меняется интенсивность лейкопоза в сторону лейкопении на фоне заметной активизации регуляторов апоптоза: уровень Caspase-3 продолжает увеличиваться, а уровень Bcl-2 - снижаться (Рис.9).

Морфологические признаки апоптоза лимфоцитов, исследованные световой микроскопией, также свидетельствуют об активизации запрограммированного разрушения этих клеток, снижении общего уровня лейкоцитов и лимфоцитов и, как следствие, развитии иммунодепрессии.

Таким образом, несбалансированное преобладание активности регуляторных клеток и супрессорных факторов может служить основой иммунодефицитов, вызванных не генетическими дефектами, а нарушением функции иммунцитов и гибелью клеток иммунной системы.

Гематологические исследования подтвердили факт более активного разрушения лимфоцитов. Так, при всех трех экспериментальных гельминтозах (сифациозе мышей, трихоцефалезе мышей и пассалурозе кроликов) в мазках крови на фоне уменьшения общего числа лимфоцитов заметно увеличивалось количество лимфоцитов с признаками разрушения ядер и образования апоптотических телец.

Статистический анализ показал наличие достоверно значимых корреляционных связей между происходящим апоптозом лимфоцитов и общей динамикой изменений в лейкоцитарной формуле. При гельминтозах в хронической стадии заметно уменьшается (в несколько раз) общее количество лейкоцитов: (в 1,5 раз – при сифациозе, в 2 раза- при трихоцефалезе, в 1,2 раза- при пассалурозе). Изменяется и процентное соотношение клеток в лейкоцитарной формуле: значительно уменьшается по сравнению с острой фазой абсолютное число и процент эозинофилов, но остается выше контрольных значений; уменьшается число сегменто- ядерных гетерофилов, лимфоцитов, моноцитов, и в меньшей степени – базофилов и палочко- ядерных гетерофилов (Рис.10).

То есть, гельминтозы в хронической стадии вызывали выраженную лейкопению, сопровождающуюся снижением уровня эозинофилов и лимфоцитов, снижением уровня моноцитов, базофилов и гетерофилов (нейтрофилов). При этом снижение количества гетерофилов происходило более интенсивно за счет популяции сегменто- ядерных форм, а лимфоцитов- за счет Т-популяции. Количество В-лимфоцитов устойчиво сохранялось около

Рисунок 9. Изменение молекулярных и цитологических показателей апоптоза в крови мышей в процессе хронического течения сифациоза

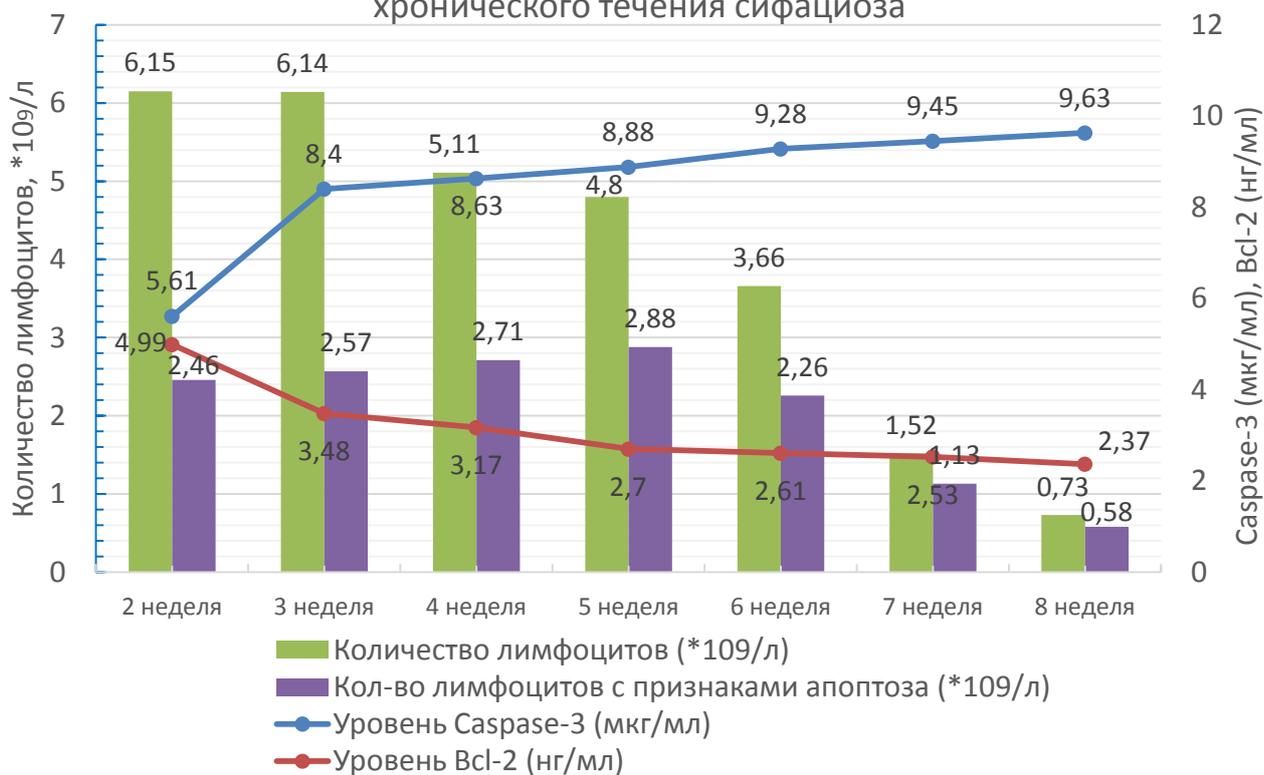
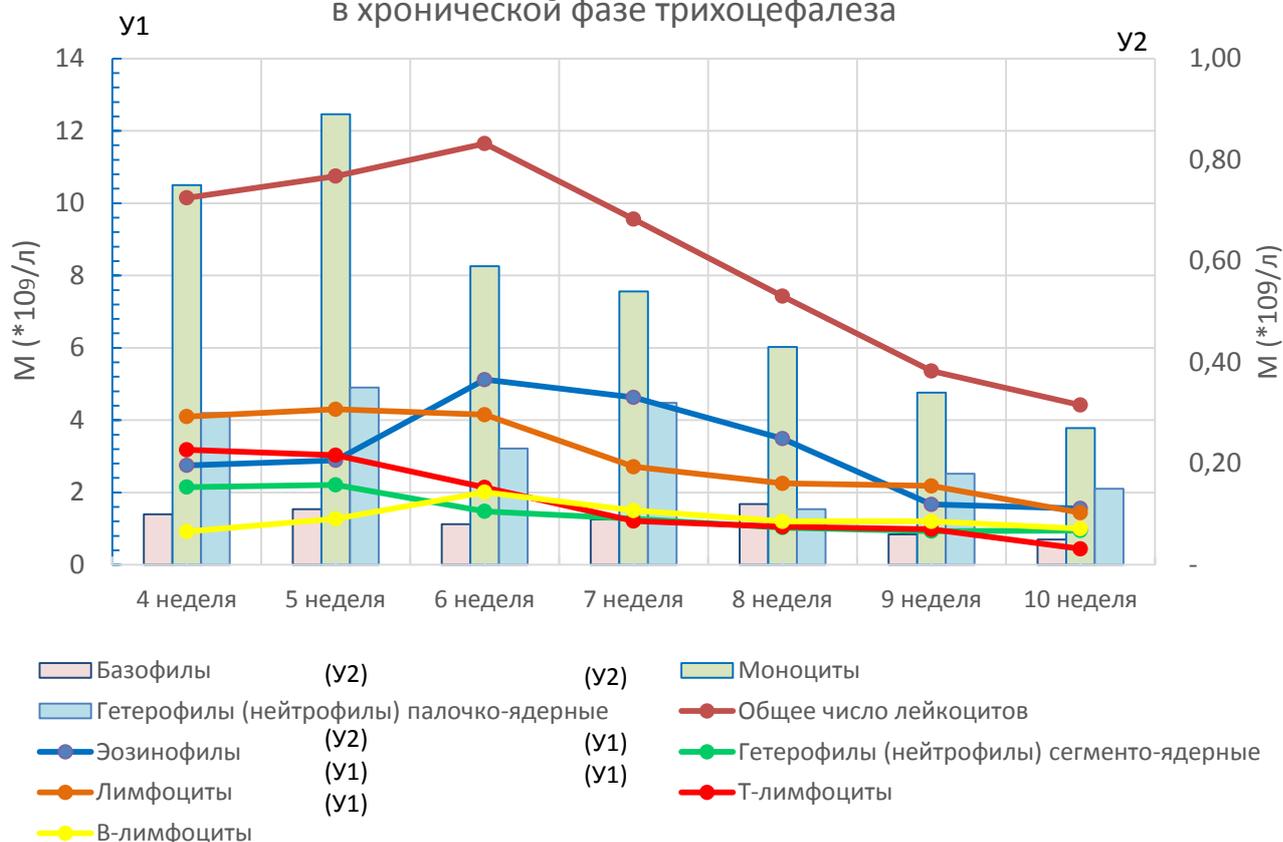


Рисунок 10. Изменение лейкоцитарной формулы мышей в хронической фазе трихоцефалеза



контрольных значений, несмотря на некоторую активизацию апоптоза этой популяции клеток. Это свидетельствует о преобладании апоптоза в Т-популяции лимфоцитов над В-популяцией.

При изучении корреляционных взаимосвязей между исследуемыми молекулярными и цитологическими показателями нами установлено, что сильная корреляционная зависимость ($R \geq 0,7$) и статистически значимое влияние наблюдались между Bcl-2, и показателями лейкоцитарной формулы – L, LT, LB. То есть, накопление продуктов окисления липидов (ПОЛ) в результате развития окислительного стресса, снижение уровней TNF- α , IL-1, IL-2 и IL-5 запускают и модулируют дальнейшие процессы изменения баланса цитокинов, нарушают пролиферацию иммуно- компетентных клеток, меняют выработку антител, активируют апоптоз лимфоцитов, способствуют появлению соответствующих изменений в тканях и органах и в итоге - формируют иммуносупрессию.

В свою очередь, уровень против- апоптотических белков Bcl-2 показал прямую сильную корреляцию и статистически значимое влияние на уровень воспалительного цитокина TNF- α , общий лейкопоз (L) и количество лимфоцитов (LB, LT). Поэтому, значительное снижение Bcl-2 в хронической фазе гельминтозов закономерно активировало процесс апоптоза в лимфоцитах.

Интересен факт, который был установлен с помощью корреляционного и регрессионного анализа, что АОРР и ПОЛ не имеют взаимозависимости и влияния друг на друга. По-видимому, смена направленности воздействия свободных радикалов при окислительном стрессе и выбор в качестве мишеней липидных молекул вместо белков, обусловлена регуляцией со стороны цитокиновых медиаторов, баланс которых в хронической фазе гельминтозов также закономерно меняется.

