

На правах рукописи

**Львова Мария Николаевна**

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПАТОГЕНЕЗА  
ОПИСТОРХОЗА, ВЫЗВАННОГО ТРЕМАТОДОЙ  
*OPISTHORCHIS FELINEUS***

03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2019

Работа выполнена в лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

Научный руководитель: Мордвинов Вячеслав Алексеевич д.б.н., заведующий лабораторией молекулярных механизмов патологических процессов ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», г. Новосибирск

Официальные оппоненты: Айдагулова Светлана Владимировна д.б.н., профессор, заведующая лабораторией клеточной биологии и фундаментальных основ репродукции ФГБОУ «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск

Беклемишев Анатолий Борисович д.б.н., профессор, заведующий лабораторией генной инженерии ФГБНУ "Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины", г. Новосибирск

Ведущая организация: ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», г. Кольцово

Защита диссертации состоится «  »    2020 года на заседании диссертационного совета Д 003.011. на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект академика Лаврентьева 10.

тел. (383) 363-49-06 (1321); факс: (383) 333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института: <http://www.bionet.nsc.ru/>

Автореферат разослан «  »    2019 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
д.б.н.

Хлебодарова Т.М.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Инвазия печеночными сосальщиками семейства *Opisthorchiidae* – *Opisthorchis felineus*, *O. viverrini*, *Clonorchis sinensis* – остается серьезной проблемой здравоохранения во многих странах мира. Самый обширный и интенсивный очаг *O. felineus*-описторхоза расположен в Обь-Иртышском бассейне, который охватывает значительную часть территории Сибири (Fedorova et al., 2018), заболеваемость населения в некоторых районах достигает 60%. Из-за большого туристического потока в Юго-Восточную Азию у жителей России увеличивается риск инфицирования эндемичными для этого региона видами *O. viverrini* и *C. sinensis*.

Описторхоз характеризуется длительным течением и развитием тяжелых осложнений, таких как холангит, холецистит, дискинезия и стриктуры желчных протоков, абсцесс печени, панкреатит и может способствовать возникновению холангiocарциномы (Афтаева и др., 2018; Байкова и др., 2018; Sriraj et al., 2016). У пациентов, страдающих хроническим описторхозом, вызванным *O. felineus*, ведущими осложнениями являются стриктуры желчных протоков различной локализации, острые и хронические панкреатиты (Бражникова, Цхай, 2004; Афтаева и др., 2018), тогда как у больных с *O. viverrini*-описторхозом – холангiocарцинома (Sripa et al., 2007). Исключительно при *O. felineus*-описторхозе в желчных протоках гепатобилиарной системы лабораторных животных и человека описано накопление буро-коричневого содержимого (Зуевский, 2010; Соловьева и др., 2011). На сегодняшний день актуально сравнительное исследование сроков появления и выраженности изменений, возникающих в печени, а также особенностей проявления патологии при инвазии разными видами возбудителей описторхоза.

Изучение механизмов развития *O. viverrini*-описторхоза показало, что значительный вклад в патогенез вносит экскреторно-секреторный продукт (ЭСП) гельминта (Sripa, Kaewkes, 2000a; Smout et al., 2015; Suttiprapa et al., 2018). Компонентами ЭСП являются белки и другие секрецируемые и экскретируемые молекулы, продукты жизнедеятельности паразитов, содержимое их кишечника, вещества, которые высвобождаются с поверхности тегумента. Установлено, что они играют важную роль во многих аспектах взаимоотношений в системе «паразит – хозяин» и способствуют длительному паразитированию гельминтов (Smout et al., 2015; Suttiprapa et al., 2018). С помощью современных протеомных подходов описан белковый состав ЭСП *O. viverrini* и *C. sinensis* (Mulvenna et al., 2010; Zheng et al., 2011; Suttiprapa et al., 2018). Эти данные используют при поиске мишеней для усовершенствования иммунодиагностики *O. viverrini*-описторхоза и клонорхоза, а также при разработке вакцин против этих гельминтозов (Ju et al., 2009; Prasopdee et al., 2019). Современными протеомными методами ЭСП *O. felineus* не исследован. Изучение на клеточном уровне механизмов взаимоотношений в системе «паразит – хозяин» при *O. felineus*-описторхозе, прежде всего, молекулярных аспектов жизнедеятельности гельминта и состава его ЭСП, необходимы для получения новых знаний о патогенезе паразитарных заболеваний, они

раскрывают перспективы для создания принципиально новых диагностических и лечебных технологий.

**Цель данной работы** – сравнительный анализ патоморфологических и патогенетических особенностей экспериментального описторхоза, вызванного представителями рода *Opisthorchis*.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Сравнить в динамике гистологические изменения гепатобилиарной системы сирийских хомячков (*Mesocricetus auratus*) при экспериментальном описторхозе, вызванном *O. felineus* и *O. viverrini*;
2. Провести комплексный анализ состава содержимого кишечника *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*;
3. Определить белковый состав экскреторно-секреторного продукта *O. felineus* и его возможную локализацию в печени экспериментальных животных;
4. Получить рекомбинантную форму одного из белков экскреторно-секреторного продукта и антитела к данному белку.

**Научная новизна работы.** Впервые получены результаты сравнительного гистологического исследования изменений печени при экспериментальном описторхозе, вызванном *O. felineus* и *O. viverrini*. В динамике развития патологии у животных с *O. felineus*-описторхозом выявлены ранние и более выраженные структурные изменения гепатобилиарной системы. Доказано, что представители семейства *Opisthorchiidae*, *O. felineus* и *C. sinensis*, являются гематофагами. Определена природа пигмента, локализованного как в кишечнике марит *O. felineus* и *C. sinensis*, так и в гепатобилиарной системе экспериментальных животных. С помощью электронной микроскопии, спектроскопии и масс-спектрометрии установлено, что это гемозоин – продукт биокристаллизации (дезоксидации) гема. На основании ультраструктурного исследования просвета кишечника гельминтов обнаружено, что формирование гемозоина происходит на поверхности липидных капель. При этом у близкородственного вида *O. viverrini* гемозоин в просвете кишечника не обнаружен. Впервые с помощью масс-спектрометрии и биоинформационного анализа определен белковый состав экскреторно-секреторного продукта *O. felineus*. В отличие от *O. viverrini*, в состав секретома *O. felineus* входит большее количество антиоксидантных и протеолитических ферментов, из них мажорными являются глутатион-S-трансфераза и катепсин F. *O. felineus*, аналогично *O. viverrini*, выделяет экзосомоподобные везикулы.

**Теоретическая и практическая значимость исследования.** Результаты сравнительного гистологического исследования печени хомячков, инфицированных *O. felineus* и *O. viverrini*, а также данные исследования ЭСП *O. felineus* расширяют имеющиеся представления о структурных изменениях гепатобилиарной системы и особенностях патогенеза экспериментального описторхоза. Это вносит вклад в фундаментальные знания о видовых особенностях биологии паразита и о молекулярно-биологических основах взаимоотношений в системе «паразит – хозяин» при описторхозе. Они могут быть использованы в курсе лекций по клеточной биологии и

паразитологии в ВУЗах. Данные масс-спектрометрического анализа экскреторно-секреторных белков *O. felineus* и знания о биохимических особенностях питания паразита необходимы для поиска новых терапевтических мишеней и дальнейшего усовершенствования методов иммунодиагностики описторхоза. Полученная рекомбинантная форма белка тиоредоксин пероксидазы *O. felineus* и поликлональные антитела к ней позволяют исследовать патогенез описторхоза на молекулярном уровне. Кроме того, они могут быть использованы для усовершенствования иммунодиагностики *O. felineus*-описторхоза.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Трематоды *O. felineus* и *C. sinensis* являются гематофагами, у которых обезвреживание гема происходит в кишечнике путем формирования кристаллов гемозоина на поверхности липидных капель;
2. Экспериментальный описторхоз, вызванный *O. felineus*, но не *O. viverrini*, характеризуется присутствием специфических темно-коричневых депозитов гемозоина в гепатобилиарной системе, а также более ранними и выраженными гистопатологическими изменениями печени;
3. Особенности патогенеза описторхоза, вызванного *O. felineus*, определяются присутствием в составе экскреторно-секреторного продукта гемозоина и большого количества протеолитических и антиоксидантных ферментов, а также характером его распределения в печени окончательного хозяина.

