

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И
ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

ЛЬВОВА МАРИЯ НИКОЛАЕВНА

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

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Мордвинов Вячеслав Алексеевич

Новосибирск 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Общая характеристика семейства Opisthorchiidae (<i>O. felineus</i>, <i>O. viverrini</i>, <i>C. sinensis</i>).....	11
1.1.1. Систематическое положение	11
1.1.2. Географическое распространение исследуемых видов и эпидемиология описторхоза	12
1.1.3. Жизненный цикл описторхид.....	13
1.1.4. Морфология описторхид на стадии половозрелой мариты.....	16
1.1.5. Питание описторхид.....	20
1.2. Гематофагия у паразитов.....	21
1.2.1. Детоксикация гема.....	23
1.2.2. Гемозоин и его формирование	24
1.2.3. Получение β -гематина <i>in vitro</i>	28
1.2.4. Биологическая роль гемозоина.....	29
1.2.5. Гемозоин – мишень для диагностики и лечения паразитозов.....	31
1.3. Культивирование описторхид	32
1.4. Патогенез описторхоза.....	34
1.5 Патоморфологические изменения печени при описторхозе	35
1.6. Экскреторно-секреторный продукт трематод	38
1.6.1 Секреты трематод, в том числе описторхид.....	40
Заключение	47
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	49
2.1. Материалы и реактивы.....	49
2.2. Животные.....	49
2.2.1. Получение метацеркарий	49
2.2.2 Инфицирование лабораторных животных	50

2.3. Сравнительное гистологическое исследование печени	50
2.4. Окраска парафиновых срезов печени иммуногистохимическим методом	51
2.5. Выделение мариит <i>O. felineus</i>, <i>O. viverrini</i> и <i>C. sinensis</i>	52
2.6. Получение экскреторно-секреторного продукта <i>O. felineus</i> и выделение белков	52
2.6.1. Электрофорез белков в полиакриламидном геле	53
2.6.2. Получение поликлональных кроличьих антител.....	54
2.6.2.1. Иммуноферментный анализ.....	54
2.6.3. Протеолиз отдельных белков экскреторно-секреторного продукта <i>O. felineus</i> в полиакриламидном геле.....	55
2.6.4. Протеолиз белков экскреторно-секреторного продукта <i>O. felineus</i> в растворе.....	56
2.6.5. Масс-спектрометрический анализ белкового состава экскреторно-секреторного продукта <i>O. felineus</i>	56
2.6.6. Биоинформатический анализ и базы данных.....	57
2.6.7. Выделение экзосомоподобных везикул.....	58
2.7. Получение рекомбинантного белка тиоредоксин пероксидазы <i>O. felineus</i>.....	59
2.7.1. Схема клонирования.....	59
2.7.2. Выделение РНК <i>O. felineus</i> , синтез кДНК	59
2.7.3. Получение фрагмента ДНК, соответствующего тиоредоксин пероксидазе <i>O. felineus</i> без сигнальной последовательности	60
2.7.4. Электрофорез ДНК в агарозном геле.....	60
2.7.5. Получение плазмидной конструкции, экспрессирующей рекомбинантный белок тиоредоксин пероксидазу <i>O. felineus</i>	61
2.7.6. Приготовление электрокомпетентных клеток и их трансформация	61
2.7.7. Скрининг колоний на предмет наличия вставки	62
2.7.8. Выделение плазмидной ДНК и секвенирование вставки	62
2.7.9. Получение и очистка рекомбинантного белка тиоредоксин преоксидазы <i>O. felineus</i>	63
2.8. Анализ содержимого кишечника <i>O. felineus</i>, <i>O. viverrini</i> и <i>C. sinensis</i>	64

2.8.1. Просвечивающая электронная микроскопия кишечника <i>O. felineus</i> , <i>O. viverrini</i> и <i>C. sinensis</i>	64
2.8.2. Спектрометрия характеристических потерь энергии электронами кристаллов в кишечнике <i>O. felineus</i> и <i>C. sinensis</i>	64
2.8.3. Выделение и очистка кристаллов из <i>O. felineus</i> , <i>O. viverrini</i> и <i>C. sinensis</i>	64
2.8.4. Получение β -гематина.....	65
2.8.5. Сканирующая электронная микроскопия выделенных кристаллов	66
2.8.6. Инфракрасная Фурье-спектроскопия выделенных кристаллов	66
2.8.7. Масс-спектрометрический анализ кристаллов	66
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	67
3.1. Гистопатологические изменения печени хомячков, инфицированных <i>O. felineus</i> и <i>O. viverrini</i>	67
3.2. Анализ содержимого кишечника трематод семейства Opisthorchiidae (<i>O. felineus</i>, <i>O. viverrini</i> и <i>C. sinensis</i>).....	82
3.2.1 Морфология содержимого кишечника трематод семейства Opisthorchiidae (<i>O. felineus</i> , <i>O. viverrini</i> и <i>C. sinensis</i>)	83
3.2.2 Морфология и химический анализ кристаллов из кишечника <i>O. felineus</i> и <i>C. sinensis</i>	85
3.2.3. Особенности формирования кристаллов гемозоина в кишечнике <i>O. felineus</i> и <i>C. sinensis</i>	88
3.3. Экскреторно-секреторный продукт <i>O. felineus</i>.....	94
3.3.1. Протеомный анализ экскреторно-секреторного продукта <i>O. felineus</i>	98
3.4. Рекомбинантный белок тиоредоксин пероксидаза <i>O. felineus</i>.....	112
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	116
ВЫВОДЫ.....	118
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	119
Приложение 1	146
Приложение 2	147

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

SDS – додецилсульфат натрия

ДМСО – диметилсульфоксид

IgE – иммуноглобулин E

CAP-18 – антимикробный пептид кателицидин

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

EST – (expressed sequence tag) частичная последовательность кДНК

RAV семейство белков – группа низкомолекулярных ГТФ- связывающихся мембранных белков

ИЛ-6 – интерлейкин 6

ИЛ-4 – интерлейкин 4

ЛПС – липополисахарид

ЭСП – экскреторно-секреторный продукт

ФНО- α – фактор некроза опухоли альфа

MS/MS – тандемная масс-спектрометрия

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

пн – пар нуклеотидов

MALDI – англ. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

ПААГ – полиакриламидный гель-электрофорез

ИПТГ – изопропил- β -D-тиогалактозид

ПЦР – полимеразная цепная реакция

АФК – активные формы кислорода

ТСЕР – трис (2-карбоксиил) фосфин гидрохлорид

NCBI – база данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI – National Center for Biotechnological Information)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Инвазия печеночными сосальщиками семейства Opisthorchiidae – *Opisthorchis felineus*, *O. viverrini*, *Clonorchis sinensis* – остается серьезной проблемой здравоохранения во многих странах мира. Установлено, что более 40 млн людей инфицированы этими паразитами и около 680 млн находятся в группе риска по заражению (Saijuntha et al., 2019). Самый обширный и интенсивный очаг описторхоза, вызываемого *O. felineus*, расположен в Обь-Иртышском бассейне, который охватывает значительную часть территории Сибири. Заболеваемость населения в некоторых районах этого очага описторхоза достигает 60% (Fedorova et al., 2018). Следует отметить, что данные официальной статистики о заболеваемости населения описторхозом отражают лишь некоторую часть заболевших, из-за отсутствия специфической симптоматики и трудностей в постановке диагноза, как в острую, так и в хроническую стадию инфекции (Пальцев, Яхина, 2008). К тому же из-за большого туристического потока в Юго-Восточную Азию у жителей России увеличивается риск инфицирования *O. viverrini* и *C. sinensis*.

Описторхоз характеризуется длительным течением (десятки лет) и развитием тяжелых осложнений, таких как холангит, холецистит, дискинезия и стриктуры желчных протоков, абсцесс печени, панкреатит, может способствовать возникновению холангиокарциномы (Афтаева и др., 2018; Байкова и др., 2018; Sripa et al., 2007; Sriraj et al., 2016). У пациентов, страдающих хроническим описторхозом, вызванным *O. felineus*, ведущими осложнениями являются стриктуры желчных протоков различной локализации, а также острые и хронические панкреатиты (Бражникова, Цхай, 2004; Афтаева и др., 2018), тогда как для описторхоза, вызванного *O. viverrini*, основным осложнением является развитие холангиокарциномы (Sripa et al., 2007). Исключительно при описторхозе, вызванном *O. felineus*, в гепатобилиарной системе лабораторных животных и человека описано накопление буро-коричневого пигмента в желчных протоках (Зуевский, 2010; Соловьева и др., 2011). Следует подчеркнуть, что на сегодняшний день отсутствует сравнительный анализ сроков появления, выраженности тех или иных изменений, возникающих в печени, и наличие особенностей патологии при инвазии разными видами возбудителей описторхоза.

Изучение механизмов развития патологических изменений в гепатобилиарной системе окончательных хозяев при описторхозе, вызванном *O. viverrini*, показало, что значительный вклад в патогенез вносит экскреторно-секреторный продукт (ЭСП) гельминта (Sripa, Kaewkes, 2000a; b; Vale et al., 2013; 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. Показано, что они играют важную роль во многих аспектах взаимоотношений в системе «паразит – хозяин» у различных трематод. Например, облегчают проникновение гельминтов через ткани хозяина (Robinson et al., 2009), позволяют им избегать или модулировать иммунный ответ (Loukas et al., 2001; Donnelly et al., 2008; Park et al., 2009), участвуют в морфофункциональной перестройке окружающих тканей и обеспечении питательными веществами (Robinson et al., 2009; Daorueang et al., 2012; Smout et al., 2015; Suttiaprapa et al., 2018). Все это, в свою очередь, способствует длительному паразитированию гельминтов в организме окончательного хозяина. С помощью современных протеомных подходов описан белковый состав ЭСП *O. viverrini* и *C. sinensis* (Ju et al., 2009; 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 разработки вакцин против этих гельминтозов (Ju et al., 2009; Chaiyadet et al., 2019; Prasopdee et al., 2019). Современными протеомными методами ЭСП *O. felineus* не исследован. Изучение на клеточном уровне механизмов взаимоотношений в системе «паразит – хозяин» при описторхозе, вызванном *O. felineus*, прежде всего, молекулярных аспектов жизнедеятельности гельминта и состава его ЭСП, позволяет получить новые знания о патогенезе паразитарных заболеваний и открывает перспективы создания принципиально новых диагностических и лечебных технологий.

Цель 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 *Clonorchis 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 эксперимента 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, локализующегося 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 (детоксикации) гема. На основании ультраструктурного исследования просвета кишечника гельминтов установлено, 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 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 пероксидаза *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. Основные результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: 6-м Семинаре по алиментарным и водным паразитарным зоонозам (FBPZ6) (2009, Бангкок); II Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: геномика, протеомика, биоинформатика» (2011, Новосибирск); Международном конгрессе по печеночным сосальщикам (2011, Кхон Кен); 38-м Конгрессе Федерации европейских биохимических обществ (FEBS) (2013, Санкт-Петербург); I Международной конференции молодых ученых: биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов (2014, Кольцово); 7-й Всероссийской научно-практической конференции «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (2015, Новосибирск); VI Съезде Паразитологического общества «Современная паразитология – основные тренды и вызовы» (2018, Санкт-Петербург).

Основные публикации:

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 марицы 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.

Вклад автора. Основные результаты получены автором самостоятельно. Сравнительное гистологическое исследование печени при описторхозной инвазии *O. felineus* и *O. viverrini* выполнено автором под руководством профессора В. Sripa 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 центре коллективного пользования Международного томографического центра СО РАН.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, описания используемых материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 308 ссылок. Работа изложена на 150 странице, содержит 40 рисунков, 2 таблицы и 2 приложения.

Благодарности. Выражаю глубокую благодарность научному руководителю – доктору биологических наук Мордвинову Вячеславу Алексеевичу за общее руководство и помощь на всех этапах выполнения диссертации. Выражаю глубокую признательность профессору университета города Кхон Кен (Таиланд) Vanchob Sripa за предоставленную возможность освоить методики и выполнить работу по сравнительному анализу гистологических изменений печени хомячков с описторхозной инвазией. Выражаю искреннюю благодарность за сотрудничество к.б.н. Е.В. Киселевой, к.б.н. М.В. Жуковой и к.б.н. Т.Г. Дужак. Благодарю сотрудников лаборатории иммуногенетики ИМКБ СО РАН за помощь в освоении методов молекулярной биологии, а также весь коллектив Лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов за помощь и поддержку. Выражаю искреннюю благодарность д.б.н. Д.Ф. Августинovich за ценные замечания и научные дискуссии. Благодарю д.б.н., профессора С.В. Айдагулову и к.б.н. Е.А. Литвинову за рецензирование диссертации.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика семейства Opisthorchiidae

(*O. felineus*, *O. viverrini*, *C. sinensis*)

1.1.1. Систематическое положение

К классу Trematoda подклассу Digenea (Дигенетические сосальщики) относится около 6000 видов гельминтов. Все они являются облигатными паразитами со сложным жизненным циклом, со сменой одного и более промежуточных хозяев, имеющими в качестве органа прикрепления чаще всего 2 присоски (переднюю – ротовую и брюшную). На Рисунке 1 представлена систематика наиболее значимых дигенетических сосальщиков с точки зрения инфицирования человека.