Снижение уровней ферментов АсАТ, АлАТ, γ -ГТФ и ЩФ также подтверждают факт вовлечения в патологические процессы гепато- билиарной системы и других внутренних органов.

Таким образом, наши исследования показали, что вторичная паразитогенная иммунодепрессия является результатом ингибирования окислительных, обменных процессов, повышения ферментативной и апоптотической активности в организме хозяина, что способствует развитию у него дисбаланса иммунологических показателей, количественных и функциональных изменений лимфоцитов периферической крови, нарушений нормальных соотношений клеточных субпопуляций, дисглобулинемий и т.д.

Все эти показатели свидетельствует о снижении резистентности организма в процессе хронизации гельминтозного процесса, затухании реакций гиперчувствительности и аллергических проявлений и развитии иммунной недостаточности.

3. Молекулярные и цитологические изменения в патогенезе острой фазы гельминтозов при проведении этиотропной моно- и комбинированной терапии

Использование антигельминтных препаратов в нашем эксперименте в режиме моно - терапии в терапевтических дозах (альбендазол, мебендазол, медамин, пирантела памоат) показало усиление патологических реакций клеточного и гуморального звена иммунитета, вызванное самой инвазией. Только дегельминтизация левамизолом при трихоцефалезе мышей вызывала некоторые улучшения показателей иммунной и биохимической реактивности, по сравнению с зараженными животными.

Применение комплексного подхода в лечении гельминтозов на основе сочетанного применения антигельминтных препаратов с антиоксидантом гамавитом и иммуноактивным препаратом ронколейкином с целью ослабления или устранения нежелательных побочных эффектов на иммунную систему и на организм в целом оказалось намного продуктивнее (Рис.11,12,13,14).

Проведенная нами дегельминтизация животных антигельминтными препаратами в терапевтических дозах на фоне однократной иммуностимуляции и антиоксидантного воздействия значительно повышала показатели иммунного статуса организма и, в основном, была достаточной для восстановления иммунитета.

Лечение животных левамизолом в комплексе с детоксикацией и иммуностимуляцией способствовало постепенному и полному восстановлению иммунной реактивности организма мышей при трихоцефалезе. При этом, уровень продуктов окисления белков и липидов, образующихся в ходе развития ОС, цитокиновый и иммуно- глобулиновый статусы, биохимические показатели крови, уровень белков, участвующих в апоптозе, лейкоцитарная формула и морфология органов восстанавливались до физиологических значений, характерных для здоровых животных.

Анализируя результаты собственных исследований и данные литературы можно отметить, все перечисленные экспериментальные данные свидетельствуют о благоприятном исходе инвазионных процессов в организме хозяина при такой схеме терапии гельминтозов [Алтухов Н.М., 2009; Tallima H. et al., 2017]. Применение комплексной терапии показало заметное «сдерживание» процессов роста общего числа лейкоцитов, абсолютного количества лимфоцитов и лимфоцитов, вовлекаемых в процессы апоптоза. Кроме того, характерные для острой фазы гельминтозов глубокие нарушения процессов пролиферации и дифференциации кроветворных клеток селезенки, лимфатических узлов и костного мозга, проявляющиеся в виде общего лейкоцитоза, лимфоцитоза, умеренного моноцитоза, выраженной эозинофилии и нейтрофильного лейкоцитоза корректировались и восстанавливались до физиологических норм.

Рисунок 11. Динамика изменения показателей оксидативного стресса (ОС) в сыворотке крови мышей в острой фазе сифациоза при проведении моно- и комплексной терапии

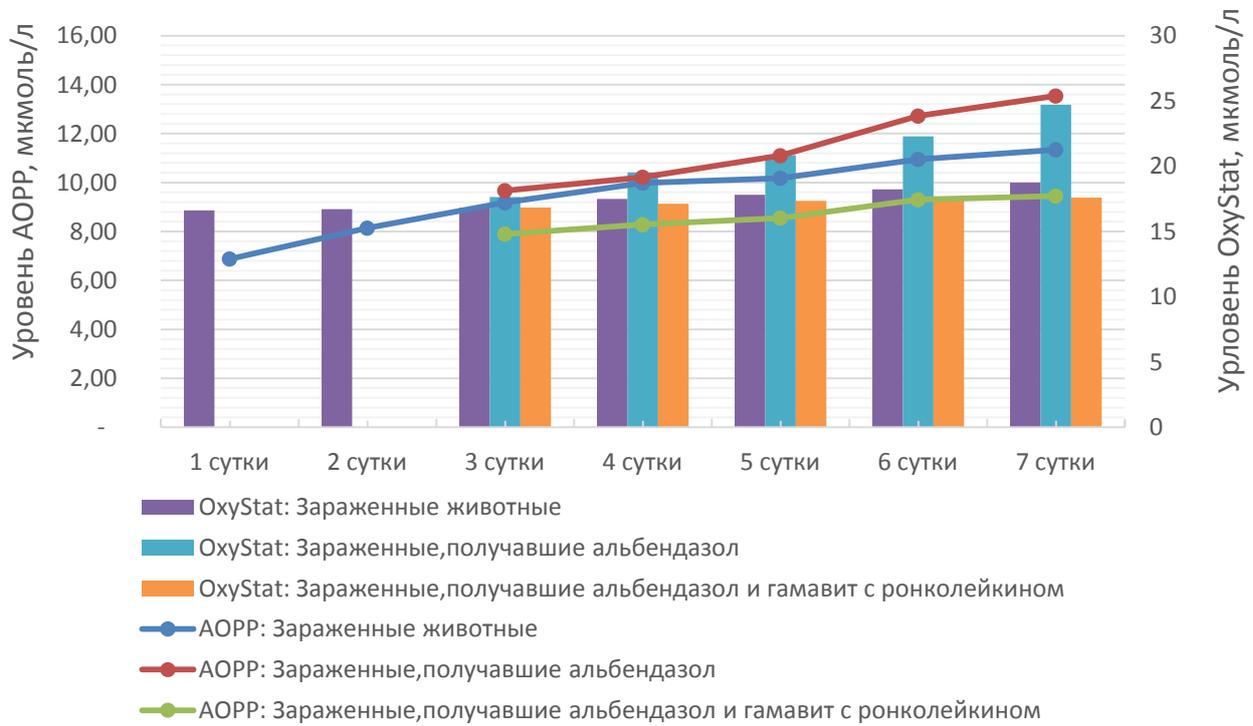


Рисунок 12. Динамика содержания некоторых противовоспалительных цитокинов в крови мышей в острой фазе трихоцефалеза при проведении этиотропной моно- и комбинированной терапии

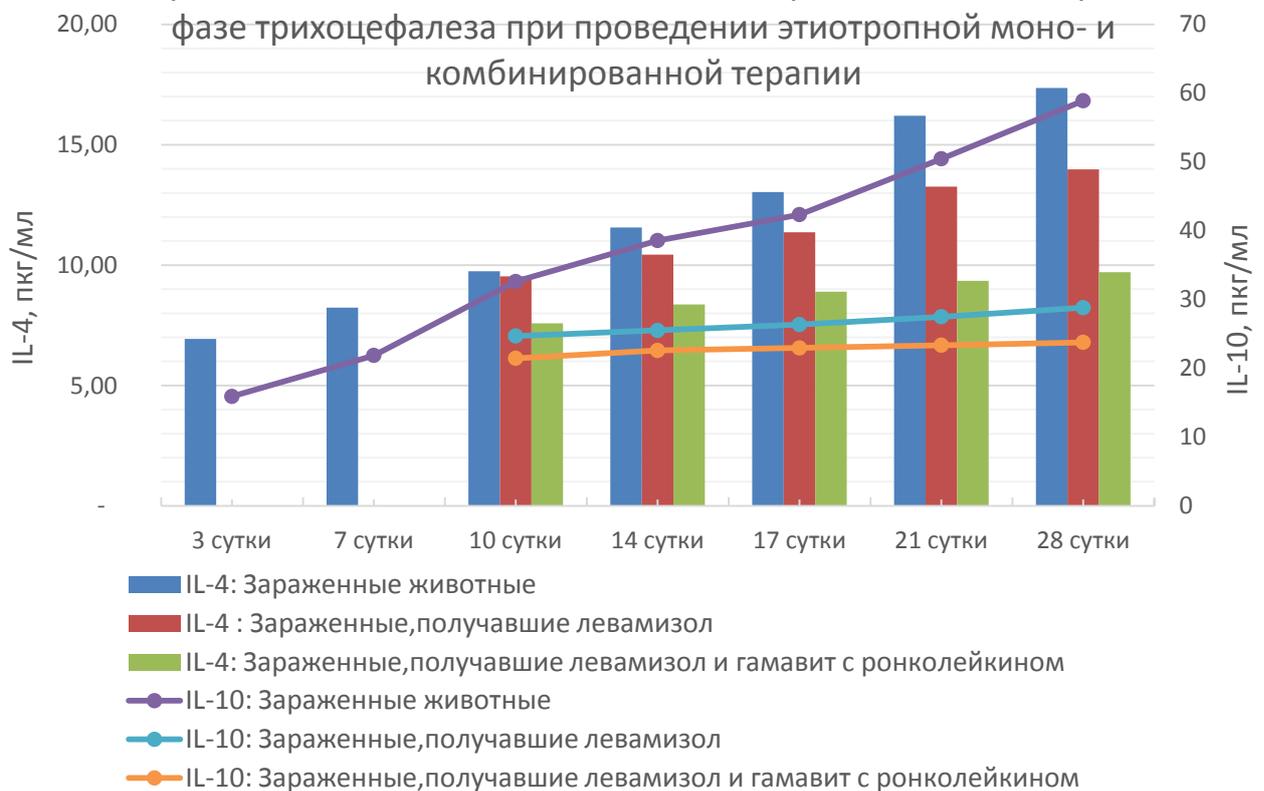


Рисунок 13. Уровень иммуноглобулинов IgG, IgE в крови мышей в острой фазе трихоцефалеза при проведении этиотропной моно- и комбинированной терапии

