

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 холангиокарциномы (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 – холангиокарцинома (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; Suttiaprapa et al., 2018). Компонентами ЭСП являются белки и другие секретируемые 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; Suttiaprapa 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; Suttiaprapa 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 мари *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 биоинформатического анализа определен белковый состав экскреторно-секреторного продукта *O. felineus*. В отличие от *O. viverrini*, в состав секрета *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. Sriра 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/ЕЕС) 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 (Bhamarapavati 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 биоинформатический 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. felinus* и *O. viverrini*

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

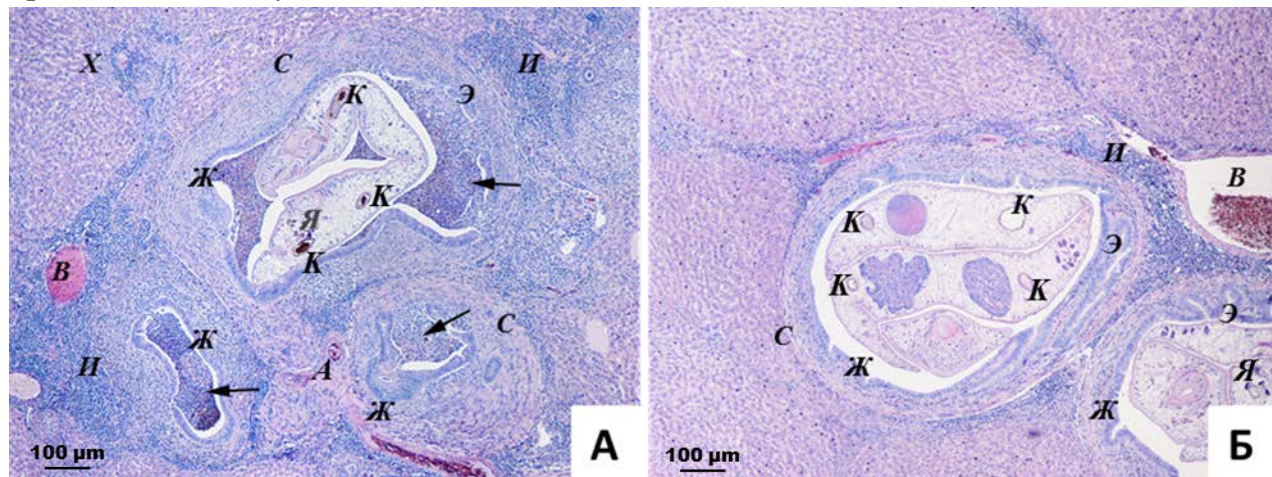


Рис. 1. Фрагменты печени хомячков, инфицированных *O. felinus* (А) и *O. viverrini* (Б), через 4 недели после заражения. Стрелки указывают на формирующиеся в просвете желчных протоков гранулемы. Здесь и на рисунках 3, 4, 10, 12: А – артерия; В – вена; Ж – желчный проток; И – перидуктальная клеточная 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 гранул вокруг умерших гельминтов и яиц в желчных протоках, что сужало их просвет. В кишечнике *O. felinus* 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, не смотря 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 трематод. Кроме того, отмечено более позднее (по сравнению с *O. felinus*) 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 перидуктальные клеточные инфильтраты были отодвинуты разросшейся соединительной тканью на периферию. Пролиферация соединительной ткани в паренхиме печени способствовала формированию ложных долек. Отмечено образование большого числа холангиол.