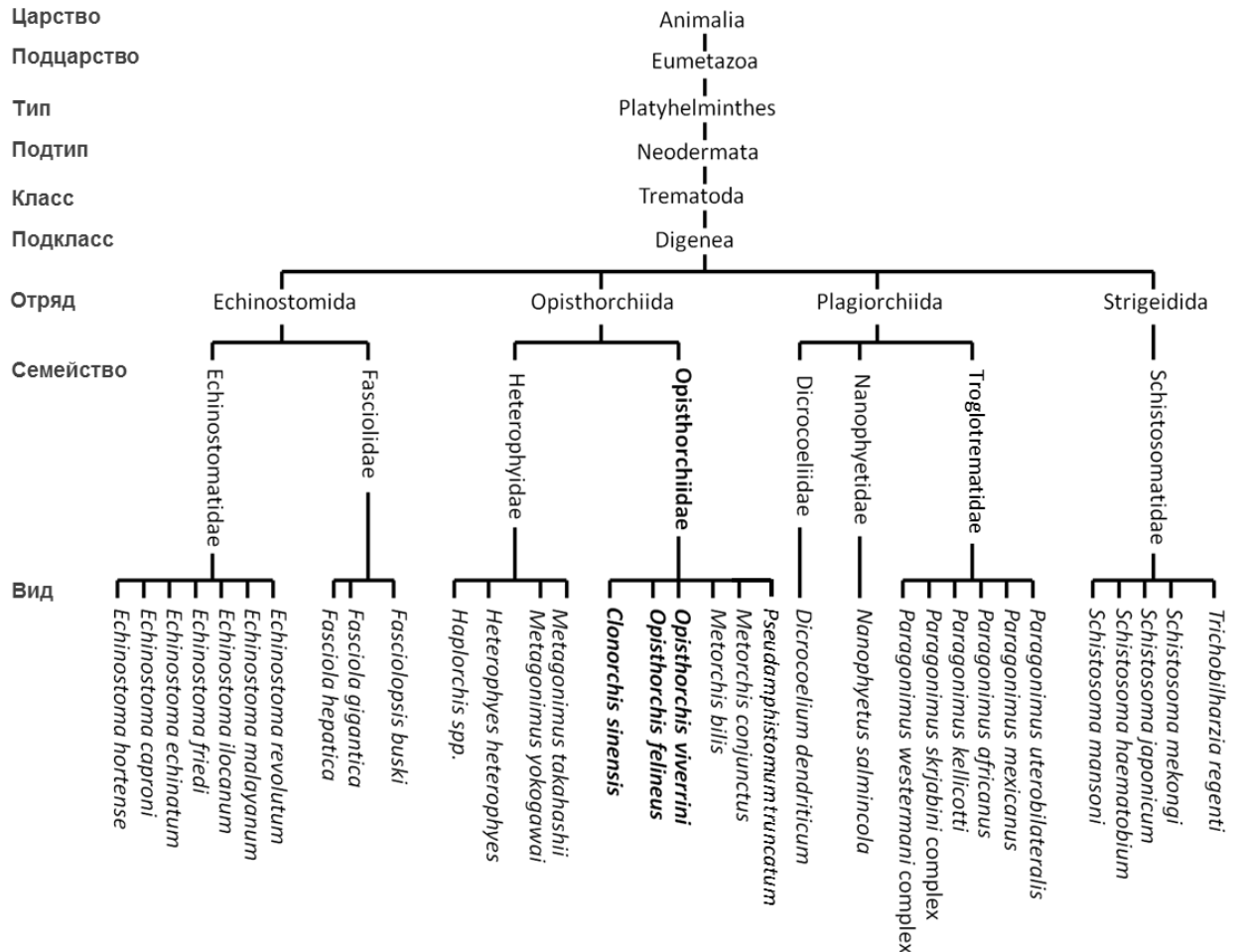


Рисунок 1. Таксономическая классификация паразитирующих на человеке трематод (дополнено, из Keiser, Utzinger, 2009).

Как показано на Рисунке 1, исследуемые в работе виды *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884)¹, *Opisthorchis viverrini* (Poirier, 1886) и *Clonorchis sinensis* (Cobbold, 1875) относятся к классу Trematoda (сосальщики), подклассу Digenea, отряду Opisthorchiida, семейству Opisthorchiidae.

1.1.2. Географическое распространение исследуемых видов и эпидемиология описторхоза

Гельминтозы, которые вызывают трематоды семейства Opisthorchiidae – *O. felineus*, *O. viverrini* (описторхоз) и *C. sinensis* (клонорхоз), являются паразитарными, природно-очаговыми заболеваниями. На территории нашей страны расположен самый обширный и интенсивный очаг описторхоза в мире, вызываемого *O. felineus* (кошачья или сибирская двуустка) – Обь-Иртышский бассейн, который охватывает Новосибирскую, Омскую, Томскую, Тюменскую области, Ханты-Мансийский, Ямало-Ненецкий автономные округа, Пермский край Российской Федерации и северные области Республики Казахстан. Описторхоз на этой территории распространен неравномерно. Наиболее зараженными являются территории, прилегающие к среднему и нижнему течению рек Обь и Иртыш (Fedorova et al., 2018), где инфицированность населения в некоторых регионах достигает более 60% (Беэр, 2005; Fedorova et al., 2018). Очаги описторхоз находятся в бассейнах рек Волга, Кама, Северная Двина, Дон, Неман, Днепр и рек Урала, есть данные о наличии очага низкой интенсивности в бассейне Енисея. Вид *O. felineus* встречается на территории стран ближнего зарубежья (Украина, Белоруссия, Казахстан, страны Прибалтики), а также в Польше, Венгрии, Франции, Германии, Нидерландах, Италии, Португалии и Испании (Mordvinov, Furman, 2010). *O. viverrini* (виверровая двуустка) является широко распространенным паразитом в Юго-Восточной Азии (Таиланд, Лаос, Вьетнам, Камбоджа) (Suwannatrai et al., 2018). *C. sinensis* (китайская двуустка) распространен в Китае, Корее, Японии, Лаосе, Вьетнаме и на Дальнем Востоке России, в бассейне реки Амур (Mordvinov, Furman, 2010; Young et al., 2010).

По данным различных исследователей, в мире около 40 млн людей инфицировано и около 680 млн находятся в группах риска по инфицированию *C. sinensis* и *Opisthorchis spp.* (Keiser, Utzinger, 2009; Saijuntha et al., 2019). В России, по официальным данным на 2018 год, описторхоз, вызываемый *O. felineus*, по-прежнему занимал первое место по количеству инфицированных людей среди биогельминтозов (около 80%) (Роспотребнадзор, 2019). Следует отметить, что данные официальной статистики о

¹ Первое упоминание в тексте названия таксона видового ранга сопровождается указанием в скобках автора таксона и года его описания.

заболеваемости населения описторхозом отражают лишь некоторую часть заболевших из-за отсутствия специфической симптоматики и трудностей в постановке диагноза, как в острую, так и в хроническую стадию заболевания (Пальцев, Яхина, 2008). Достоверным подтверждением диагноза «описторхоз» является обнаружение гельминтов и/или их яиц в кале или желчи, однако у копроовоскопии есть ряд ограничений. Яйцепродукция начинается после полового созревания гельминтов в среднем через 3-4 недели после инфицирования, поэтому на ранних этапах болезни она неинформативна. Существует цикличность яйцепродукции и неравномерность распределения яиц по содержимому толстой кишки, кроме того, при низкой интенсивности инвазии продуцируется малое количество яиц. Для исследования важны правильный забор и хранение материала, метод выделения яиц, а также квалификация лаборанта (Charoensuk et al., 2019). В последнее время из-за демографических и социально-экономических причин (вахтовый метод работы, эмиграция, туризм и др.) нозоарел гельминтозов, вызванных представителями семейства Opisthorchiidae, расширен (Сыскова, 2004; Yossepowitch et al., 2004; Pozio et al., 2013; Asare et al., 2014).

Таким образом, высокий уровень заболеваемости людей описторхозом/клонорхозом, вызываемым трематодами семейства Opisthorchiidae (*O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*) продолжает оставаться важной социально-медицинской проблемой населения, как нашей страны, так и стран Азии и Европы.

1.1.3. Жизненный цикл описторхид

Возбудители описторхоза/клонорхоза обладают сложным жизненным циклом, который протекает с участием трех хозяев: первого промежуточного, второго промежуточного (дополнительного) и окончательного (Рисунок 2) (Беэр, 2005; Wykoff et al., 1965; Kaewkes, 2003; Yurlova et al., 2017; Saijuntha et al., 2019). В ходе жизненного цикла особь паразита проходит шесть стадий, пять из которых являются личиночными, и на каждой стадии паразит претерпевает морфологические изменения, при этом жизненный цикл у всех описторхид одинаковый.

Половозрелые мариты *O. felineus* продуцируют яйца (Рисунок 2 – 1), которые с фекальными массами окончательного хозяина попадают в окружающую среду, в том числе в водоемы (Беэр, 2005; Harinasuta, Harinasuta, 1984). Экспериментально установлено, что яйца *O. felineus* сохраняют жизнеспособность и инвазионную способность при нахождении в воде при температуре 4 – 7°C в течение 15 месяцев, через 20 месяцев жизнеспособными остаются около 30% яиц, а гибель всех яиц наступает через

29 месяцев (Герман, Беэр, 1984). При этом попавшие на почву яйца гибнут значительно быстрее.

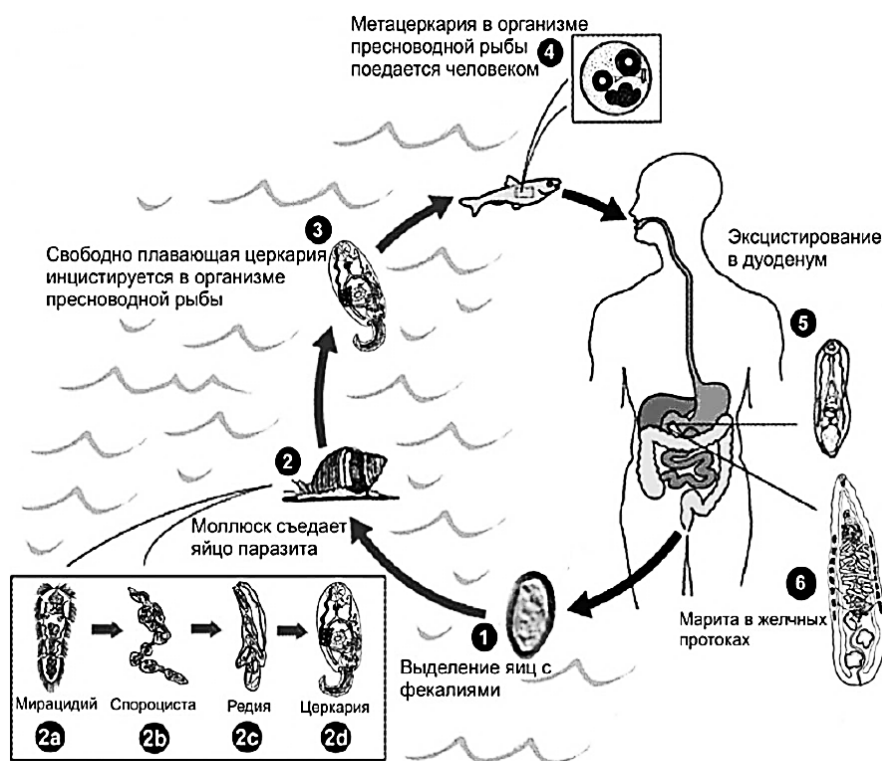


Рисунок 2. Жизненный цикл описторхид на примере *O. felinus* (адаптировано с <http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Opisthorchiasis.htm>).

Яйца медицински значимых представителей семейства Opisthorchiidae обладают сходной морфологией. Они овальной формы, бледно-желтого цвета с двухконтурной оболочкой, крышечкой на одном полюсе и бугорком на другом. Форма и размер яиц могут варьировать внутри одного вида и в среднем составляют 22 - 35 мкм в длину и 10 - 19 мкм в ширину (Беэр, 2005; Ditrich et al., 1992). Яйца гельминтов этого семейства по морфологии и размеру также схожи с яйцами представителей других семейств Heterophyidae и Lecithodendriidae класса трематод (Kaewkes, 1991; Ditrich et al., 1992), что следует учитывать при копроовоскопической диагностике описторхоза/клонорхоза. В зрелых яйцах описторхов находятся сформированные личинки – мирацидии (Рисунок 2 – 2a) (Беэр, 2005). Попавшие в воду яйца заглатывают переднежаберные брюхоногие моллюски семейств: Vithyniidae, Hydrobiidae, Thiaridae – первые промежуточные хозяева описторхид (Беэр, 2005; King, Scholz, 2001). В кишечнике моллюсков из яиц выходят мирацидии, которые мигрируют в ткани хозяина и там превращаются в спороцисты – первое партеногенетическое поколение (Рисунок 2 – 2b). Внутри спороцист из зародышевых клеток образуется второе партеногенетическое поколение – редии (Рисунок 2 – 2c), которые начинают питаться тканями промежуточного хозяина, и из их

зародышевых клеток могут образовываться новые редии или подвижные личинки – церкарии (Рисунок 2 – 2d) (Бэер, 2005; Yurlova et al., 2017).