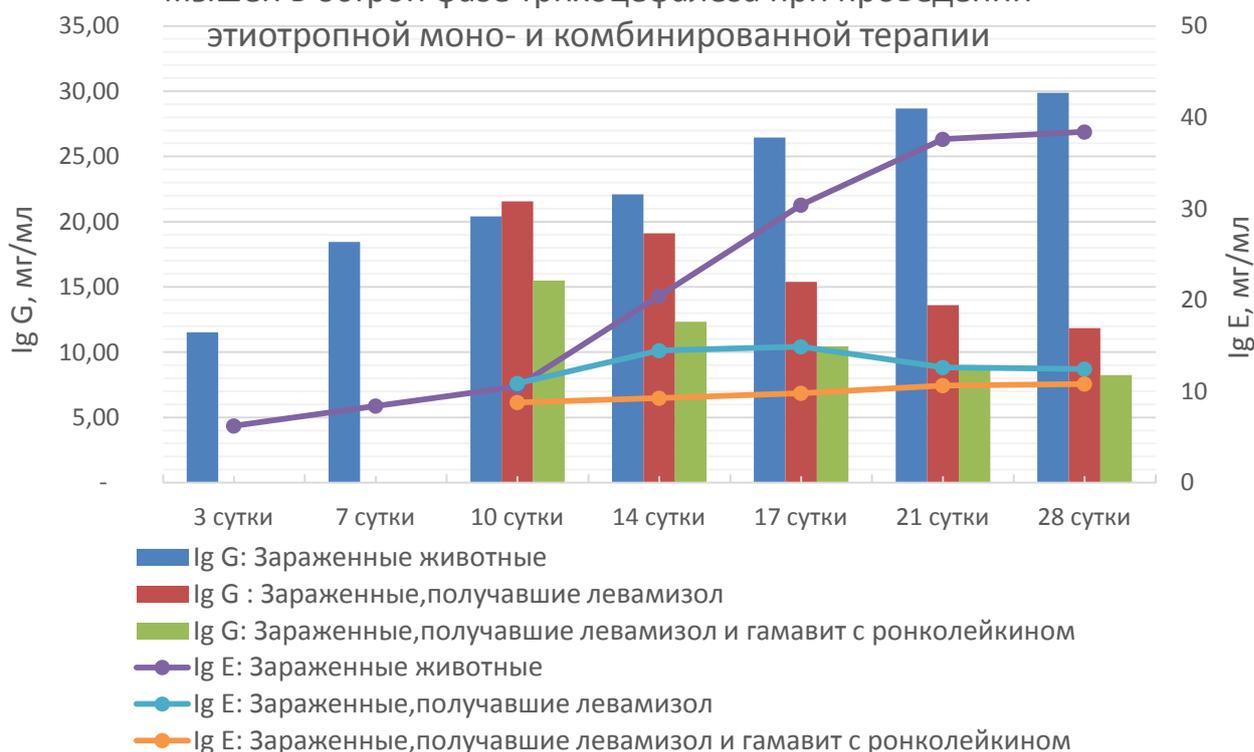
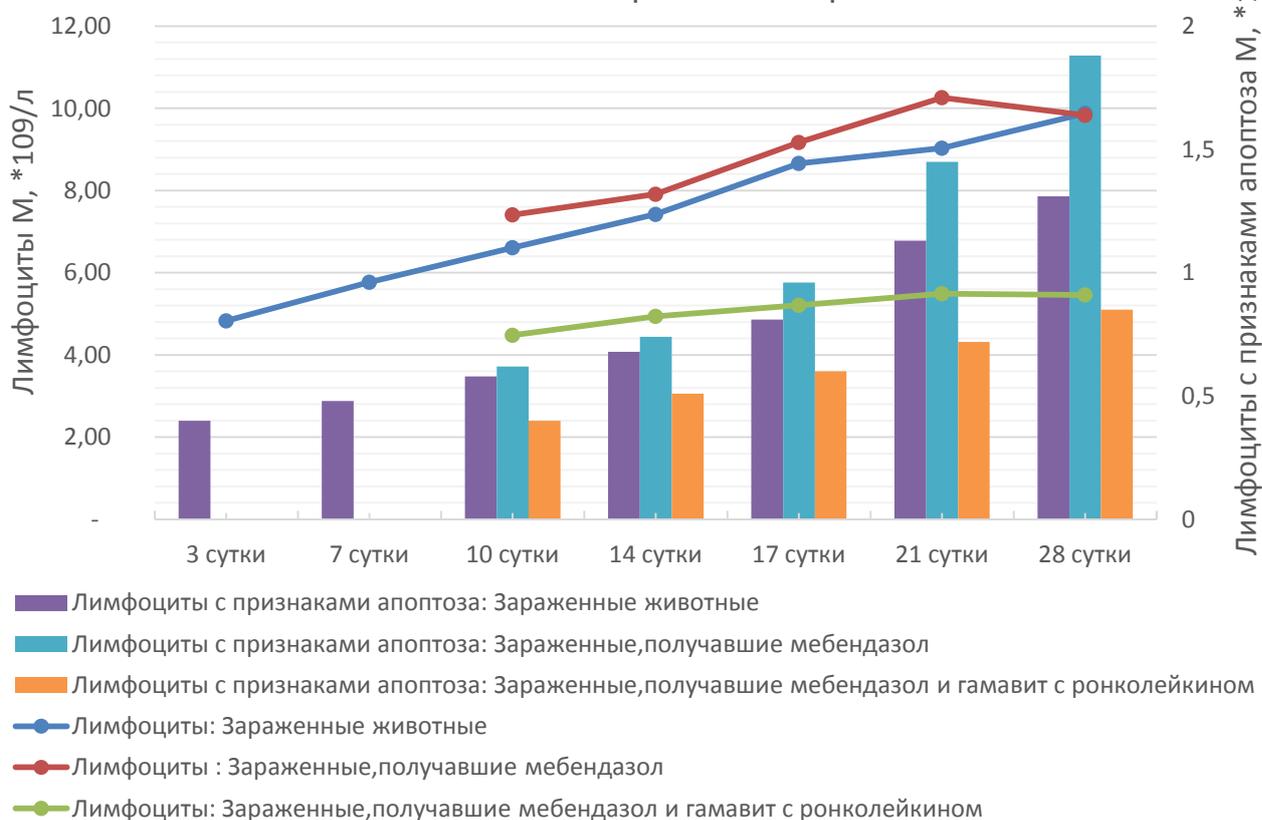


Рисунок 14. Изменение цитологических показателей апоптоза в крови кроликов в острой фазе пассалуроза при проведении моно- и комбинированной терапии



4. Молекулярные и цитологические изменения в патогенезе хронической фазы гельминтозов при проведении этиотропной моно- и комбинированной терапии

Как показал эксперимент, гельминтозы в хронической фазе сопровождаются развитием вторичных иммунодефицитов в организме хозяина. При этом применение большинства антигельминтных препаратов, вызывает дальнейшее углубление иммунопатологических реакций на молекулярном, клеточном и органном уровнях. В организме животных в хронической фазе сохраняются и даже усиливаются признаки иммунопатологии (Рис.15,16,17,18).

Комплексная терапия с одновременным использованием антигельминтного препарата, антиоксиданта гамавита и иммуномодулятора ронколейкина показала значительное повышение безопасности применения этиотропных средств и нормализацию многих показателей: белковых маркеров окислительных процессов, восстановление баланса про- и противовоспалительных цитокинов, повышение количества Т-лимфоцитов и хорошая активность В-клеток, восстановление уровня Ig, баланса белков, регулирующих апоптоз, в крови, что следует считать благоприятным прогнозом.

Результаты исследований позволили установить заметное увеличение адаптивных эффектов окислительного стресса, сопровождающихся активной мобилизацией структурных и энергетических ресурсов, о чем свидетельствуют выявленные липо- тропный эффект стресса и активация перекисного окисления липидов, проявляющиеся повышением концентрации ПОЛ на фоне снижения уровня содержания АОПР.

Комплексная терапия гельминтозов в хронической фазе также вызывала значительные позитивные реакции в уровне и балансе цитокинов, иммуноглобулинов, в ферментативном спектре сыворотки крови животных (уровень АлАТ, АсАТ, ГТФ - γ и ЩФ), лейкоцитарной формуле и балансе белков, регулирующих апоптоз - Caspase-3 и Bcl-2 (Рис.15,16,17, 18).

Полное восстановление иммунного статуса и всех изучаемых показателей было зарегистрировано в организме мышей, зараженных трихоцефалезом, которых на фоне дегельминтизации левамизолом подвергали одновременно иммуностимуляции и антиоксидантной терапии (Рис.15).

Проведение комплексной терапии и дополнительное введение к антигельминтным препаратам иммуностимулятора ронколейкина и антиоксиданта гамавита заметно усиливало иммуноклеточные реакции в крови и лимфоидных органах до уровня, свидетельствующего о нормализации иммунного баланса во всем организме.

