

Experimental opisthorchiasis: a study of blood cells, hematopoiesis and startle reflex in laboratory animals

D.F. Avgustinovich¹✉, I.A. Orlovskaya², L.B. Toporkova², G.B. Vishnivetskaya¹, A.V. Katokhin¹, M.N. Lvova¹, E.V. Kashina¹, N.P. Bondar¹, N.A. Feofanova^{1, 2}, V.A. Mordvinov^{1, 3}

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Scientific Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

³ Scientific Research Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, Russia

One of the species of the family Opisthorchiidae, *Opisthorchis felineus* (*O. felineus*), causes severe disturbances in humans and animals, and so it is the subject of important research studies. Two weeks after infection we compared the impact of *O. felineus* invasion on the changes in blood cells composition, bone marrow hematopoiesis and behavioral startle-reflex in inbred C57BL/6 male mice and Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). Considerable interspecies differences were revealed for many parameters estimated. It was found that the relative weight of the main organ of the peripheral immune system – spleen, is significantly larger in mice than in hamsters. Moreover, the infection with *O. felineus* caused a significant enlargement of the spleen only in mice. More pronounced changes in the blood cells composition, which was accompanied by activation of hematopoietic stem cells of myeloid and erythroid set, were determined in hamsters. Blood changes in the response to infection in mice were less severe and were not accompanied by the changes in colony formation. Mouse acoustic startle reaction differed from hamster one too. The expression of the startle reaction and the value of pre-pulse inhibition were discriminated in animals of two species. Infected hamsters had no reaction of habituation to the sound stimulus. In addition, the maturation of *O. felineus* worms was faster in hamsters than in mice. Data obtained suggest a greater resistance of mice to *O. felineus* infection, but do not exclude the availability of mice as a model in the study of processes taking place in the host during the development of experimental opisthorchiasis.

Key words: *O. felineus*; acute opisthorchiasis; hamsters; mice; blood cells; red bone marrow; hemopoiesis; startle-reflex.

Экспериментальный описторхоз: исследование состава форменных элементов крови, гемопоэза и стартл-рефлекса у лабораторных животных

Д.Ф. Августинович¹✉, И.А. Орловская², Л.Б. Топоркова², Г.Б. Вишневецкая¹, А.В. Катохин¹, М.Н. Львова¹, Е.В. Кашина¹, Н.П. Бондарь¹, Н.А. Феофанова^{1, 2}, В.А. Мордвинов^{1, 3}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики», Новосибирск, Россия

Один из видов семейства Opisthorchiidae – *Opisthorchis felineus* (*O. felineus*) – вызывает тяжелые нарушения в организме человека и животных, поэтому является объектом актуальных научных исследований. В работе проведено сравнительное исследование влияния инвазии *O. felineus* на изменение в составе форменных элементов крови, костномозгового гемопоэза и поведенческого рефлекса вздрагивания у мышей C57BL/6 и сирийских хомячков через две недели после инфицирования. Обнаружены существенные межвидовые различия по многим показателям. Было установлено, что относительная масса основного органа периферической иммунной системы – селезенки – у мышей существенно больше, чем у хомячков. Более того, инвазия *O. felineus* вызвала гипертрофию селезенки только у мышей. У хомячков были более выраженные отклонения от нормы в составе форменных элементов крови, которые сопровождалась активацией миело- и эритропоэза. У мышей установленные изменения в крови не сопровождалась сдвигами колониеобразующей активности костного мозга. Мыши отличались от хомячков и по реакции вздрагивания на акустический сигнал как по выраженности самой реакции, так и по величине преимпульсного ингибирования. У инфицированных хомячков не было реакции привыкания на звуковой сигнал. Кроме того, у хомячков созревание марит *O. felineus* происходило раньше,

чем у мышей. Полученные данные говорят о большей резистентности мышей к инфицированию *O. felineus*, однако не исключают возможности использования мышей в качестве модельных при исследовании процессов, происходящих в организме хозяина на фоне экспериментального описторхоза.

Ключевые слова: *O. felineus*; острый описторхоз; хомячки; мыши; форменные элементы крови; красный костный мозг; гемопоэз; стартл-рефлекс.

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Avgustinovich D.F., Orlovskaya I.A., Toporkova L.B., Vishnivetskaya G.B., Katokhin A.V., Lvova M.N., Kashina E.V., Bondar N.P., Feofanova N.A., Mordvinov V.A. Experimental opisthorchiasis: a study of blood cells, hematopoiesis and startle reflex in laboratory animals. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(2):155-164. DOI 10.18699/VJ16.143

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Августинович Д.Ф., Орловская И.А., Топоркова Л.Б., Вишневская Г.Б., Катохин А.В., Львова М.Н., Кашина Е.В., Бондарь Н.П., Феофанова Н.А., Мордвинов В.А. Экспериментальный описторхоз: исследование состава форменных элементов крови, гемопоэза и стартл-рефлекса у лабораторных животных. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(2):155-164. DOI 10.18699/VJ16.143

Описторхоз – паразитарное заболевание, широко распространенное во всем мире: 40 млн людей инфицированы трематодами семейства Opisthorchiidae и 750 млн находятся в группе риска (Keiser, Utzinger, 2007; Hung et al., 2013). Очевидно, что описторхоз, возникающий при заражении человека и животных представителями этого семейства, *Opisthorchis viverrini* (*O. viverrini*) и *Opisthorchis felineus* (*O. felineus*), является актуальной проблемой современности. Вид *O. viverrini* распространен преимущественно на территории Юго-Восточной Азии (Тайланд, Лаосская Народно-Демократическая Республика, Вьетнам, Камбоджа) (Keiser, Utzinger, 2007; Sripta et al., 2011). На территории Российской Федерации и стран Западной Европы преобладающим видом является *O. felineus*. Самый крупный очаг *O. felineus*-индуцированного описторхоза в России – Обь-Иртышский бассейн, где зараженность населения в Тюменской и Томской областях достигает 40–95 % (Adams, 2006; Ogorodova et al., 2007; Mordvinov, Furman, 2010; Pozio et al., 2013). Инфицирование метацеркариями *O. felineus* происходит при употреблении в пищу сырой или недостаточно термически обработанной рыбы семейства карповых. При заражении прежде всего страдает гепатобилиарная система, поскольку метацеркарии, попадая в организм окончательного хозяина, паразитируют во внутри- и внепеченочных желчных протоках, где они в течение месяца превращаются в половозрелых гельминтов (Бакштановская, Степанова, 2005; Adams, 2006; Sripta et al., 2007; Mordvinov et al., 2012; Pozio et al., 2013). У человека описторхоз провоцирует развитие тяжелых осложнений (гнойный холангит, холецистит, хронический гепатит, стриктуры желчевыводящих путей, абсцессы печени, обтурационную желтуху, панкреатит) и может способствовать возникновению холангиокарциномы (Бражникова, Толкаева, 2000, 2002; Бакштановская, Степанова, 2005; Sripta et al., 2007, 2012; Mairiang et al., 2012).

В настоящее время описторхоз рассматривается как системное заболевание, поскольку в патологический процесс вовлекаются органы и системы, которые не имеют непосредственного контакта с паразитами (Степанова

и др., 2004; Ахмедов, Критевич, 2009). Так, уже на ранних стадиях заболевания (острый описторхоз) в ответ на механическое повреждение эпителиальных клеток внутрипеченочных желчных протоков и на секрецию продуктов метаболизма паразита включаются защитные иммунные механизмы организма хозяина (Sripta et al., 2007). При этом изменения в клеточном составе крови и костном мозге появляются в организме окончательного хозяина одними из первых. Однако оценка колониеобразующей активности гемопоэтических предшественников в костном мозге при инфицировании *O. felineus* до сих пор не проводилась.