Примерно через два месяца с момента заражения церкарии выходят из организма моллюсков и, передвигаясь у дна водоема, нападают на второго промежуточного хозяина – рыбу семейства Карповых (Рисунок 2 – 3, 4) (Фаттахов, 2002; Narinasuta, Narinasuta, 1984). Церкарии активно внедряются через кожу в мышечную или соединительную ткань рыб, затем инцистируются, образуя следующую стадию - метацеркарии - инвазивные личинки (Рисунок 2 – 4). Форма цисты зрелой метацеркарии шаровидная или слегка овальная. Ее размер колеблется от 0,17x0,23 до 0,34x0,43 мм. (Горчакова и др., 2003). Метацеркария отличается от взрослой половозрелой особи меньшими размерами, наличием шипиков по всему телу, отсутствием половой системы, большим количеством гликогена в тканях (Звягина, Начева, 1993). Личинки *O. felineus* в настоящее время выявлены у 26 видов и подвигов рыб семейства Карповых, таких как язь, елец, линь, верховка, голянь, сазан, карп, плотва сибирская и европейская, вобла, лещ, усач, пескарь, красноперка и др. Однако основным переносчиком метацеркарий *O. felineus* во всех речных бассейнах, кроме бассейнов Балтийского моря и Енисея является язь (Фаттахов, 1994).

Личинки трематод семейства Opisthorchiidae приспособлены к длительному пребыванию во втором промежуточном хозяине, а также могут накапливаться в теле рыбы практически в течение всей ее жизни (Бэер, 2005; Yurlova et al., 2017). Наиболее часто метацеркарии трематод семейства Opisthorchiidae локализуются в наружном слое спинных мышц и вдоль боковой линии рыбы. Инфицирование дефинитивных хозяев (широкий спектр рыбоядных домашних и диких млекопитающих и человек) трематодами семейства Opisthorchiidae происходит при употреблении в пищу сырой, недостаточно термически обработанной, слабосоленой или вяленой речной рыбы семейства Карповых, инфицированной метацеркариями (Рисунок 2 – 5), которые эксцистируются под действием трипсина в двенадцатиперстной кишке. Попав в полость кишки с помощью хемотаксиса, метацеркарии проникают в общий желчный проток, а затем в желчные протоки печени, желчный пузырь или протоки поджелудочной железы – места паразитирования в окончательном хозяине. Превращение эксцистированной метацеркарии (ювенильной мариты) *O. felineus* в половозрелую особь (мариту) совпадает с началом яйцепродукции и в среднем наступает через 20 - 25 дней после инфицирования (Бэер, 2005; Yurlova et al., 2017).

Взрослая марита продуцирует около 1000 яиц в сутки (Астафьев и др., 1989), которые с каловыми массами окончательного хозяина попадают в окружающую среду, в том числе, и водоемы. Цикл замыкается. Продолжительность жизни взрослых особей

гельминтов семейства Opisthorchiidae в организме человека составляет десятки лет, а ряд авторов полагает, что без лечения инвазия может сохраняться пожизненно (Ахрем-Ахремович, 1963; Sripa et al., 2010). В организме окончательного хозяина описторхиды не размножаются, нарастание инвазии происходит только за счет повторных инфицирований (Яблоков, 1979; Yurlova et al., 2017).

1.1.4. Морфология описторхид на стадии половозрелой мариты

Для представителей семейства Opisthorchiidae характерно плоское тело ланцетовидной формы, лишенное членистости. Его передняя часть сужена, включает в себя ротовую и брюшную присоски, задняя – расширена, с закругленным концом (Рисунок 3).

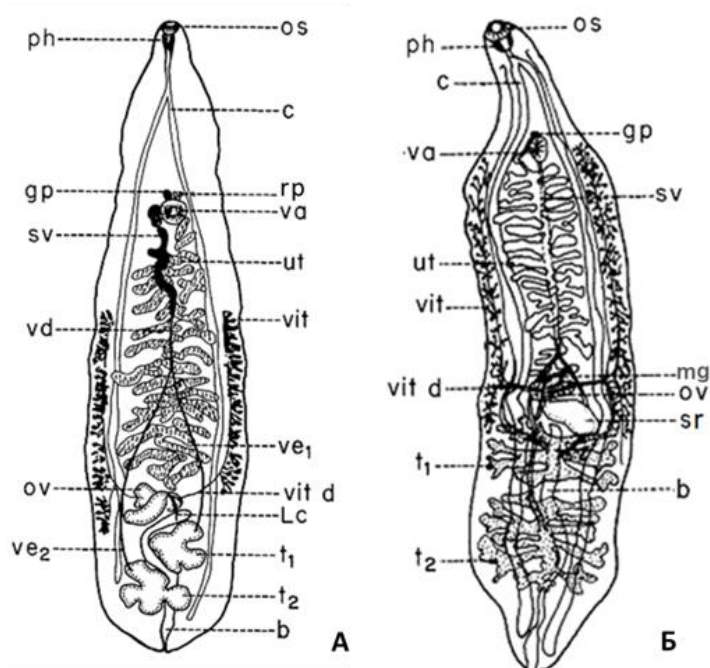


Рисунок 3. Схема строения мариты *O. felineus/O. viverrini* (А) (из Wykoff, 1965) и мариты *C. sinensis* (Б) (из Rim, 1986).

b – экскреторный пузырь, с – кишка, гр – половая пора, lc - Лауреров канал, mg – скорлуповая железа, os – ротовая присоска, ov – яичник, ph – глотка, rp – родильная пора, sr – семяприемник, sv – семенной пузырек, t₁t₂ – семенники, ut – матка, va – брюшная присоска, vd – семяпровод, ve₁ve₂ - семявыносящие каналы, vit – желточники (вителлиновые железы), vit d – желточный канал.

Размеры описторхид зависят от размеров окончательного хозяина и интенсивности инвазии (Гинецинская, 1968; Яблоков, 1979). В среднем у *O. felineus* тело длиной 5,8 – 13 мм, шириной 0,75 – 2,2 мм, у *O. viverrini* – длина 5,4 – 10,2 и ширина 0,8 – 1,9 мм, у *C. sinensis* – длина 8 – 15 и ширина 1,5 – 4 мм (Kaewkes, 2003; Rim, 2005). Плоское тело описторхид не имеет полости, все внутренние органы находятся в рыхлой массе паренхиматозных клеток. Ротовая присоска расположена на переднем конце тела, а

приблизительно между первой и второй его четвертью находится брюшная, несколько меньшая по размеру. (Яблоков, 1979; Астафьев, 1989). Обе присоски являются органами прикрепления, которые представляют собой мускульные валики, состоящие из нескольких слоев мышечных волокон, идущих в различных направлениях. В глубине ротовой присоски (выполняет как функцию прикрепления, так и питания), находится ротовое отверстие, ведущее в глотку, окруженную выраженным мышечным слоем. За ней следует короткий пищевод, который раздваивается на две ветви кишечника, слепо заканчивающиеся в задней части тела паразита. Кишечник *O. felinus* выстлан клетками эпителия. Мембрана этих клеток, обращенная в просвет кишечника, образует длинные извитые выросты (ламеллы), которые покрыты гликокаликсом. Установлена определенная морфологическая и, вероятно, физиологическая дифференциация кишечного эпителия в различных участках пищеварительного тракта *O. felinus* (Куперман и др., 1991). У описторхид внеклеточное пищеварение.

Ультраструктура покровов тела трематод хорошо изучена (Smyth, Halton, 1983; Braschi et al., 2006; Sotillo et al., 2010a), в том числе и для описторхид (Куперман и др., 1991; Inatomi et al., 1971; Arinhasmit et al., 1994). Их тело покрыто тегументом, который состоит из наружного и погружного слоев (Рисунок 4).

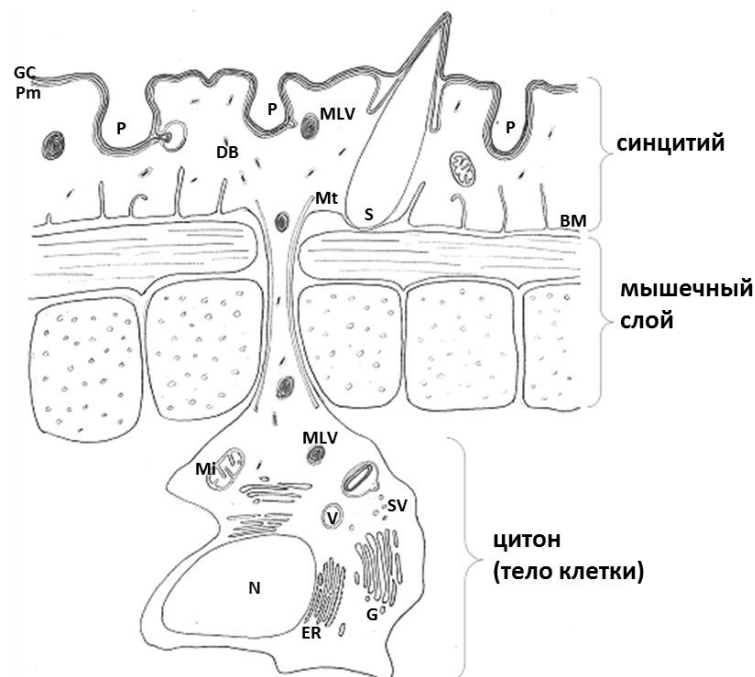


Рисунок 4. Общая схема строения тегумента трематод (из Braschi et al., 2006). Соотношение элементов отражено не в масштабе.

BM – базальная мембрана, DB – дисковидные тельца, ER – эндоплазматический ретикулум, G – комплекс Гольджи, GC – гликокаликс, Mi – митохондрии, MLV – мультиламеллярные везикулы, Mt – микротрубочка, N – ядро, P – инвагинации, Pm – плазматическая мембрана, S – шип, SV – везикулы, V – вакуоль.

Шипики есть только у ювенильных марит семейства Opisthorchiidae. Наружный синцитиальный безъядерный цитоплазматический слой ограничен наружной и внутренней плазматическими мембранами. При этом наружная образует большое количество микроворсинок и складок (особенно в передней части тела), которые увеличивают площадь поверхности паразита, и покрыты гликокаликсом, а внутренняя (между синцитием и мышечным слоем) имеет инвагинации и, предположительно, служит фильтрационным барьером у трематод (Smyth, Halton, 1983; Apinhasmit et al., 2000; Gobert et al., 2003). В синцитиальном слое располагается большое количество митохондрий, гранул различной плотности и везикул. Предполагается, что часть гранул участвует в возобновлении внешней мембраны и гликокаликса (Abath, Werkhauser, 1996). Матрикс синцитиального слоя содержит цитоскелетные структуры, которые соединяют внешнюю мембрану с внутренней для обеспечения достаточной подвижности поверхностного слоя гельминта (Apinhasmit et al., 1994; Jones et al., 2004). К тому же цитоскелет тегумента играет роль остова для тела гельминтов (Jones et al., 2004). Погружной слой представлен ядродержащей частью клеток (цитоны тегумента), расположенной под мышечным слоем и соединенной с синцитиальным слоем с помощью цитоплазматических отростков клеток.

Тегумент активно секретирует гранулы и везикулы различной электронной плотности и формы, синтез которых происходит в цитонах тегумента с участием гранулярного эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи. При этом набор включений в синцитиальном слое и в цитонах идентичен (Bogitsh, 1986). Выход секрета на поверхность тела паразита осуществляется мерокриновым способом (Куперман и др., 1991; Inatomi et al., 1971; Apinhasmit et al., 1994). Тегумент является полифункциональным образованием, выполняющим несколько взаимосвязанных функций: покровную, барьерно-защитную, секреторную и абсорбционную (Куперман и др., 1991; Smyth, Halton, 1983; Apinhasmit et al., 1994; Van Hellemond et al., 2006). Так, абсорбция тегументом различных субстратов с низкой молекулярной массой показана *in vitro* у большинства трематод (Skelly et al., 2014).

На поверхности тегумента обнаружены белки и компоненты мембран клеток хозяина, что позволяет гельминтам мимикрировать и избегать иммунного ответа хозяина (Golan et al., 1986; Braschi, Wilson, 2006). Так как тегумент паразита контактирует с окружающей средой (желчь и различные клетки, в том числе иммунной системы хозяина), состав наружной мембраны не статичен и постоянно подвергается обновлению. Показано, что у *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) и *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) внешняя мембрана тегумента постоянно возобновляется, что является одним из механизмов

уклонения гельминтов от иммунного ответа хозяина (Dalton et al., 2004; Van Hellemond et al., 2006; Robinson et al., 2009). Возобновление поверхности тегумента имеет место как *in vivo*, так и *in vitro* (при культивировании), но с разной скоростью (Sotillo et al., 2010a). У шистосом в условиях *in vitro* обмен происходит быстрее и составляет 45 часов, в отличие от 5 суток *in vivo*. (Saunders et al., 1987). Показано, что с поверхности тегумента трематоды секретируют экзосомо-подобные везикулы, в состав которых входят белки, рассматриваемые в качестве перспективных кандидатов для разработки вакцин, а также потенциальные факторы патогенности, микроРНК и т.д. (Marcilla et al., 2012; Bernal et al., 2014; Chaiyadet et al., 2015a; Sotillo et al., 2016).

Наряду с тегументом, проявляющим высокую секреторную активность, в паренхиме переднего отдела тела описторхид находятся одноклеточные железы, содержащие крупный электроно-плотный секрет округлой и удлинённой формы, протоки которых открываются в области ротовой присоски (Куперман и др., 1991; Apinhasmit et al., 1994)

Выделительная система описторхид представлена мерцательными клетками, собирательными экскреторными канальцами и выделительным каналом, S-образно изгибающимся и проходящим между парными семенниками и открывающимся отверстием на заднем конце тела мариты (Яблоков, 1979).

