

Изменение молекулярных показателей апоптоза лимфоцитов крови мышей при сифациозе и его лечении

Е. А. Гришина

кандидат биологических наук, доцент, заместитель руководителя НИЦ, ведущий научный сотрудник отдела молекулярно-биологических исследований, Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, Москва, Российская Федерация
E-mail: gelana2010@yandex.ru

Аннотация

Проведено изучение некоторых молекулярных показателей апоптоза лимфоцитов периферической крови при сифациозе мышей, а также при антигельминтной монотерапии левамизолом и комплексной иммуномодулирующей терапии с ронколейкином.

Исследование показало, что развитие инвазионного процесса вызывает активацию проапоптотического белка Caspase-3 и снижение экспрессии Bcl-2 в лимфоцитах животных, что свидетельствует об усилении процесса апоптоза лимфоцитов. Монотерапия и комплексная терапия показала сдерживающий эффект в развитии апоптоза лимфоцитов.

Ключевые слова: гельминтозы, иммунодепрессия, апоптоз лимфоцитов, индукторы апоптоза, ингибиторы апоптоза, этиотропная терапия, иммуномодулирующая терапия.

Veterinary science

Study of lymphocytes apoptosis molecular markers in mice blood during syfaciosis and its treatment

E. A. Grishina

Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Head of Department of Molecular Biology of research center, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Moscow, Russian Federation
E-mail: gelana2010@yandex.ru

Abstract

The aim of the study was to investigate molecular markers of apoptosis in mice' lymphocytes of peripheral blood. Mice were infected with syphaciosis and were prescribed monotherapy of levamisole or complex therapy with ronkoleukin.

The study showed that activation of Caspase-3 protein and decrease of expression of Bcl-2 in animal lymphocytes were caused by gelminths' invasion. These changes increased lymphocytes' apoptosis.

However, both mono and complex therapy showed the holding effect in lymphocytes apoptosis.

Keywords: helminthosis, immunity, immunodepression, apoptosis of lymphocytes, inductors and inhibitors of apoptosis.

Введение. Исследование апоптоза клеток крови при развитии гельминтозного процесса и в ходе проведения терапии позволяет наиболее точно определить механизмы развития иммунопатологии при гельминтозах и определить правильную стратегию лечения.

Установлено, что метаболиты некоторых гельминтов обуславливают апоптотическую активность как в соматических, так и в генеративных клетках хозяина [1, 6, 7, 16]. Однако выявленных фактов индукции апоптоза в иммунокомпетентных клетках совсем мало. Именно эти данные позволяют наиболее точно определить механизмы развития иммунопатологии в форме гиперчувствительности в острой фазе инвазионного процесса или в форме иммуносупрессии при хронизации гельминтозного процесса. Было показано, что апоптоз CD4+ Т-лимфоцитов селезенки максимально возрастает в острую стадию шистосомоза и снижается в хроническую стадию заболевания [8, 9, 16]. Также было установлено, что метацестоды и цисты свиных цепней секретируют цистеин-протеазу, которая *in vitro* вызывает в CD4+ Т-лимфоцитах человека типичные для апоптоза морфологические нарушения (целостность клеточной мембраны, перетяжки и фрагментация ядра, хроматиновая конденсация, появление апоптотических тел и исчезновение микротрубочек) [22].

Как известно, основными участниками эффекторной стадии апоптоза являются цистеиновые протеазы (каспазы), которые существуют в клетке как неактивные проформы и зимогены и которые расщепляются на активные формы ферментов, активируя апоптоз. Они расщепляют белки весьма характерным для апоптоза образом – в местах расположения аспарагиновых оснований. Одна из основных функций эффекторных каспаз заключается в прямом и опосредованном разрушении клеточных структур за счет протеолиза различных субстратов. При этом гидролизу подвергаются белки ядерной мембраны, разрушается цитоскелет, расщепляются белки, регулирующие клеточную адгезию. К таким эффекторным исполнителям апоптоза и относится каспаза-3. К ключевым дистальным механизмам реализации апоптоза относят активацию целого каспазного

каскада [10, 20]. Также они обуславливают протеолиз ингибитора ДНК-азы и фрагментацию, нарушение цитоскелета клетки.