**Апробация результатов.** По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в журналах, входящих в международные базы цитирования WOS и Scopus. Основные результаты работы были представлены и обсуждены на научных конференциях: 6-ом Семинаре по алиментарным и водным паразитарным зоонозам (FBPZ6) (2009, Бангкок); «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: геномика, протеомика, биоинформатика» (2011, Новосибирск); Международном конгрессе по печеночным сосальщикам (2011, Кхон Кен); 38-ом Конгрессе Федерации европейских биохимических обществ (2013, Санкт-Петербург); I Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (2014, Кольцово); «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (2015, Новосибирск); VI Съезде Паразитологического общества «Современная паразитология – основные тренды и вызовы» (2018, Санкт-Петербург).

**Вклад автора.** Основные результаты получены автором самостоятельно. Сравнительное гистологическое исследование печени при инвазии *O. felineus* и *O. viverrini* выполнено автором под руководством профессора В. Sripi на базе Лаборатории патоморфологии университета Кхон Кен (Таиланд). Исследование содержимого кишечника описторхид, а также электронная микроскопия микровезикул, полученных из ЭСП *O. felineus*, проведены совместно с к.б.н. Е.В. Киселевой и к.б.н. М.В. Жуковой на базе ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН. Масс-спектрометрические исследования проведены совместно с к.б.н. Т.Г. Дужак в ЦКП Международного томографического центра СО РАН.

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы (308 источников). Работа изложена на 150 страницах, содержит 40 рисунков, 2 таблицы и 2 приложения.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Животные.** Работа выполнена на самцах хомячков *Mesocricetus auratus* в возрасте 2 – 3 мес., инфицированных перорально по 50 метацеркарий *O. felineus*, *O. viverrini* или *C. sinensis*. Эксперименты проводили на базе медицинского факультета Университета Кхон Кена (Таиланд) и на базе конвенционального вивария ИЦиГ СО РАН. Все эксперименты осуществляли в соответствии с принципами гуманности, изложенными в директивах Европейского сообщества (86/609/EEC) и Хельсинкской декларации.

**Анализ патоморфологических изменений в печени хомячков, инфицированных *O. felineus* или *O. viverrini*.** В ходе эксперимента было сформировано 3 группы животных: интактные (n=35), инфицированные *O. felineus* (n=35) или *O. viverrini* (n=35). Через 1, 2, 3, 4, 8, 12 и 24 недели после заражения из эксперимента выводили по 5 животных из каждой группы для гистологического исследования срезов печени, окрашенных гематоксилином и эозином. Степень выраженности патоморфологических изменений оценивали полуколичественно (Bhamarapravati et al., 1978; Wonkchalee et al., 2012).

Для анализа содержимого кишечника *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis* использовали следующие методы: выделение и очистку кристаллов из марит гельминтов, получение кристаллов β-гематина, просвечивающую и сканирующую электронную микроскопию, спектрометрию характеристических потерь энергии электронами, инфракрасную Фурье-спектроскопию, масс-спектрометрию.

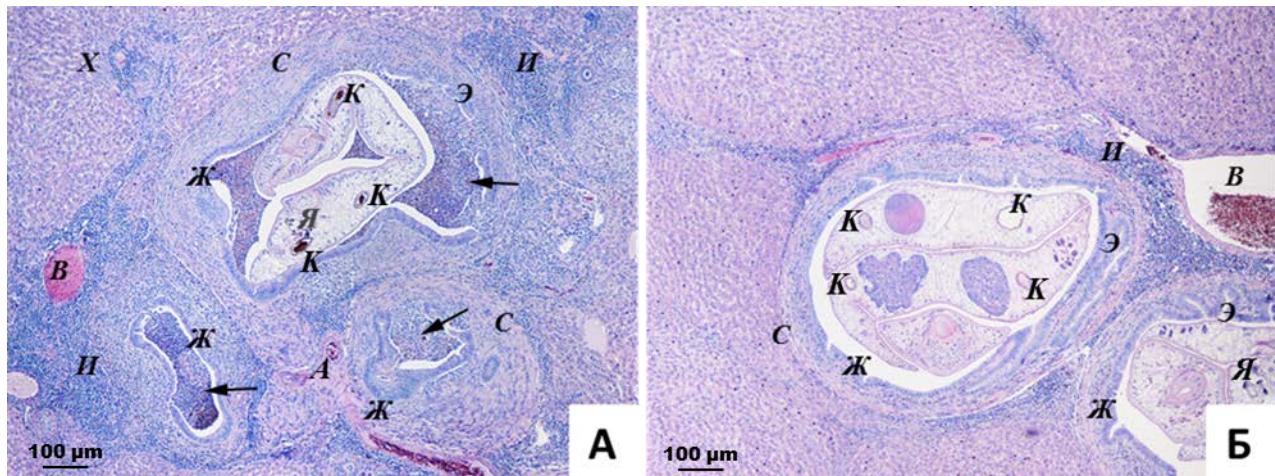
Для анализа белкового состава экскреторно-секреторного продукта *O. felineus* проводили: культивирование *in vitro* марит *O. felineus*, выделение белков из культуральной среды и определение их концентрации по Бредфорду, электрофорез белков в полиакриламидном геле, протеолиз белков в растворе и в полиакриламидном геле, масс-спектрометрию и биоинформационный анализ полученных данных, выделение экзосомоподобных везикул из ЭСП *O. felineus* и их электронную микроскопию, иммуноферментный анализ, иммуногистохимическое окрашивание срезов печени хомячков, инфицированных *O. felineus*, кроличьими поликлональными антителами, полученными к ЭСП гельминта.

Для получения рекомбинантного белка тиоредоксин пероксидазы *O. felineus* применяли следующие методы: выделение РНК, синтез кДНК, амплификацию ДНК со специфическими для тиоредоксин пероксидазы *O. felineus* праймерами, электрофорез ДНК в агарозном геле, клонирование нуклеотидной последовательности в прокариотической системе экспрессии, секвенирование плазмидной ДНК, получение и аффинную очистку рекомбинантного белка. Кроме этого нарабатывали кроличьи поликлональные антитела к нему, которые использовали при иммуногистохимическом окрашивании.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Патоморфологические изменения печени хомячков, инфицированных *O. felineus* и *O. viverrini*

На раннем этапе развития *O. felineus*-описторхоза (1 – 4 недели после заражения) признаки воспаления (инфилтратия), появившиеся к концу 1-ой недели, постепенно нарастали и к концу 4-ой недели были максимальными (Рис. 1А).



**Рис. 1.** Фрагменты печени хомячков, инфицированных *O. felineus* (А) и *O. viverrini* (Б), через 4 недели после заражения. Стрелки указывают на формирующиеся в просвете желчных протоков гранулемы. Здесь и на рисунках 3, 4, 10, 12: А – артерия; В – вена; Ж – желчный проток; И – перидуктальная клеточная инфильтрация; С – разрастание соединительной ткани; Э – гиперплазированный, многорядный эпителий желчного протока; Х – вновь образованные холангиолы; К – просвет кишечника гельминта; Я – яйца гельминта в полости матки. Гематоксилин-эозин. Увеличение А, Б х40.