Нервная система описторхид ортогонального типа, состоит из двух мозговых ганглиев и трех пар продольных стволов (дорсальные, латеральные и вентральные), которые связаны поперечными комиссурами (Гинецинская, 1968; Leksomboon et al., 2012).

Представители семейства Opisthorchiidae являются гермафродитами. Оплодотворение внутреннее, перекрестное. Мужская часть половой системы представлена двумя семенниками, расположенными в задней части тела мариты. У *O. felineus* и *O. viverrini* они обычно четырех - пяти лопастные, у *C. sinensis* – древовидно ветвящиеся и расположены один за другим. От семенников отходят семявыносящие каналы, объединяющиеся в семяпровод, который около брюшной присоски переходит в тонкостенный, чаще трубчатый, извитой семенной пузырек, который, в свою очередь, открывается в генитальную пору - небольшое отверстие перед брюшной присоской (см Рисунок 3) (Wykoff et al., 1965; Rim, 1986). В состав женской половой системы входят яичник, желточники (вителлиновые железы), находящиеся снаружи от кишечника и сгруппированные в 8 фолликулов, и их протоки, клетки тельца Мелиса (или скорлуповая железа), оотип, Лауреров канал, по которому удаляется избыток желточных клеток, матка, семяприемник (см Рисунок 3).

1.1.5. Питание описторхид

Связь паразита с хозяином в основном пищевая и включает однонаправленное потребление питательных веществ. Причем задача питания сводится к обеспечению особи пластическим материалом для производства максимально большого количества потомков, что помогает успешному сохранению вида и дальнейшему его распространению. Исследование питания трематод, в том числе описторхид, *in vivo* затруднено, так как они обитают в тканях и органах хозяина. Информацию о характере питания получают косвенными методами:

1. исследование содержимого кишечника паразита, используя аналитические, гистохимические, спектрофотометрические и другие технологии;
2. введение красителей, лекарств, меченой еды в организм хозяина и затем исследование паразита на наличие этих субстратов;
3. гистологические и гистохимические исследования фиксированных *in situ* (в тканях хозяина) паразитов и содержимого их кишечника;
4. прямое наблюдение за паразитами, содержащимися *in vitro*.

Первые три метода представляют большую часть информации о характере пищи и питании трематод. Четвертый метод может способствовать получению дополнительной информации о питании паразитов. Однако культивирование *in vitro* пока не может в полной мере соответствовать условиям *in vivo*, так как они более сложные, и весьма важным является фактор(ы) окружения для нормального существования паразита.

Пищеварительная система трематод хорошо развита. Мышцы глотки, совместно с циркулярными и продольными слоями мышечной оболочки переднего отдела тела описторхид, играют роль насоса в процессе питания паразитов. Трематода первоначально заглатывает участок ткани в ротовую присоску для прикрепления. Непрерывное локальное всасывание ротовой присоской и глоткой, которым помогает пульсирующее движение циркулярных и продольных мышечных слоев передней части тела, повреждает подлежащие ткани хозяина (эпителий и поверхностные кровеносные сосуды) (Sripa, 2003). Учитывая строение передних отделов пищеварительной системы трематод, и способ заглатывания пищи – сосальщики, они могут питаться только жидкой или полужидкой пищей. К тому же многие трематоды также усваивают питательные вещества через тегумент (Smyth, Halton, 1983; Skelly et al., 2014).

Данные о характере питания описторхид весьма противоречивы (Sripa, 2003). Предполагается, что они питаются муцином, межклеточной жидкостью в местах десквамации эпителия, холангиоцитами и, возможно, кровью (Беэр, 2005; Sripa, 2003). В просвете кишечника *C. sinensis* было обнаружено содержимое темного цвета и клетки

крови (Chu et al., 1982). В другом исследовании меченные радиоактивным ^{51}Cr эритроциты были обнаружены в желчи и, в гораздо большем количестве, в просвете кишечника мариты *C. sinensis* (Kim et al., 1982).

Считается, что гематофагия – это преобладающая стратегия питания у дигенетических сосальщиков (Dalton et al., 2004). Так показано, что большое количество трематод [*Schistosoma spp*, *F. hepatica*, *Echinostoma spp*, *Haematoloechus medioplexus* (Stafford, 1902), *Gorgoderia cygnoides* (Zeder, 1800) и др.] питаются кровью хозяина (Smyth, Halton, 1983; Oliveira et al., 2000; Pisciotta et al., 2005; Toh et al., 2010).

1.2. Гематофагия у паразитов

У трематод, питающихся кровью хозяина, гемолиз эритроцитов происходит в просвете кишечника, а белки подвергаются гидролизу большим набором протеолитических ферментов (Dalton, 1999; Delcroix et al., 2006; Hall et al., 2011; Larsen et al., 2012). У *S. mansoni* и *F. hepatica* был определен набор ферментов, участвующих в деградации белков крови, в том числе и гемоглобина, до пептидов и аминокислот – это цистеиновые протеазы (катепсины групп В, С, L), легумаин, аспарагиновые протеазы (катепсин группы D) и аминопептидазы (Brindley et al., 1997; Delcroix et al., 2006).

Гемоглобин составляет около 90% всего белка эритроцитов, после расщепления его белковой части протеазами остается большое количество железосодержащей простетической группы – гема. Свободный гемоглобин, гем и железо являются высокотоксичными для паразита и его хозяина. Гем способствует формированию активных форм кислорода (АФК), что приводит к развитию окислительного стресса (Рисунок 5) (Larsen et al., 2012; Chiabrande et al., 2014).

Гем является источником реакционноспособного железа (Fe^{+2}), которое, в свою очередь, может принимать участие в реакции Фентона ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{+2} \rightarrow \text{Fe}^{+3} + \text{OH}^- + \text{OH}^\bullet$) с образованием гидроксильного радикала (OH^\bullet). Чрезвычайно высокая химическая активность АФК обуславливает их деструктивное действие. АФК повреждают белки (окисление -SH-групп, FeS-центров ферментов, фрагментация полипептидных цепей, повышение чувствительности белков к действию протеаз) и нуклеиновые кислоты (прямое повреждение азотистых оснований, разрыв водородных связей между цепями ДНК, появление «сшивок»). Еще одной мишенью для АФК являются липиды, основные компоненты клеточных мембран. АФК вызывают их перекисное окисление (ПОЛ), в результате чего нарушается структура и повышается проницаемость мембран клеток. Под действием продуктов ПОЛ (малоновый диальдегид и др.) нарушается структура белков, их ферментативная активность, работа мембранных каналов. В клетке АФК активируют

кислород-чувствительные провоспалительные транскрипционные факторы, нарушают экспрессию белков. Все вышеперечисленное приводит к нарушению функционирования и уменьшению жизнеспособности клетки (Vincent, 1989; Jeney et al., 2002; Chiabrando et al., 2014).

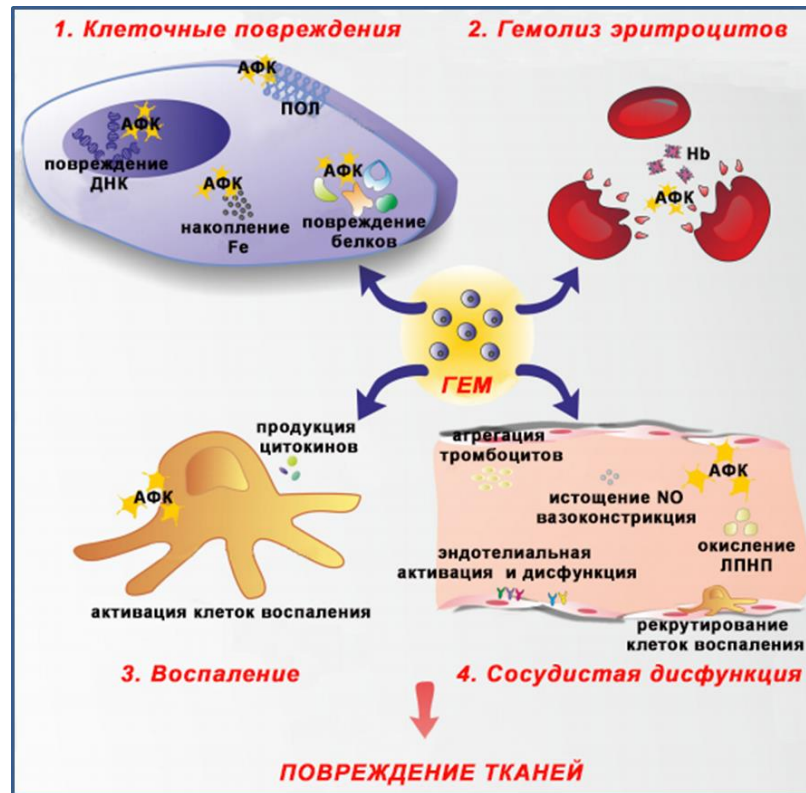


Рисунок 5. Токсические эффекты гема (из Chiabrando et al., 2014), объяснения в тексте. АФК – активные формы кислорода. ПОЛ – перекисное окисление липидов. ЛПНП – липопротеины низкой плотности. Нб – гемоглобин.

Свободный гем является гемолитическим агентом. Благодаря липофильной природе он может связываться с фосфолипидными мембранами, нарушая их целостность, что способствует клеточному лизису (Schmitt et al., 1993; Jeney et al., 2002). Гем вызывает эндотелиальную дисфункцию с помощью нескольких механизмов: увеличивает экспрессию молекул адгезии и эндотелиальной активации, рекрутирует клетки воспаления и способствует агрегации тромбоцитов, вызывает сужение сосудов и окисление липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) (Woollard et al., 2009; Larsen et al., 2012; Chiabrando et al., 2014). Все это приводит к повреждению тканей, в том числе и гельминтов, и способствует развитию воспаления. Таким образом, метаболизм экзогенного гема является одним из ключевых процессов для паразитов-гематофагов, определяющих их выживание.

1.2.1. Детоксикация гема

Способы детоксикации гема у паразитов условно можно разделить на три группы: катаболизм гема, отграничение от гема с помощью физического барьера и перевод гема в нетоксичную кристаллическую форму (Toh et al., 2010).

Гемоксигеназы в присутствии кислорода и НАДФН (например, у человека) катализируют превращение гема через несколько реакций в биливердин, а затем в билирубин. Считалось, что у паразитов-гематофагов отсутствуют гемоксигеназа-подобные ферменты, однако стали появляться публикации (Okada, 2009; Taylor, Kelly, 2010), в которых описаны такие белки и определена их активность, например, у *Plasmodium falciparum* (Welch, 1897) и *Leishmania donovani* (Laveran, Mesnil, 1903). Однако у гельминтов функционирование гемоксигеназа-подобных белков не доказано.

Некоторые члены семейства глутатион-S-трансфераз (GST) демонстрируют катаболическую активность по отношению к гему (Atamna, Ginsburg, 1995). У нематод *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803) и *Ancylostoma caninum* (Ercolani, 1859) обнаружен специальный класс этих ферментов, которые обладают высокой аффинностью к гему, и эти ферменты участвуют в обезвреживании и транспорте гема (van Rossum et al., 2004; Zhan et al., 2005). У эритроцитарной формы возбудителей малярии обнаружена единственная GST, которая значительно отличается от всех известных классов этого фермента и связывает гем. У штаммов *P. falciparum*, обладающих резистентностью к хлорохину, значительно повышен уровень экспрессии GST, и этот фермент составляет более 1% общего количества белка в клетках паразитов (Harwaldt et al., 2002). Полагают, что GST и глутатион играют значительную роль в альтернативном пути детоксикации гема (Deponte, Becker, 2005; Toh et al., 2010). Возможно, GST возбудителя малярии связывает гем и конъюгирует его с глутатионом (Deponte, Becker, 2005), далее, вероятно, через ряд реакций в присутствии кислорода и его реактивных форм происходит расщепление порфиринового кольца с высвобождением железа (Atamna, Ginsburg, 1995). Однако остается еще много нерешенных вопросов, например, оптимум pH для GST *P. falciparum* – около 8, при этом в пищеварительной вакуоли, где происходит высвобождение гема, кислая среда (Harwaldt et al., 2002).

У многих кровососущих насекомых в среднем кишечнике обнаружен полупроницаемый внеклеточный слой – перитрофический матрикс, состоящий из белков, протеогликанов и хитинов, которые защищают кишечный эпителий от вредных воздействий, в том числе и свободного гема (Pascoa et al., 2002). Показано, что компонент перитрофического матрикса – муцин 1, продуцируемый клетками кишечника комара *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (AeIMUCI), *in vitro* связывает гем (Devenport et al., 2006).

Еще одним способом обезвреживания гема у насекомых является формирование гемосом. Например, у клещей *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888) гем накапливается в некристаллических агрегатах в специальных органеллах эпителия среднего кишечника – гемосомах (Lara et al., 2003). Зрелые гемосомы состоят на 90% из агрегатов гема (компактный центр), окруженных липидными мембранами. Механизм поступления гема в гемосомы еще не известен. Клетки, содержащие «созревшие» гемосомы, после завершения переваривания компонентов крови отделяются от стенки кишечника и выводятся из организма клеща с фекалиями (Lara et al., 2003).

Однако наиболее распространенным способом обезвреживания гема у паразитов является образование железосодержащего темно-коричневого пигмента, впервые обнаруженного у возбудителя малярии и названного малярийным пигментом, или гемозоином [от греческого *haima* («кровь») + *zoon* («животное»)]. Этот способ характерен для триатомовых клопов, простейших, а также для ряда трематод, питающихся кровью хозяина [*Schistosoma* spp, *Echinostoma trivolvis* (Cort, 1914) и др.] (Chen et al., 2001; Oliveira et al., 2005; Oliveira et al., 2007).