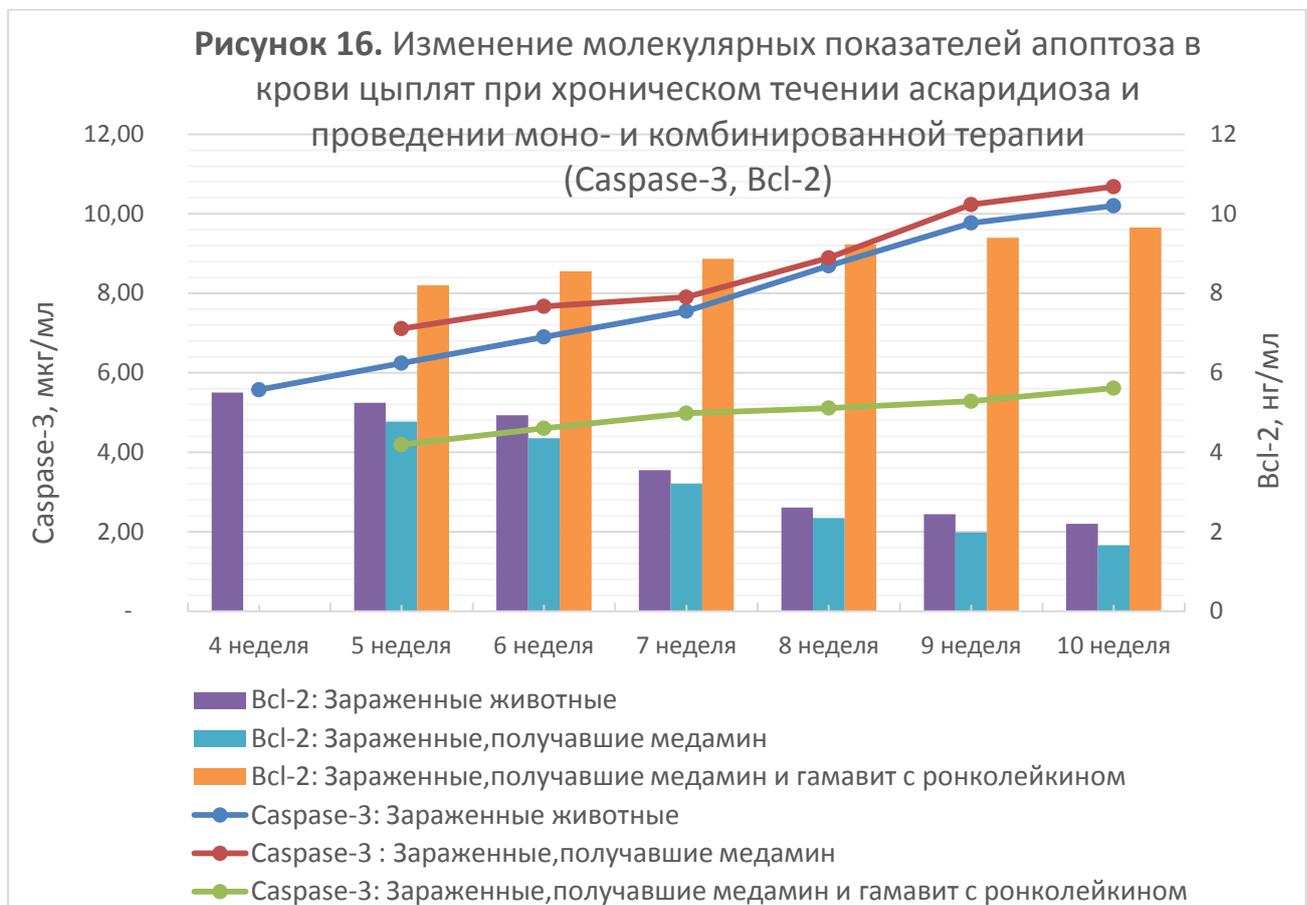
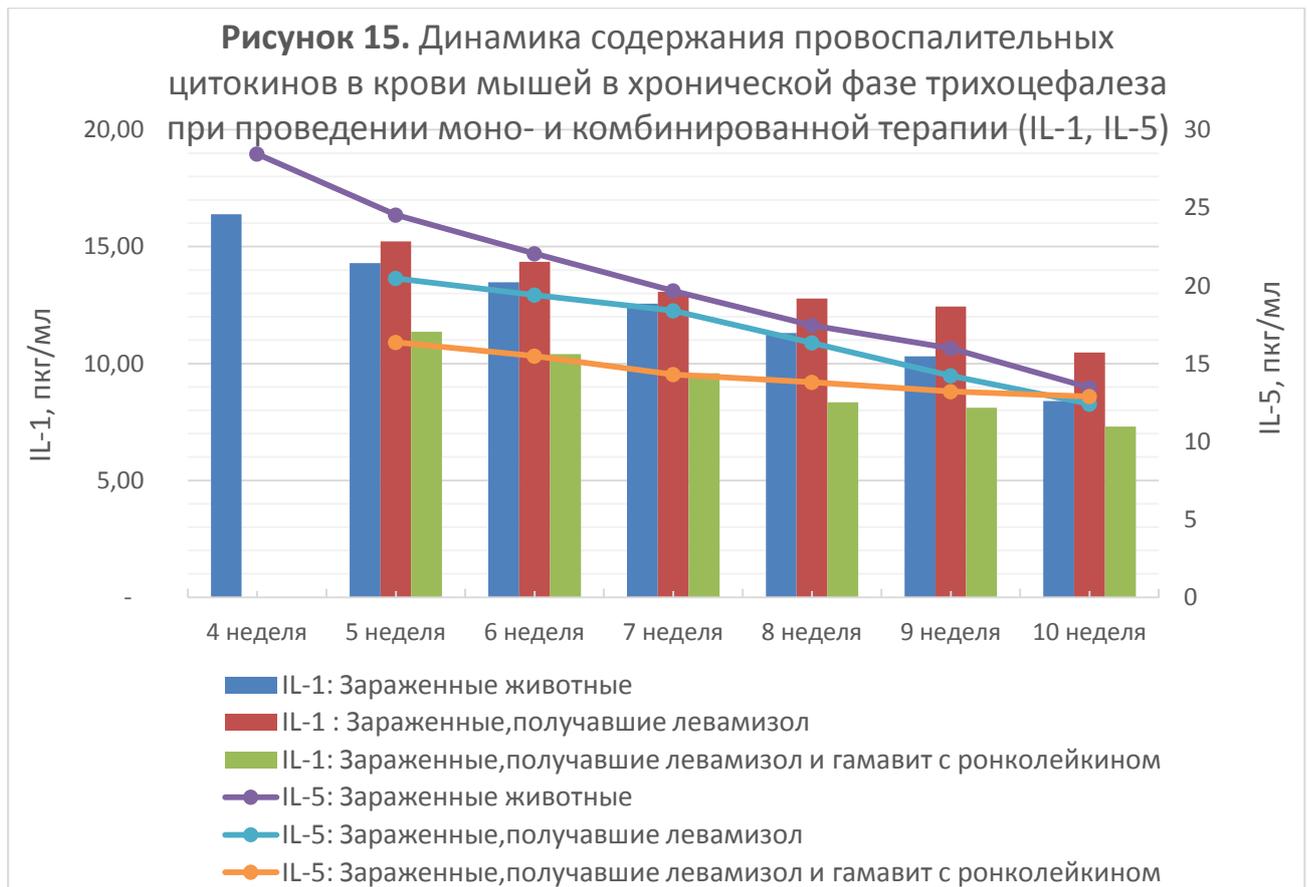


Рисунок 17. Изменение цитологических показателей апоптоза в крови при хроническом течении гетеракидоза и проведении моно- и комбинированной терапии

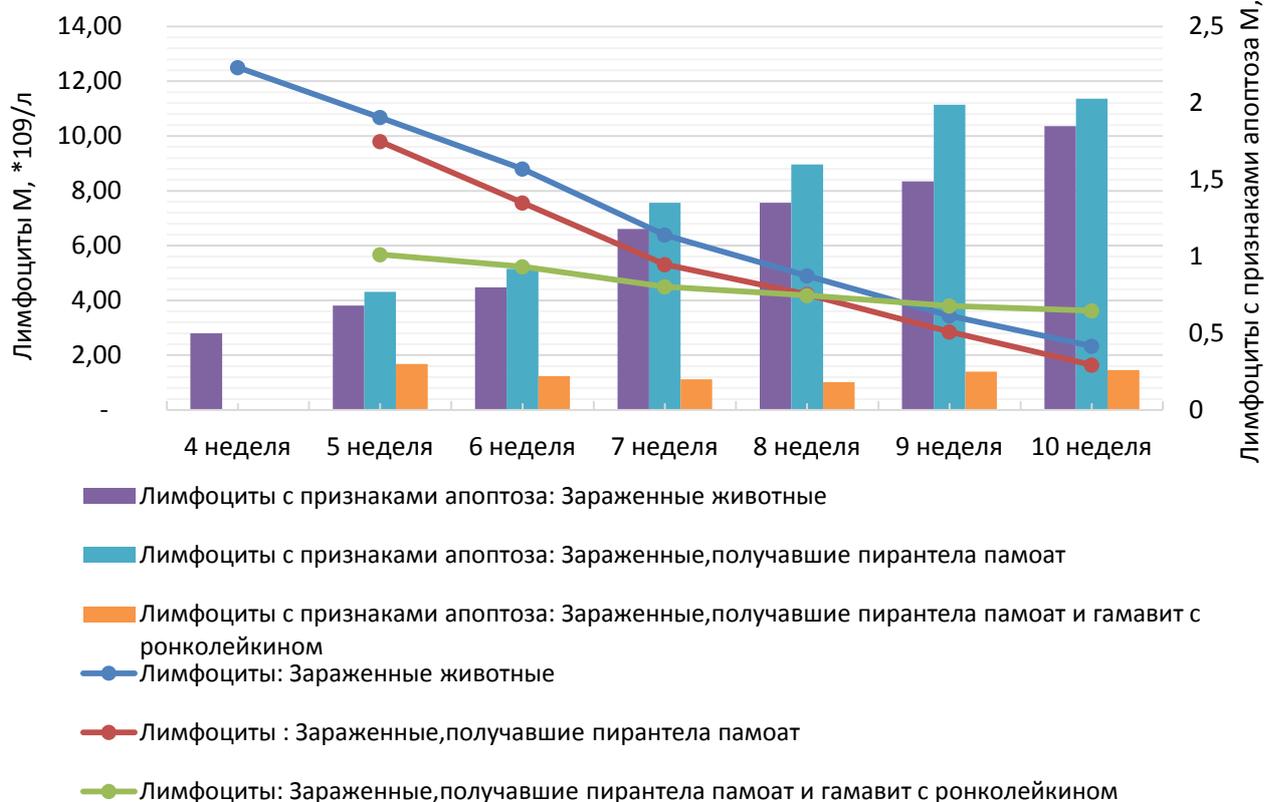
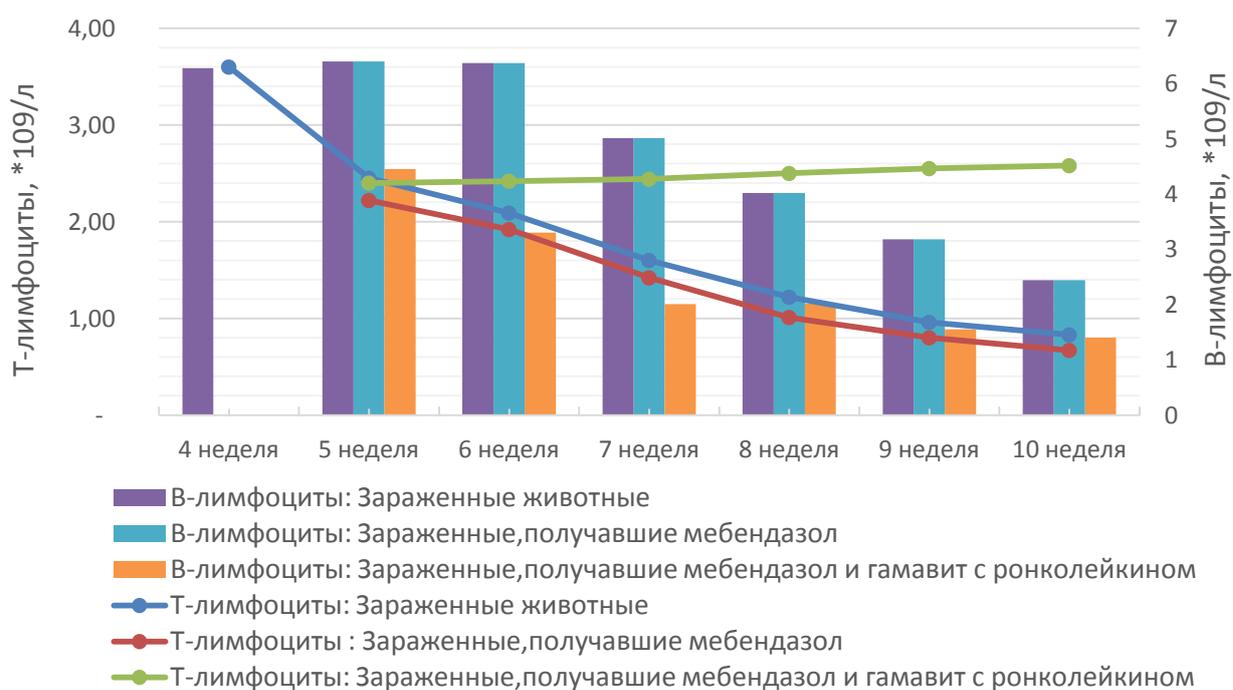


Рисунок 18. Изменение содержания Т- и В-лимфоцитов в крови кроликов в хронической фазе пассалуроза при проведении моно- и комбинированной терапии



5. Микро - морфологические признаки иммунопатологии при гельминтозах и их лечении

Установленная нами морфологическая картина патологических процессов в тканях тонкого кишечника, печени, почек, сердца, легких, селезенки и тимуса в острой фазе гельминтозов свидетельствует о системной и региональной гипер- иммунореактивности и характеризуется нарушениями секреции эпителиоцитов и гепатоцитов, дистрофией клеток паренхимы органов, нарушением микро-кровообращения и проницаемости стенок сосудов, пролиферацией клеточных элементов сосудистой стенки, периваскулярными изменениями в виде клеточных инфильтратов и др. Это подтверждается многими авторами при большинстве гельминтозов [Новак М.Д., 2004; Соловьева О.Г. с соавт., 2010; Куликова С.В. с соавт., 2010, 2011; Малеев В.В. с соавт., 2011 и др.].