Известно, что хроническое воспаление печени нарушает нейротрансмиссию в мозге, что приводит к изменению в поведении (D’Mello, Swain, 2011). Описторхоз на хронической стадии заболевания обуславливает развитие у людей симптомов депрессивного спектра (Бронштейн, Лучшев, 1998). Можно полагать, что на ранних этапах (острый описторхоз) нарушения в мозге могут повлиять на проявление врожденных рефлексов (например, стартл-рефлекс или реакция вздрагивания (startle reaction) у человека и животных в ответ на резкий звуковой сигнал) (Paylor, Crawley, 1997). Этот рефлекс является универсальным для млекопитающих компонентом защитной реакции организма и характеризуется некоторыми формами пластичности, включая преимпульсное ингибирование (prepulse inhibition, PPI) и габитуацию (привыкание) (Hoffman, Searle, 1968; Graham, 1975; Geyer, Braff, 1987), которые одинаково проявляются у разных видов млекопитающих. Таким образом, пластичность стартл-реакции является идеальным кандидатом для трансляционных исследований (Braff et al., 2001). Преимпульсное ингибирование характеризует способность ЦНС фильтровать сенсорную информацию и проявляется в снижении моторной реакции организма на резкий стимул при наличии слабого предварительного стимула. Известно, что в норме после продолжительного ряда повторных стимулов происходит снижение стартл-реакции или габитуация (Geyer, Braff, 1987). Патологически усиленный рефлекс отличается от физиологического своей выраженностью и отсутствием привыкания к стимулу и может быть следствием разнообразных заболеваний, затрагивающих нервную систему.

Учитывая вышесказанное, полагаем, что проведение работы по моделированию инвазии *O. felineus* и исследование последствий инфицирования весьма актуальны. В настоящее время во всем мире такие эксперименты проводят на сирийских хомячках (*Mesocricetus auratus*), лабораторных животных, наиболее восприимчивых к инфицированию личинками описторхов (Sripa, Kaewkes, 2000; Jittimane et al., 2007; Максимова и др., 2012; Lvova et al., 2012). В редких случаях описторхоз моделируют на других представителях млекопитающих, например, на серебристых лисицах (Schuster et al., 2003) или песчанках (*Meriones unguiculatus*) (Boonmars et al., 2009). В ранних исследованиях исключалась возможность моделирования *O. felineus*-индуцированного описторхоза у мышей инбредной линии C57BL/6 (Зеленцов, 1974). В то же время, как подчеркивают некоторые авторы (Choi et al., 2003), это создает определенные сложности для исследований, поскольку основные современные молекулярные и биохимические разработки в научных лабораториях подразумевают использование, прежде всего, крыс и мышей. Как сообщает компания Labome (2012), проанализировавшая около 10 000 публикаций за период 2008–2011 гг., мыши являются предпочтительными лабораторными животными для исследований, а инбредная линия мышей C57BL/6, геном которых был полностью секвенирован в 2005 г., на втором месте после генома человека, самая используемая линия для создания физиологических или патологических моделей в экспериментах *in vivo*.

В этой связи задачами нашего исследования было, во-первых, моделирование *O. felineus*-индуцированного описторхоза у мышей инбредной линии C57BL/6, во-вторых, изучение влияния инвазии *O. felineus* на изменения в составе форменных элементов крови, костномозгового гемопоэза и старгг-рефлекса у животных и, в-третьих, проведение сравнительного анализа данных показателей у сирийских хомячков и мышей на стадии острого описторхоза.

Материалы и методы

Животные. В работе были использованы самцы сирийских хомячков (*Mesocricetus auratus*) и мышей инбредной линии C57BL/6 в возрасте 3–4 мес., полученные из Центра генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X00). Животных содержали в стандартных условиях: при световом режиме 12:12 ч (свет:темнота), температуре воздуха 23–24 °С; достаточном количестве гранулированного корма и воды. Группы мышей в клетках размером 36×23×12 см были сформированы в одномесечном возрасте. Хомячки были рассажены по одному в аналогичные клетки. Все процедуры были проведены согласно директивам European Communities Council от 24 ноября 1986 г. (86/609/ЕЕС), а также заключению Комиссии по биоэтике ИЦиГ СО РАН (протокол № 22 от 30 мая 2014 г.).

Процедура эксперимента. Животные каждого вида были разделены на две группы: контрольные (с введением физиологического раствора) и опытные, зараженные метацеркариями *O. felineus* в дозе 100 личинок на каждую особь. Введение осуществляли внутрижелудочно с помощью зондов (Braintree Scientific, Inc.). Через 12 дней

у мышей и хомячков оценивали рефлекс вздрагивания на звуковой сигнал в приборе «SR-Pilot» (San Diego Instruments, Inc.). На третьи сутки после поведенческого тестирования животных умерщвляли декапитацией и производили забор крови, а также образцов красного костного мозга из берцовой кости для дальнейшего гематологического исследования. Кроме этого, определяли массу печени и селезенки в пересчете на 1 г массы тела животного. Печень с желчным пузырем помещали в физиологический раствор для дальнейшего микроскопического анализа числа и зрелости марит *O. felineus* в желчных протоках. Выделенных из печени марит переносили на предметное стекло для фотографирования (без фиксации и подкрашивания), проведенного в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН на микроскопе Axioskop 2 plus, оснащенный AnxioCamp HRc камерой (Zeiss, Германия).

Получение метацеркарий *O. felineus*. Личинки *O. felineus* были получены из инфицированных язей, выловленных из р. Обь Новосибирской области. Рыбный фарш обрабатывали в 1 %-м растворе хлористого пепсина и инкубировали при 37 °С в течение ночи с последующей фильтрацией и осаждением в 0,9 %-м растворе хлористого натрия. Под микроскопом определяли жизнеспособность метацеркарий для дальнейшего введения животным.

Следует подчеркнуть, что в проведенном исследовании была соблюдена полная стандартизация заражения животных двух видов – хомячков и мышей. Во-первых, и хомячкам, и мышам была введена одинаковая доза личинок *O. felineus* (100 метацеркарий/особь). Во-вторых, метацеркарии были извлечены из одной партии язей, выловленных в р. Обь в один сезон (конец мая). Инфицирование и исследование параметров у представителей двух видов было сделано параллельно в одно и то же время. Эти условия необходимы для корректного сопоставления оцениваемых показателей.

Анализ клеточного состава периферической крови и оценка количества коммитированных предшественников клеток костного мозга. Клеточный состав крови мышей и хомячков оценивали с помощью гематологического анализатора PCE-90 (ERMA Inc., Япония). Относительное количество форменных элементов крови мышей и хомячков подсчитывали в мазках, окрашенных по Романовскому–Гимзе, затем рассчитывали их абсолютную численность.

Костный мозг животных вымывали из бедренной кости с помощью шприца кондиционной средой RPMI1640, содержащей 10 % FCS. Подсчитывали количество клеток костного мозга в 1 мл среды с помощью гематологического анализатора (ERMA Inc., Япония). Для определения числа коммитированных предшественников клетки костного мозга животных в концентрации $2,0 \times 10^4$ /мл инкубировали в 24-луночных планшетах в метилцеллюлозной среде M 3434 (Stem Cell Technology, Канада), содержащей цитокины SCF, EPO, IL-3, IL-6. Гранулоцитарно-макрофагальные (КОЕ-ГМ), бурс-образующие и колониобразующие эритроидные (БОЕ-Э, КОЕ-Э) и гранулоцитарно-эритроидно-макрофагально-мегакариоцитарные (КОЕ-ГЭММ) колонии подсчитывали под инвертированным микроскопом после 14-дневной ин-

кубации при температуре 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5 % CO₂, согласно рекомендациям производителя (Stem Cell Technologies, Канада).