1.2.2. Гемозоин и его формирование

Кристаллы гемозоина представляют собой димеры гематина (гематин – окисленная форма гема, содержащая трехвалентный атом железа – феррипротопорфирин IX) соединенные координационными связями между Fe^{3+} одного гема и кислородом карбоксильной группы пропионовой кислоты другого - (Fe_1-O_4) (Рисунок 6). На присутствие этих связей указывает наличие пиков абсорбции при инфракрасной Фурье спектроскопии на 1667 и 1207 см^{-1} , которые свидетельствуют о валентных колебаниях связей $C=O$ и $C-O$ карбоксильных групп, которых нет у мономеров гема (Slater et al., 1991). Далее димеры формируют так называемые «кристаллические решетки» с помощью водородных связей (Slater et al., 1991; Pagola et al., 2000; Egan, 2008a).

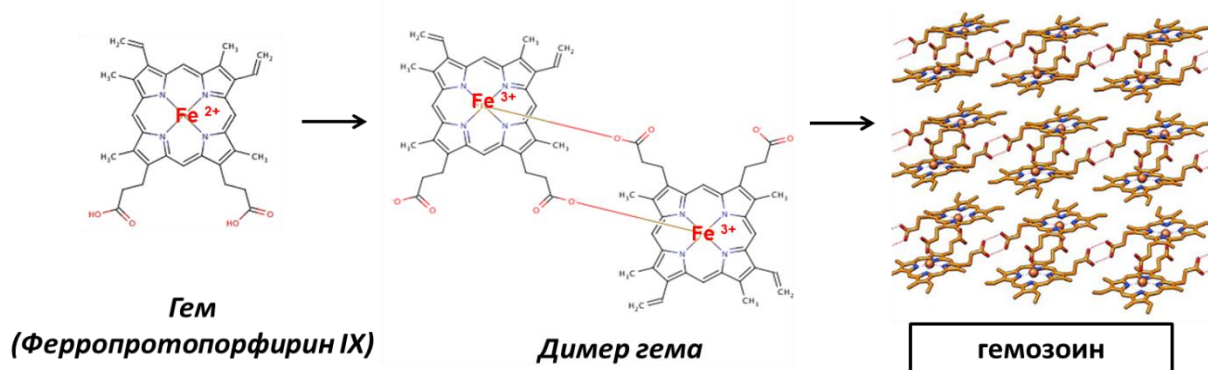


Рисунок 6. Структура гемозоина (частично из Nakatani et al., 2014).

Гемозоин паразитов идентичен синтетическому β -гематину, который также состоит из димеров гема, имеющих координационные связи (Fe_1O_4) и соединенных водородными связями (Bohle et al., 1997). В научной литературе часто упоминается термин β -гематин как синоним гемозоина (Pagola et al., 2000).²

Гемозоин, продуцируемый различными паразитами, и β -гематин, единицей строения которых являются димеры гема, имеют различную морфологию. Форма β -гематина зависит от метода, которым он был получен (см. раздел 1.2.3). У возбудителей малярии млекопитающих гемозоин схож морфологически и представляет собой триклинные кристаллы (по форме напоминают параллелепипед), размер которых варьирует в зависимости от вида и в среднем составляет 100 нм x 100 нм x 300 - 500 нм (Рисунок 7 А) (Noland et al., 2003). Кристаллы гемозоина у *Schistosoma spp.* гетерогенны по размеру, округлой формы, их поверхность местами ребристая, размер варьирует в широких пределах от 50 нм до нескольких мкм в диаметре (Рисунок 7 Б, В) (Oliveira et al., 2005).

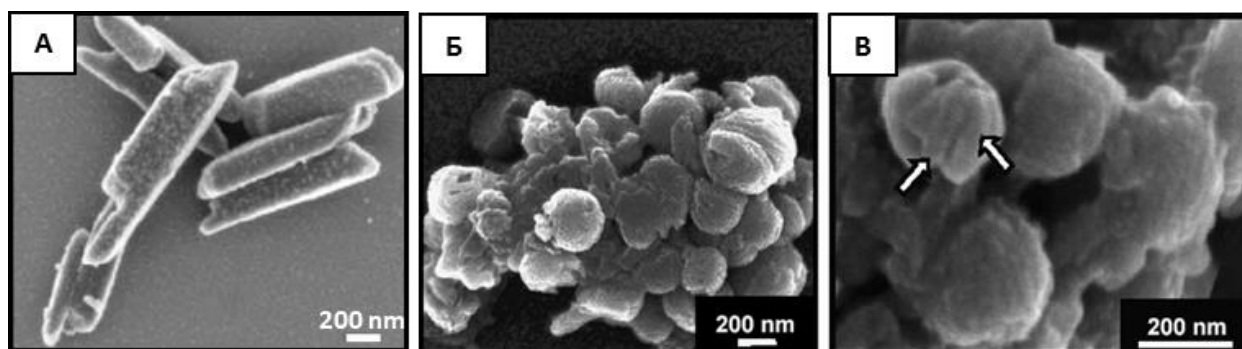


Рисунок 7. Электронные микрофотографии кристаллов гемозоина. А – *P. falciparum* клон 3В-D5 (фотография из статьи Noland et al., 2003); Б, В – *S. mansoni*, стрелками показаны индивидуальные кристаллы гемозоина, собранные в мульткристаллические структуры (фотографии из статьи Oliveira et al., 2005).

В отличие от гема (мономера), кристаллы гемозоина и β -гематина не растворимы в воде, диметилсульфаксиде (ДМСО), лаурилсульфате натрия (SDS) и бикарбонатном буфере (рН 9), но растворимы в 20 мМ NaOH и обладают парамагнитными свойствами (Fitch, Kanjanangulpan, 1987; Slater, 1991; Butykai et al., 2013).

Несмотря на усилия исследователей, до сих пор нет окончательного представления о формировании кристаллов гемозоина и возможных катализаторах этого процесса. Первоначально предполагалось, что особый фермент («полимераза гема») инициирует и обеспечивает этот процесс, так как каталитический эффект экстракта *P. falciparum* на

² Однако далее в тексте диссертации β -гематин, будет употребляться только применительно к кристаллам пигмента, полученным *in vitro*.

образование кристаллов *in vitro* ингибировался при кипячении и требовался определенный оптимум pH 5,5 (Chou, Fitch, 1992; Slater, Cerami, 1992).

Позднее у возбудителя малярии *P. falciparum* были найдены богатые гистидином белки II и III (HRP – histidine-rich protein), аминокислотная последовательность которых на 85% состояла из повторов His-His-Ala-Ala-Asp и His-His-Ala-His-His-Ala-Ala-Asp-Ala (Panton et al., 1989; Sullivan et al., 1996). Эти белки, выделенные из пищеварительной вакуоли *P. falciparum* (на стадии трофозоитов), и их рекомбинантные формы связывают гем и способствуют формированию гемозоина *in vitro* в кислой среде (Lynn et al., 1999; Sullivan et al., 1996). Однако G. Noland с соавторами (2003) показали, что у штаммов *P. falciparum* (клон HB3 – HRP II+, HRP III-; клон Dd2 – HRP II-, HRP III+; клон 3B-D5 – HRP II-, HRP III-) с дефектом или отсутствием генов, кодирующих богатые гистидином белки (HRP II и HRP III), происходит формирование гемозоина, и по морфологии он не отличается от такого у других возбудителей малярии у млекопитающих. Это позволило авторам утверждать, что белки HRP II и HRP III желательны, но не являются абсолютно обязательными для формирования гемозоина *in vivo* (Noland et al., 2003).

Позднее был обнаружен и охарактеризован белок, обезвреживающий гем (HDP – Heme Detoxification Protein). Уникальный, высоко консервативный среди различных видов возбудителей малярии белок, который присутствует в пищеварительной вакуоли, связывает гем и эффективно способствует формированию гемозоина (Jani et al., 2008). Далее было показано, что у *P. falciparum* в пищеварительной вакуоли существует мультиферментный комплекс, который участвует в деградации гемоглобина и формировании гемозоина (Рисунок 8).

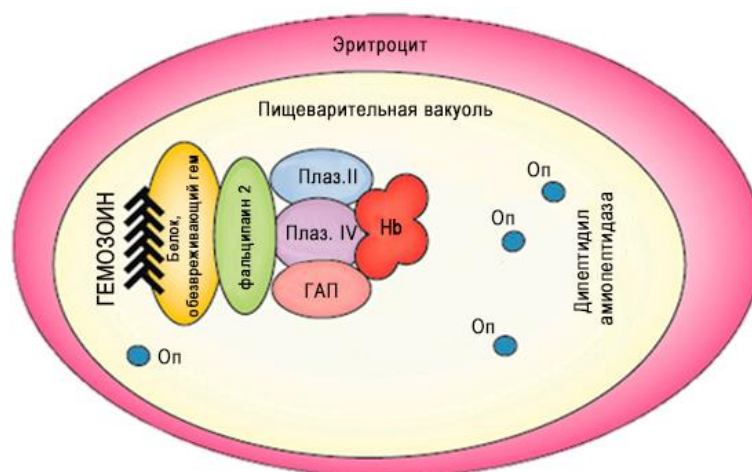


Рисунок 8. Модель мультиферментного формирующего гемозоин комплекса в пищеварительной вакуоли *P. falciparum* (из Chogh et al., 2012).

Нб – гемоглобин, Плазм. II – плазмепсин II, Плазм. IV – плазмепсин IV, ГАП – гистоаспаратная протеиназа, Оп – олигопептиды.

Этот комплекс содержит цистеиновые протеазы – фальципаин (falcipain 2/2'), аспартатные протеиназы – плазмепсины (plasmepsin II и IV), гисто-аспартатную протеазу (histo aspartic protease) и HDP. Основная гемоглобиназа *P. falciparum* – фальципаин 2 в этом комплексе непосредственно связана с HDP для эффективного превращения высвобождающихся молекул гема в гемозоин (Chogh et al., 2012).

Образование гемозоина также описывали как спонтанный химический процесс, который не требует никакого паразитарного материала, так как идентичный гемозоину (по строению димеров) β -гематин может быть получен *in vitro* в отсутствие белков-катализаторов (Egan et al., 1994; Adams et al., 1996). Оказалось, что скорость спонтанного формирования кристаллов *in vitro* в физиологических условиях была слишком низкой (несколько дней), чтобы этим можно было объяснить формирование гемозоина (Dorn et al., 1998). С другой стороны, было доказано, что это аутокаталитический процесс, так как и гемозоин, и β -гематин выступали в качестве ядер кристаллизации и способствовали дальнейшему росту кристаллов *in vitro* (Dorn et al., 1995; Chen et al., 2001; Noland et al., 2003). Однако инициатор образования ядер кристаллизации так и не был найден. Вероятно, HRP II и III, HDP или другие белки могут выполнять эту роль (Egan, 2008b). A. Dorn с соавторами (1998) показали, что процесс кристаллизации значительно ускоряется при добавлении липидов.

К. Bendrat с соавторами (1995) предположили, что липиды играют ключевую роль в формировании гемозоина. Ненасыщенные жирные кислоты и моно-, ди-олеилглицеролы – компоненты мембран эритроцитов, неинфицированных возбудителями малярии, повышают растворимость гема в кислой окружающей среде и инициируют образование гемозоина *in vitro* (Fitch et al., 1999). Была выдвинута гипотеза об участии фосфолипидов вакуолярных мембран трофозоитов *P. falciparum* в формировании гемозоина (Hempelmann et al., 2003). Капли нейтрального жира в пищеварительной вакуоли *P. falciparum* тесно связаны с кристаллами гемозоина (Рисунок 9 А) (Coppens, Vielemeyer, 2005). У трематоды *S. mansoni* нет аналогов богатых гистидином белков, однако в цитоплазме эпителия кишечника и в просвете кишечника присутствует большое количество липидных капель, причем некоторые липидные капли связаны с кристаллами гемозоина (Рисунок 9 Б) (Correa Soares et al., 2007). Связь кристаллов с поверхностью липидной капли и наличие в просвете кишечника последовательных стадий кристаллизации, начиная с формирования на поверхности капли ядра кристаллизации и заканчивая мульткристаллическими комплексами, привели к выводу о том, что формирование гемозоина связано с гидрофильно/гидрофобным разделом сред, между поверхностью липидной капли и окружающей жидкостью (Рисунок 9 Б, В) (Correa Soares et al., 2007).