Все изменения совпадали по времени и протекали параллельно клеточным реакциям, выразившимся в последовательной смене в составе инфильтратов различных популяций лимфоцитов, плазматических клеток, макрофагов, полиморфно-ядерных лейкоцитов, тучных клеток и фибробластов.

Результаты морфологических исследований кишечника, печени и почек у зараженных животных свидетельствовали о наличии белковой дистрофии энтероцитов, гепатоцитов и нефроцитов, преобладании лимфоцитарных инфильтратов. Эти изменения встречались в различной комбинации, определяя степень гистологической активности и стадию гельминтоза. Выраженность указанных изменений в наших исследованиях зависела от продолжительности инвазионного процесса.

Эксперимент показал, что в острой фазе гельминтозов особенно выражено развитие реакций гиперчувствительности в форме аллергического воспаления в тканях тонкого кишечника, печени, почек, легких и селезенки (Рис.19, 20, 21, 22, 23, 24).

Аллергический ответ организма животных проявился самым различным образом, в том числе в виде эозинофильной пневмонии у мышей при сифациозе, аллергического миокардита у кроликов при пассалурозе, гепатита у мышей при сифациозе и трихоцефалезе.

Характерным признаком воспаления в острой фазе гельминтозов являлось и наличие в инфильтратах и среди клеток грануляционной ткани большого количества эозинофильных лейкоцитов, а также само возникновение в тканях кишечника, легких и почек таких гранулем.

Клеточный состав гранулем, их структура и локализация зависели от особенностей того или иного гельминтоза, вызывающего воспалительный процесс, хотя по морфологии они далеко не всегда являются специфическими. По нашему мнению, это связано с тем, что в формировании воспалительных гранулем различного происхождения участвуют в разных количественных соотношениях по существу одни и те же клеточные элементы: гистиоциты,

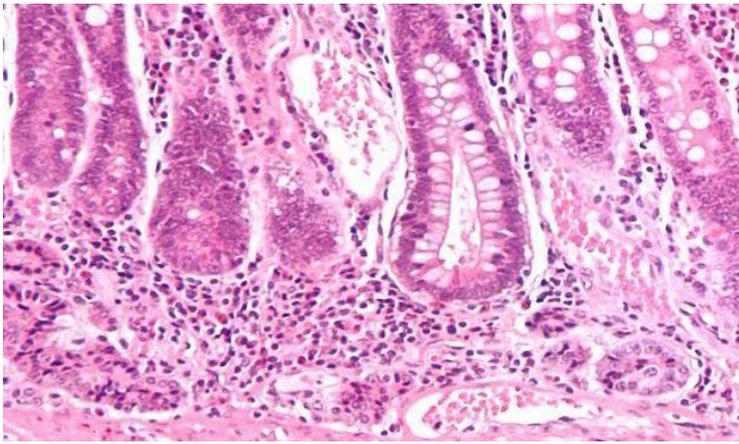


Рис. 19. Микрофотография участка тонкого кишечника мыши на 3 сутки при сифациозе. Полнокровие и отечность слизистой. Лимфо- гистиоцитарная инфильтрация. Гематоксилин– эозин (x 400).

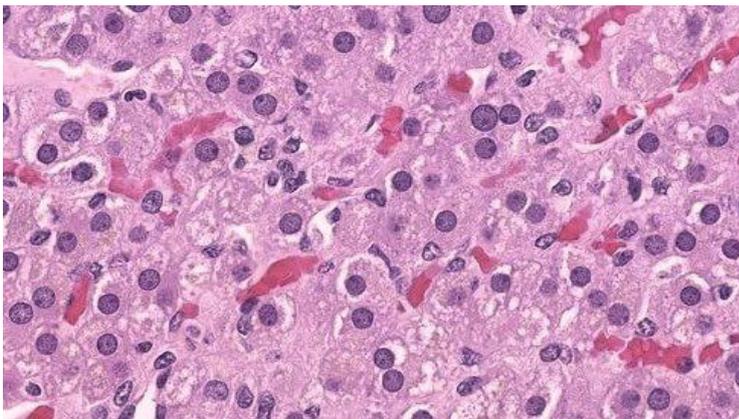


Рис. 20. Микрофотография участка печени кролика на 14 сутки при пассалурозе. Гиперемия, дистрофия гепатоцитов, нарушение балочного строя. Гематоксилин– эозин (x 600).

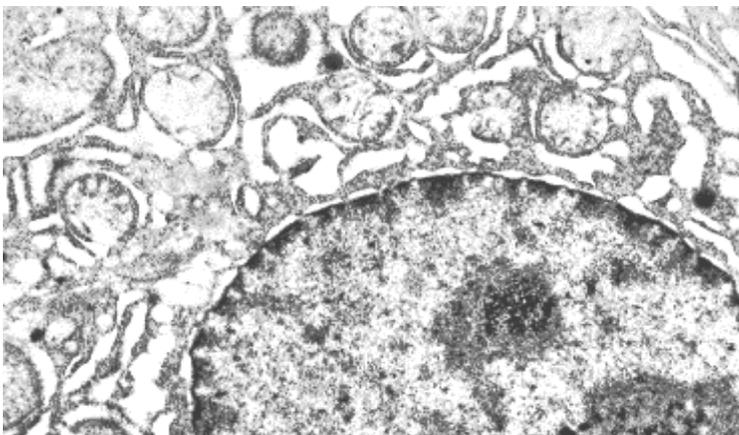


Рис. 21. Электронная микрофотография участка печени мыши на 10 сутки при трихоцефалезе. Расширение перинуклеарного пространства. Набухание митохондрий, деструкция крист (x 15 000).

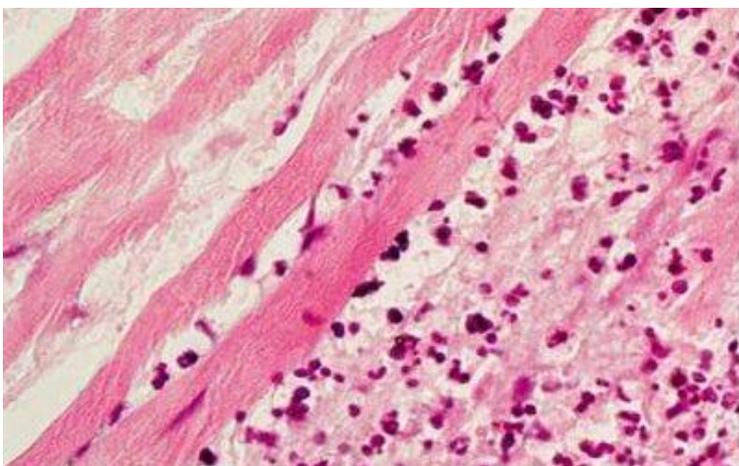


Рис. 22. Микрофотография участка сердца мыши на 17 сутки при трихоцефалезе. Набухание кардиомиоцитов, деформация ядер. Гематоксилин– эозин (x 900).

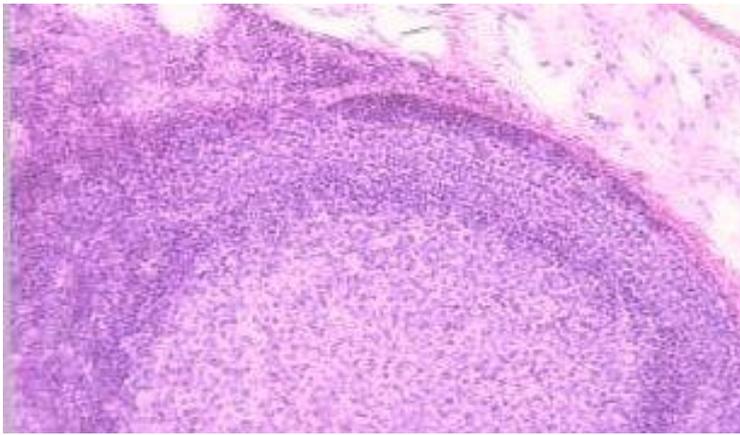


Рис. 23. Микрофотография участка селезенки мыши на 14 сутки при трихоцефалезе. Утолщение серозной оболочки. Отек органа. Полнокровие пульпы. Гематоксилин - эозин (x 600).

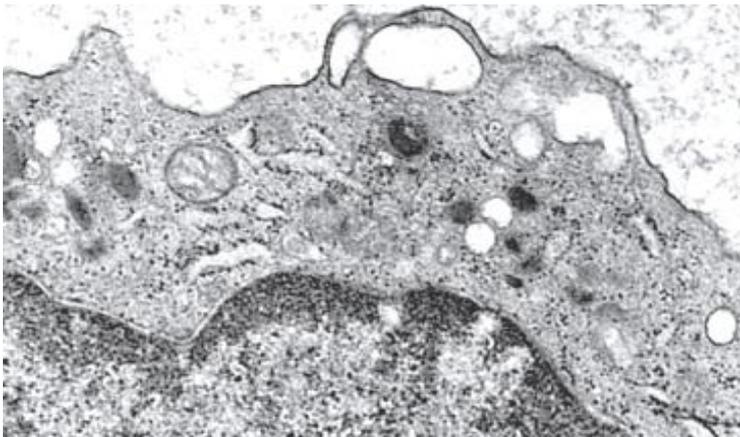


Рис. 24. Электронная микрофотография участка тимуса кролика на 14 сутки при пассалурозе. Гиперплазия. Отек тимоцита. Деформация ядра, деструкция митохондрий (x 22 000).

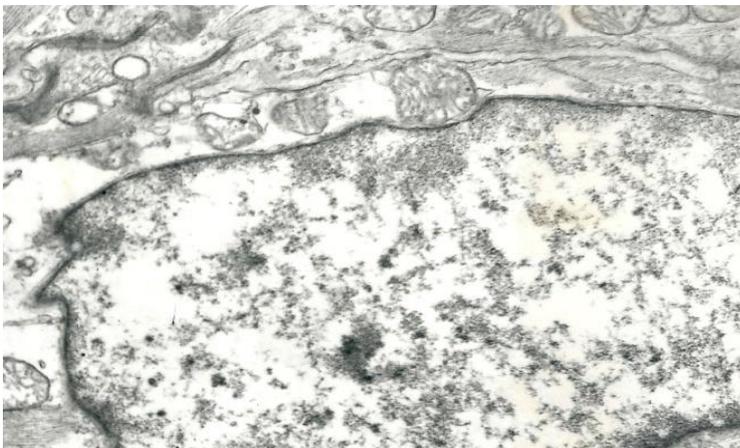


Рис. 25. Электронная микрофотография участка сердца цыплят при аскаридиозе. Вакуолярная дегенерация кардиомиоцитов. Гиперплазия митохондрий. Деформация ядра (x 22 000).