Измерение стартл-рефлекса и его преимпульсного ингибирования. Реакцию вздрагивания в ответ на акустический стимул измеряли с помощью прибора «SR-Pilot» (San Diego Instruments), состоящего из пластиковой камеры (15 × 19 × 25 см), в пол которой вмонтированы пьезоэлектрические датчики, включающиеся в момент подачи звукового сигнала. Фоновый белый шум составлял 65 дБ. Животное помещали в камеру и после 3 мин адаптации предъявляли четыре импульса (P) интенсивностью 115 дБ и длительностью 40 мс, чередовавшихся с четырьмя импульсами, предваряемыми слабыми (85 дБ, 40 мс) преимпульсами (PP), которые давались за 100 мс до основного импульса. Интервал между одиночными стимулами (P) и комбинацией (PP) составлял 15 с. Величина реакции животного на стимулы отражалась на экране прибора в виде относительных единиц. Значение преимпульсного ингибирования (PPI) (в процентах) рассчитывали по формуле: $100 - PP \times 100/P$ (Paylor, Crawley, 1997).

Статистика. Поскольку большинство исследуемых параметров имели нормальное распределение согласно W-критерию Shapiro-Wilk (Statistica 6.0), использовали параметрические методы обработки полученных данных. Для этого применяли двухфакторный дисперсионный анализ с последующим post-hoc сравнением групп по критерию Fisher LSD. В качестве первого фактора был взят «вид животных» (хомячки, мыши), в качестве второго – «воздействие» (контроль – введение физиологического раствора, опыт – введение метацеркарий *O. felinus*). При сравнении массы тела у животных в качестве первого фактора была взята «временная точка измерения» (исходная – перед заражением, конечная – через 14 дней после инфицирования), в качестве второго – «воздействие». Для сравнения числа марит в желчных протоках инфицированных мышей и хомячков, а также величины реакции вздрагивания животных на первый и четвертый стимул в контрольной и опытной группах применяли *t*-критерий Стьюдента для независимых и зависимых параметров соответственно. В каждой группе было по 7–13 животных. Данные представлены как среднее ± SEM. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$ и на уровне тенденции при $0,05 < p < 0,1$.

Результаты

Установлено, что через две недели после инвазии личинок *O. felinus* количество марит в желчных протоках хомячков и мышей было приблизительно одинаковым [(24,89 ± 2,29; $n = 9$) и (29,69 ± 2,92; $n = 13$) соответственно; $t = 1,20$; $p = 0,24$].

Обнаружена разная степень зрелости марит, в зависимости от вида хозяина. У гельминтов, извлеченных из мышей, хорошо визуализировали лишь заполненный кишечник (рис. 1). У марит из хомячков идентифицировали семенники, матку с яйцами и желточники, что предполагает начало яйцепродукции. Кроме того, у хомячков мариты были крупнее, чем у мышей. Наряду с более зрелыми маритами в желчных протоках печени хомячков также были обнаружены незрелые особи.

Исследование показало, что хомячки и мыши, зараженные личинками *O. felinus*, в течение двух недель после инфицирования набирали массу тела по-разному (рис. 2). Хомячки как контрольной, так и экспериментальной групп увеличили массу тела за две недели, влияние фактора «временная точка измерения» было статистически значимым [F(1,28) = 16,2; $p = 0,001$], как и влияние фактора «воздействие» [F(1,28) = 4,3; $p = 0,047$]. Взаимодействия факторов не было. Прирост массы был более выраженным у контрольных хомячков ($p = 0,005$) по сравнению с инфицированными ($p = 0,014$).

У мышей конечная масса тела отличалась от исходной ([F(1,48) = 15,4; $p = 0,001$] – для первого фактора) в равной степени как у контрольных, так и у опытных животных ([F(1,28) = 2,0; $p = 0,162$] – для второго фактора). Взаимодействие факторов не установлено. Прирост массы тела мышей был значимым как на фоне инфицирования ($p = 0,006$), так и без него ($p = 0,010$).

Через две недели после заражения относительная масса печени не менялась у представителей двух видов [F(1,38) = 1,5; $p = 0,236$] (рис. 3). Обращает на себя внимание, что у мышей относительная масса печени как у контрольных, так и у зараженных была значительно больше, чем соответствующие показатели у хомячков, влияние фактора «вид животных» было значимым [F(1,38) = 37,3; $p = 0,000$]. Взаимодействие факторов не установлено.

Относительная масса селезенки также зависела от вида животных и была в обоих случаях (контроль, опыт) существенно больше у мышей [F(1,38) = 46,2; $p = 0,000$]. Более того, прирост относительной массы селезенки зависел от инфицирования [F(1,38) = 17,5; $p = 0,000$]. Взаимодействия факторов не было. Post-hoc анализ показал, что у хомячков повышение этого показателя было на уровне тенденции ($p = 0,064$), а у мышей существенно более выраженное ($p = 0,000$).

Анализ состава форменных элементов крови выявил значительные его изменения на фоне инвазии *O. felinus* (таблица), при этом более выраженные у хомячков. Число палочкоядерных нейтрофилов зависело как от фактора «вид животных» [F(1,24) = 22,7; $p = 0,000$], так и от фактора «воздействие» [F(1,24) = 42,7; $p = 0,000$]. Взаимодействие факторов было статистически значимым [F(1,24) = 30,5; $p = 0,000$]. Дальнейшее post-hoc сравнение показало, что этот параметр значительно возрос у хомячков ($p = 0,000$), но не у мышей ($p = 0,481$). Хомячки и мыши различались также по числу сегментоядерных нейтрофилов [F(1,24) = 12,0; $p = 0,002$], однако влияние фактора «воздействие» было на уровне тенденции [F(1,24) = 3,0; $p = 0,099$], взаимодействия факторов не было. Введение метацеркарий *O. felinus* значительно снижало этот показатель у хомячков ($p = 0,044$), но не у мышей ($p = 0,756$). В отличие от хомячков, у мышей увеличилось число базофилов после заражения ($p = 0,001$), воздействие было существенным [F(1,24) = 8,5; $p = 0,008$]. Более того, мыши после воздействия значительно отличались от хомячков по этому показателю ($p = 0,000$). Влияние фактора «вид животных» [F(1,24) = 11,5; $p = 0,002$] и взаимодействие факторов были значимыми [F(1,24) = 8,5; $p = 0,008$]. И у хомячков ($p = 0,000$), и у мышей ($p = 0,001$) существенно повышалось число эозинофилов после инфици-