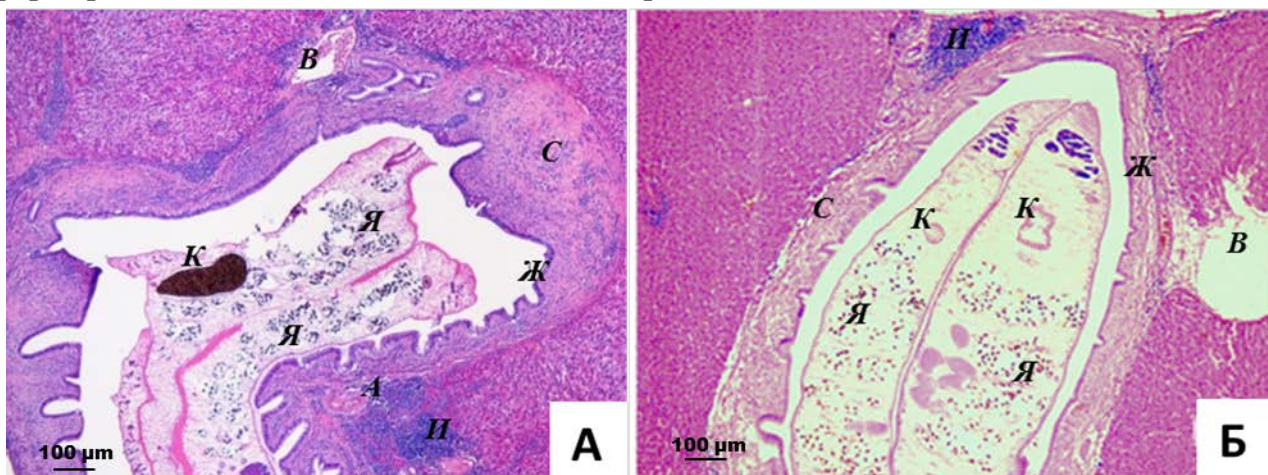


Рис. 2. Фрагменты печени хомячков, инфицированных *O. felinus* (А) и *O. viverrini* (Б), через 24 недели после заражения. Гематоксилин-эозин. Увеличение А, Б х40.

У животных, инфицированных *O. felinus*, перидуктальный 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. felinus*, 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**).

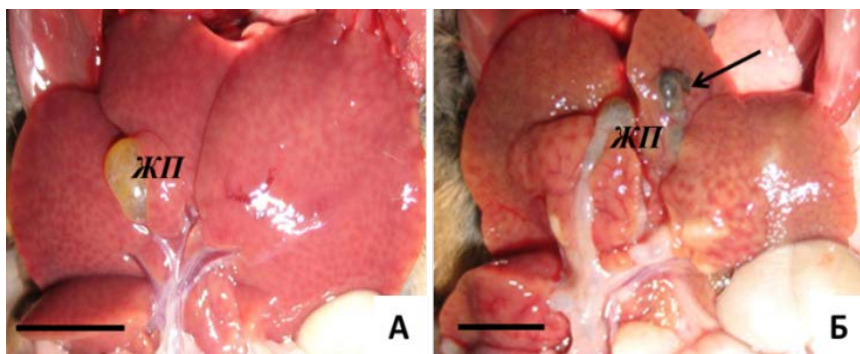


Рис. 3. Висцеральная поверхность печени у интактных животных (А) и у хомячков через 8 недель после заражения *O. felinus* (Б). Стрелка указывает на холангиоэктаз с темным содержимым. ЖП – желчный пузырь. Шкала 1 см.

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).