В расширенных желчных протоках участки эрозий (отсутствия эпителия, чаще всего в местах прикрепления гельминтов) сочетались с зонами гиперплазии и дисплазии эпителия. На 3-ей неделе начали появляться единичные подкапсульные холангиоэктазы. В междольковой и перидуктальной соединительной ткани происходило формирование новых желчных ходов (холангиол). К этому сроку гельминты достигли половой зрелости и начиналась яйцепродукция. Впервые через 3 недели после инфицирования отмечено формирование паразитарных гранулем вокруг умерших гельминтов и яиц в желчных протоках, что сужало их просвет. В кишечнике *O. felineus* обнаружено темно-коричневое содержимое, определяемое далее на протяжении всего эксперимента.

У животных, инфицированных *O. viverrini*, наблюдалась схожая гистологическая картина повреждений гепатобилиарной системы (Рис. 1Б). Однако, несмотря на идентичность клеточного состава инфильтратов в стенках желчных протоков, их площадь была меньше, изменения эпителия желчных протоков и перидуктальный фиброз были менее выражены, что говорит о сравнительно меньшем воспалении, индуцированном этим видом trematod. Кроме того, отмечено более позднее (по сравнению с *O. felineus*) начало яйцепродукции (после 4-ой недели). Яйцевые гранулемы и холангиоэктазы возникали еще позже – после 8-ой недели инфицирования.

На поздних сроках инвазии (8 – 24 недели) у хомячков обеих групп желчные протоки были неравномерно расширены с сосочковыми выростами соединительной ткани, выстилающий их эпителий местами был истончен или эрозирован, с участками гиперплазии и дисплазии (Рис. 2). Инфильтрация портальных трактов была представлена в виде скоплений лимфоидных клеток, некоторые периудуктальные клеточные инфильтраты были отодвинуты разросшейся соединительной тканью на периферию. Пролиферация соединительной ткани в паренхиме печени способствовала формированию ложных долек. Отмечено образование большого числа холангиол.

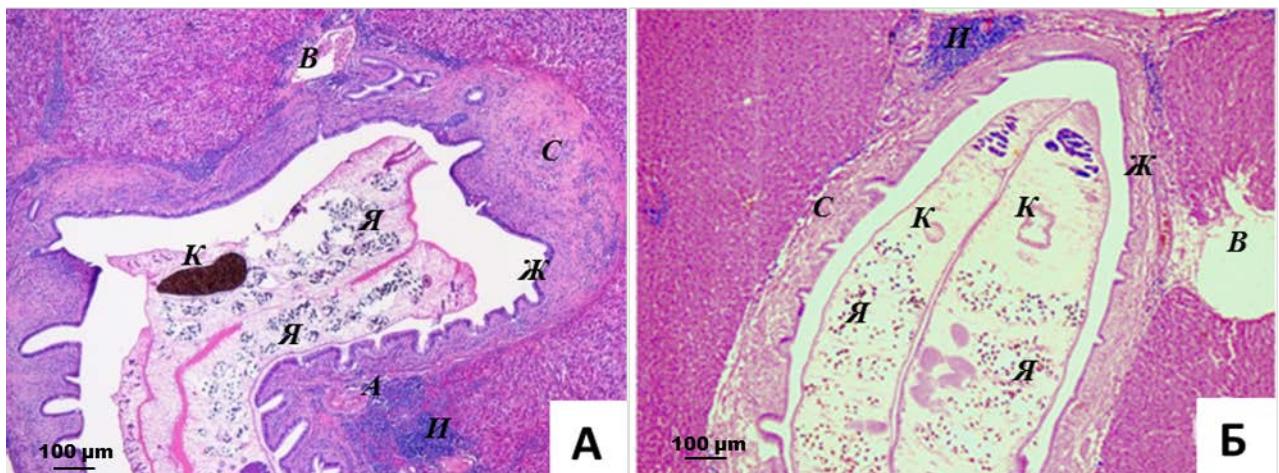


Рис. 2. Фрагменты печени хомячков, инфицированных *O. felineus* (А) и *O. viverrini* (Б), через 24 недели после заражения. Гематоксилин-эозин. Увеличение А, Б х40.

У животных, инфицированных *O. felineus*, периудуктальный фиброз и клеточная инфильтрация были более выражены, крупные холангиоэктазы представляли собой многокамерные кисты, выстланные уплощенным эпителием и окруженные соединительной тканью, в просвете которых определялись паразиты, грануляционная ткань с яйцами, большое количество слизи и темно-коричневого содержимого. В обеих группах животных в печени наряду с «созревающими» (подвергающимися фиброзу) появлялись свежие гранулемы. Некоторые гранулемы «выбухали» в виде полипов в просвет желчного протока, деформируя и сужая его.

Только у животных, инфицированных *O. felineus*, через 8 недель после заражения обнаружен холангиоэктаз на висцеральной поверхности левой медиальной доли печени, заполненный гельминтами и густым, студнеобразным темно-коричневым веществом, по внешнему виду напоминающим темное содержимое кишечника гельминтов (Рис. 3).

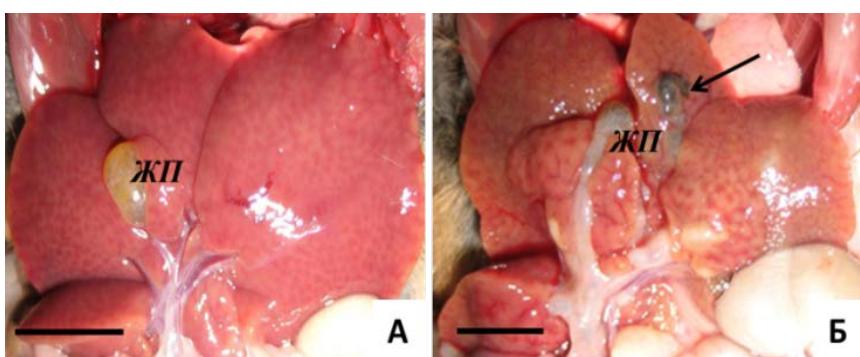


Рис. 3. Висцеральная поверхность печени у интактных животных (А) и у хомячков через 8 недель после заражения *O. felineus* (Б). Стрелка указывает на холангиоэктаз с темным содержимым. ЖП – желчный пузырь. Шкала 1 см.

Исключительно в печени хомячков, зараженных *O. felineus*, были обнаружены гранулемы, в которых преобладали клетки с темно-коричневым содержимым, сходным с темными гранулами в кишечнике гельминта (Рис. 4).

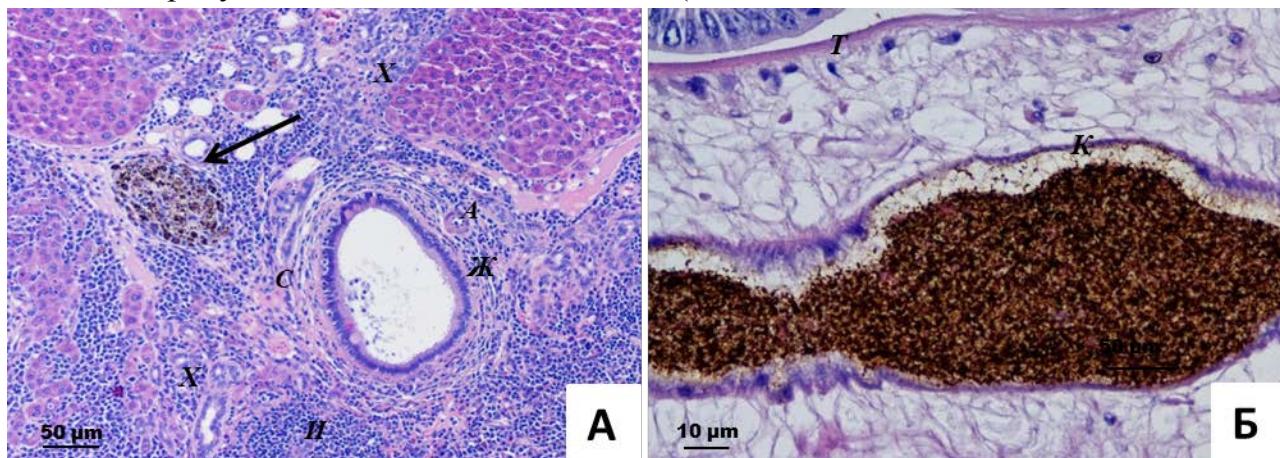


Рис. 4. Фрагмент печени хомячка через 8 недель после инфицирования *O. felineus* (А) и просвет кишечника мариты *O. felineus* с темно-коричневым содержимым (Б). Стрелкой обозначена гранулема с клетками, содержащими темно-коричневые гранулы, сходные с темными гранулами в кишечнике гельминта. *T* – тегумент гельминта. Гематоксилин-эозин. Увеличение А x100, Б x400.