рования, о чем свидетельствует фактор «воздействие» [F(1,24) = 49,6; $p = 0,000$]. Через две недели после заражения животные двух видов несколько различались по этому показателю ($p = 0,063$), однако выраженных межвидовых различий не было [F(1,24) = 1,5; $p = 0,233$], как не было и взаимодействия факторов. Обращает на себя внимание то, что животные различались по числу гранулоцитов исходно ($p = 0,002$) и после ($p = 0,000$) инвазии *O. felineus*. Оба фактора влияли на этот показатель {F(1,24) = 42,8; $p = 0,000$ } – «вид животных»; [F(1,24) = 8,2; $p = 0,009$] – «воздействие», взаимодействия факторов не было. При этом в ответ на инфицирование снижалось количество лимфоцитов у хомячков ($p = 0,005$), но не у мышей ($p = 0,368$). По числу моноцитов наблюдалась обратная картина: их было значительно меньше у контрольных ($p = 0,000$) и опытных ($p = 0,002$) мышей, чем у хомячков соответствующих групп. Это отражено в значимости фактора «вид животных» [F(1,24) = 31,0; $p = 0,000$] При этом влияния фактора «воздействие» не обнаружено у представителей двух видов [F(1,24) = 1,9; $p = 0,182$] и не было взаимодействия факторов. Если рассматривать абсолютное содержание в крови лейкоцитов в целом, то введение метацеркарий *O. felineus* не влияло на него как у хомячков, так и у мышей [F(1,23) = 0,2; $p = 0,639$] и не было также видовых различий по этому показателю [F(1,23) = 2,4; $p = 0,137$]. Взаимодействие факторов отсутствовало. По количеству эритроцитов животные двух видов исходно не различаются. После инфицирования их было несколько больше в крови мышей, чем у хомячков ($p = 0,058$). Однако не установлено влияния обоих факторов на этот показатель {F(1,24) = 1,1; $p = 0,306$ } и [F(1,24) = 0,3; $p = 0,617$]; и их взаимодействие. В то же время содержание гемоглобина в крови зависело от инфицирования [F(1,23) = 4,5; $p = 0,046$]: оно несколько снижалось у хомячков ($p = 0,065$). При этом животные двух видов не различались существенно по этому показателю [F(1,23) = 0,1; $p = 0,708$], взаимодействия факторов не было. Межвидовые различия установлены и по числу тромбоцитов [F(1,24) = 8,9; $p = 0,006$]: в крови мышей обеих групп (контрольные, опытные) их больше, чем у хомячков ($p = 0,046$ и $p = 0,044$ соответственно). Количество тромбоцитов не менялось у животных двух видов после заражения [F(1,24) = 0,1; $p = 0,866$]. Отношение суммарного объема всех форменных элементов (эритроциты, лейкоциты, тромбоциты) к общему объему крови (гематокрит) исходно было существенно ниже у мышей, чем у хомячков ($p = 0,001$). Влияние фактора «вид животных» было статистически значимым [F(1,24) = 14,3; $p = 0,000$]. Введение хомячкам личинок *O. felineus* несколько снижало этот показатель ($p = 0,084$), так что после заражения хомячки и мыши не различались по гематокриту. Однако значимого влияния фактора «воздействие» и взаимодействия факторов не было.

Анализ колониеобразующей активности клеток костного мозга выявил существенные межвидовые различия в реакции на инвазию *O. felineus* (рис. 4). Как видно на рис. 4, у хомячков наблюдалось «оживление» костномозгового гемопоэза, у мышей не было значимых изменений показателей колониеобразующей активности. Количество ранних предшественников (КОЕ-ГЭММ) в костном мозге

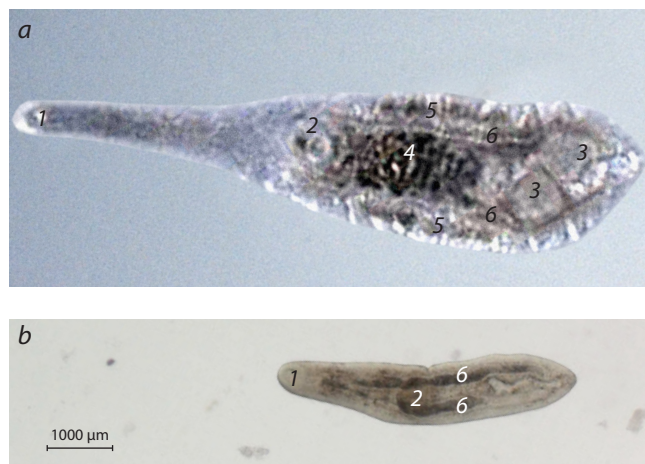


Fig. 1. *O. felineus* worms isolated from the bile ducts of the liver and gall bladder of (a) hamsters and (b) mice.

Worms from hamsters are illuminated from above; worms from mice, from below. Organs: 1, oral sucker; 2, ventral sucker; 3, testes; 4, uterus; 5, vitellaria; 6, caecum branches.

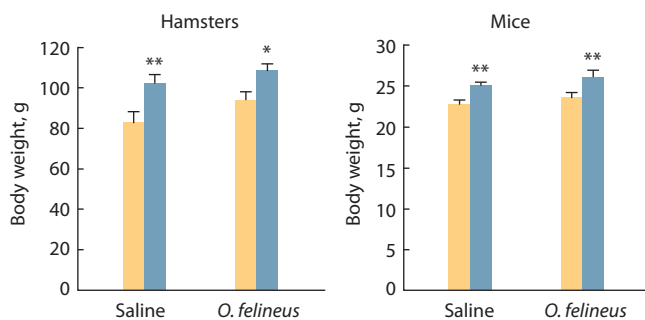


Fig. 2. Body weight dynamics in control (saline) and experimental (*O. felineus* infection) mice and hamsters.

Yellow bars indicate the initial weight; blue bars, the final weight. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, compared to the initial weight; (Fisher LSD test).

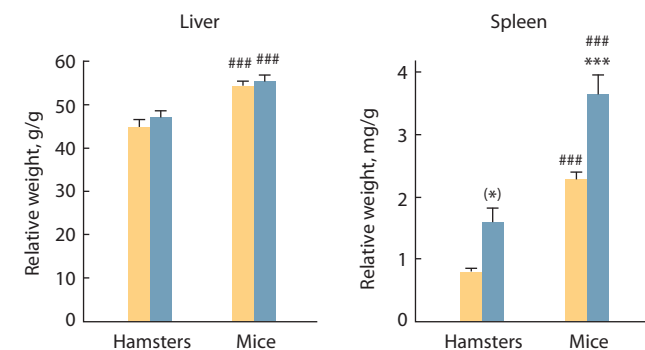


Fig. 3. Changes in the relative weight of liver and spleen in hamsters and mice having received *O. felineus*.

Yellow bars, control animals; blue bars, experimental animals. (*) $0,05 < p < 0,10$; (***) $p < 0,001$, compared to the control. ### $p < 0,001$, compared to the respective group of hamsters (Fisher LSD test).

Changes in the blood cell composition in animals infected with *O. felinus*

Blood cells	Hamsters		Mice	
	Control	Experiment	Control	Experiment
Leukocytes ($\times 10^9$ U/L)	14.01 \pm 3.15	17.36 \pm 3.26	12.07 \pm 2.24	11.21 \pm 1.09
Neutrophils, %				
stab	0.29 \pm 0.18	20.71 \pm 3.08***	1.57 \pm 0.48	3.29 \pm 1.32###
segmented	20.57 \pm 2.83	13.71 \pm 2.22*	9.71 \pm 2.31##	8.71 \pm 1.63
Basophils, %	0.57 \pm 0.20	0.57 \pm 0.70	0.71 \pm 0.29	2.43 \pm 0.43*** ###
Eosinophils, %	0.29 \pm 0.18	4.29 \pm 0.61***	0.43 \pm 0.21	3.00 \pm 0.65*** (#)
Lymphocytes, %	65.43 \pm 3.39	51.29 \pm 4.26**	81.29 \pm 2.60##	77.14 \pm 2.09###
Monocytes, %	13.00 \pm 1.63	10.86 \pm 0.67	6.29 \pm 1.08###	5.43 \pm 0.69##
Erythrocytes ($\times 10^{12}$ U/L)	9.72 \pm 0.72	7.70 \pm 0.87	9.09 \pm 1.02	10.20 \pm 0.92(##)
Hemoglobin, g/L	18.29 \pm 0.83	14.94 \pm 1.62(*)	17.10 \pm 0.65	15.19 \pm 1.45
Hematocrit, %	76.74 \pm 5.66	62.40 \pm 7.14(*)	45.86 \pm 5.18###	50.70 \pm 4.09
Platelets ($\times 10^9$ U/L)	228.29 \pm 23.94	253.71 \pm 55.72	722.26 \pm 316.73#	753.50 \pm 80.15#

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; (*) $0.05 < p < 0.10$, compared to the corresponding control; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$; (##) $0.05 < p < 0.10$, compared to the corresponding parameter in hamsters; (Fisher LSD test).