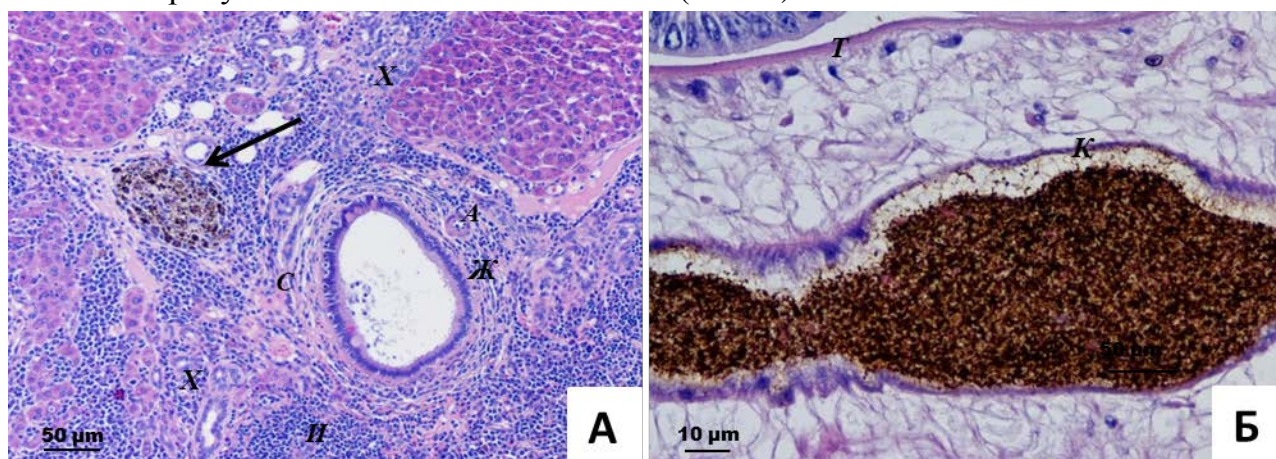


Рис. 4. Фрагмент печени хомячка через 8 недель после инфицирования *O. felineus* (А) и просвет кишечника мариты *O. felineus* с темно-коричневым содержимым (Б). Стрелкой обозначена гранулема с клетками, содержащими темно-коричневые гранулы, сходные с темными гранулами в кишечнике гельминта. Т – тегумент гельминта. Гематоксилин-эозин. Увеличение А х100, Б х400.

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

Сравнительный полуколичественный 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).

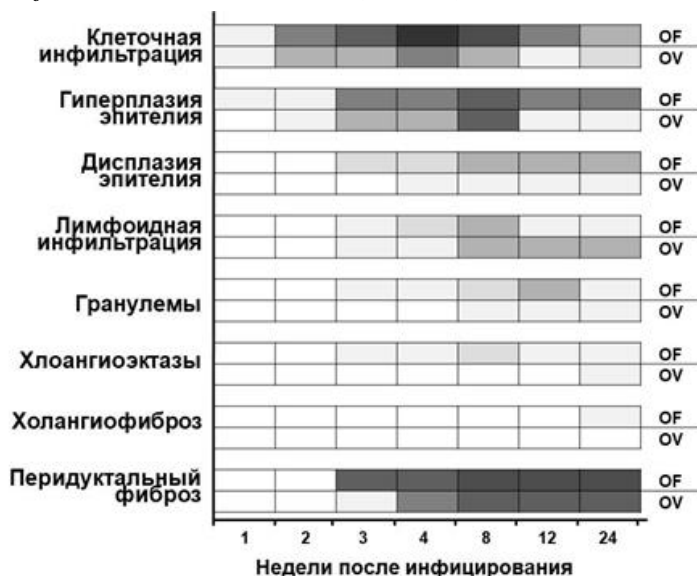


Рис. 5. Динамика гистопатологических изменений в печени хомячков, инфицированных *O. felineus* (OF) и *O. viverrini* (OV), с 1 по 24 недели после заражения. Справа – шкала интенсивности изменений от 1 (минимальных) до 4 (максимальных). * – при среднем значении по группе больше 1,5; 2,5 и 3,5 ему присваивалась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