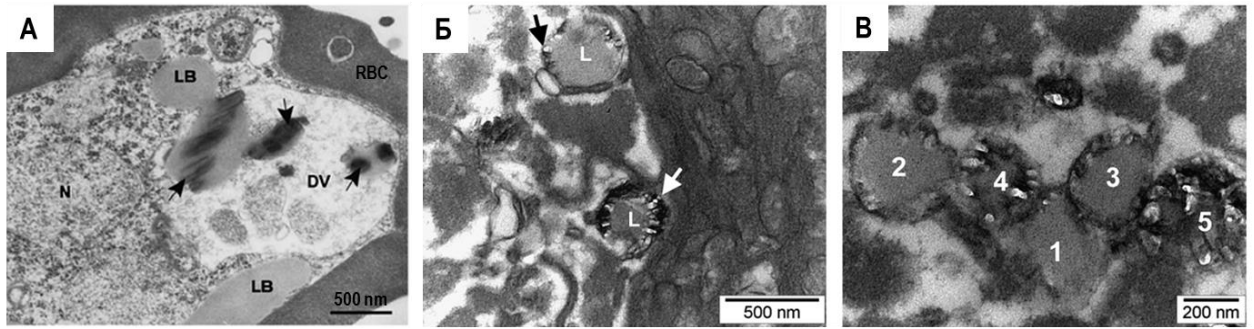


Рисунок 9. А – Наличие материала, позитивного на окраску малахитовым зеленым (окраска на нейтральные жиры), тесно связанного с кристаллами гемозоина (показано стрелками) в пищеварительной вакуоли внутри эритроцитарной стадии *Plasmodium falciparum*. DV – пищеварительная вакуоль; RBC – эритроцит; LB – липидные капли; N – ядро (фотография из статьи Correns, Vielemeyer, 2005). Б, В – просвечивающая электронная микроскопия просвета кишечника женской особи трематоды *Schistosoma mansoni*. Б – липидные капли окружены кристаллами гемозоина (указано стрелками). В – последовательные стадии (указаны цифрами, 1 – начальная и т.д.) формирования гемозоина на липидных каплях. L – липидные капли (фотографии из статьи Correia Soares et al., 2007).

Формирование β -гематина *in vitro* в физиологических условиях проходит эффективно на поверхности липидов в водной среде, при этом молекулярное моделирование показало, что формирование гемозоина *in vivo* может осуществляться через самосборку мономеров гема в димеры, и далее биокристаллизация происходит на разделе фаз липиды/вода (Egan et al., 2006). Таким образом, окончательное представление о механизмах формирования гемозоина *in vivo* у паразитов-гематофагов не сформулировано. Лишь установлено, что у *S. mansoni* этот процесс идет на поверхности липидных капель.

1.2.3. Получение β -гематина *in vitro*

Существует несколько методов получения β -гематина *in vitro*, но наибольшее распространение получили следующие:

1. водный – образование β -гематина происходит из гематина (феррипротопорфирин IX гидроксид) в водной среде, при кислой pH (уксусная, пропионовая или бензойная кислоты) и повышенной температуре (60 – 70°C). Кристаллы формируются около 18 часов (Slater et al., 1991; Bohle et al., 2002);

2. безводный – в атмосфере инертного газа гемин (феррипротопорфирин IX хлорид) растворяется в минимальном количестве 2,6-диметилпиридина в присутствии метанола и ДМСО при комнатной температуре. Кристаллы формируются от 2 недель до нескольких месяцев (Bohle et al., 1997; Bohle et al., 2002).

Как ранее было упомянуто, гемозоин и β -гематин имеют одинаковую структуру и свойства, однако условия, при которых идет образование кристаллов *in vitro*, существенно

вливают на их морфологию (Рисунок 10) (Bohle et al., 1997; Bohle et al., 2002). Кристаллы, полученные первым методом, - мелкие, нерегулярные, могут быть собраны в большие агломераты и обогащены аморфным материалом, в отличие от β -гематина, полученного вторым способом, кристаллы которого значительно крупнее, правильной формы, по морфологии схожи с кристаллами гемозоина у возбудителей малярии, но длиннее последних (см Рисунки 7 А; 10 Б).

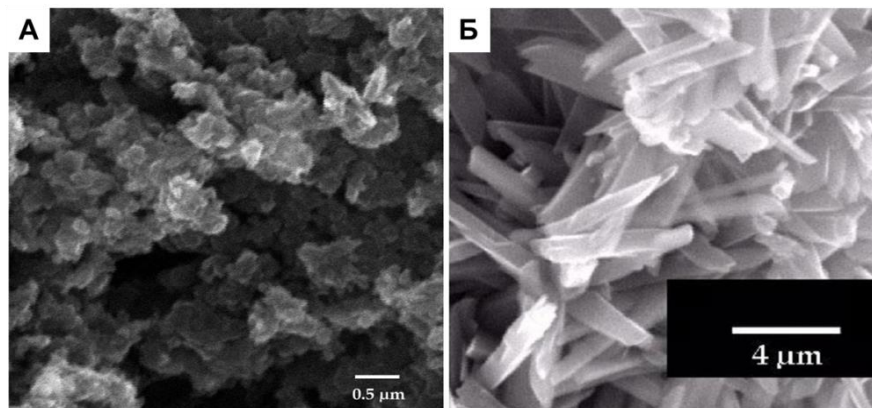


Рисунок 10. Сканирующая электронная микроскопия кристаллов β -гематина полученных с помощью А – водного и Б – безводного методов (фотографии из статьи Bohle et al., 2002).

Многие антималярийные препараты блокируют формирование гемозоина, и тем самым реализуется токсическое действие гема на паразитов (Combrinck et al., 2013; Coronado et al., 2014). Синтетический аналог β -гематин широко используют для изучения процесса формирования гемозоина, свойств уже известных и новых антипаразитарных лекарственных препаратов, а также биологических эффектов гемозоина (Parapini et al., 2000; Tekwani, Walker, 2005; Carter et al., 2007; Sun et al., 2016).

1.2.4. Биологическая роль гемозоина

Биологические эффекты гемозоина можно разделить на 2 группы: имеющие значение для паразита и для хозяина.

Для паразита. Как было описано ранее, образование гемозоина необходимо для обезвреживания гема, образующегося в больших количествах в процессе пищеварения у паразитов-гематофагов (Toh et al., 2010). Для трематоды *S. japonicum* (Katsurada, 1904) было показано, что кристаллы гемозоина в просвете кишечника паразита частично деградируют около микроворсинок, прилегающих к вителлиновым железам. В процессе развития ювенильных гельминтов синхронно с увеличением гемозоина происходило накопление большого количества железа в этих железах, к тому же отмечалась повышенная экспрессия гена белка ферритина, являющегося депо молекул железа. Все это позволило авторам предположить, что формирование и деградация гемозоина служат

источником железа для паразита (Sun et al., 2013; Xiao, Sun, 2017). Яйца *S. mansoni*, и особенно их оболочка, содержат большое количество железа (Jones et al., 2007). Для формирования яиц и развития мирацидиев этого паразита необходим гем и, в частности, железо (Toh et al., 2015).

Для хозяина. В отличие от внутриклеточных паразитов, гельминты-гематофаги регулярно опорожняют содержимое кишечника, и кристаллы гемозоина попадают в полости и ткани хозяина. При шистосомозе гемозоин накапливается в клетках Купфера и других фагоцитирующих клетках внутри и вокруг яйцевых гранул в печени лабораторных животных (Stenger et al., 1967; Grimaud et al., 1976; Tao et al., 2006). Так как скопления клеток, «нагруженных» гемозоином, локализованы с очагами выраженного воспаления и фиброза, ряд авторов предполагает, что существует связь между уровнем депонированного в печени пигмента и фиброзом в печени при шистосомозе (Cameron, Ganguly, 1964; Tao et al., 2006).

При инфекции *O. viverrini* в печени человека и животных в зонах фиброза и неоплазии эпителия желчных протоков выявлено большое количество железосодержащих M2 макрофагов (Bility, Sripa, 2014).

Гемозоин, продуцируемый *P. falciparum* и *S. mansoni*, окисляет полиненасыщенные жирные кислоты *in vivo* и *in vitro*, образуются токсичные гидроксипроизводные арахидоновой кислоты (Xiao, Sun, 2017). Фагоцитоз гемозоина (*S. mansoni*) и окисленных жирных кислот *in vitro* приводит к снижению продукции NO макрофагами, что свидетельствует об иммуномодулирующем действии гемозоина при шистосомозе (Carter et al., 2007). В модели шистосомоза у мышей гемозоин накапливался в макрофагах в печени во время развития индуцированного яйцами паразита Th2 гранулематозного воспаления. Более того, *in vitro* повышение экспрессии маркеров альтернативной активации макрофагов совпадало с фагоцитозом гемозоина (*S. mansoni*) (Truscott et al., 2012). В макрофагах после фагоцитоза гемозоина (*P. falciparum*) активировалось перекисное окисление липидов, и возрастала концентрация окисленных форм ненасыщенных жирных кислот, отражая токсическое воздействие гемозоина на клетки хозяина (Schwarzer et al., 2003).

Обнаружена связь тяжелой хронической малярии и тяжелого шистосомоза с развитием у пациентов и лабораторных животных железодефицитного состояния и анемии (Friedman et al., 2005; Skorokhod et al., 2010). Механизм развития этой патологии пока до конца не ясен, однако в ее развитии может быть задействован гемозоин (Anyona et al., 2012; Thawani et al., 2013). У детей раннего возраста малярия может манифестироваться как тяжелая анемия. Показано угнетающее действие гемозоина,

продуктов ПОЛ (вызванного гемозоином) и макрофагов, находящихся в костном мозге и «нагруженных» этим пигментом, на эритропоэз (Skorokhod et al., 2010; Anyona et al., 2012). При хроническом шистосомозе, вызванном *S. mansoni*, у мышей наблюдается ингибирование эритропоэза (Kamal et al., 1989), хотя механизм этого изменения до сих пор не ясен. У мышей внутривенное введение β -гематина вызывало анемию (значительное снижение содержания эритроцитов и гемоглобина), спленомегалию и увеличение количества макрофагов в селезенке (Sun et al., 2016). При описторхозе, вызванном *O. felineus*, у ряда пациентов установлены нарушения в обмене железа, более выраженная у женщин норма/гипохромная анемия и признаки угнетения эритропоэза (уменьшение количества и нарушение созревания клеток эритроидного ряда, уменьшение фигур митоза) (Limakhina, 1954; Забозлаев, 1973).

Таким образом, гемозоин важен для паразита с точки зрения обезвреживания реакционно-способного гема и, возможно, депонирования железа, которое необходимо для формирования яиц гельминтов-гематофагов и поддержания их жизнедеятельности в организме окончательного хозяина. Для хозяина гемозоин является патогенетическим фактором развития паразитоза и играет роль как токсический, иммуномодулирующий, вероятный провоспалительный и профибротический агент, который может способствовать развитию анемии. Это особенно актуально, поскольку гемозоин может оставаться в клетках и тканях хозяина длительное время (Bouga et al., 2013).

1.2.5. Гемозоин – мишень для диагностики и лечения паразитозов

Процесс биокристаллизации гема является высокоспецифичным и жизненно важным для паразитов, питающихся кровью хозяина, все это делает его привлекательной мишенью для разработки антипаразитарных лекарств. Одним из механизмов действия всех наиболее эффективных антималярийных препаратов производных хинолина и артемизинина является ингибирование формирования гемозоина в пищеварительной вакуоли *P. falciparum* (Combrinck et al., 2013). Блокирование процесса обезвреживания гема ведет к образованию АФК в организме паразита, губительных для его существования, однако до конца механизм действия этих препаратов не ясен.

Использование производных хинолина при шистосомозе у мышей показало ингибирование формирования гемозоина в кишечнике женских особей *S. mansoni*, значительное снижение выживаемости паразитов, уменьшение паразитемии и яйцепродукции (Oliveira et al., 2004; Correa Soares et al., 2009). Артемизинин и его производные также обладают антигельминтной активностью в отношении многих

трематод, в том числе *S. mansoni*, *F. hepatica*, *E. caproni* (Richard, 1964) и *C. sinensis* (Xiao et al., 2004; Keiser, Utzinger, 2007).

Учитывая особенные физико-химические свойства гемозоина, его используют для разработки новых методов диагностики малярии. Так, выделение трофозоитов малярийного плазмодия из эритроцитов и дальнейшее определение гема в кристаллах гемозоина с помощью масс-спектрометрии с лазерной десорбцией и ионизацией является чувствительным и специфичным методом диагностики этой инфекции (Demirev et al., 2002). Предложена магнитооптическая технология для быстрой количественной диагностики малярии, которую можно использовать в неинвазивном формате (Newman et al., 2010).

1.3. Культивирование описторхид

Воспроизведение полного жизненного цикла в лабораторных условиях осуществлено только для некоторых представителей *Schistosoma spp.* и *Echinostoma spp.* (Moloney, 1987; Toledo, Fried, 2005), для трематод семейства Opisthorchiidae возможно лишь частичное его воспроизведение из-за наличия двух промежуточных хозяев. Трудности связаны с отсутствием «чистой» неинфицированной лабораторной линии моллюсков подходящего вида, длительностью содержания пресноводных рыб семейства карповых и сложностью регистрации их инфицирования церкариями. Обычно это искусственное инфицирование лабораторных животных.

Для исследования описторхоза, вызванного *O. felineus* или *O. viverrini*, в качестве модельных животных чаще всего используют сирийских хомячков (*Mesocricetus auratus*) (Waterhouse, 1839) (Chaiyadet et al., 2015a; Matchimakul et al., 2015; Gasser et al., 2016; Avgustinovich et al., 2017; Maksimova et al., 2017; Kovner et al., 2019). Они не являются естественными хозяевами трематод семейства Opisthorchiidae, тем не менее, инвазивный процесс протекает у них столь же длительно и интенсивно, как и у естественных хозяев; кроме того, изменения пораженных органов не теряют типичных черт и не приобретают новых (Астафьев и др., 1989). Лабораторных животных инфицируют *per os* метацеркариями, полученными после пептического переваривания рыбного фарша при 37°C и неоднократного промывания осадка. По истечении необходимого срока животных выводят из эксперимента, и немедленно выделяют паразитов из желчного пузыря и желчных протоков печени.