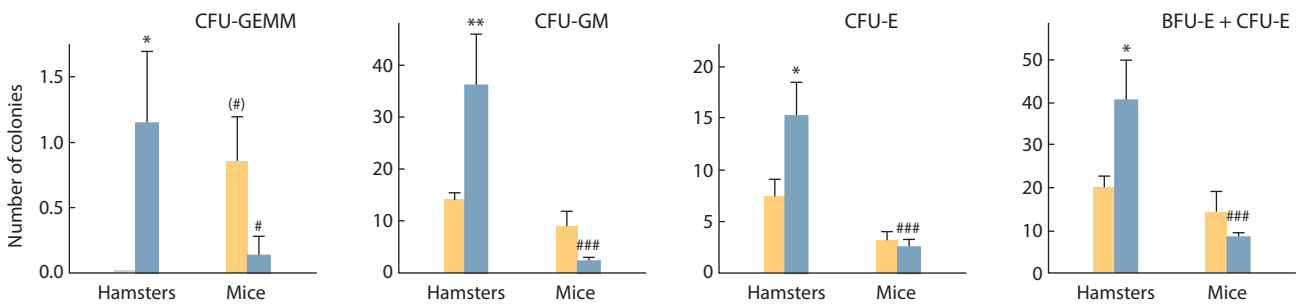


Fig. 4. The colony-forming activity of bone marrow cells in hamsters and mice having received *O. felinus*.

Yellow bars, control animals; blue bars, experimental animals; BFU-E, burst-forming unit erythroid; CFU-E – colony-forming unit erythroid; CFU-GM, colony forming unit of granulocytes and/or macrophages; CFU-GEMM, pluripotent hemopoietic stem cells; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, compared to the control; # $p < 0.05$; ### $p < 0.001$; (##) $0.05 < p < 0.1$, compared to the respective group of hamsters (Fisher LSD test).

мышей исходно несколько превышало этот показатель ($p = 0,081$) у хомячков, однако через две недели после заражения наблюдалось статистически значимое увеличение КОЕ-ГЭММ у хомячков ($p = 0,023$) настолько, что инфицированные животные двух видов существенно различались по этому показателю ($p = 0,044$). При статистически незначимом влиянии обоих факторов на этот показатель {[$F(1,24) = 0,1$; $p = 0,832$] – «вид животных» и [$F(1,24) = 0,4$; $p = 0,525$] – «воздействие»} установлено их взаимодействие [$F(1,24) = 7,8$; $p = 0,010$]. Хомячки и мыши исходно не различались по числу гранулоцитарно-макрофагальных предшественников ($p = 0,481$). Однако после инвазии *O. felinus* у хомячков количество КОЕ-ГМ резко увеличилось ($p = 0,007$), в то время как у мышей не наблюдалось изменения объема данной популяции предшественников. В результате этого инфицированные хомячки и мыши стали статистически значимо различать-

ся по этому показателю [$F(1,24) = 14,2$; $p = 0,001$]. При отсутствии влияния фактора «воздействие» [$F(1,24) = 2,1$; $p = 0,156$] статистически значимым было взаимодействие двух факторов [$F(1,24) = 7,6$; $p = 0,011$]. Число эритроидных предшественников (как ранних, БОЕ-Э, так и суммарных, БОЕ-Э+КОЕ-Э) также увеличивалось у хомячков после заражения ($p = 0,011$ и $p = 0,020$ соответственно), в результате чего обнаружены межвидовые различия по этому показателю {[$F(1,24) = 18,5$; $p = 0,000$] и [$F(1,24) = 10,8$; $p = 0,003$] соответственно}. Хотя исходно популяции эритроидных предшественников были сравнимы у мышей и хомячков. При отсутствии выраженного влияния фактора воздействия для КОЕ-Э [$F(1,24) = 3,1$; $p = 0,089$] и БОЕ-Э+КОЕ-Э [$F(1,24) = 1,5$; $p = 0,228$] в обоих случаях установлено взаимодействие факторов {[$F(1,24) = 4,6$; $p = 0,043$] и [$F(1,24) = 5,2$; $p = 0,032$] соответственно}.

При исследовании поведенческой реакции вздрагивания у животных установлены межвидовые различия по PPI [$F(1,29) = 5,3; p = 0,029$] (рис. 5). У мышей этот параметр исходно оказался ниже, чем у хомячков ($p = 0,009$). Влияние фактора «воздействие» на этот показатель не обнаружено, как и не было взаимодействия факторов $\{[F(1,29) = 0,0; p = 0,914]$ и $[F(1,29) = 2,8; p = 0,104]$ соответственно}. Различались животные двух видов и по реакции привыкания на звуковой стимул (рис. 5). У контрольных хомячков реакция на четвертый звуковой сигнал была сниженной ($t = 3,12; p = 0,026$), у зараженных хомячков такого снижения не обнаружено. У мышей как в контрольной, так и в опытной группе изменений реакции на звуковой сигнал не было.

Обсуждение

Проведенное исследование, стандартизованное по способу заражения, выявило некоторые общие и видоспецифические особенности реагирования животных на инфицирование метацеркариями *O. felinus*.

Установлено, что и у хомячков, и у мышей через две недели после инвазии количество марит *O. felinus* в желчных протоках печени было одинаковым. Однако у хомячков наряду с незрелыми маритами были обнаружены и более развитые особи, у которых визуализировался процесс яйцеобразования. У мышей все мариты были незрелые, меньшего размера, чем у хомячков, и имели только развитый кишечник. Следовательно, созревание марит *O. felinus* у представителей двух видов идет по-разному, быстрее развитие описторхов происходит в хомячках. Этот факт объясняет преимущественное использование в экспериментах сирийских хомячков в качестве модельных животных для изучения процессов описторхоза у млекопитающих (Boonmars et al., 2009).

Очевидно, что причины неодинакового созревания марит *O. felinus* связаны с разной защитной реакцией хозяина, обусловленной нейро-иммуно-эндокринным статусом. В этой связи обращает на себя внимание большая относительная масса селезенки у мышей, по сравнению с хомячками. Причем в ответ на инфицирование этот показатель у мышей, в отличие от хомячков, еще более увеличивался. Учитывая то, что селезенка является самым крупным органом периферической иммунной системы, в которой происходит дифференцировка зрелых В-лимфоцитов в плазмциты – основные антителопродукторы организма (Прокопенко, Волина, 2001), можно полагать, что у мышей выше степень иммунной защиты от личинок *O. felinus*. При этом инфицированные животные обоих видов за две недели опыта набирали массу тела так же, как и незараженные сородичи, но у инфицированных хомячков этот прирост был слабее, чем у инфицированных мышей, что может также косвенно свидетельствовать о большей восприимчивости хомячков к инфицированию, которая проявляется в некотором ингибировании метаболических процессов.

Кровь, будучи связующим звеном всех систем и органов, одной из первых реагирует на любые воздействия на организм. Как показано для *O. viverrini* (Sripa et al., 2011) и для *O. felinus* (Lvova et al., 2012), личинки паразитов вызывают, во-первых, механическое повреждение

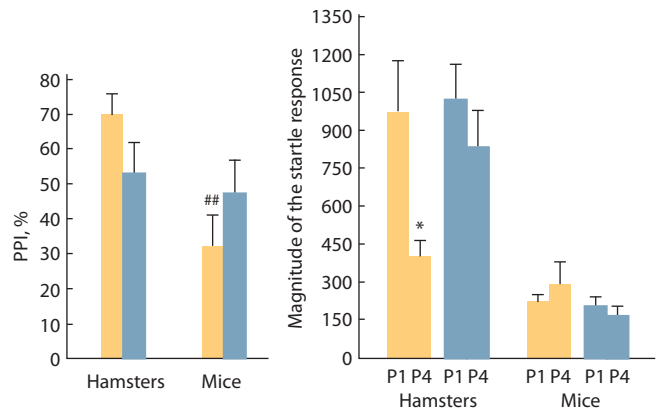


Fig. 5. Effect of *O. felinus* infection on prepulse inhibition (PPI) of the startle response to acoustic stimulation and magnitude of the startle response to the first (P1) and fourth (P4) stimuli in hamsters and mice. Yellow bars, control animals; blue bars, experimental animals; * $p < 0,05$, compared to P1; ## $p < 0,01$, compared to the respective group of hamsters (Fisher LSD test and Student t test).