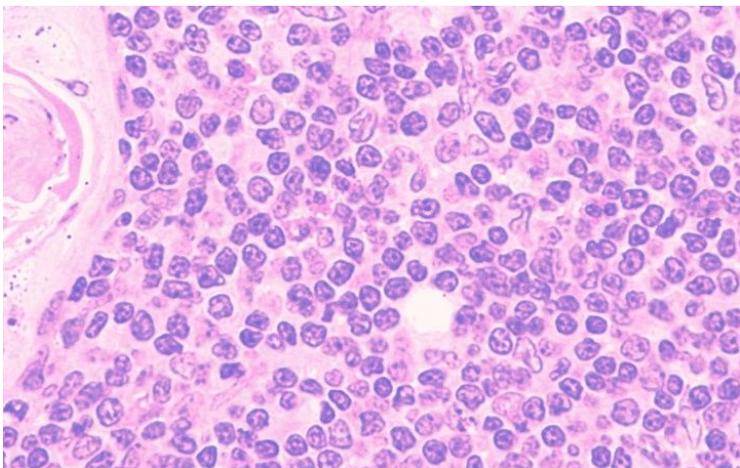


Рис. 26. Микрофотография участка тимуса кролика на 70 сутки при пассалурозе. Апоптоз тимоцитов и лимфоцитов. Гематоксилин - эозин (x 400).

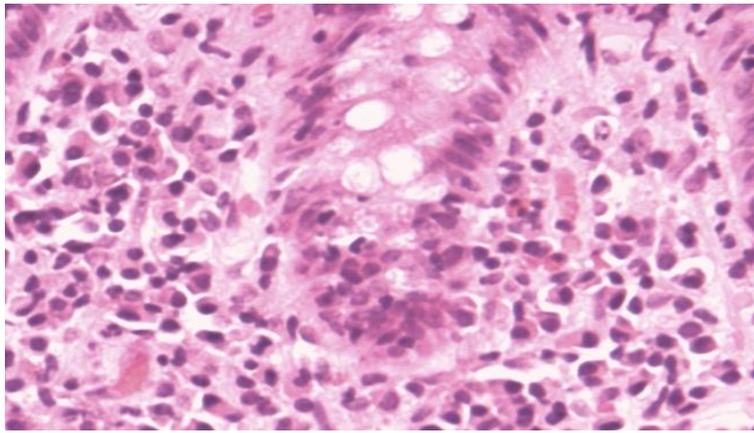


Рис. 27. Микрофотография участка тонкого кишечника кролика на 56 сутки при пассалурозе и монотерапии мебендазолом. Хронический энтерит. Атрофия ворсин. Гемостаз. Гематоксилин - эозин (x 600).

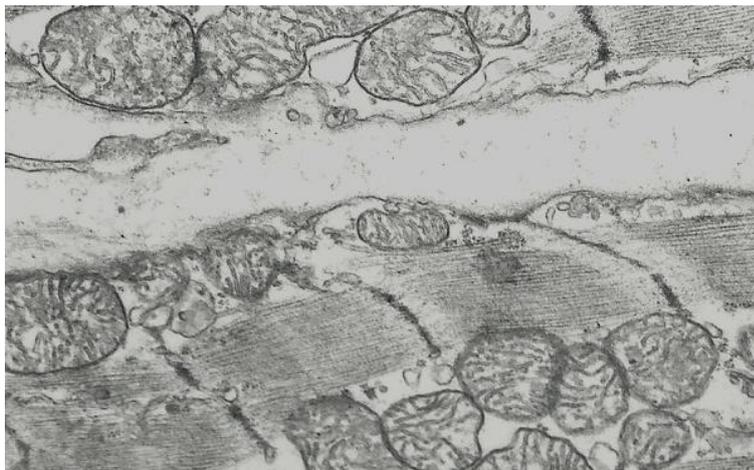


Рис. 28. Электронная микрофотография участка сердца кролика на 56 сутки при пассалурозе и монотерапии мебендазолом. Набухание кардиомиоцитов. Плазматическое пропитывание межклеточных пространств (x 18 000).

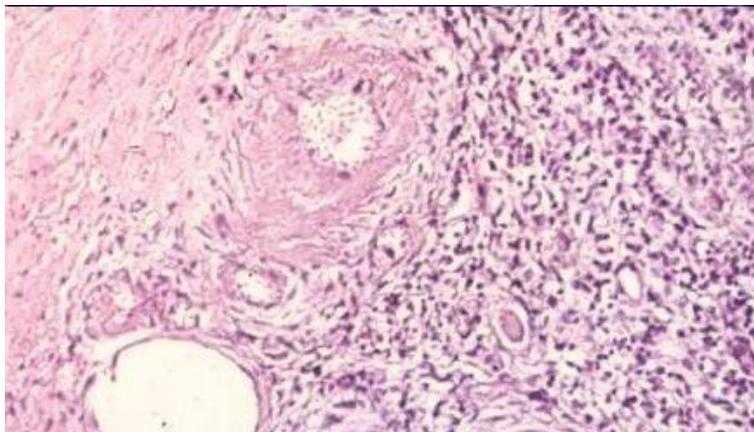


Рис. 29. Микрофотография участка почки мыши на 49 сутки при трихоцефалезе и монотерапии левамизолом. Лимфоидноклеточная инфильтрация. Стаз артериол. Гематоксилин - эозин (x 200).

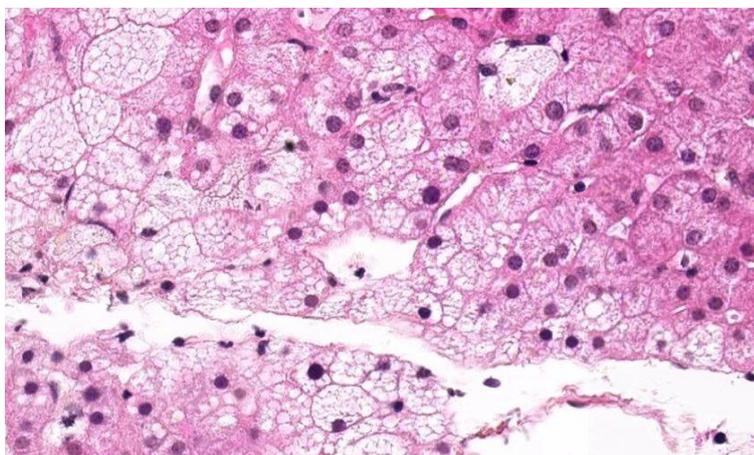


Рис. 30. Микрофотография участка селезенки кролика на 56 сутки при пассалурозе и монотерапии мебендазолом. Лимфоидная инфильтрация. Дистрофия спленоцитов. Гематоксилин - эозин (x 600).

эпителиоидные клетки и плазмоциты с большей или меньшей примесью нейтрофильных и эозинофильных лейкоцитов.

В хронической фазе гельминтозов морфологическая характеристика патологических процессов в тканях тонкого кишечника, печени, почек, сердца, легких, селезенки и тимуса также свидетельствует о системной и региональной иммуносупрессии (Рис. 25,26). Так, гиперплазия лимфоидной ткани портальной стромы печени наблюдалась в случаях давности инвазирования свыше 21 суток при сифациозе мышей и при пассалурозе кроликов. Деструкция эпителия желчных протоков зафиксирована при сифациозе мышей, трихоцефалезе мышей, при пассалурозе кроликов, при аскаридозе цыплят и при гетеракидозе цыплят. Все эти явления регистрировались при сроке инвазирования более 21-28 суток. Результаты наших исследований совпадают с данными литературных источников, где указана связь вышеуказанных морфологических изменений с давностью заболевания [Dixon F.J., 2001].

В паренхиме легких (респираторные бронхиолы и альвеолы) постепенно уменьшаются признаки разрушения альвеолярной стенки и деструкции всех типов альвеолоцитов и эндотелия мелких сосудов. Выявляются признаки неоваскулогенеза и значительное усложнение пространственной организации микрососудов. Все это неизбежно приводит к структурно-функциональной реорганизации воздухоносных путей и респираторного отдела легких, нарушается секреция мокроты.

Признаки миокардита, характерные для острой фазы гельминтозов, сменяются миокардиопатией на фоне дегенеративных изменений миокарда с кардиосклерозом и обусловлены, по видимому, ремодуляцией миокарда на фоне изменения спектра цитокинов. Структурное ре-моделирование миокарда выражалось в форме гипертрофии кардиомиоцитов, деградации фибриллярного коллагена при хроническом течении сифациоза мышей, пассалуроза кроликов и гетеракидоза и аскаридоза цыплят.

В селезенке зараженных животных показатель площади лимфатических узловых образований без светлых центров уступал его значению в контроле при трихоцефалезе мышей и при пассалурозе кроликов; лимфатические узловы образования со светлыми центрами отсутствовали у животных всех экспериментальных групп. Площадь периваскулярных лимфоидных муфт сокращалась.

Тимус больных гельминтозами животных реагировал значительным уменьшением площади коркового вещества органа у всех зараженных животных. Эти данные также подтверждают глубокое иммуно- дефицитное состояние в хронической фазе гельминтозов.

При проведении моно- терапии патологические изменения в органах несколько усиливались, что свидетельствует о токсичности используемых препаратов (Рис. 27,28,29,30).

Комплексная терапия гельминтозов, включающая использование антиоксиданта гамавита и иммуномодулятора ронколейкина вызывала в

лимфоидных органах (селезенка, тимус) животных глубокие позитивные иммуноморфологические реакции. Они выражались в виде расширения Т- и В- зависимых зон. Эти изменения в структурах лимфоидных органов развивались уже на ранних стадиях после применения комплексной терапии, постепенно и интенсивно нарастали, были продолжительными и даже в конце опыта несколько превосходили уровень здоровых животных.

Исходя из принятых современных теорий о роли тимуса в иммунном ответе, расширение коркового вещества тимуса, служит результатом активизации его иммунологических функций, направленных на дифференцировку лимфоцитов, индуцирование иммуно- компетентности клеткам-предшественникам (костномозговым лимфоцитам), усиление контроля иммунологических функций других лимфоидных органов и др.