Мы не наблюдали ни одного случая развития холангiocарциномы у хомячков обеих групп на всем протяжении эксперимента. Однако на канцерогенный потенциал *O. felineus* может указывать наличие дисплазии эпителия желчных протоков и появление холангифиброза (предракового состояния) на 24-ой неделе инфекции на фоне хронического воспаления. Для *O. viverrini* связь между развитием холангифиброза и холангiocарциномой показана (Shimonishi et al., 2000).

Сравнительный полу количественный анализ гистологических данных, полученных в разные сроки после инфицирования *O. felineus* и *O. viverrini*, указывал на схожий характер повреждений, сопутствующих обеим инфекциям. Однако время появления этих изменений и степень их выраженности различались у животных, инфицированных *O. felineus* и *O. viverrini* (Рис. 5).

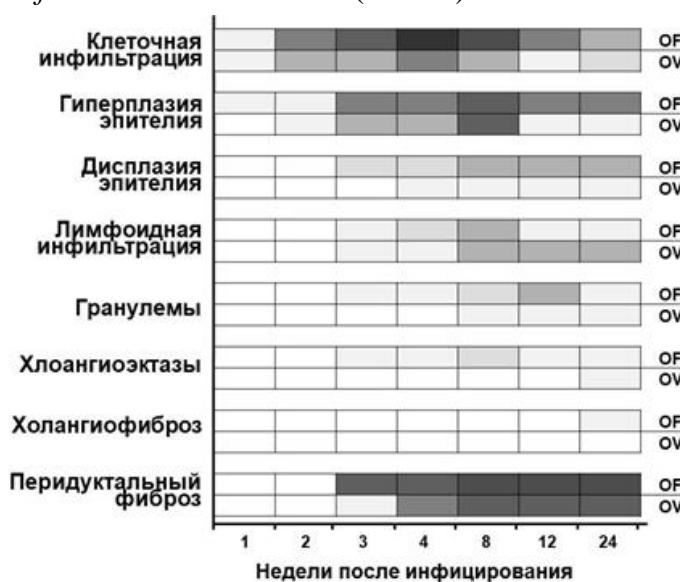
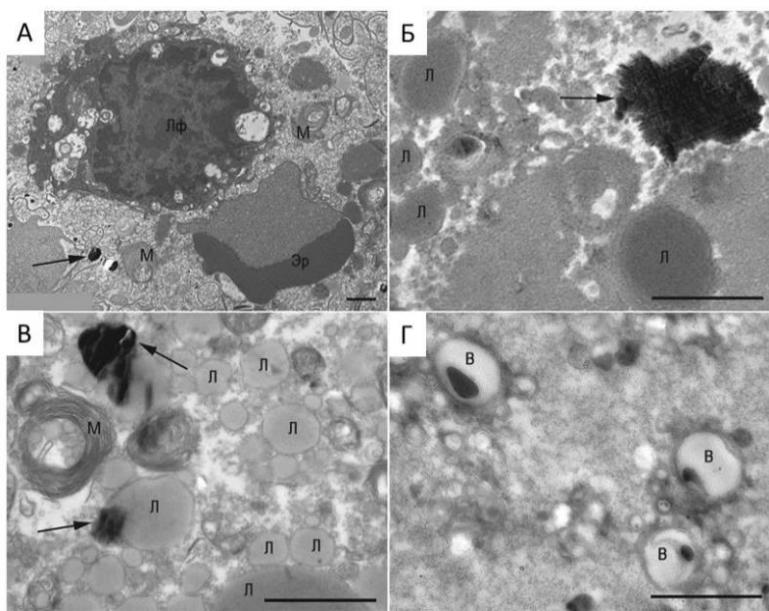


Рис. 5. Динамика гистопатологических изменений в печени хомячков, инфицированных *O. felineus* (OF) и *O. viverrini* (OV), с 1 по 24 недели после заражения. Справа – шкала интенсивности изменений от 1 (минимальных) до 4 (максимальных). \* – при среднем значении по группе больше 1,5; 2,5 и 3,5 ему присваивалась оценка 1\*, 2\* и 3\*, соответственно.

Сочетание более выраженных и ранних очагов воспаления, дисплазии, тонкокишечной метаплазии эпителия желчных протоков, гранулем вокруг яиц паразитов, холангиоэктазов, заполненных темным студнеобразным содержимым, и, наконец, периудактального фиброза с формированием холангиофиброза на фоне хронического *O. felineus*-описторхоза указывают на большую патогенность этого вида трематод. Вероятно, это обусловлено составом ЭСП *O. felineus*, прежде всего, содержимым кишечника гельминтов.

#### Анализ содержимого кишечника трематод семейства Opisthorchiidae (*O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*)

Электронная микроскопия просвета кишечника *O. felineus* выявила деградирующие клетки крови – эритроциты и лимфоциты, липидные капли, мультиембранные структуры, электронно-плотные кристаллы нерегулярной округлой формы со слоистой структурой (Рис. 6А, Б). Содержимое кишечника *C. sinensis* имело сходную морфологию и включало все вышеперечисленные компоненты, но липидных капель было больше (Рис. 6В). Содержимое кишечника *O. viverrini* было однородным, в нем присутствовали электронно-прозрачные вакуоли с плотными гранулами округлой формы и небольшое количество липидных капель, однако клеток крови и электронно-плотных кристаллов выявить не удалось (Рис. 6Г).

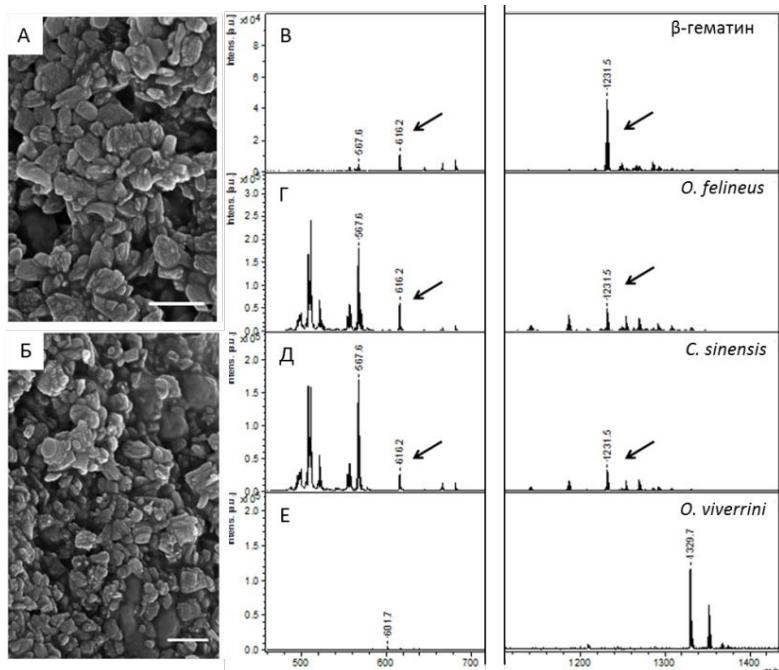


**Рис. 6.** Содержимое кишечника *O. felineus* (А, Б), *C. sinensis* (В) и *O. viverrini* (Г) на ультратонких срезах. Стрелки указывают на электронно-плотные кристаллы в просвете кишечника *O. felineus* и *C. sinensis*. Лф – разрушающийся лимфоцит; Эр – разрушающийся эритроцит; Л – липиды; М – мультиембранные структуры; В – электронно-прозрачные вакуоли с плотными гранулами округлой формы. Шкала 1 мкм.