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

Митохондриальный путь характеризуется перекрестным взаимодействием между каспазами, проапоптотическими белками семейства Bcl-2 (Bax и Bad), а также цитохромом С, AIF (apoptosis inducing factor), высвобождаемых митохондриями. Большое количество белков Bcl-2 постоянно экспрессируется на внешней митохондриальной мембране. Они выполняют функцию защиты клеток от апоптоза путем поддержания инактивированного состояния проапоптотического белкового комплекса, в состав которого входят прокаспаза-9, адаптер Araf-1 (apoptotic protease activating factor-1), AIF, цитохром С и ряд других факторов. В семействе белков Bcl-2 также существует группа апоптоз-опосредующих факторов. Для переключения клетки в режим апоптоза необходимо связывание Bcl-2, что нейтрализует его ингибирующее действие. Такое связывание может осуществляться любым из проапоптотических факторов Bcl-2 семейства [21]. В результате увеличивается проницаемость мембраны митохондрий, происходит высвобождение цитохрома С в цитоплазму, связывание его с Araf-1, что приводит к активации каспазы-9, которая, в свою очередь, активирует каспазу-3 [10, 18].

Имеются данные, что каспаза-3 принимает также участие в регуляции клеточного цикла [12, 15], процессинге цитокинов [23], дифференцировке миоцитов [13], пролиферации Т-лимфоцитов [7, 16]. Иными словами, каспаза-3 имеет плеiotропные функции [11, 19], далеко не ограничивающиеся участием в реализации внутриклеточной апоптотической программы.

Предполагается, что для регуляции ответа клетки на сигналы смерти имеет зна-

чение соотношения про- и антиапоптозных белков. Поэтому изучение динамического равновесия между про- и противоапоптотическими маркерами в иммунокомпетентных клетках очень важно для понимания механизмов развития иммунопатологии на всем протяжении формирования инвазионного процесса.

В то же время правильный выбор терапевтической стратегии и снижение побочного действия химиотерапевтических средств, хорошо известных в практике, – актуальный вопрос современной иммунологии и биохимии.

Считается, что одним из лучших антигельминтных препаратов является левамизол [5, 17], который помимо этиотропного эффекта еще проявляет свойства стимулятора клеточной системы иммунитета. Сочетание иммуностимулирующей и антигельминтной активности делает этот препарат весьма перспективным для применения. Однако фармакопейный левамизол обладает выраженным побочным действием на организм животных. В ветеринарии его относят к так называемым «тяжелым» антигельминтным препаратам. Считается, что левамизол в зрелых лимфоидных клетках повышает уровень внутриклеточного цГМФ, уменьшает содержание внутриклеточного цАМФ лимфоцитов и гранулоцитов, способствует повышению реактивности рецепторов на Т-клетках.

Одной из основных точек иммуностимулирующего действия левамизола является его действие на Т-лимфоциты, преимущественно Т-хелперы/индукторы (CD4+). Препарат повышает чувствительность Т-лимфоцитов к тимическим факторам. Он стимулирует синтез белка в лимфоцитах и усиливает их бластный ответ. Более подробные исследования продемонстрировали, что левамизол может выполнять не только функции иммуностимулятора, способного усилить слабую реакцию клеточного иммунитета, но и иммуномодулятора, несколько ослабляя чрезмерный и не действуя на нормальный иммунный ответ [5].

Этиотропная терапия гельминтозов зачастую малоэффективна, поскольку приводит к затягиванию периода выздоровления и переходу острой формы болезни в хрониче-

скую. Выявляемые при данном заболевании нарушения со стороны иммунной системы вызывают необходимость включения в схему лечения иммуномодулирующих препаратов. К таким иммуномодуляторам нового поколения, созданным на основе интерлейкина-2 человека, относится препарат «Ронколейкин» – с большим спектром возможностей применения в ветеринарной практике (от применения при вакцинации до лечения тяжелых форм любых заболеваний) [3, 4].

Таким образом, изучение динамического равновесия между молекулярными про- и противоапоптотическими маркерами иммунокомпетентных клеток крайне важно не только для понимания механизмов развития иммунопатологии на протяжении формирования инвазионного процесса, но и в ходе проведения этиотропной монотерапии или комплексного лечения.