эпителия в желчных протоках печени и тканях в местах прикрепления ротовой и брюшной присосками. Во-вторых, они начинают выделять экскреторно-секреторные продукты, которые являются иммуногенными. Как было показано, экскреторно-секреторный продукт *O. felinus* содержит широкий спектр многофункциональных белков, модулирующих иммунные характеристики хозяина и вызывающих морфофункциональные патологические изменения в тканях (Львова и др., 2014). На этом фоне происходит активация макрофагов, тучных клеток, эозинофилов и других клеток иммунной системы хозяина, участвующих в механизмах гуморального и клеточного иммунитета (Степанова, Подклетнова, 2002; Новицкий и др., 2008; Lvova et al., 2012). С первых дней инфицирования наблюдаются динамические преобразования в печени, сопровождаемые повышением проницаемости сосудистых стенок и существенной инфильтрацией лейкоцитов (Бычков и др., 2008).

Как показало наше исследование, наибольшие изменения в составе форменных элементов крови на фоне инфицирования личинками *O. felinus* происходят у хомячков. Установлено значительное увеличение палочкоядерных и снижение сегментоядерных форм нейтрофилов. Это может отражать тяжесть патологического процесса в организме и свидетельствовать о повышении фагоцитарной функции, направленной на элиминацию поврежденных тканей хозяина, полученных при внедрении личинок *O. felinus* в эпителий желчных протоков, поскольку в норме палочкоядерные нейтрофилы присутствуют в периферической крови в небольшом количестве (1–6 %) (Кишкун, 2013). У мышей не было значительных изменений данных показателей.

В отличие от хомячков у мышей при заражении паразитами было обнаружено значительное повышение количества базофилов в крови. В норме базофилы содержатся в небольшом количестве и всего несколько часов (Кишкун, 2013). Гистамин – основной компонент базофилов,

который участвует в аллергических реакциях, поэтому повышение количества базофилов в крови связывают с проявлением аллергии. По-видимому, наблюдаемое повышение количества базофилов является специфической реакцией мышей в ответ на инфицирование. Помимо гистамина гранулы базофилов содержат большое количество серотонина, лейкотриенов, простагландинов и других медиаторов, вовлеченных в аллергические реакции и процессы воспаления. Возможно, повышение базофилов в крови мышей обеспечивает им большую устойчивость к инфицированию *O. felinus*.

В то же время повышение числа эозинофилов как у хомячков, так и у мышей является общей неспецифической реакцией организма в ответ на инвазии *O. felinus*. Аналогичное повышение числа эозинофилов у хомячков на 7-е–10-е сут после заражения наблюдали другие исследователи (Степанова, Подклетнова, 2002; Бычков и др., 2008). Повышенная эозинофилия на фоне заражения личинками *O. felinus* наблюдается и у людей (Бронштейн, Лучшев, 1998), причем у пациентов с острым описторхозом, в отличие от больных хроническим описторхозом, наблюдается наибольшее количество эозинофилов в крови (Литвинова и др., 2006). Обычно эозинофилия сопровождается различными паразитарными заболеваниями (Choi et al., 2003; Начева, Литягина, 2012).

В нашей работе установлено снижение числа лимфоцитов у инфицированных хомячков и отсутствие такового у мышей. Обращают на себя внимание значительные межвидовые различия по числу агранулоцитов у животных: у мышей в обоих случаях (контроль, опыт) лимфоцитов в крови больше, а моноцитов – меньше, чем у хомячков. К тому же у контрольных и опытных мышей наблюдалось увеличенное число тромбоцитов в крови, по сравнению с хомячками. Поскольку главная функция лимфоцитов – распознавание антигена и участие в иммунном ответе, а моноциты являются основным источником органо- и тканеспецифичных макрофагов (Кишкун, 2013), обладающих фагоцитарной функцией, можно предполагать, что у мышей существуют специфические механизмы защиты от чужеродных организмов, в том числе паразитов. При этом абсолютное содержание всех лейкоцитов в крови (агранулоциты + гранулоциты) мышей и хомячков было в обоих случаях приблизительно одинаковым.

Кроме того, у хомячков уже на стадии острого описторхоза прослеживаются возможные признаки анемии, что также подчеркивает меньшую устойчивость к инфицированию *O. felinus* у хомячков, чем у мышей. У них несколько снижен уровень гемоглобина и гематокрит, в то время как у мышей эти показатели остаются неизменными. Можно предположить, что вследствие заражения повышается скорость разрушения эритроцитов в селезенке хомячков. Возможно и другое объяснение, а именно: учитывая разную степень зрелости личинок *O. felinus* у представителей двух видов, можно предположить, что более развитые особи паразита в желчных протоках печени хомячков начинают интенсивнее питаться кровью хозяина. Недавно были получены первые результаты о том, что мариты *O. felinus* питаются кровью хозяина, при этом переводят гем в пигмент гемозин (темное содержимое в кишечнике паразита) (Lvova et al., 2016).

Развитие любого воспалительного процесса реализуется за счет эффекторных клеток крови (нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов), имеющих костномозговое происхождение. Изменение численности и функционального состояния лейкоцитов крови во многом свидетельствует об активности воспаления. Первые доказательства ответственности гемопозитической стволовой клетки (ГСК) за гемопозитический гомеостаз в процессе формирования иммунных ответов были получены в 80-е годы прошлого столетия (Козлов и др., 1982). В последние годы продемонстрирована способность ГСК прямо и немедленно отвечать на воспалительные сигналы. Активация пролиферации и дифференцировки ГСК в ответ на инфекционный сигнал сопровождается мобилизацией более дифференцированных клеток из костного мозга в очаг воспаления (King, Goodell, 2011).

Для описторхоза характерно повышение экспрессии толл-подобных рецепторов (Toll-like receptors, TLRs) (Yongvanit et al., 2012). В последние годы показано, что ГСК экспрессируют TLRs, связывание TLR инициирует их входение в клеточный цикл, что стимулирует дифференцировку миелоидных предшественников (Megias et al., 2012). Кроме прямого TLR стимула, в миелоидной дифференцировке принимают участие провоспалительные цитокины: TNF, IFN I и II, IL-6 (Maltby et al., 2014). Таким образом, патоген-опосредованная стимуляция миелоидной дифференцировки может обеспечивать быстрое пополнение иммунных клеток в процессе формирования врожденных реакций на инфекцию.

Усиление костномозгового гемопоэза у хомячков может свидетельствовать о формировании ответа ГСК на инвазивное воздействие *O. felinus*. Наблюдается достоверное увеличение количества ранних (КОЕ-ГЭММ) и гранулоцитарно-макрофагальных (КОЕ-ГМ) предшественников, пополняющих популяции гранулоцитов и макрофагов, расходуемых в процессе воспалительной реакции. Формирующаяся анемия (некоторое снижение гемоглобина и гематокрита) обуславливает, очевидно, стимуляцию эритропоэза (повышение количества эритроидных колоний).