При определении химического состава электронно-плотных кристаллов в просвете кишечника *O. felineus* и *C. sinensis* методом спектроскопии характеристических потерь энергии электронами в их составе было выявлено железо по Fe-L<sub>2,3</sub> спектру. Пиков железа не было в областях свободных от кристаллов, а также в плотных гранулах в кишечнике *O. viverrini*.

Кристаллы *O. felineus* и *C. sinensis* имели круглую форму, аморфную слоистую структуру и были гетерогенны по размеру от 50 нм до 2 мкм (Рис. 7А, Б). По морфологии и наличию в составе железа они были сходны с кристаллами гемозоина, обнаруженными ранее в кишечнике *Schistosoma mansoni* (Oliveira et al., 2005). Присутствие гема в образцах β-гематина (синтетический аналог гемозоина, полученный *in vitro*), *O. felineus*

и *C. sinensis* было подтверждено с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии (Рис. 7В – Е) по наличию уникального иона [Fe(III) + porphyrin (C<sub>34</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Fe1)]<sup>+</sup> с *m/z* 616.2 Да (Bradshaw et al., 2014).

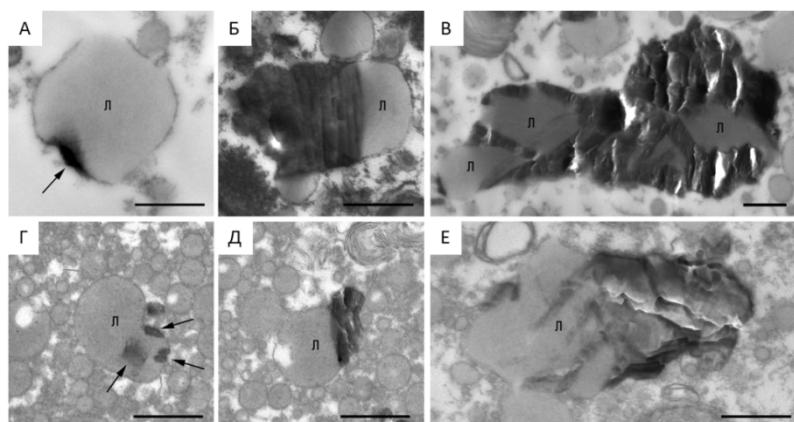


**Рис. 7.** Сканирующая электронная микроскопия кристаллов, выделенных из *O. felineus* (А), *C. sinensis* (Б). Шкала 10 мкм. MALDI-TOF масс-спектры  $\beta$ -гематина (контроль) (В) и выделенных кристаллов из *O. felineus* (Г) и *C. sinensis* (Д), а также спектр осадка, полученного из *O. viverrini* (Е). Стрелками обозначены пики, соответствующие мономеру гема - *m/z* 616.2 и димеру гема - *m/z* 1231.5.

Химические свойства и инфракрасные спектры

кристаллов, выделенных из *O. felineus*, *C. sinensis*, и  $\beta$ -гематина идентичны описанным ранее для гемозоина из *Plasmodium falciparum* и *S. mansoni* (Slater et al., 1991; Chen et al., 2001). Таким образом, полученные нами результаты указывают на то, что *O. felineus* и *C. sinensis* так же, как и многие другие trematodes (*Schistosoma spp*, *Fasciola hepatica* и т.д.) являются паразитами, питающимися кровью хозяина. У *O. viverrini* гемозоин не обнаружен, что предполагает некоторые особенности питания у этого вида гельминтов.

Обнаруженные в просвете кишечника *O. felineus* и *C. sinensis* кристаллы гемозоина часто контактировали с внеклеточными липидными каплями. На рисунке 8 представлена предполагаемая последовательность формирования кристаллов у этих гельминтов. На начальных стадиях видны небольшие электронно-плотные включения (ядра кристаллизации) (Рис. 8А, Г). На поздних стадиях формирования кристаллы окружали одну или несколько липидных капель, формируя мультикристаллические комплексы (Рис. 8В, Е).



**Рис. 8.** Стадии формирования кристаллов гемозоина на липидных каплях в кишечнике *O. felineus* (А, Б, В) и *C. sinensis* (Г, Д, Е). Стрелки указывают на ядра кристаллизации на поверхности липидных капель. Л – липидные капли. Шкала 500 нм.

Таким образом, биокристаллизация гемозоина у *O. felineus* и *C. sinensis* происходит путем ассоциации молекул гема с липидными каплями на разделе водной и липидной фаз, аналогично процессу, описанному для *S. mansoni* (Correa Soares et al., 2007).

Трематоды семейства Opisthorchiidae обладают внеклеточным пищеварением и периодически опорожняют содержимое кишечника в просвет желчных протоков. Гемозоин, попадающий в организм хозяина, не является для него инертным и аккумулируется в клетках на длительное время (Boura et al., 2013). Возможно, именно образование и накопление гемозоина, его контакт с клетками иммунной системы хозяина вносят вклад в наблюдаемые различия по интенсивности воспаления, фиброза, гиперплазии эпителия желчных протоков и более раннее их появление при описторхозе, вызванном *O. felineus*, по сравнению с *O. viverrini*.

Показана эффективность многих антималярийных препаратов (производные хинолина и артемизинина) в отношении трематод-гематофагов. Одним из механизмов антигельминтного действия этих веществ является ингибирование образования гемозоина, и, как следствие, реализация токсического действия гема на гельминтов (Keiser, Utzinger, 2007; Coronado et al., 2014). Можно предположить наличие активности этих препаратов и в отношении *O. felineus*.

### Эксокреторно-секреторный продукт *O. felineus*

Так как патогенез описторхоза связан с действием метаболитов гельминта на ткани хозяина, нами был определен белковый состав ЭСП *O. felineus*. Для этого проведено культивирование половозрелых марит *in vitro* в течение 24 часов аналогично протоколу исследований для *O. viverrini* (Mulvenna et al., 2010). Пептиды, полученные после трипсинолиза ЭСП в растворе, анализировали с помощью масс-спектрометрии ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье – метода для анализа малых количеств белка в смеси. Было получено 6308 масс-спектров пептидов. При использовании последовательностей ESTs *O. felineus* (Pomaznaya et al., 2013) и базы данных NCBI в составе ЭСП *O. felineus* было идентифицировано 45 белков, которые можно разделить на группы в соответствии с их биологической функцией (Таблица 1).