Цель исследования. Изучение динамики значений молекулярных показателей апоптоза лимфоцитов периферической крови при сифациозе мышей, а также при антигельминтной монотерапии левамизолом и комплексной иммуномодулирующей терапии с ронколейкином для определения возможных механизмов развития вторичной иммунодепрессии в процессе хронизации гельминтозного процесса и выбора правильной стратегии лечения.

Задачей исследования являлось определение концентрации проапоптотического маркера Caspase-3 и антиапоптотического маркера Bcl-2 в лизате лимфоцитов крови:

- мышей при развитии сифациоза;
- зараженных мышей на фоне проведения антигельминтной монотерапии левамизолом;
- зараженных мышей на фоне проведения комплексной терапии левамизолом и ронколейкином;
- незараженных мышей на фоне введения терапевтических доз левамизола;
- незараженных мышей на фоне введения терапевтических доз левамизола и ронколейкина.

Материалы и методы. В эксперименте использовались 290 белых мышей со средним весом тела 18–20 г. Мыши содержались в стандартных условиях вивария ФГБНУ ВНИИ фундаментальной и прикладной па-

разитологии животных и растений имени К. И. Скрябина.

В ходе эксперимента животные были подразделены на следующие группы:

1) интактные мыши (контрольная группа) – 10 особей;

2) мыши, зараженные *Syphacia obvelata* (Rudolphi, 1802), Seurat, 1916, – 60 особей;

3) мыши, зараженные *Syphacia obvelata* (Rudolphi, 1802), Seurat, 1916 и получавшие на 7-е сутки развития инвазии монотерапию левамизолом (декарисом) однократно в дозе 7,5 мг/кг, – 50 особей;

4) мыши, зараженные *Syphacia obvelata* (Rudolphi, 1802), Seurat, 1916 и получавшие на 7-е сутки развития инвазии комплексную терапию левамизолом (декарисом) однократно в дозе 7,5 мг/кг и ронколейкином в дозе 0,05 мг/кг (5000 МЕ/кг), – 50 особей;

5) незараженные мыши, получавшие монотерапию левамизолом (декарисом) однократно в дозе 7,5 мг/кг, – 60 особей;

6) незараженные мыши, получавшие комплексную терапию левамизолом (декарисом) однократно в дозе 7,5 мг/кг и ронколейкином в дозе 0,05 мг/кг (5000 МЕ/кг), – 60 особей.

Для молекулярных исследований мононуклеарные лейкоциты выделяли из цельной венозной крови, полученной из хвостовой

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

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

Результаты и обсуждение. В ходе эксперимента нами было установлено характерное изменение молекулярных показателей лимфоцитов периферической крови мышей в процессе развития сифациоза. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что в процессе развития гельминтозного процесса на протяжении трех недель происходят характерные изменения в уровнях проапоптотического белка Caspase-3 и антиапоптотического белка Bcl-2 (табл. 1).

Таблица 1

Изменение молекулярных показателей апоптоза в периферической крови мышей в процессе развития сифациоза и проведения терапии

Группы животных	Сроки развития инвазии и проведения терапии					
	3-и сут (n=10)	7-е сут (n=10)	10-е сут (n=10)	14-е сут (n=10)	17-е сут (n=10)	21-е сут (n=10)
1	2	3	4	5	6	7
Caspase-3 (мкг/мл) (M±m, P)						
Контрольная группа мышей (интактные), n=10	2,58±0,12	2,24±0,04	2,78±0,13	2,36±0,16	2,48±0,15	2,61±0,11
Группа зараженных мышей, n=60	3,41±0,12*	4,53±0,08* ^{**}	5,48±0,05* ^{**}	5,61±0,11* ^{**}	7,39±0,03* ^{**}	8,40±0,03* ^{**}
Группа зараженных мышей, получавших левамизол, n=50		4,89±0,07*	6,41±0,09* ^{**}	6,63±0,10* ^{**}	7,33±0,13* ^{**}	6,44±0,12* ^{**}
Группа зараженных мышей, получавших левамизол и ронколейкин, n=50		4,49±0,09*	4,41±0,11*	3,63±0,13* ^{**}	3,33±0,10* ^{**}	2,44±0,12* ^{**}