В наших исследованиях на звуковой сигнал более выражено реагировали контрольные хомячки (по сравнению с контрольными мышами). При этом у инфицированных хомячков, в отличие от контрольных особей, не было реакции привыкания, что может свидетельствовать об определенных нарушениях в работе нервной системы. У людей усиленная стартл-реакция или отсутствие габитуации может быть следствием разнообразных заболеваний, затрагивающих нервную систему, например, посттравматический синдром у людей сопровождается повышением силы реакции и снижением скорости привыкания к стимулу, такие же изменения наблюдаются и при моделировании этого синдрома у крыс (Garrick et al., 2001; Marshall, Garakani, 2002). Что касается отсутствия реакции привыкания у мышей как контрольной, так и опытной групп, то, возможно, для выявления габитуации у данного вида животных четырех повторов оказалось просто недостаточно. Известно, что выраженность преимпульсного ингибирования стартл-реакции способны изменять многие фармакологические средства,

генетические мутации, психические и неврологические заболевания и некоторые другие факторы (Braff et al., 2001). Заражение личинками описторха не повлияло на величину ингибирования реакции вздрагивания, измеренную на сроке заражения 12 дней у мышей и хомячков. Однако не исключено, что при более длительном инфицировании экспериментальных животных (например, 6 мес.) нарушений будет существенно больше по многим показателям работы нервной системы.

Таким образом, в проведенном исследовании обнаружены существенные межвидовые различия уже на ранних стадиях инфицирования животных личинками *O. felineus*. Через две недели после инфицирования у хомячков наблюдались изменения в составе форменных элементов крови, свидетельствующие о проявлении воспалительных реакций в организме хозяина, вызванных инвазией. Одновременно с этим происходила активация гемопоэтических стволовых клеток-предшественников миелоидного и эритроидного ряда. Исследования реакции хомячков на акустический сигнал свидетельствуют о некоторых нарушениях в центральной нервной системе. Кроме того, более зрелые марины *O. felineus*, выделенные из желчных протоков хомячков, по сравнению с маридами, выделенными из мышей, также свидетельствуют о меньшей устойчивости хомячков к заражению. В отличие от хомячков, у мышей изменения в крови в ответ на инфицирование были менее выраженные и не сопровождалась увеличением гемопоэтической колониеобразующей активности и изменениями в реакции вздрагивания на акустический стимул. Полученные данные говорят о большей резистентности мышей к инфицированию *O. felineus*. Изучение причин устойчивости мышей к гельминтным инвазиям – предмет будущих исследований. На данном этапе можно определенно говорить о том, что острая стадия экспериментального описторхоза, более пролонгированная у мышей, не исключает возможности использования этого вида животных для моделирования *O. felineus*-индуцированного паразитоза.

Acknowledgments

This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, projects 16-04-00356a and 15-04-03551a), the SB RAS Program for Research Collaboration (Integration Project 19), and State Budgeted Project 0324-2015-0004.

The authors are grateful to the Microscopy Center of ICG (<http://www.bionet.nsc.ru/microscopy/>) for the access to the equipment and to colleagues of the Laboratory of Behavioral Neurogenomics, ICG, for the access to the “SR-Pilot” (San-Diego Instruments) device.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

Adams A.M. Foodborne Trematodes. Foodborne Parasites. Ed. Y.R. Ortega. N.Y.: Springer Science + Business Media, LLC, 2006. Chap.7: 161-196.
Akhmedov V.A., Kritevich M.A. Chronic opisthorchiasis is a multiple-organ pathology. Vestnik Novosibirskogo Gosudarstvennogo Uni-

versiteta. Seriya Biologiya, Clinicheskaya Medicina=Herald of Novosibirsk State University. Biology, Clinical Medicine. 2009;7(1): 118-121.
Bakhtanovskaya I.V., Stepanova T.F. An analysis of complex of biochemical parameters of liver functions in chronic opisthorchiasis. Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni=Medical Parasitology and Parasitic Diseases. 2005;4:18-21.
Boonmars T., Boonjaraspinyo S., Kaewsamut B. Animal models for *Opisthorchis viverrini* infection. Parasitol. Res. 2009;104:701-703.
Braff D.L., Geyer M.A., Swerdlow N.R. Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies Psychopharmacology. 2001;156:234–258.
Brazhnikova N.A., Tolkaeva M.V. Peculiarities of clinic, diagnostics and treatment of the opisthorchiasis liver abscesses. Annaly Khirurgicheskoy Gepatologii=Annals of Surgical Hepatology. 2000;5(1): 37-42.
Brazhnikova N.A., Tolkaeva M.V. Cancer of the liver, biliary tract and pancreas in chronic opisthorchiasis. Byulleten Sibirskoy Meditsiny=Bulletin of Siberian Medicine. 2002;2:71–76.
Bronstein A.M., Luchshev V.I. Trematode infections of the liver: opisthorchiasis and clonorchiasis. Russkiy Meditsinskiy Zhurnal=Russian Medical Journal. 1998;6(3):140-148.
Bychkov V.G., Krylov G.G., Sabirov A.Kh., Zuyevskiy V.P., Khadiyeva Ye.D., Zhandekov Ye.D. Hepatic cell transformation changes in experimental opisthorchiasis. Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni=Medical Parasitology and Parasitic Diseases. 2008;3:9-12.
Choi Y.K., Yoon B.I., Won Y.S., Lee C.H., Hyun B.H., Kim H.C., Oh G.T., Kim D.Y. Cytokine responses in mice infected with *Clonorchis sinensis*. Parasitol. Res. 2003;91(2):87-93.
D’Mello C., Swain M.G. Liver-brain inflammation axis. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2011;301(5):G749-G61.
Garrick T., Morrow N., Shalev A.Y., Eth S. Stress-induced enhancement of auditory startle: an animal model of posttraumatic stress disorder. Psychiatry. 2001;64:346-354.
Geyer M.A., Braff D.L. Startle habituation and sensorimotor gating in schizophrenia and related animal models. Schizophrenia Bull. 1987;13(4):643-668.
Graham F. The more or less startling effects of weak prestimuli. Psychophysiology. 1975;12:238–248.
Hoffman H.S., Searle J.L. Acoustic and temporal factors in the evocation of startle. J. Acoust. Soc. Am. 1968;43:269–282.
Hung N.M., Madsen H., Fried B. Global status of fish-borne zoonotic trematodiasis in humans. Acta Parasitol. 2013;58(3):231-258.
Jittimane J., Sermswan R.W., Puapairoj A., Maleewong W., Wongratnacheewin S. Cytokine expression in hamsters experimentally infected with *Opisthorchis viverrini*. Parasite Immunol. 2007;29(3): 159-167.
Keiser J., Utzinger J. Food-borne trematodiasis: current chemotherapy and advances with artemisinins and synthetic trioxolanes. Trends Parasitol. 2007;23(11):555-562.
King K.Y., Goodell M.A. Inflammatory modulation of HSCs: viewing the HSC as a foundation for the immune response. Nature. 2011;11:685-692.
Kishkun A.A. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika. Uchebnoe posobie [Clinical Laboratory Diagnostics. Textbook]. Moscow, GEOTAR-Media Publ., 2013.
Kozlov V.A., Zhuravkin I.N., Tsyrova I.G. Stvolovaya krovetvornaya kletka i immunnyy otvet [Hematopoietic Stem Cell and Immune Response]. Novosibirsk, Nauka, 1982.
Labome.com. Laboratory Mice and Rats. Mat. Methods 2012;2:113. <http://www.labome.com/method/Laboratory-Mice-and-Rats.html>
Litvinova L.S., Kolobovnikova Yu.V., Knoutareva E.N., Grigoryeva E.S., Souvorova E.V., Novitsky V.V., Ryazantseva N.V. Cytotoxic potential of eosinophiles’ granulocytes in patients having eosinophilia syndrome. Byulleten Sibirskoy Meditsiny=Bulletin of Siberian Medicine. 2006;3:26-31.