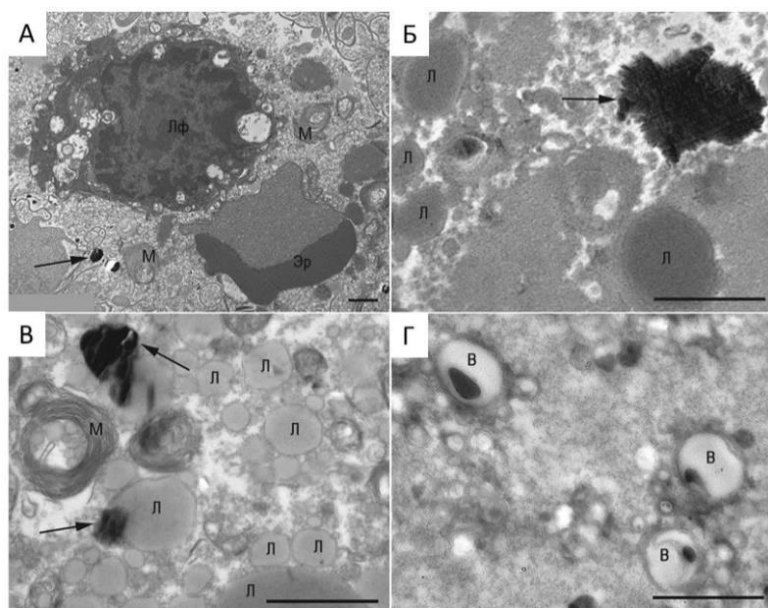


Рис. 6. Содержимое кишечника *O. felineus* (А, Б), *C. sinensis* (В) и *O. viverrini* (Г) на ультратонких срезах. Стрелки указывают на электронно-плотные кристаллы в просвете кишечника *O. felineus* и *C. sinensis*. Лф – разрушающийся лимфоцит; Эр – разрушающийся эритроцит; Л – липиды; М – мультимембранные 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_{2,3} 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 округлую 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 гемозина, обнаруженными ранее в кишечнике *Schistosoma mansoni* (Oliveira et al., 2005). Присутствие гема в образцах β-гематина (синтетический аналог гемозина, 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 (C₃₄H₃₂N₄O₄Fe)]⁺ с m/z 616.2 Да (Bradshaw et al., 2014).

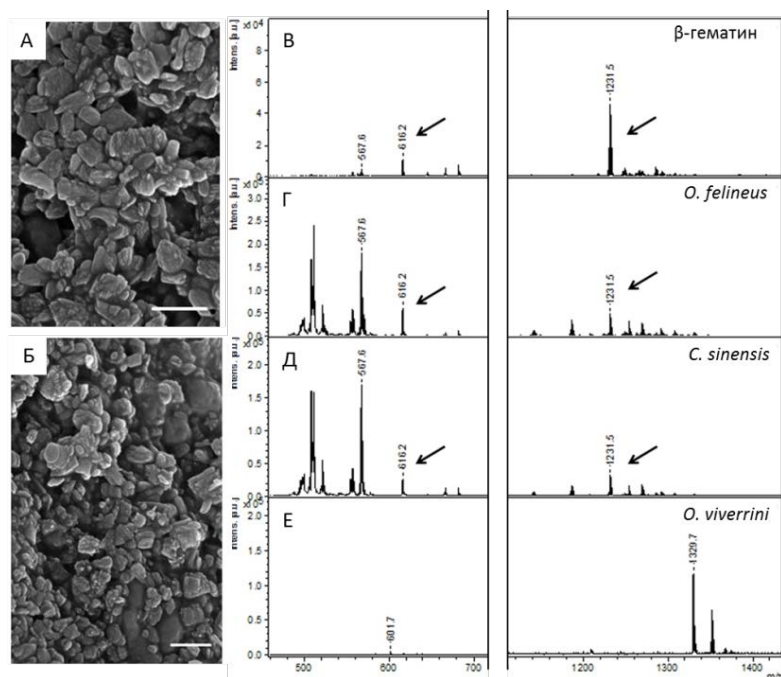


Рис. 7. Сканирующая электронная микроскопия кристаллов, выделенных из *O. felineus* (А), *C. sinensis* (Б). Шкала 10 мкм. MALDI-TOF масс-спектры β-гематина (контроль) (В) и выделенных кристаллов из *O. felineus* (Г) и *C. sinensis* (Д), а также спектр осадка, полученного из *O. viverrini* (Е). Стрелками 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 β-гематина идентичны описанным ранее для гемозина 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 трематоды (*Schistosoma spp.*, *Fasciola hepatica* и т.д.) являются паразитами, питающимися кровью хозяина. У *O. viverrini* гемозин не обнаружен, что предполагает некоторые особенности питания у этого вида гельминтов.

Обнаруженные в просвете кишечника *O. felineus* и *C. sinensis* кристаллы гемозина 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).