1	2	3	4	5	6	7
Группа незараженных мышей, получавших левамизол, n=60	2,69±0,06	2,82±0,07*	2,91±0,10*,**	3,60±0,11*,**	3,83±0,13*,**	4,41±0,14*,**
Группа незараженных мышей, получавших левамизол и ронколейкин, n=60	2,89±0,05*	2,47±0,09*,**	2,41±0,12*,**	2,23±0,14*,**	1,83±0,10*,**	1,44±0,10*,**
Vcl-2 (нг/мл) (M±m, P)						
Контрольная группа мышей (интактные), n=10	7,60±0,03	7,45±0,05	7,68±0,02	8,03±0,07	7,96±0,09	7,85±0,07
Группа зараженных мышей, n=60	7,40±0,12*	6,87±0,07*,**	5,80±0,08*,**	4,99±0,13*,**	3,71±0,09*,**	3,48±0,06*,**
Группа зараженных мышей, получавших левамизол, n=50		7,87±0,17*	6,80±0,08*,**	5,79±0,13*,**	5,99±0,09*,**	4,68±0,16*,**
Группа зараженных мышей, получавших левамизол и ронколейкин, n=50		7,63±0,14*	6,81±0,09*,**	6,59±0,11*,**	6,79±0,08*,**	6,64±0,14*,**
Группа незараженных мышей, получавших левамизол, n=60	7,82±0,15*	7,97±0,14*	7,40±0,11*,**	7,69±0,16*,**	7,97±0,07*,**	8,18±0,14*,**
Группа незараженных мышей, получавших левамизол и ронколейкин, n=60	7,55±0,16	7,63±0,14	7,81±0,10*,**	8,39±0,15*,**	8,63±0,11*,**	8,84±0,18*,**

Примечание: * – достоверное отличие в сравнении с контролем при $P < 0,05$; ** – достоверное отличие с началом эксперимента при $P < 0,01$.

Количество Caspase-3 – антиапоптотического белка в контрольной группе мышей составило 2,24±0,04 – 2,78±0,13 мкг/мл. В мазках периферической крови мышей, зараженных сифациозом, уже на первых трех неделях после заражения было зафиксировано увеличение концентрации этого белка с 3,41±0,12 мкг/мл на 3-е сутки до 8,40±0,03 мкг/мл на 21-е сутки.

Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что в организме хозяина в условиях развития сифациоза токсическое действие на иммунокомпетентные клетки могут оказывать и сами гельминты, и их активные метаболиты, в частности активные формы кислорода, являющиеся следствием оксидативного стресса и запускающие, по видимому, процессы апоптоза.

Уровень Vcl-2 в лимфоцитах периферической крови контрольной группы мышей составил 7,60±0,03 нг/мл – 8,03±0,07 нг/мл. Развитие гельминтозного процесса приводит

до к достоверному снижению количества антиапоптотического белка Vcl-2 – от 7,40±0,12 на 3-и сутки до 3,48±0,06 нг/мл на 21-е сутки (табл. 1). Иными словами, механизмы поддержания равновесия между про- и противоапоптотическими белками в норме каким-то образом нарушаются паразитами в сторону усиления процесса апоптоза лимфоцитов. Обнаруженные нами факты свидетельствуют о том, что в условиях развития инвазии наблюдается индукция апоптоза лимфоцитов, что выражается в значительном увеличении уровня Caspase-3 и снижении уровня антиапоптотического белка Vcl-2.

Анализируя данные научной литературы, можно сделать вывод, что происходит изменение экспрессии генов, отвечающих за выработку про- и противоапоптотических белков, что, в свою очередь, является основным следствием генотоксического эффекта гипероксии и формирования кислородзависимых свободных радикалов [14]. На сегодня

няшний день не вызывает сомнения важная роль окислительного стресса (ОС) в развитии и клиническом течении гельминтозов. Известно, что окислительный стресс индуцирует патологические процессы, а также повреждения ДНК [2]. Генетические процессы являются центральным звеном между обратимыми метаболическими процессами и процессами, приводящими к гибели клетки.

Можно сделать вывод, что основным следствием генотоксического эффекта гипероксии и формирования кислородзависимых свободных радикалов является изменение экспрессии генов, отвечающих за выработку про- и противоапоптотических белков.