- Lvova M.N., Duzhak T.G., Tsentlovich Yu.P., Katokhin A.V., Mordvinov V.A. Secretome of the adult liver fluke *Opisthorchis felinus*. *Parazitologiya=Parasitology (St.-Petersburg)*. 2014;48(3):169-184.
- Lvova M.N., Tangkawattana S., Balthaisong S., Katokhin A.V., Mordvinov V.A., Sripa B. Comparative histopathology of *Opisthorchis felinus* and *Opisthorchis viverrini* in a hamster model: an implication of high pathogenicity of the European liver fluke. *Parasitol. Int.* 2012;61(1):167-172.
- Lvova M.N., Zhukova M.V., Kiseleva E.V., Mayboroda O.A., Hensbergen P., Kizilova E.A., Besprozvannykh V.V., Sripa B., Katokhin A.V., Mordvinov V.A. Hemozoin in the gut contents of liver flukes (Opisthorchiidae family). *Int. J. Parasitol.* 2016;46:147-156. DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.12.003>.
- Maksimova G.A., Zhukova N.A., Kashina E.V., Lvova M.N., Katokhin A.V., Tolstikova T.G., Ogorodova L.M., Kaminsky I.P., Sazonov A.E., Mordvinov V.A. Experimental model of opisthorchiasis in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Byulleten Sibirskoy Meditsiny=Bulletin of Siberian Medicine*. 2012;6:59-65.
- Maltby S., Hansbro N.G., Tay H.L., Stewart J., Plank M., Donges B., Rosenberg H.F., Foster P.S. Production and differentiation of myeloid cells driven by proinflammatory cytokines in response to acute pneumovirus infection in mice. *J. Immunol.* 2014;193(8):4072-4082.
- Mairiang E., Laha T., Bethony J.M., Thinkhamrop B., Kaewkes S., Sithithaworn P., Tesana S., Loukas A., Brindley P.J., Sripa B. Ultrasonography assessment of hepatobiliary abnormalities in 3359 subjects with *Opisthorchis viverrini* infection in endemic areas of Thailand. *Parasitol. Int.* 2012;61(1):208-211.
- Marshall R.D., Garakani A. Psychobiology of the acute stress response and its relationship to the psychobiology of post-traumatic stress disorder. *Psychiat. Clin. N. Am.* 2002;25(2):385-395.
- Megías J., Yáñez A., Moriano S., O'Connor J.E., Gozalbo D., Gil M.L. Direct Toll-like receptor-mediated stimulation of hematopoietic stem and progenitor cells occurs in vivo and promotes differentiation toward macrophages. *Stem Cells*. 2012;30(7):1486-1495.
- Mordvinov V.A., Furman D.P. The Digenea parasite *Opisthorchis felinus*: a target for the discovery and development of novel drugs. *Infect. Disord. Drug Targets*. 2010;10(5):385-401.
- Mordvinov V.A., Yurlova N.I., Ogorodova L.M., Katokhin A.V. *Opisthorchis felinus* and *Metorchis bilis* are the main agents of liver fluke infection of humans in Russia. *Parasitol. Int.* 2012;61(1):25-31.
- Nacheva L.V., Lityagina A.V. Cellular reactions in helminthiasis. *Rossiyskiy parazitologicheskiy zhurnal=Russian Journal of Parasitology*. 2012;3:80-86.
- Novitsky V.V., Ryazantseva N.V., Litvinova L.S., Tkachenko S.B., Kolobovnikova Yu.V., Lepekhin A.V., Chernyshova N.P., Grigoryeva E.S., Suvorova E.V., Zima A.P. Change in the production of key cytokines for regulation eosinophilic granulocytes in *Opisthorchis felinus* invasion. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika=Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2008;2:38-42.
- Ogorodova L.M., Freidin M.B., Sazonov A.E., Fedorova O.S., Gerbek I.E., Cherevko N.A., Lebedeva N.Y. A pilot screening of prevalence of atopic states and opisthorchosis and their relationship in people of Tomsk Oblast. *Parasitol. Res.* 2007;101(4):1165-1168.
- Paylor R., Crawley J.N. Inbred strain differences in prepulse inhibition of the mouse startle response. *Psychopharmacology*. 1997;132:169-180.
- Pozio E., Armignacco O., Ferri F., Gomez Morales M.A. *Opisthorchis felinus*, an emerging infection in Italy and its implication for the European Union. *Acta Trop.* 2013;126(1):54-62.
- Prokopenko V.D., Volina E.G. *Struktura i funktsii immunnyy sistema cheloveka [Structure and function of the human immune system.]*. Moscow, RUDN, 2001.
- Schuster R., Dell K., Nöckler K., Vöster J., Schwartz-Porsche D., Haidler W. Liver enzyme activity and histological changes in the liver of silver foxes (*Vulpes vulpes fulva*) experimentally infected with *opisthorchiid* liver flukes. A contribution to the pathogenesis of opisthorchiidosis. *Parasitol. Res.* 2003;89(5):414-418.
- Sripa B., Bethony J.M., Sithithaworn P., Kaewkes S., Mairiang E., Loukas A., Mulvenna J., Laha T., Hotez P.J., Brindley P.J. Opisthorchiasis and Opisthorchis-associated cholangiocarcinoma in Thailand and Laos. *Acta Trop.* 2011;120(Suppl. 1):S158-S168.
- Sripa B., Kaewkes S. Relationship between parasite-specific antibody responses and intensity of *Opisthorchis viverrini* infection in hamsters. *Parasite Immunol.* 2000;22(3):139-145.
- Sripa B., Kaewkes S., Sithithaworn P., Mairiang E., Laha T., Smout M., Pairojkul C., Bhudhisawasdi V., Tesana S., Thinkamrop B., Bethony J.M., Loukas A., Brindley P.J. Liver fluke induces cholangiocarcinoma. *PLoS Med.* 2007;4(7):e2011148-1155.
- Sripa B., Thinkhamrop B., Mairiang E., Laha T., Kaewkes S., Sithithaworn P., Periago M.V., Bhudhisawasdi V., Yonglithipagon P., Mulvenna J., Brindley P.J., Loukas A., Bethony J.M. Elevated plasma IL-6 associates with increased risk of advanced fibrosis and cholangiocarcinoma in individuals infected by *Opisthorchis viverrini*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012;6(5):e1654-1-9.
- Stepanova T.F., Bakshtanovskaia I.V., Skichko S.I. Parameters of thyroid status in patients with acute and superinvasion opisthorchiasis. *Fundamentalnye issledovaniya=Fundamental research*. 2004;6:103-104.
- Stepanova T.F., Podkletnova L.F. Parazitotsenoticheskie aspekty invazionno-infektsionnoy patologii (opistorkhoz i tuberkulez) [Parasitecoenotic aspects of invasive- infected pathology (opisthorchiasis and tuberculosis)]. Tyumen: TGU, 2002.
- Yongvanit P., Thanan R., Pinlaor S., Sithithaworn P., Loilome W., Namwat N., Techasen A., Dechakhamphu S. Increased expression of TLR-2, COX-2, and SOD-2 genes in the peripheral blood leukocytes of opisthorchiasis patients induced by *Opisthorchis viverrini* antigen. *Parasitol. Res.* 2012;110(5):1969-1977.
- Zelentsov A.G. Susceptibility of inbred mice to helminths. II. Development of *Opisthorchis felinus* in mice of strains A/He, CBA/Lac, CC57w/MJ, C57BL/LJ, DBA/2J and SWR. *J. Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni=Medical Parasitology and Parasitic Diseases*. 1974;43(1):95-98.