**Таблица 1.** Результаты определения белкового состава 24-часовой фракции ЭСП *O. felineus*.

№	Аннотация белка	NCBI ID	ВГ	С	КП	%П	ДБ	МБ	СБ
Цитоскелетные белки									
1	Tubulin beta	GAA38205	<i>Cs</i>	172	10	14	483	54203	NC
2	Tubulin beta-3	CAP72051	<i>Fh</i>	74	8	16,9	444	49819	NC
3	Paramyosin	JK624626	<i>Of</i>	65	16	12,1	864	99446	-
4	Actin-2	JK626665	<i>Of</i>	51	5	3,3	376	41731	
Антиоксидантные белки									
5	26 kDa GST	JK625686	<i>Of</i>	1678	109	79,7	218	25038	NC
6	28 kDa GST	JK625148	<i>Of</i>	950	73	49,2	212	24676	-
7	GST (PgH <sub>2</sub> D-isomerase)	JK626354	<i>Of</i>	611	89	46,6	213	24552	-

8	Thioredoxin peroxidase	JK625690	<i>Of</i>	167	45	24,6	212	23583	SP
9	GST omega-1	GAA34234	<i>Cs</i>	99	14	21,8	281	31498	-
10	Thioredoxin-1	GAA55399	<i>Cs</i>	77	2	17	104	11337	NC
11	Cu/Zn SOD	GAA54059	<i>Cs</i>	53	12	21,7	152	15540	NC

Метаболические ферменты

12	Retinal dehydrogenase 1	GAA49763	<i>Cs</i>	589	13	36	488	52636	NC
13	Fructose-bisphosphate aldolase class I	JK006516	<i>Of</i>	234	18	20,5	362	39515	-
14	Fructose-1,6-bisphosphatase	JK624616	<i>Of</i>	206	13	16,6	346	37706	NC
15	Enolase	GAA51601	<i>Cs</i>	180	9	34,4	431	46195	NC
16	Lactate dehydrogenase	AAV80238	<i>Cs</i>	78	4	29,4	328	35633	NC
17	Urocanate hydratase	GAA31650	<i>Cs</i>	70	22	15,3	663	73363	NC
18	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	JK624457	<i>Of</i>	62	13	43,2	618	68911	-
19	Glucose-6-phosphate isomerase	GAA28387	<i>Cs</i>	61	2	3,2	581	64840	NC
20	Protein-tyrosine phosphatase	GAA48198	<i>Cs</i>	58	17	16,3	887	97480	-
21	Triosephosphate isomerase	GAA50993	<i>Cs</i>	55	3	7,7	229	25269	NC
22	Glutamate dehydrogenase [NAD(P)+]	GAA53751	<i>Cs</i>	50	4	2,5	551	61113	-
23	Elongation of very long chain fatty acids protein 7	GAA51690	<i>Cs</i>	50	13	7,1	273	32286	-

Протеолитические ферменты

24	Cathepsin F precursor	JK625804	<i>Of</i>	362	23	19,2	326	40228	SP
25	Leucine aminopeptidase 2	ACR27085	<i>Cs</i>	167	10	24,2	519	56124	-
26	Cysteine protease	JK626481	<i>Of</i>	54	2	7,6	328	36817	SP
27	Cathepsin B1	ABM47070	<i>Cs</i>	52	5	11,7	339	37899	SP

Ингибиторы протеаз

28	Putative cys1 protein (cystatin)	GAA51719	<i>Cs</i>	214	12	3,1	1611	185461	-
29	Leukocyte elastase inhibitor (serpin)	GAA48350	<i>Cs</i>	84	6	36,1	405	46049	NC

Транспортные (связывающие) белки

30	Myoglobin	JK624892	<i>Of</i>	3444	247	47,5	150	16938	-
31	Ferritin heavy chain	GAA37250	<i>Cs</i>	708	55	57,5	173	20124	NC

32	Fatty acid-binding protein	JK624428	<i>Cs</i>	74	4	13,7	133	15220	NC
Белки теплового шока									
33	Heat shock cognate 71 kDa protein	GAA52732	<i>Cs</i>	70	7	3,8	347	38181	-
Другие белки									
34	Cyclophilin A	JK626045	<i>Of</i>	439	20	38,8	162	17554	-
35	RutC family protein PH0854	GAA48115	<i>Cs</i>	481	12	9,7	355	39932	-
36	Perlecan	GAA54374	<i>Cs</i>	283	53	19,3	981	109041	-
37	Collagen alpha-1(IV) chain	GAA31679	<i>Cs</i>	107	52	10,7	1720	170414	-
38	Protein FAM115C	GAA55952	<i>Cs</i>	89	10	20,6	568	64153	
39	GPI-anchored surface glycoprotein	GAA49598	<i>Cs</i>	51	22	8,4	1591	177595	SP
40	Periostin	GAA53413	<i>Cs</i>	51	14	3,1	1052	117785	-
Белки с неизвестной функцией									
41	Hypothetical protein	JK624591	<i>Of</i>	476	13	35,4	135	14782	NC
42	Unknown/(helminth defence molecule-1)	AAM55183	<i>Cs</i>	114	34	41,2	90	10391	SP
43	Hypothetical protein Smp_210440	CCD75568	<i>Sm</i>	66	5	30	513	99386	NC
44	SJCHGC09098 protein	AAX25827	<i>Sj</i>	65	10	5,6	650	75573	NC
45	Hypothetical protein CLF_101969	JK625189	<i>Of</i>	51	9	17,4	84	10813	SP

NCBI ID – идентификационный номер в базе данных NCBI. ВГ – вид гельминта *Of* – *Opisthorchis felineus*; *Cs* – *Clonorchis sinensis*; *Sm* – *Schistosoma mansoni*; *Sj* – *Schistosoma japonicum*; *Fh* – *Fasciola hepatica*. С – скор программы Mascot (Matrix Science, Великобритания). КП – количество пептидов, которые были определены в белке. %П – процент покрытия аминокислотной последовательности. ДБ – длина белка, количество аминокислот. МБ – масса белка в Да. СБ – предсказание способности секретироваться. Наличие сигнального пептида в белке обозначено SP, неклассического сигнального пептида – NC (программы SignalP 4.1, SecretomeP 2.0, Германия), отсутствие сигнального пептида – «-».

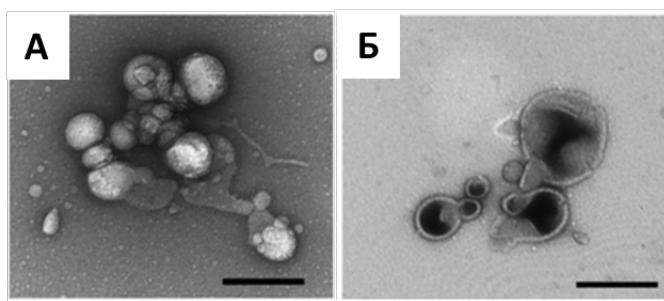
Считается, что GST, SOD, тиоредоксин пероксидаза и тиоредоксин, широко представленные в ЭСП паразитов-гематофагов, защищают их от АФК, продуцируемых не только клетками иммунной системы хозяина, но и образующихся в процессе переваривания гемоглобина (Oliveira, Oliveira, 2002; Donnelly et al., 2008). Вероятно, такой широкий спектр антиоксидантных ферментов и особенно GST в ЭСП *O. felineus* связан со спецификой его питания.

В ЭСП *O. felineus* найдены протеолитические ферменты: катепсины F и B1, цистеиновая протеаза, лейцинаминопептидаза. Важно, что спектр протеаз в ЭСП у разных представителей семейства Opisthorchiidae заметно различается (Ju et al., 2009;

Mulvenna et al., 2010; Zheng et al., 2011). Так у *O. viverrini* в 24-часовой фракции ЭСП был определен только катепсин D (Mulvenna et al., 2010), и лишь спустя 7 суток культивирования паразитов *in vitro* удалось идентифицировать катепсин F и легумайн. Это указывает на то, что протеазы не являются основным компонентом ЭСП *O. viverrini*, в отличие от других трематод (Mulvenna et al., 2010). Помимо обеспечения паразитов питательными веществами и процессинга их белков, протеазы выполняют дополнительные функции, в том числе, связанные с взаимоотношениями в системе «паразит – хозяин». Например, участвуют в избегании атак иммунной системы хозяина (расщепление иммуноглобулинов), деградации компонентов внеклеточного матрикса, что определяет развитие патологии при гельминтозах (Dzik, 2006). Учитывая это, можно предположить, что более сложный состав протеаз в ЭСП *O. felineus*, по сравнению с таковым у *O. viverrini*, может быть причиной более выраженной патогенности этого вида трематод.