Предпринимаются попытки культивирования гельминтов *in vitro*, в том числе описторхид (Кондинский, 1974; Tuti et al., 1982; Smyth, 1990; Yoneva, Mizinska-Boevska, 2001; Uddin et al., 2012). Жизнеспособность гельминтов при культивировании *in vitro*

определяют по целостности и цвету их покровов, подвижности и яйцепродукции (Smyth, 1990). Культивирование гельминтов *in vitro* интересует исследователей с точки зрения возможности:

- рутинного поддержания гельминтов в лаборатории без использования лабораторных животных;
- изучения особенностей морфологии, питания и многих других вопросов биологии паразитов;
- проведения иммунологических исследований: получение антигенов, не контаминированных тканями хозяина, разработка вакцин, сокультивирование с отдельными линиями клеток для определения механизмов взаимодействия в системе «паразит – хозяин»;
- наблюдения за действием антигельминтных препаратов.

Несмотря на привлекательность этого метода, полноценное культивирование *in vitro* описторхид на всех стадиях – от метацеркарии до половозрелой мариты – на практике не выполнимо: (i) – существует специфический химический состав среды обитания (биохимические стимулы для развития) и микроокружение в окончательном хозяине; (ii) – для многих трематод, в том числе описторхид, отсутствуют четкие знания об особенностях питания гельминтов; (iii) – возможность обитания в хозяине в нестерильной среде (более актуально для кишечных паразитов), которая также может иметь значение для нормальной жизнедеятельности паразитов.

Несмотря на использование всевозможных вариантов, и сроков культивирования паразитов на различных стадиях жизненного цикла, пока не удалось в полной мере определить оптимальные условия культивирования трематод *in vitro* (Yoneva, Mizinska-Voevska, 2001). Способность поддерживать *in vitro* метаболически активных гельминтов некоторый период времени на данный момент широко используется для получения достаточного количества экскреторно-секреторного продукта для дальнейшего изучения его состава, определения кандидатов для совершенствования серодиагностики и разработки вакцин, а также быстрого тестирования *in vitro* антигельминтных препаратов. При этом для культивирования чаще всего используется стандартная культуральная среда RPMI 1640 с антибиотиками для предотвращения бактериальной контаминации (Jefferies et al., 2001; Perez-Sanchez et al., 2006; Mulvenna et al., 2009; Mulvenna et al., 2010; Uddin et al., 2012).

1.4. Патогенез описторхоза

Описторхоз – системное заболевание, его патогенез сложен и до конца не изучен, однако, ведущую роль в нем играют следующие факторы: механические, токсико-аллергические, нейрорефлекторные, вторичная инфекция (Пальцев, 2005; Sriра, 2003; Saijuntha et al., 2019).

Механическое повреждение органов и тканей в месте обитания описторхов (желчные и панкреатические протоки) обусловлено постоянным деструктивным действием присосок паразитов, а также шпиков, находящихся на поверхности тела ювенильных марит. Присоски нарушают целостность эпителиального слоя в протоках печени, образуются эрозии, которые впоследствии регенерируют, в том числе и под действием стимулов, выделяемых описторхами (Smout et al., 2009). Постоянные механические повреждения также обусловлены способом питания описторхов (см. раздел 1.1.5). При хроническом описторхозе частичная или полная обтурация просвета желчных протоков телами гельминтов, слущенным эпителием, а также пролиферативные изменения эпителия желчных протоков способствуют нарушению оттока желчи и повышению внутрипротокового давления, что приводит к образованию внутрипеченочных и субкапсулярных кистозных расширений (холангиоэктазов) (Яблоков, 1979; Sriра, 2003). Нарушаются состав и реологические свойства желчи из-за ее сгущения и повышения количества слизи в желчных протоках (Степанова и др., 2006; Wongpaitoon et al., 1988).

Токсическое воздействие продуктов жизнедеятельности гельминтов на организм (Кужель и др., 2013; Sriра, 2003), а также сенсибилизация организма хозяина антигенами описторхов способствуют развитию аллергических и иммунопатологических реакций (Яблоков, 1979; Sriра, Kaewkes, 2000b; Sriра, 2003; Wongratanacheewin et al., 2003). Также развитию иммунопатологических изменений и нарушению оттока желчи способствует образование воспалительных гранул вокруг погибших гельминтов и их яиц в желчных протоках. Еще одним фактором развития аллергической перестройки организма является аутоенсибилизация продуктами деградации собственных клеток организма хозяина (гибель холангиоцитов при травматизации эпителия описторхами). Значительная роль аллергических факторов в патогенезе описторхоза подтверждается повышением уровня эозинофилов в крови при описторхозе, эозинофильной инфильтрацией гепатобилиарной системы на ранней стадии заболевания, высоким уровнем IgE (Озерецковская, 2000; Sriра, Kaewkes, 2000b).

Механическое и химическое раздражение интерорецепторов гепатобилиарной системы способствует возникновению патологической нервной импульсации. Роль

нейрорефлекторных факторов в развитии описторхоза подтверждает тот факт, что функциональные и морфологические изменения наблюдаются в органах пищеварительной системы, не являющихся непосредственным местом обитания паразитов (функциональные расстройства и патоморфологические изменения в желудке и двенадцатиперстной кишке, дисфункция сфинктеров желчевыводящих путей) (Яблоков, 1979; Пальцев, 2005).

Холестаза, изменение биохимического состава желчи, увеличение количества слизи, а также дискинезия желчных протоков, желчного пузыря и дисфункция сфинктеров, создают благоприятные условия для присоединения вторичной инфекции (Яблоков, 1979; Степанова и др., 2006; Saltykova et al., 2016). При длительном течении описторхоза все это может способствовать развитию таких осложнений как желчекаменная болезнь, гнойный холецистит, холангит и абсцесс печени (Бражникова, Цхай, 2004; Sripa, 2003).

1.5 Патоморфологические изменения печени при описторхозе

Морфофункциональные изменения в органах паразитирования описторхид у человека и инфицированных животных описаны рядом авторов (Bhamarapravati et al., 1978; Riganti et al., 1989; Sripa, Kaewkes, 2002; Sripa, 2003; Sripa et al., 2003; Pinlaor et al., 2004; Kovner et al., 2019;). При описторхозе, вызванном как *O. felineus*, так и *O. viverrini*, наиболее выраженные патологические изменения наблюдаются в желчных протоках (место обитания гельминтов). Патоморфология печени при описторхозе у людей и лабораторных животных схожа и степень выраженности ее проявлений зависит от срока и интенсивности инвазии (Шмырева, 1966; Kovner et al., 2019; Sripa, 2003).

На начальных этапах развития инфекции, вызванной представителями семейства Opisthorchiidae, в основном изученной на лабораторных животных, морфофункциональные изменения характеризуются развитием паразитарного холангита, перихолангита, сочетающегося с гепатитом (Яблоков, 1979; Дроздов, Зубов, 1982; Bhamarapravati et al., 1978; Pinlaor et al., 2004). Изменения обнаруживаются, прежде всего, во внутрипеченочных желчных протоках, в патологический процесс вовлекаются также перипортальная ткань и паренхима печени. Перипортальная и перидуктальная инфильтрация состоит из большого количества эозинофилов, нейтрофилов и мононуклеарных клеток. Со временем состав клеточных инфильтратов меняется, в нем начинают преобладать лимфоциты и моноциты. В паренхиме печени патологические изменения характеризуются наличием дистрофии и даже некроза (Яблоков, 1979; Дроздов, Зубов, 1982; Bhamarapravati et al., 1978).

Желчные протоки при описторхозе, как правило, расширены, с участками десквамации (в местах прикрепления присосок гельминтов) и гиперплазии эпителия,

увеличено количество муцин-продуцирующих бокаловидных клеток. Перидуктально постепенно нарастает количество соединительнотканых волокон. С началом яйцепродукции в толще стенок желчных протоков вокруг яиц, а также погибших гельминтов, формируются гранулемы. В первом случае они представляют собой локальные участки экссудативно-пролиферативного воспаления; в состав гранулем входят макрофаги и гигантские клетки инородных тел (в них определяются фагоцитированные яйца описторхов), окруженные значительной эозинофильной инфильтрацией, что отражает иммунную перестройку организма (Дроздов, Зубов, 1982; Bhamarapravati et al., 1978; Pinlaor et al., 2004).

При хронической инвазии трематод семейства Opisthorchiidae у лабораторных животных и людей имеется гепатомегалия; поверхность печени может быть мелкобугристой, бугристой; внепеченочные протоки расширены, стенки их утолщены. В динамике описторхоза развивается перидуктальный и перипортальный фиброз (Kovner et al., 2019). Хронический описторхоз характеризуется прогрессирующим продуктивным холангитом. Наблюдается неоднородность эпителиальной выстилки: пролиферация эпителия желчных протоков с развитием аденоматозных разрастаний и иногда полипов, с участками тонкокишечной метаплазии и дисплазии. В составе инфильтратов преобладают лимфоциты и моноциты. Формируются ложные дольки и новые желчные ходы (холангиолы), появляются каналикуло- и холангиоэктазы (Шмырева, 1966; Зуевский, 2010). Гиперпластические процессы и фиброз при хроническом описторхозе захватывают всю желчевыделительную протоковую систему, включая и внепеченочные желчные пути, что может приводить к формированию различных стриктур (Бражникова, Цхай, 2004).

Интраоперационно у пациентов с хроническим *O. felinus*-описторхозом особенностью холангиоэктазов является их преимущественная локализация в левой доле печени, множественность, склонность к абсцедированию (Бражникова, Цхай, 2004). В просвете желчных протоков и холангиоэктазов, содержащих особи гельминтов, у пациентов и лабораторных животных отмечено характерное темное содержимое (Зуевский, 2010; Соловьева и др., 2011).

Описторхоз характеризуется длительным течением (десятки лет) и развитием тяжелых осложнений, таких как холангит, холецистит, дискинезия и стриктуры желчных протоков, абсцесс печени, панкреатит; вероятно, может способствовать возникновению холангиокарциномы (Бражникова, Цхай, 2004; Афтаева и др., 2018; Байкова и др., 2018; Srira et al., 2007; Saijuntha et al., 2019). Международное агентство по исследованию рака признало двух представителей семейства Opisthorchiidae – *O. viverrini* и *C. sinensis* - канцерогенами 1 группы, т.е. хроническая инвазия гельминтов может приводить к

развитию холангиокарциномы (IARC, 2012). *O. felineus* относят к канцерогенам 3 группы, для которых недостаточно данных в пользу канцерогенности для человека и животных. Многие отечественные авторы не подвергают сомнению связь между описторхозом, вызванным *O. felineus*, и опухолями печени (Бражникова, Толкаева, 2002; Бражникова, Цхай, 2004; Байкова и др., 2018). Тем не менее, эти же авторы отмечают, что у пациентов, страдающих хроническим описторхозом, вызванным *O. felineus*, на первом месте среди развивающихся осложнений находятся стриктуры желчных путей различной локализации, на втором – острые и хронические панкреатиты и, наконец, на третьем – рак органов, поврежденных паразитами (поджелудочная железа, печень, желчный пузырь, желчные протоки) (Бражникова, Толкаева, 2002; Бражникова, Цхай, 2004; Афтаева и др., 2018). Тогда как для описторхоза, вызванного *O. viverrini*, ведущим осложнением является холангиокарцинома (Sripa et al., 2007; Saijuntha et al., 2019).

При описторхозе наряду с патологией пищеварительной системы описаны патологические изменения в других органах и тканях организма человека и животных (Яблоков, 1979; Пальцев, 2005; Зуевский, 2010; Соловьева и др., 2011; Sripa, 2003). Исследование суперинвазивного описторхоза, вызванного *O. felineus*, проведенное в эксперименте и на клиническом материале, выявило экссудативно-пролиферативные, воспалительные изменения легких, схожие с проявлениями, наблюдаемыми в гепатобилиарной системе. Авторы полагают, что инициаторами изменений в легких являются метаболиты описторхов, а именно наблюдаемое у экспериментальных животных с 60 суток после инфицирования и в материале от пациентов содержимое темного цвета, обнаруженное в исследуемых тканях и расположенное в виде отдельных гранул или скоплений, окруженных лимфоцитами и макрофагами (Соловьева и др., 2011). Экспериментальный описторхоз, вызванный *O. viverrini*, сопровождается присутствием иммунных комплексов к компонентам тегумента гельминтов и фибрилл амилоида в клубочках почек, канальцевой атрофией, интерстициальным воспалением и фиброзом, что приводит к протеинурии и нарушению функционирования почек (Sripa, 2003).

Несмотря на то, что патоморфологическая картина при описторхозе, вызванном как *O. felineus*, так и *O. viverrini*, по литературным данным, в общем, схожа, сложно оценить наличие особенностей патологии и степень «агрессивности» конкретных представителей семейства Opisthorchiidae. Отсутствует сравнительный анализ сроков появления, выраженности тех или иных изменений, возникающих в печени, что влияет на развитие осложнений и особенности медикаментозного вмешательства в отношении конкретного вида описторхов.

1.6. Экскреторно-секреторный продукт трематод

Широкий спектр секретируемых или экскретируемых молекул, которые нужны для поддержания жизнедеятельности трематод, отражает сложность строения, жизненного цикла и превращений, которые они претерпевают в организме окончательного хозяина (миграция, рост и половое созревание). Все вещества, которые активно секретирует и экскретирует паразит, продукты его жизнедеятельности, содержимое кишечника и то, что высвобождается с поверхности его тегумента, объединено термином экскреторно-секреторный продукт (ЭСП). Компоненты ЭСП играют ключевую роль в различных аспектах взаимоотношений «паразит – хозяин». Они способствуют проникновению гельминтов через ткани хозяина (Robinson et al., 2009), позволяют избегать или модулировать его иммунный ответ (Donnelly et al., 2008; Loukas et al., 2001; Park et al., 2009), участвуют в морфофункциональной перестройке окружающих тканей и обеспечении питательными веществами паразита (Berasain et al., 1997; Daorueang et al., 2012; Liang et al., 2013; Matchimakul et al., 2015; Robinson et al., 2009; Smout et al., 2015; Thuwajit et al., 2006). Все это, в свою очередь, способствует длительному паразитированию гельминтов в организме окончательного хозяина.