Иммуноморфологические перестройки в лимфоидных органах животных касаются именно тех структур, которые имеют непосредственное отношение к продукции Т- и В-лимфоцитов и свидетельствует о глубоких иммунологических реакциях в организме, направленных на стабилизацию клеточного и гуморального иммунитета и создание иммунного баланса в организме. Эти данные свидетельствуют о восстановлении и активизации в селезенке и тимусе нарушенного соотношения и синтеза клеток зернистого и эритроидного ростка, а также лимфоидного ряда, направленные на восстановление иммунного баланса в организме и создание прочного иммунитета.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эксперимент показал, что в острой фазе гельминтозов ключевым звеном и первым инициирующим фактором для всех дальнейших процессов иммуно- и патогенеза сразу после заражения является окислительный стресс, который вызван секреторно - экскреторными продуктами и метаболитами личинок гельминтов. ОС использует свободные радикалы и продукты окисления белков (АОРР) в качестве индукторов всех дальнейших событий иммуногенеза – изменения баланса про- и противовоспалительных цитокинов (в основном, за счет TNF- α , IL-1, IL-2, IL-4), дифференцировки Т- хэлперов, включением Th2-ответа и активацией регуляторного цитокина IL-5.

На следующем этапе кооперации осуществляется взаимодействие Т- лимфоцитов с В-лимфоцитами (гуморальный иммунный ответ), в ходе которого В-лимфоциты получают стимуляцию цитокином IL-1, а от Th2 – цитокином IL-2, что вызывает последующее их деление и дифференцировку в клетки памяти или плазматические клетки, которые синтезируют антитела.

В результате усиленной пролиферации Т- и В-лимфоцитов, как следствие, происходит выработка Ig и смена их изотипов. Вначале это – низко-специфические IgM, а затем, под влиянием секретируемых Т-хелперами лимфокинов- высоко-специфические IgG, A и E.

Активная пролиферация Т- и В-лимфоцитов приводит к резкому повышению (на 4-6 порядков) частоты соматических мутаций в гипер-

вариабельных зонах вариабельных генов иммуноглобулинов. В результате, в клетках ослабляется экспрессия факторов, предотвращающих развитие апоптоза, что приводит к нарастающей гибели В-лимфоцитов и Т-лимфоцитов при отсутствии дополнительных сигналов к выживанию. Процессы апоптоза иммуно- компетентных клеток постепенно нарастают только к концу острой фазы гельминтозов, выражаясь плавным увеличением дисбаланса между про-апоптотическим белковым маркером Caspase-3 и против- апоптотическим белковым маркером Bcl-2.

Антигены, взаимодействуя с фиксированными на клетках антителами, приводят к секреции гистамина, серотонина, эозинофильных хемотаксических факторов, простагландинов и других медиаторов, которые действуют на сосуды и клетки-мишени, опосредованно включая в развитие воспалительной и аллергической реакции эозинофилы, нейтрофилы, моноциты и тромбоциты. За счет активации лейкопоза и развития лейкоцитоза (с преобладанием эозинофилии) формируются признаки гиперчувствительности немедленного типа и системного воспаления, проявляющиеся на биохимическом и морфологическом уровнях в органах и тканях.

Ключевым событием хронической фазы гельминтозов можно считать затухание окислительного стресса с переключением окислительных процессов на вещества липидной природы и с последующей сменой соотношения между продуктами окисления белков (АОРР) и продуктами окисления липидов (ПОЛ) в сторону последних, изменение баланса про- и противовоспалительных цитокинов (в основном, за счет снижения TNF- α , IL-2, IL-10 и продолжающегося роста IL-4) в сторону подавления воспалительного эффекта, снижение пролиферации Т- и В-лимфоцитов и уменьшение выработки Ig.

Как показал эксперимент, процессы апоптоза иммуно- компетентных клеток значительно активируются во время хронической фазы гельминтозов, выражаясь в продолжающемся увеличении количества Caspase-3 на фоне снижения Bcl-2 и в развитии еще большего дисбаланса между уровнями этих белковых маркеров.

За счет подавления лейкопоза и развития в последующем лейкопении формируются признаки затухания воспалительных процессов, проявляющиеся на биохимическом и морфологическом уровнях в органах и тканях, на фоне развивающейся иммуно- супрессии.

Исследования всех вышеназванных параметров при проведении двух разных стратегий лечения гельминтозов - этиотропной моно - терапии с использованием терапевтических доз альбендазола, левамизола, мебендазола, медамина и пирантела памоата и комбинированной терапии, сочетающей антигельминтный препарат с антиоксидантом гамавитом и иммуномодулятором ронколейкином позволили не только подтвердить правильность установленных механизмов иммуно- и патогенеза гельминтозов, но и обосновать преимущества комплексного лечения над моно- терапией и разработать практические рекомендации по обязательному использованию в

лечении гельминтозов компонентов, корректирующих состояние оксидантной и иммунной системы.

Восстановление всех изученных показателей иммунитета при использовании комплексной терапии в нашем эксперименте показало несостоятельность утверждений о безопасности применения моно-терапии при дегельминтизации. Поэтому открытие новых анти-стрессовых и иммуномодулирующих препаратов нового поколения позволит в дальнейшем поставить под контроль иммунную систему и за счет эффективной защиты рецепторов иммунных клеток от повреждений во многих случаях предотвратить развитие иммунных дисфункций при гельминтозах. Это поможет поддерживать высокую иммунокомпетентность организма хозяина и снизить отрицательные последствия инвазий, повышая сохранность и продуктивность сельскохозяйственных животных и здоровье человека.

ВЫВОДЫ

1. Основным иницирующим фактором иммуногенеза в острой фазе гельминтозов является развивающийся окислительный стресс и накопление продуктов окисления белков-АОРР, которые активируются инвазией и стимулируют выработку про-воспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 и IL-2, повышение уровня которых направляет развитие противопаразитарного иммунитета по Th2-пути, способствует развитию системного остро-фазного ответа за счет стимуляции лейкопоэза и развития лейко- и лимфоцитоза.

2. Активация IL-5, IL-4 и IL-10 в острой фазе гельминтозов, которые секретируются Th2-клетками, дополнительно стимулируют процесс пролиферации В-лимфоцитов, стимулируют пролиферацию и дифференцировку предшественников эозинофилов и активируют хемотаксис зрелых эозинофилов. В результате усиливается продукция иммуноглобулинов активированными В-лимфоцитами, происходит смена их изотипов с IgM на IgG и IgE и развивается эозинофилия и гиперглобулинемия.

3. Снижение уровня Bcl-2 в лизате лимфоцитов на фоне существенного подъема значений Caspase-3 и TNF- α , который регулирует танатогенную программу, свидетельствует о смещении баланса апоптогенных факторов в сторону активизации запрограммированной гибели клеток к концу острой и началу хронической фазы гельминтозов и нарушении соотношений клеточных суб-популяций, что служит явным признаком развития воспалительной реакции и гиперчувствительности немедленного типа.

4. Основным иницирующим фактором смены событий иммуногенеза в хронической фазе гельминтозов является изменение направленности окислительного стресса за счет снижения продуктов окисления белков (АОРР) и накопления продуктов окисления липидов-ПОЛ, дисбаланс которых приводит к подавлению выработки про- и противо-воспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 и IL-2 и IL-10), кроме IL-4, угнетению пролиферации и дифференцировки Т-, В-лимфоцитов и эозинофилов.

5. Уменьшение продукции иммуноглобулинов В-лимфоцитами и очередная смена их изотипов с IgE на IgA, увеличение дисбаланса между белковыми маркерами Caspase-3 и Bcl-2, в результате чего значительно активируются процессы апоптоза В- и Т-лимфоцитов, вызывают дополнительное подавление лейкопоэза, что приводит к гипоглобулинемии, лейкопении, затуханию выраженных системных и локальных воспалительных реакций и гиперчувствительности на фоне прогрессирования иммуносупрессии.

6. Диагностическими критериями гиперчувствительности в острой фазе и иммуносупрессии при хроническом течении гельминтозов также послужили уровни АлАТ, АсАТ, ЩФ и ГТФ-γ в крови и морфологическая характеристика патологических процессов в тканях и органах, которые проявились нарушением кровообращения, дистрофиями, отеком и клеточной инфильтрацией – в острой фазе и гиперплазиями, фиброзом, сокращением площади лимфоидных муфт селезенки и уменьшением площади коркового вещества тимуса – в хронической фазе гельминтозов.

7. Использование антигельминтных препаратов в терапевтических дозах в режиме моно- терапии (альбендазол, мебендазол, медамин, пирантела памоат) показало усиление патологических реакций клеточного и гуморального звена иммунитета, вызванное самой инвазией. Только дегельминтизация левамизолом при трихоцефалезе мышей вызывала некоторые улучшения показателей иммунной и биохимической реактивности по сравнению с зараженными животными.

8. Комплексная терапия гельминтозов с применением антиоксиданта гамавита и иммуно- модулятора ронколейкина вызывала выраженные позитивные реакции в показателях ОС, уровне и балансе цитокинов, иммуноглобулинов, в ферментативном спектре сыворотки крови животных, лейкоцитарной формуле и балансе белков, регулирующих апоптоз (Caspase-3, Bcl-2), а также в морфологической структуре тканей и органов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Определение уровня продуктов окисления (AOPP, ПОЛ) при гельминтозах может служить предиктором развивающейся стадии инвазии и сроков её хронизации и может быть использовано как доступный диагностический критерий при наблюдении за больными животными.

2. Определение продукции цитокинов при гельминтозах может служить маркером особенностей протекания воспалительного процесса, развития реакций гиперчувствительности или иммунодепрессии и основанием для дальнейшего индивидуального подбора терапии.

3. Значимыми для оценки выраженности иммунопатологических процессов при гельминтозах явилось повышение уровней сывороточных цитокинов TNF-α, IL-1, IL-2 и IL-4, что позволит использовать их для мониторинга тяжести течения инвазии.

4. Продукция молекулярных маркеров Caspase-3 и Bcl-2 может

свидетельствовать об усилении апоптоза лейкоцитов и развивающейся иммунодепрессии, поэтому её определение может быть использовано в выборе стратегии лечения для поддержания высокой иммуно- компетентности и снижения отрицательных последствий инвазий.

5. Применение антиоксидантов в комплексной терапии гельминтозов на практике даёт возможность избежать активации ОС, который формирует дисбаланс цитокинов и развитие глубоких иммунных дисфункций на ранних этапах развития инвазии, поэтому является перспективным направлением для лечения остро протекающих и интенсивных инвазий.

6. Применение иммуно- модуляторов в комплексной терапии гельминтозов на практике даёт возможность снизить развитие дисбаланса цитокинов и связанные с ним нарушения лейкопоэза, что также является перспективным направлением для лечения длительных и тяжело поддающихся лечению инвазий.

7. Совместное использование антиоксидантов и иммуно- модуляторов в комплексной терапии гельминтозов на практике даёт возможность эффективно избежать развития любых иммуно- патологических процессов и является перспективным направлением для лечения любых инвазий.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве образования и науки Российской Федерации:

1. *Ю.К.Богоявленский, Е.А.Гришина.* Реактивность почек при гельминтозах и после лечения антигельминтиками. «Медицинская паразитология и паразитарные болезни», М., 1995, №2, С. 27-30.