Проведение терапии левамизолом показало менее интенсивный рост показателя Caspase-3 по сравнению с зараженными животными: от $4,89 \pm 0,07$ мкг/мл на 1-е сутки от начала терапии до $6,44 \pm 0,12$ мкг/мл на 21-е сутки проведения эксперимента и менее резкое снижение показателя Bcl-2 с $7,87 \pm 0,17$ нг/мл на 1-е сутки от начала терапии до $4,68 \pm 0,16$ нг/мл на 21-е сутки проведения эксперимента. Это, по-видимому, обусловлено «сдерживающим» эффектом левамизола как иммуномодулятора на апоптоз лимфоцитов.

Проведение комплексной терапии, сочетающей левамизол и ронколейкин, показало плавное снижение активности белка Caspase-3 до контрольных значений ($2,44 \pm 0,12$ мкг/мл) от начала применения до 21-х суток эксперимента и удержание показателя Bcl-2 на уровне контрольных значений. Свойства ронколейкина обусловлены входящим в его состав IL-2, который продуцируется субпопуляцией Т-лимфоцитов (Т-хелперы I) в ответ на антигенную стимуляцию. По-видимому, синтезированный IL-2 воздействует на Т-лимфоциты, усиливая их пролиферацию и последующий синтез IL-2. Биологические эффекты IL-2 опосредуются его связыванием со специфическими рецепторами, представленными на различных клеточных мишенях, и поэтому его действие направлено влияет на рост, дифференцировку и активацию Т- и В-лимфоцитов, моноцитов, макрофагов, олигодендроглиальных клеток, клеток Лангерганса и др. От его присутствия зависит развитие цитолитической активности натуральных киллеров и цитотоксических Т-лимфоцитов. Все это и

усилило иммуномодулирующие свойства левамизола и дополнительно способствовало нормализации процессов апоптоза.

Заключение. В результате проведенного комплексного исследования достоверно показано, что у животных, находящихся в процессе развития гельминтозного процесса, наблюдается повышенная апоптотическая активность лимфоцитов на рецепторном уровне, проявляющаяся в повышении уровня проапоптотического белка Caspase-3 и снижении уровня антиапоптотического белка Bcl-2. Можно предположить, что в организме хозяина в условиях формирования сифациоза происходит развитие окислительного стресса, когда метаболиты гельминтов и активные формы кислорода оказывают токсическое действие на иммунокомпетентные клетки хозяина и запускают процессы апоптоза.

В свою очередь, проведенная терапия левамизолом показала менее интенсивный рост показателя Caspase-3 и совсем незначительное снижение белка Bcl-2 по сравнению с зараженными животными, что свидетельствует о свойствах левамизола как иммуномодулятора, сдерживающего апоптоз лимфоцитов.

Проведение комплексной терапии, сочетающей левамизол и ронколейкин, показало полное восстановление до нормы концентраций белков Caspase-3 и Bcl-2, что обусловлено свойствами входящего в состав ронколейкина IL-2.

Литература

1. *Бекиш В. Я., Дурнев А. Д.* Генотоксическое и цитотоксическое воздействия белковых соматических продуктов гельминтов на лимфоциты крови доноров *in vitro* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2004. Т. 138. № 8. С. 198–201.
2. *Гуськов Е. П., Шкурат Т. П., Вардуни Т. В. и др.* Генетика окислительного стресса. Ростов-н/Д.: Изд-во СКНЦ ВШ ЮФУ, 2009.
3. *Егорова В. Н., Мусеев А. Н., Барышников П. И.* Роль эндогенного интерлейкина-2 в регуляции иммунитета животных // Ветеринария. 2012. № 12. С. 16–18.
4. Ронколейкин: методические рекомендации для ветеринарных врачей. СПб.: Альтер Эго, 2009.
5. *Санин А. В.* О применении гамавита при дегельминтизации животных «тяжелыми»