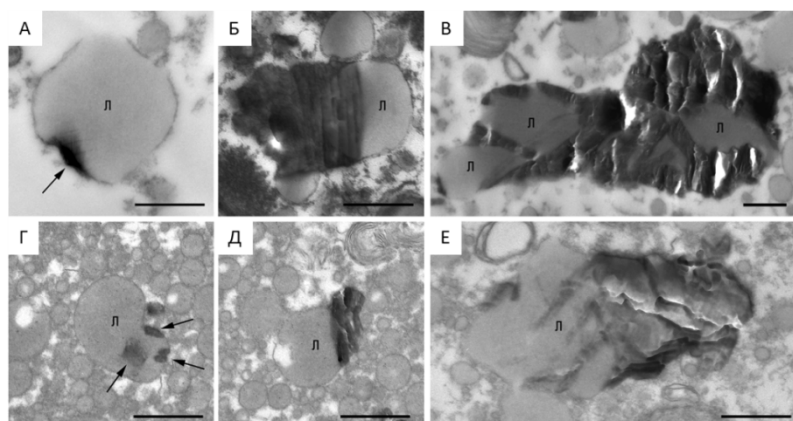


Рис. 8. Стадии формирования кристаллов гемозина на липидных каплях в кишечнике *O. felineus* (А, Б, В) и *C. sinensis* (Г, Д, Е). Стрелки указывают на ядра кристаллизации на поверхности липидных капель. Л – липидные капли. Шкала 500 нм.

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 (Bouga 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*.

Экскреторно-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* (Pomaznou 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	Cs	172	10	14	483	54203	NC
2	Tubulin beta-3	CAP72051	Fh	74	8	16,9	444	49819	NC
3	Paramyosin	JK624626	Of	65	16	12,1	864	99446	-
4	Actin-2	JK626665	Of	51	5	3,3	376	41731	
Антиоксидантные белки									
5	26 kDa GST	JK625686	Of	1678	109	79,7	218	25038	NC
6	28 kDa GST	JK625148	Of	950	73	49,2	212	24676	-
7	GST (PgH ₂ D-isomerase)	JK626354	Of	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 легумаин. 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).

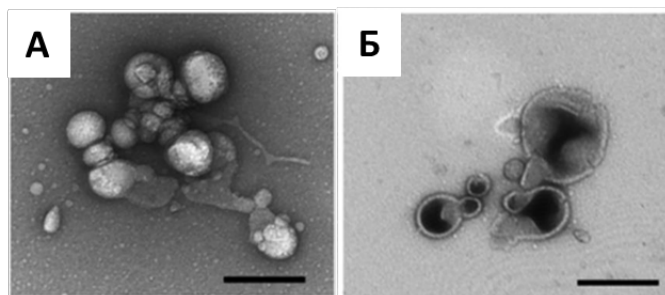


Рис. 9. Негативное контрастирование микровезикул, выделенных из ЭСП *O. felineus* (А, Б). Шкала 200 нм.

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 А-1 хомячка в составе ЭСП *O. felineus* подтверждают то, что этот гельминт является гематофагом, а компонент системы комплемента С3 и С 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

иммуногистохимическое 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 холангиоцитов, в местах контакта с паразитом (Рис. 10А). На дальнейших сроках инвазии интенсивность и площадь окраски, как и площадь клеточной инфильтрации, увеличивались (Рис. 10Б - Г).