2. *Е.П.Широкова, Е.А.Гришина.* Микроструктурные изменения органов кролика при пассалурозе. «Медицинская паразитология и паразитарные болезни», М., 1997, № 2, С. 18-21.

3. *Е.А.Гришина, А.С.Довгалева.* Некоторые механизмы вторичной иммуносупрессии в процессе хронизации гео- гельминтозов. Российский паразитологический журнал. - М., 2016. - №2 (36). - С. 202-209.

4. *Е.А.Гришина.* Антигены и метаболиты гельминтов как регулирующие факторы противопаразитарного иммунитета. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. М., 2016; №2: С. 58–63.

5. *Е.А.Гришина.* Роль цитокинов в развитии иммунитета при гельминтозах. Российский паразитологический журнал. — М., 2016. — Т. 38. — Вып. 4 . — С. 521–526.

6. *Е.А.Гришина.* Изменение цитокинового статуса лабораторных животных при развитии гельминтозного процесса. «Актуальные вопросы ветеринарной биологии», 2017.-№ 1 (33): С.8-12.

7. **Е.А.Гришина.** Исследование показателей апоптоза лимфоцитов крови животных при гельминтозах. Российский паразитологический журнал. – 2017. – Т. 40. – Вып. 2. – С.162–167.
8. **Е.А.Гришина.** Исследование активности окислительного стресса у животных в острой стадии гельминтоза и на фоне терапии. Журнал «Ветеринария, зоотехния и биотехнология». 2017, № 10, с.84-90.
9. **Е.А.Гришина.** Цитокиновый статус лабораторных животных при гельминтозах и их лечении Вестник Уральской медицинской академической науки. 2017, Том 14, №4, С.332-340, DOI: 10.22138/2500-0918-2017-14-4-332-340.
10. **Е.А.Гришина, А.А.Еровиченков.** Биохимическое обоснование применения комплексной терапии в острой фазе экспериментальных гельминтозов животных. Журнал Инфектологии, 2017, Том 9, №3, С.32-39, DOI: 10.22625/2072-6732-2017-9-3-32-39.
11. **Е.А.Гришина.** Динамика изменений маркеров окислительного стресса у животных в острой стадии гельминтозов. «Актуальные вопросы ветеринарной биологии», 2018.-№ 1(37): С.11-14.
12. **Е.А.Гришина.** Исследование молекулярных показателей апоптоза лимфоцитов крови мышей при развитии и лечении трихоцефалеза. Ветеринарная патология. 2018, № 3. С.11-16.
13. **Е.А.Гришина.** Особенности иммунитета при гельминтозах. Современные проблемы и подходы к их решению. Электронный журнал АгроЭкоИнфо. – 2018, №3. – http://agroecoinfo.narod.ru/journal/STATYI/2018/3/st_315.doc.
14. **Е.А.Гришина.** Изменение молекулярных показателей апоптоза лимфоцитов крови мышей при сифациозе и его лечении. Журнал «Ветеринария, зоотехния и биотехнология». 2018, № 8, С.14-20.
15. **Е.А.Гришина.** Изменение биохимических показателей крови при развитии острой фазы пассалуроза кроликов. Ветеринарная патология. 2018, №4, С.28-32.
16. **Е.А.Гришина.** Роль апоптоза лейкоцитов в развитии иммуносупрессии при трихоцефалезе мышей. Журнал «Ветеринария, зоотехния и биотехнология». 2019, №2, С.16-21.

Монографии, статьи, материалы конференций:

17. **Ю.К.Богоявленский, Т.К.Раисов, Н.В.Чебышев, Е.А.Гришина, С.В.Жукова.** Патология при гельминтозах (**монография**).- М.,1991,182 с.
18. **Ю.К.Богоявленский, М.Г.Мушкambarова, Е.А.Гришина.** Патоморфология тканей и органов хозяина после применения антигельминтиков (**монография**).- Ашхабад, 1992, 114 с.
19. **Н.В.Чебышев, Ю.К.Богоявленский, Е.А.Гришина.** Гельминтозы: органно-системные процессы в их патогенезе и лечении (**монография**).- М.: Медицина, 1998, 240 с.

20. *Т.Ю.Макарова, Е.А.Гришина.* Структурные нарушения органов овец при диктиокаулезе и после применения антигельминтика ринтала. Сборник научных трудов по материалам докладов Всероссийской научно-практической конференции, Кемерово, 1996, С. 62.

21. *Е.А.Гришина, Т.Ю.Макарова.* Структурные нарушения органов овец при диктиокаулезе и после использования антигельминтика панакура. Сборник научных трудов по материалам докладов Всероссийской научно-практической конференции, Кемерово, 1996, С. 44.

22. *Е.А.Гришина, Н.Н.Земскова.* Морфофункциональное состояние ткани легких при гельминтозах. Тезисы научной конференции института паразитологии «Систематика, таксономия и фауна паразитов», 22-24 окт. 1996 г., М., 1996, С. 40-41.

23. *Е.А.Гришина, Ю.К.Богоявленский.* Трансформация морфологического состояния некоторых органов хозяина при аскаридозе и гетеракидозе в процессе использования противогельминтных препаратов. Сборник научных трудов Всероссийской научной конференции «Взаимоотношения паразита и хозяина», М., 1998, декабрь, С. 37.

24. *Ю.К.Богоявленский, Е.А.Гришина.* Морфофункциональное состояние тканей гетеракисов и цыплят при инвазии и лечении медамином. Материалы Всероссийской научной конференции, посвященной 120-летию со дня рождения акад. К.И. Скрябина, 8-10 дек. 1998 г., М., 1999, С. 6 – 14.

25. *Е.А.Гришина, Ю.К.Богоявленский.* Реактивность печени при гельминтозах и после лечения антигельминтиками. Сборник научных трудов РМАПО МЗ РФ «Актуальные вопросы эпидемиологии и инфекционных болезней», М., 1999., Вып. 3, С. 296-300.

26. *Е.А.Гришина.* Формирование патологических процессов в головном мозге при трихоцефалёзе и сифачиозе мышей. Сборник научных трудов РМАПО МЗ РФ «Актуальные вопросы эпидемиологии и инфекционных болезней», М., 2001, Вып. 2, С.112-118.

27. *Е.А.Гришина, Г.В.Гончарова.* Поражения печени при нематодозах и после лечения некоторыми антигельминтными препаратами. Сборник ИнПарАН РФ, 2002, С. 210-214.

28. *Е.А.Гришина.* Патологические процессы в нервной системе мышей при лечении трихоцефалеза и сифачиоза антигельминтиком комбантрином. Сборник трудов научно-практической конференции, посвященной 125-летию акад. К.И.Скрябина «Современные проблемы общей, медицинской и ветеринарной паразитологии», Витебск, ВГМУ, 2004, С. 230-233.

29. *Ю.Б.Лазарева, А.В.Филиппова, Л.М.Романова, Е.А.Гришина.* Актуальные проблемы подавления иммунитета при гельминтозах. Фундаментальные науки и практика. Сборник научных трудов., РФ, 2010, вып. 2, С. 70 – 71.

30. *Е.А.Гришина, Е.А.Черникова, О.Н.Авдеева.* Создание банка сывороток как необходимое условие формирования системы гарантии

качества лабораторных исследований паразитарных заболеваний. В сборнике: Актуальные вопросы медицины XXI века. Сборник статей Международной научно-практической конференции. г. Уфа, РФ, 2014. С. 18-22.

31. ***Е.А.Гришина, Е.А. Черникова, С.С. Козлов.*** Современные методы диагностики паразитозов: проблемы (двойники, артефакты), интерпретация результатов. Материалы IX Всероссийской научно-практической конференции «Инфекционные аспекты соматической патологии у детей» -М.,18-19 мая, 2016.

32. ***Е.А. Гришина.*** Роль окислительного стресса в патогенезе острой стадии гельминтоза и на фоне терапии. Материалы IX Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием. Москва, 27–29 марта 2017 г. Журнал «Инфекционные болезни». 2017, т.15, Приложение №1, с.75-76.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

AOPP	- (advanced oxidation protein products) окислительное повреждение белков
Bax и Bad	- анти- апоптозные белки большого семейства Bcl-2
Bcl-2	- семейство белков, ингибирующих апоптоз
Caspase-3	- про- апоптотический белок, запускающий эффекторную необратимую стадию апоптоза
CD4+T клетки	- все виды Т- хелперных клеток (Th1, Th2 и Th0)
ELISA	- метод иммуноферментного анализа
Fas- лиганд	- белок, известный как «фактор смерти», связывается с FAS-рецептором и индуцирует гибель клеток
IFCC	- кинетический метод биохимических исследований
Ig	- иммуноглобулины
IL	- интерлейкины
L	- общее количество лейкоцитов
LB	- общее количество В-лимфоцитов
LT	- общее количество Т-лимфоцитов
НК-клетки	- цитотоксические клетки, «натуральные киллеры»
NO	- оксид азота (монооксид азота)
OxyStat	- суммарный уровень пероксидов (продуктов окисления) липидов (ПОЛ)
ROS	- (reactive oxygen species) активные формы кислорода
Th1 и Th2	- Т-хелперы (от англ. helper — помощник) -Т-лимфоциты, усиливающие адаптивный иммунный ответ
TNF-α	- фактор некроза опухоли -альфа
АГ	- антигены
АЗТ	- аллергия замедленного типа
АлАТ	- аланинтрансфераза
АНТ	- аллергия немедленного типа
АОЗ	- анти- оксидантная защита
АсАТ	- аспаратаминотрансфераза
ГТФ -γ	- глутамилтрансфераза- γ
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ЕАС	- реакция комплементарного розеткообразования с эритроцитами
Е-РОК	- реакция розеткообразования с эритроцитами
ОС	- окислительный стресс
ПВК	- противовоспалительный коэффициент
ПОЛ	- продукты окисления липидов
СЭП	- секреторно-экскреторные продукты
ЩФ	- щелочная фосфатаза

ОТ АВТОРА

Выражаем глубочайшую признательность и благодарность
за отеческую поддержку и помощь в самом начале профессионального
пути моему учителю - члену-корреспонденту РАМН СССР,
профессору **Ю.К. Богоявленскому**

Выражаем искреннюю признательность
за оказанную помощь в формировании идеи и организации эксперимента
моему наставнику - профессору **Н.В. Демидову**

Выражаем искреннюю благодарность
за предоставленную возможность завершить многолетний труд
руководству ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России

Выражаем глубокую благодарность
за ценные советы и отеческую поддержку
научному консультанту профессору **А.С. Довгалёву**

Выражаем глубокую признательность и благодарность
за глубокий анализ работы, профессиональные советы и замечания
всем рецензентам и оппонентам

Сердечно благодарим
за помощь, поддержку, пример целеустремленности и трудолюбия всех
моих молодых коллег – сотрудников **НИИ** молекулярной и
персонализированной медицины ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава
России