Кроме того, по данным масс-спектрометрического анализа пептидов, полученных в результате протеолиза разделенных с помощью одномерного гель-электрофореза белков ЭСП *O. felineus*, GST и катепсин F являются мажорными белками. Это говорит об их важной роли для выживания *O. felineus* в печени хозяина.

В составе ЭСП *O. felineus* было обнаружено большое количество не секретируемых белков – 20 (или 44%), не имеющих сигнальных пептидов, например, изоформы GST, цитоскелетные белки и другие. Для многих трематод показана секреция таких белков с помощью экзосомоподобных везикул, а клетки хозяина активно их захватывают (Marcilla et al., 2012; Chaiyadet et al., 2015a). Тегумент мариты *O. felineus* обладает высокой секреторной активностью и в его толще находится большое количество везикул (Куперман и др., 1991). Из ЭСП *O. felineus* были выделены микровезикулы диаметром 80 – 200 нм, окруженные двойной мембраной (Рис. 9).



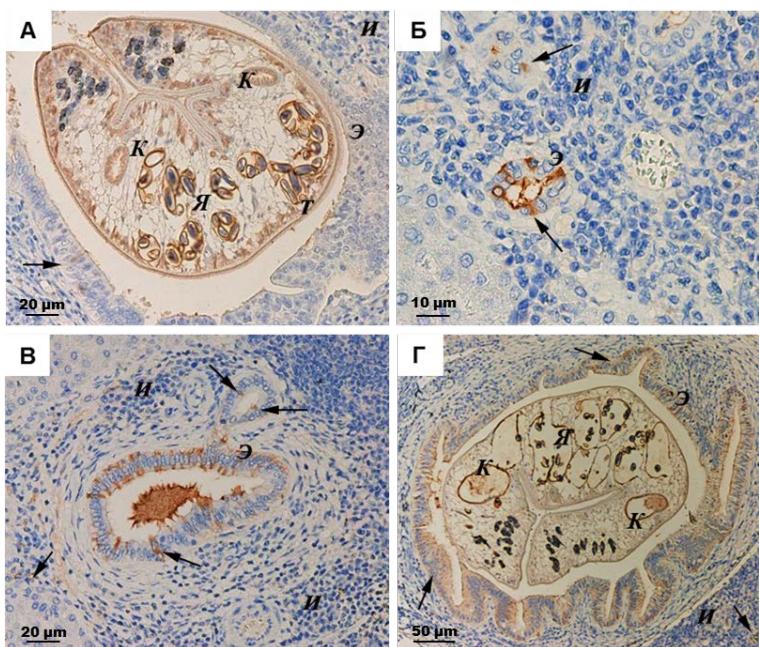
**Рис. 9.** Негативное контрастирование микровезикул, выделенных из ЭСП *O. felineus* (А, Б). Шкала 200 нм.

По морфологии они схожи с экзосомоподобными везикулами других гельминтов (Marcilla et al., 2012; Chaiyadet et al., 2015a). Состав и возможная роль этих везикул во взаимоотношениях марит *O. felineus* с окончательным хозяином нуждается в дальнейшем исследовании.

В ЭСП *O. felineus* было определено 8 белков, принадлежащих хозяину. Субъединицы гемоглобина, альбумин, гаптоглобин, серотрансферрин, аполипопротеин A-1 хомячка в составе ЭСП *O. felineus* подтверждают то, что этот гельминт является гематофагом, а компонент системы комплемента C3 и C регион цепи IgM указывают на функциональную связь паразита с иммунной системой хозяина.

Для определения *in situ* локализации экскреторно-секреторных антигенов *O. felineus* были получены поликлональные кроличьи антитела к ЭСП гельминта и проведено

имmunогистохимическое окрашивание срезов печени хомячков, инфицированных *O. felineus*, через 2, 3 и 4 недели после заражения (Рис. 10). Через 2 недели специфическое окрашивание наблюдалось не только в тканях гельминтов (тегумент, кишечник, матка с яйцами и семенники), но и в содержимом желчных протоков хомячков, а также на апикальной поверхности единичных холанггиоцитов, в местах контакта с паразитом (Рис. 10А). На дальнейших сроках инвазии интенсивность и площадь окраски, как и площадь клеточной инфильтрации, увеличивались (Рис. 10Б - Г).

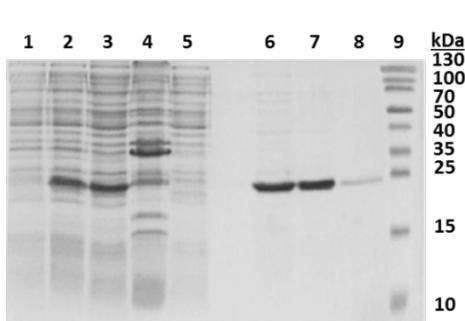


**Рис. 10.** Локализация экскреторно-секреторного антигена в печени хомячков, инфицированных *O. felineus* через 2 недели – (А), 3 недели – (Б, В) и 4 недели – (Г) после инфицирования. Стрелки указывают на клетки, окрашенные антителами к ЭСП *O. felineus*. Т – тегумент. Иммунопероксидазное окрашивание. Увеличение А, В – x200, Б – x400, Г – x100.

Примечем, ЭСП и признаки воспаления определялись не только в местах непосредственного контакта паразита с эпителием желчных протоков, но и в мелких протоках, где никогда не было гельминтов. Однако механизмы, с помощью которых вещества, продуцируемые *O. felineus*, попадают в отдаленные от паразитов клетки эпителия пока не известны.

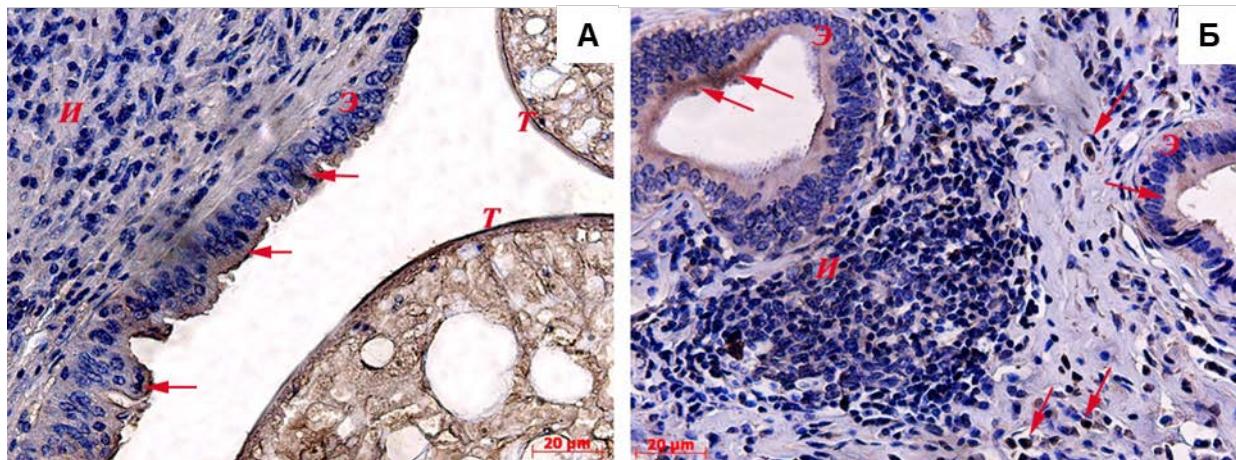
#### Рекомбинантный белок тиоредоксин пероксидазы *O. felineus*

Тиоредоксин пероксидаза (TPx) – основной фермент ЭСП, катализирующий расщепление перекиси водорода у trematod в отсутствии каталазы (Dzik, 2006). Нами с помощью вектора pQE-31 (Qiagen, Германия) и штамма *Escherichia coli* – XLBlue MRF был получен растворимый рекомбинантный белок тиоредоксин пероксидазы *O. felineus* в прокариотической системе экспрессии, очистку которого проводили с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA колонке (Qiagen, Германия). (Рис. 11).