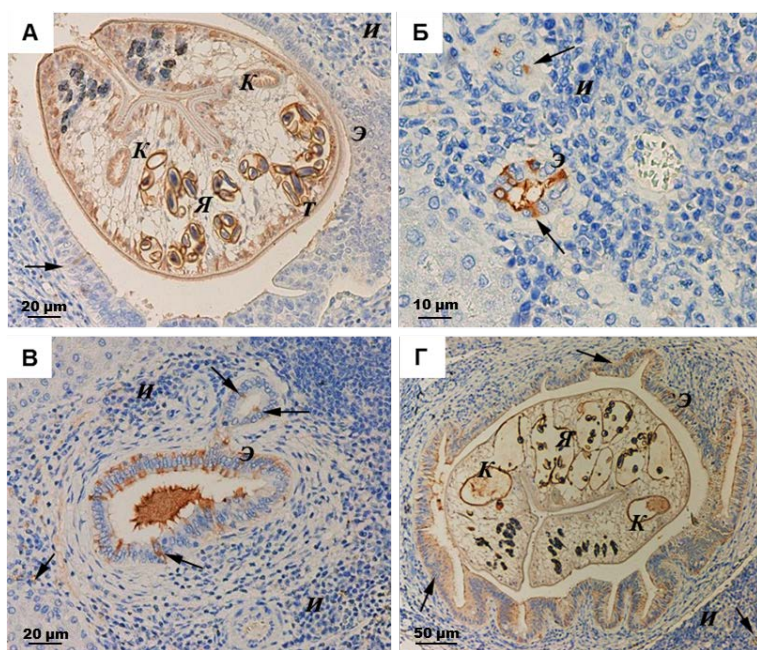


Рис. 10. Локализация экскреторно-секреторного антигена в печени хомячков, инфицированных *O. felineus* через 2 недели – (А), 3 недели – (Б, В) и 4 недели – (Г) после инфицирования. Стрелки указывают на клетки, окрашенные антителами к ЭСП *O. felineus*. Т – тегумент. Иммунопероксидазное окрашивание. Увеличение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

Причем, 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 (TRx) – основной фермент ЭСП, катализирующий расщепление перекиси водорода у трематод в отсутствие 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).

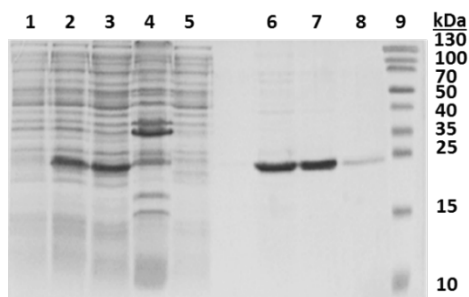


Рис. 11. Анализ экспрессии, растворимости и очистки рекомбинантного белка тиоредоксин пероксидазы *O. felineus* с помощью 10% полиакриламидного геле-электрофореза. 1 – осадок лизата *E. coli* до индукции ИПТГ, 2 – осадок лизата *E. coli* после индукции ИПТГ, 3 – супернатант лизата *E. coli* после индукции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

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

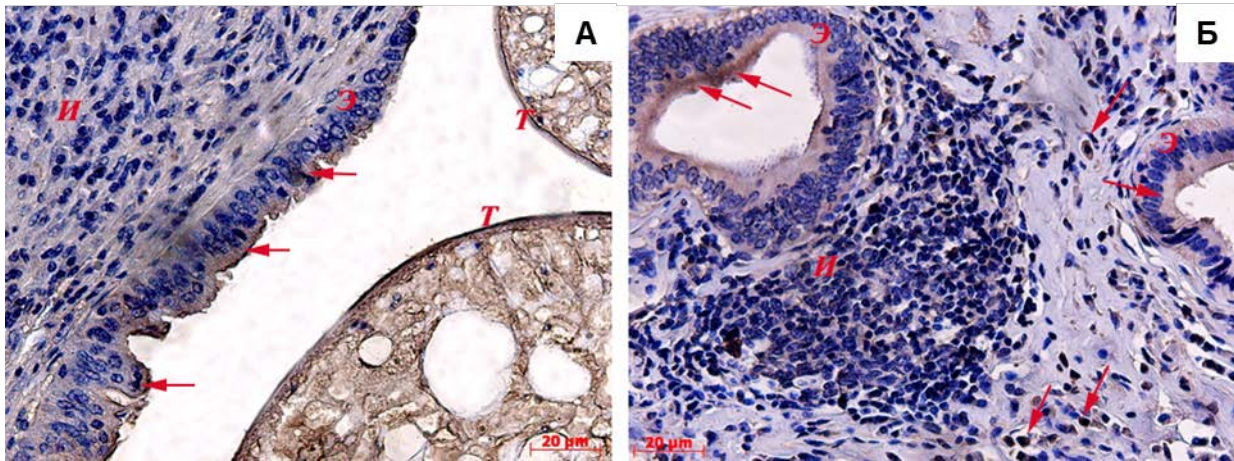


Рис. 12. Локализация тиоредоксин пероксидазы *O. felineus* в тканях печени хомячков через 2 недели (А) и 8 недель (Б) после инфицирования *O. felineus*. Стрелки указывают на клетки, окрашенные антителами к ТРх *O. felineus*. Т – тегумент *O. felineus*. Иммунопероксидазное окрашивание.

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 трематод-гематофагов, как это было показано для противомаларийных 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 секретах 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 ТРх 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 ТРх, 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, перидуктальным и холангиофиброзом.
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. **L'vova 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-β-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