- антигельминтиками // Эффективные и безопасные лекарственные средства: материалы Международного конгресса ветеринарных фармакологов. СПб., 2008. С. 112, 113.
6. Ярилин А. А. Иммунология: учебник. М., 2010.
 7. Alam M. S., Chowdhury M. A. Z., Khalique Q. A., et al. Stability analysis for seed yield and its components in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) // *Annals of Bangladesh Agriculture*, 1999. Vol. 9. Pp. 43–48.
 8. Bekish V. J. The alterations in genetic apparatus of somatic and generative cells of the host caused by helminthes metabolites // *Wiadomosci Parazytologiczne* (Poland). 2001. T. 47. Zt. 4. P. 891–896.
 9. Chow S. C., Brown A., Pritchard D. The human hookworm pathogen *Necator americanus* induces apoptosis in T lymphocytes // *Parasite Immunology*. 2000. Vol. 22. P. 29–37.
 10. Cnop M., Welsh N., Jonas J.C., et al. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities // *Diabetes*. 2005. Vol. 54 (Suppl. 2). Pp. 97–107.
 11. Estaquier J., Marguerite M., Sahuc F., et al. Interleukin 10-mediated T cell apoptosis during the T helper type 2 cytokine response in murine *Schistosoma mansoni* parasite infection // *Eur. Cytokine Netw.* 1997. Vol. 8. Pp. 153–160.
 12. Eymen B., Claverie P., Salon- C., et al. PI-4arf Triggers G2 Arrest through. *Oncogene*, 1999. Vol. 18. Pp. 1411–1418.
 13. Fernando H. C., Luketich J. D., Christie N. A., et al. Outcomes of laparoscopic Toupet compared to laparoscopic Nissen fundoplication // *Surg. Endosc.* 2002. Vol. 16. Pp. 905–908.
 14. Gondal M. A. Laser photoacoustic spectrometer for remote monitoring of atmospheric pollutants // *Applied Optics*. 1997. Vol. 36. No. 15.
 15. Green D. R. Apoptotic pathways: ten minutes to dead // *Cell*. 2005. Vol. 121. Pp. 671–674.
 16. Kennedy P. M., Lowry, J. B., Conlan L. L. Isolation of grass cell walls as neutral detergent fibre increases their fermentability for rumen micro-organisms // *J. Sci. Food Agric.* 1999. Vol. 79 (4). Pp. 544–548.
 17. Panichi M., Valle V. C. Use of levamisole camphor sulphonate treat ascariasis in dogs and cats // *Vet. Bull.* 1975. Vol. 46. Pp. 66–101.
 18. Rathmell J. C., Thompson C. B. The central effectors of cell death in immune system // *Annu. Rev. Immunol.* 1999. Vol. 17. P. 781–828.
 19. Robertson J. D., Orrenius S., Zhivotovskiy B., et al. Nuclear events in apoptosis // *Journal of Structural Biology*. 2000. No. 2–3. Vol. 129. Pp. 346–358.
 20. Rumbley C. A., Zekavat S. A., Sugaya H., et al. The schistosome granulema: characterization of lymphocyte migration, activation and cytokine production // *J. Immunol.* 1998. Vol. 161. P. 4129–4137.
 21. Scaffidi C., Schmitz I., Zha J., et al. Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274. Pp. 22532–22538.
 22. Tato P., Fernandez A. M., Solano S. et al. A cysteine protease from *Taenia solium* metacestodes induce apoptosis in human CD4+ T-cells // *Parasitol. Res.* 2004. Vol. 92. No. 3. Pp. 197–204.
 23. Zhang J., Rosenberg H. F., Nei M. Positive Darwinian selection after gene duplication in primate ribonuclease genes // *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. 1998. Vol. 95. Pp. 3708–3713.

References

1. Bekish V. Ya., Durnev A. D. (2004) Genotoxic and cytotoxic effects of protein somatic products of helminth in the blood lymphocytes of donors in vitro. *Bulletin of experimental biology and medicine*, vol. 138, no. 8, pp. 198–201.
2. Guskov E. P., Shkurat T. P., Varduni T. V., et al. (2009) Genetics of oxidative stress. Rostov n/D: Izd-vo sknts VSCH SFU.
3. Egorova V. N., Moiseev A. N., Baryshnikov P. I. (2012) Role of endogenous interleukin-2 in regulating immunity of animals. *Veterinary medicine*, no. 12, pp. 16–18.
4. (2009) Roncoleukin: guidelines for veterinarians. SPb.: Alter Ego.
5. Sanin A. V. (2008) On the use of gamavit in deworming animals with «heavy» Anthelmintics. *Effective and safe drugs: materials of the International Congress of veterinary pharmacologists*. SPb. Pp. 112, 113.
6. Yarilin A. A. (2010) Immunology: a textbook. Moscow.