**Рис. 11.** Анализ экспрессии, растворимости и очистки рекомбинантного белка тиоредоксин пероксидазы *O. felineus* с помощью 10% полиакриламидного гель-электрофореза. 1 – осадок лизата *E. coli* до индукции ИПТГ, 2 – осадок лизата *E. coli* после индукции ИПТГ, 3 – супернатант лизата *E. coli* после индукции ИПТГ, 4 – осадок лизата *E. coli* после индукции ИПТГ, 5 – промывка, 6 – 8 очищенный рекомбинантный белок TPx *O. felineus*, 9 – маркер молекулярной массы.

Для определения роли TPx *O. felineus* в патогенезе описторхоза и возможного его распределения в тканях хозяина были получены поликлональные кроличьи антитела к рекомбинантному белку TPx и проведено иммунопероксидазное окрашивание, которое показало наличие TPx не только в теле гельминта, но и в эпителии желчных протоков инфицированных животных. Причем на ранних сроках инфекции белок присутствовал в апикальной части холагиоцитов, а через 8 недель после инфицирования равномерно распределялся по холангиоцитам, в том числе мелких желчных протоков, и присутствовал в клетках перидуктальных инфильтратов (Рис. 12).



**Рис. 12.** Локализация тиоредоксин пероксидазы *O. felineus* в тканях печени хомячков через 2 недели (А) и 8 недель (Б) после инфицирования *O. felineus*. Стрелки указывают на клетки, окрашенные антителами к TPx *O. felineus*. *T* – тегумент *O. felineus*. Иммунопероксидазное окрашивание.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе впервые проведено сравнительное гистопатологическое исследование печени хомячков, инфицированных двумя эпидемиологически значимыми видами – *O. felineus* и *O. viverrini*. Выявлены видо-специфические различия по интенсивности и срокам возникновения патологических проявлений при развитии экспериментального описторхоза.

Впервые доказано, что *O. felineus*, а также близкородственный вид *C. sinensis* являются паразитами-гематофагами. В кишечнике *O. viverrini* клетки крови и гемозоин не обнаружены. Блокирование процесса формирования гемозоина может быть ключевым звеном при разработке эффективных антигельминтных средств в отношении trematod-гематофагов, как это было показано для противомалярийных препаратов.

Впервые определен белковый состав ЭСП *O. felineus* и идентифицировано 45 белков. В их число входит весь спектр ферментов необходимых для обезвреживания АФК, определено 4 изоформы GST, что больше, чем в секретомах других описторхид. Мажорными в ЭСП *O. felineus* являются GST и катепсин F. Кроме того, ЭСП *O. felineus* содержит катепсин В, цистеиновую протеазу, аминопептидазу. В отличие от *O. felineus*, у близкородственного вида *O. viverrini* протеазы не являются основным компонентом его ЭСП. Помимо белков паразита, в ЭСП *O. felineus* обнаружены белки крови хозяина. Впервые продемонстрировано присутствие экскреторно-секреторного антигена

*O. felineus* и его компонента TPx не только в тканях гельминта, но и в эпителии желчных протоков хозяина, в том числе мелких, свободных от паразитов. Это, а также выраженная инфильтрация клетками воспаления, подтверждают роль белков ЭСП и, в частности TPx, в патогенезе изменений печени при *O. felineus*-описторхозе.

Таким образом, установленные нами более выраженные патоморфологические изменения печени при инфицировании *O. felineus*, в отличие от *O. viverrini*, а также особенности биологии и состава ЭСП *O. felineus* расширяют представления о взаимоотношениях в системе «паразит – хозяин» и формировании связанных с описторхозом видо-специфических осложнений. Полученные результаты, безусловно, внесут вклад в совершенствование диагностики и лечения *O. felineus*-описторхоза.

## ВЫВОДЫ

1. Представители семейства Opisthorchiidae *O. felineus* и *C. sinensis* являются гематофагами, на что указывает содержимое их кишечника: деградирующие эритроциты и другие клетки крови хозяина, а также гемозоин – продукт обезвреживания гема. Формирование гемозоина происходит на поверхности липидных капель.
2. Экспериментальная инвазия *O. felineus* у сирийских хомячков, по сравнению с *O. viverrini*, характеризуется наличием темно-коричневых депозитов гемозоина в гепатобилиарной системе, что сопровождается более ранними и выраженными гистологическими изменениями печени: гиперплазией и дисплазией дуктального эпителия, воспалением, гранулемами вокруг яиц паразита, холангиоэктазами, периодуктальным и холангифиброзом.
3. В состав экскреторно-секреторного продукта мариты *O. felineus* входят 45 белков, классифицируемых как антиоксидантные, цитоскелетные, транспортные белки, метаболические и протеолитические ферменты, а также ряд белков, неклассифицированных или с неизвестной функцией. Мажорными белками экскреторно-секреторного продукта *O. felineus* являются глутатион-S-трансфераза и катепсин F.
4. Иммуногистохимическое исследование выявило наличие экскреторно-секреторного продукта марит *O. felineus* и в тканях гельминтов, и в эпителии желчных протоков хозяина, в том числе не содержащих паразитов, что свидетельствует об участии экскреторно-секреторного продукта в диффузном поражении билиарной системы.
5. Антитела к синтезированному рекомбинантному белку тиоредоксин пероксидазы *O. felineus* взаимодействуют и с тканями гельминтов, и с эпителием желчных протоков хозяина, что аналогично реакции с антителами к суммарному экскреторно-секреторному продукту и доказывает роль тиоредоксин пероксидазы в патоморфогенезе описторхоза, вызванного *O. felineus*.

## СПИСОК СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Lvova M.N., Tangkawattana S., Balthaisong S., Katokhin A.V., Mordvinov V.A., Sripa B. Comparative histopathology of *Opisthorchis felineus* and *Opisthorchis viverrini* in a

hamster model: an implication of high pathogenicity of the European liver fluke. // Parasitol. Int. 2012. V. 61. № 1. P. 167–172. doi: 0.1016/j.parint.2011.08.005.

2. **Львова М.Н.**, Дужак Т.Г., Центалович Ю.П., Катохин А.В., Мордвинов В.А. Секретом мариты печеночного сосальщика *Opisthorchis felineus*. // Паразитология. 2014. Т. 48. № 3. С. 169–184.

3. **Lvova M.**, Zhukova M., Kiseleva E., Mayboroda O., Hensbergen P., Kizilova E., Ogienko A., Besprozvannykh V., Sripa B., Katokhin A., Mordvinov V. Hemozoin is a product of heme detoxification in the gut of the most medically important species of the family Opisthorchiidae. // Int. J. Parasitol. 2016. V. 46. № 3. P. 147–156. doi: 10.1016/j.ijpara.2015.12.003.

4. Petrenko V.A., Pakharukova M.Y., Kovner A.V., **L'vova M.N.**, Lyakhovich V.V., Mordvinov V.A. Secretion of Thioredoxin Peroxidase Protein of Cat Liver Fluke *Opisthorchis felineus* during Modeling of Experimental Opisthorchiasis. // Bull. Exp. Biol. Med. 2017. V. 162. № 6. P. 773–776. doi: 10.1007/s10517-017-3710-5.

### СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

ИПТГ – изопропил- $\beta$ -D-тиогалактозид

ЭСП – экскреторно-секреторный продукт

EST – частичная последовательность кДНК

FhHDM-1 – белок *F. hepatica*, относящийся к классу защищающих гельминта молекул (HDM – Helminth Defense Molecule)

GST – глутатион-S-трансфераза

MALDI – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

m/z – отношение массы к заряду, где m – относительная молекулярная масса иона, а z – число элементарных зарядов

NAD(P)+ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

Of-HDM – белок *O. felineus*, относящийся к классу защищающих гельминта молекул

SOD – супероксиддисмутаза

TPx – тиоредоксин пероксидаза