ЭСП – это неопределенная сумма молекул и веществ любой химической природы. Из них многие олиго- и полисахариды в составе гликопротеинов и гликолипидов уникальны для гельминтов. Они широко представлены на поверхности тегумента, в кишечнике, секретируются и обладают антигенными и иммуномодулирующими свойствами (Prasanphanich et al., 2013). Гликопротеин (циркулирующий анодный антиген – О-гликан), ассоциированный с кишечником *S. mansoni*, содержит уникальные олигосахаридные повторы и является основой иммунодиагностики этой инфекции в крови и моче (Vermeer et al., 2003). Учитывая постоянное обновление тегумента у трематод, в составе ЭСП должно быть большое количество липидов (Van Hellemond et al., 2006).

У шистосом одним из основных компонентов мембран, в том числе и тегумента, являются фосфолипиды, в составе которых имеются специфические высшие жирные кислоты (Allan et al., 1987). Лизофосфолипиды экскретируются в кровь и, например, монопальмитоил-фосфотидилхолин, как предполагают, участвует в лизисе эритроцитов и последующем прикреплении участков их мембран к тегументу шистосом. Это приводит к тому, что на поверхности тегумента гельминтов экспонируются компоненты мембран хозяина, тем самым маскируя антигенные эпитопы паразита (Golan et al., 1986). Лизофосфотидилсерин *S. mansoni* взаимодействует с иммунными клетками хозяина и обладает иммуномодулирующими свойствами, ингибируя продукцию интерлейкина 12 (ИЛ-12) дендритными клетками (van der Kleij, Yazdanbakhsh, 2003). Так же в состав ЭСП

некоторых гельминтов-гематофагов входит гемозоин – продукт катаболизма гема, компонент содержимого кишечника, который активно выделяется в окружающие ткани хозяина (Chen et al., 2001; Truscott et al., 2012). Его патологическое действие описано выше (см. раздел 1.2.4). Однако наиболее изученными на сегодняшний момент являются белки, входящие в состав ЭСП. Сумму этих белков принято называть секретомом.

Секретируемые белки составляют около 30% от протеома организма и включают функционально различные молекулы: цитокины, хемокины, антитела, гормоны, пищеварительные и другие ферменты, антимикробные пептиды, токсины и т.д. (Ranganathan, Garg, 2009). В связи с бурным развитием геномики, транскриптомики и протеомики имеется несколько подходов к изучению секретома.

Анализ транскриптома основан на компьютерном предсказании секреторных белков по наличию у них сигнальной последовательности, которая является классическим маркером секреции белка. Согласно сигнальной гипотезе, большинство секретируемых белков имеет N-концевой сигнальный пептид, благодаря которому определяется направление транспорта белка в клетке и далее во внеклеточное пространство (Tjalsma et al., 2000).

Для медицински значимых трематод, в том числе представителей семейства Opisthorchiidae (*O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*), существуют транскриптомные и геномные данные, которые могут быть использованы для предсказания белков (Young et al., 2010; Wang et al., 2011; Young et al., 2014; Pomaznoy et al., 2015; Ershov et al., 2019). Разработана автоматизированная система (EST2 Secretome workflow) поэтапной обработки частичных последовательностей кДНК (EST) для поиска и аннотации секреторных белков, которая была успешно применена для предсказания секретома *F. hepatica* (Robinson et al., 2009). Однако, применяя этот подход, исследователи сталкиваются с некоторыми ограничениями и проблемами:

1. Этот анализ основывается на предсказании сигнальных пептидов для определения секретируемости белка. Однако многие секреторные белки не имеют классического сигнального пептида и могут секретироваться в составе везикул (Nakada et al., 2005; Lopez-Villar et al., 2006; Marcilla et al., 2007; Marcilla et al., 2012), соответственно, не могут быть предсказаны с помощью биоинформатического анализа.

2. Возможно отсутствие корреляции между количеством секретируемого белка и уровнем экспрессии мРНК (регуляция на уровнях трансляции и посттрансляционных модификаций) (de Sousa Abreu et al., 2009).

3. Некоторые секреторные белки секретируются во внутренние ткани паразита (Ranganathan, Garg, 2009).

Все это может исказить реальный состав секретома паразитов.

С приходом эпохи масс-спектрометрии и последующего биоинформатического анализа **протеомные подходы** стали предпочтительным способом получения секретомных данных. Из-за трудностей или невозможности изучения ЭСП гельминтов *in vivo*, для исследования используют их культивирование в среде или буферном растворе (см. раздел 1.3). Для анализа полученных белков на данный момент широко используются два подхода, основанных на разделении пептидов в полиакриламидном геле и без него.

Одномерный или двухмерный гель-электрофорез (1DE, 2DE) с последующей масс-спектрометрией позволяет разделить нативные белки с высоким разрешением. При 2DE в первом направлении смесь белков разделяется соответственно их заряду с помощью изоэлектрического фокусирования, во втором – по молекулярной массе. Затем после ферментативного гидролиза белков в геле проводится масс-спектрометрический анализ и биоинформатическая идентификация путем сопоставления масс и зарядов продуктов гидролиза белков с теоретическими значениями (различные базы данных), вычисленными на основе имеющихся аминокислотных и нуклеотидных последовательностей (Barrett et al., 2000; Govorun, Archakov, 2002). Хотя 2DE на сегодняшний момент остается наиболее эффективным методом разделения смеси белков, он имеет ряд ограничений: (i) – плохая воспроизводимость результатов между гелями (повторами эксперимента); (ii) – низкая чувствительность при определении белков с низкой концентрацией в образце и гидрофобных белков мембраны; (iii) – ограничение емкости образца наносимого на гель; (iv) – трудности в визуализации белков, имеющих близкие или экстремальные физические характеристики (изоэлектрическая точка, масса) (Zhou, Yu, 2003).

Подход, основанный на **ферментативном гидролизе полученной смеси белков** без предварительного их разделения в полиакриламидном геле, лишен вышеперечисленных недостатков. Смесь пептидов или пептидных фрагментов разделяют с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и затем анализируют с помощью тандемной масс-спектрометрии (MS/MS). Далее проводят биоинформатический анализ полученных масс-спектров. Белок в смеси считается идентифицированным, если определен хотя бы 1 уникальный по первичной структуре пептидный фрагмент (Barrett et al., 2000).

1.6.1 Секреты трематод, в том числе описторхид

Наиболее хорошо и всесторонне изученными являются секреты *Schistosoma spp.* Для представителей этого рода охарактеризован белковый состав ЭСП на разных стадиях

развития гельминтов (Knudsen et al., 2005; Delcroix et al., 2007; Guillou et al., 2007; Liu et al., 2009; Driguez et al., 2015). Для взрослой особи *S. japonicum* были определены белки в количестве 101, в том числе 53 секреторных, имеющих сигнальный пептид, из которых наиболее представленным был белок, связывающий жирные кислоты (FABP – fatty acid-binding protein) и белки теплового шока: HSP70s, HSP90 и HSP97 (Liu et al., 2009). Авторы полагают, что именно эти белки играют ключевую роль в модулировании иммунного ответа при шистосомозе, вызванном *S. japonicum*. Традиционно белки теплового шока считались внутриклеточными шаперонами, но недавние исследования показали, что HSP70s могут иметь локализацию на поверхности клетки или секретироваться (Mambula et al., 2007). Представители этого семейства белков обнаружены в секретах многих трематод (*S. mansoni*, *E. caproni*, *C. sinensis*) (Knudsen et al., 2005; Sotillo et al., 2010b; Zheng et al., 2011). Обнаруженные в секрете *S. japonicum* актин, белок 14-3-3, аминопептидазы, энолаза и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH) были выдвинуты в качестве потенциальных мишеней для совершенствования терапии и диагностики шистосомоза (Driguez et al., 2016). В ЭСП взрослой стадии *S. japonicum* присутствует ряд антиоксидантных ферментов [тиоредоксин пероксидаза (TRx), супероксиддисмутаза (SOD), тиоредоксин-глутатион редуктаза и глутатион-S-трансферазы (GSTs)] (Liu et al., 2009). Также в нем было обнаружено несколько белков хозяина, в том числе, такие как антимикробный белок CAP-18, иммуноглобулины и компоненты комплемента, предполагают, что источником этих молекул в ЭСП могут быть тегумент паразита или содержимое кишечника (Loukas et al., 2001; Liu et al., 2009). Ряд белков, обнаруженных в ЭСП шистосом (GSTs, FABP, парамиозин, лейцинаминопептидаза и др.), были выбраны ВОЗ для проведения исследований, направленных на разработку вакцин (Driguez et al., 2016; McManus, Loukas, 2008; Wei et al., 2010).

Из ЭСП взрослой *S. mansoni* были выделены внеклеточные везикулы (50 – 130 нм) (Sotillo et al., 2016). В их составе определено 83 белка, включающих экзосомальные маркеры (тетраспанины, HSPs, энолаза, фактор элонгации 1 α , аннексины), сапозины, ферритин, GST, TRx, лейцинаминопептидазу, 14-3-3, кальпаин и др. 26 из идентифицированных белков ранее были предложены в качестве кандидатов для разработки вакцин от шистосомоза (Driguez et al., 2016; Sotillo et al., 2016).

Секретом *F. hepatica* был исследован на различных этапах развития гельминта в окончательном хозяине, а также был определен состав внеклеточных везикул, которые выделяет гельминт в окружающую среду (Jefferies et al., 2001; Morphey et al., 2007; Robinson et al., 2009; Cwiklinski et al., 2015; Di Maggio et al., 2016). В секрете взрослой

особи *F. hepatica* идентифицировано 202 белка, из которых наиболее представленными являлись протеазы: катепсины семейств L и B, легумаин. (Di Maggio et al., 2016). Это согласуется с полученными ранее *in vivo* данными о том, что единственными белками, присутствующими в желчи инфицированных овец, были катепсины семейства L (Morphew et al., 2007). В ЭСП *F. hepatica* также обнаружены цистеиновые и сериновые ингибиторы протеаз, миоглобин, ферритин, защитная молекула гельминта (FhHDM-1), ряд ферментов углеводного обмена, GAPDH, антиоксидантные ферменты, актин и др. (Di Maggio et al., 2016; Morphew et al., 2007). В секрете этих гельминтов присутствовал ряд белков хозяина: антитромбин III, альфа 1 антитрипсин, адипонектин, иммуноглобулины и др. (Di Maggio et al., 2016).

Показано, что *F. hepatica* секретирует по крайней мере два типа везикул, которые отличаются по размеру, составу и месту секреции. Большие везикулы (в среднем 250 нм) выделяются клетками гастродермиса в просвет кишечника гельминта и содержат, в основном, предшественники катепсина L1, что предполагает пищеварительную функцию этих везикул. Мелкие экзосомоподобные везикулы (около 100 нм) секретируются тегументом паразита. В состав этих везикул входит 180 белков, включающих большинство белков описанных ранее в ЭСП *F. hepatica* (Cwiklinski et al., 2015; Di Maggio et al., 2016).

В экзосомоподобных везикулах *E. caproni* были определены белки в количестве 51 (Marcilla et al., 2012). Причем большинство обнаруженных белков присутствует в ранее описанном секрете *E. caproni*. Это белки цитоскелета (актин, тубулин, миозин, парамиозин), ферменты (энолаза, альдолаза, GAPDH и тд.), связывающие Ca белки, HSPs, TPx (Bernal et al., 2006; Guillou et al., 2007; Sotillo et al., 2010b). *In vitro* продемонстрирован захват клетками хозяина (клеточная линия рака эпителия тонкого кишечника крысы – IEC-18) экзосомоподобных везикул *E. caproni*, что предполагает важную роль этих структур в коммуникации между паразитом и хозяином (Marcilla et al., 2012).

Секреты основных медицински значимых представителей семейства Opisthorchiidae также активно изучаются (Suttiaprapa et al., 2018; Prasopdee et al., 2019). С помощью протеомных подходов J. Mulvenna с соавторами (2010) охарактеризовали состав секрета *O. viverrini* и идентифицировали 43 белка, из которых наиболее представленными в ЭСП были энолаза, GSTs, миоглобин, цистатин, а также 3 белка с неизвестной функцией (2 – не имеющих гомологов в базе данных NCBI и 1 – аутоиммунный антиген простаты 2). Дальнейшие исследования показали, что некоторые обнаруженные белки (гранулин, тиоредоксин) потенциально могут играть роль в развитии

холангиокарциномы у окончательного хозяина (Matchimakul et al., 2015; Botelho et al., 2016; Suttiaprapa et al., 2018).

При культивировании ряда клеточных линий, в том числе нормальных холангиоцитов (линия Н69) с ЭСП *O. viverrini*, а также с помощью иммуногистохимических исследований (антитела к белкам – компонентам ЭСП) срезов печени инфицированных животных было продемонстрировано попадание соответствующих белков в клетки хозяина (Suttiaprapa et al., 2008; Chaiyadet et al., 2015b). Оказалось, что *O. viverrini* секретирует экзосомоподобные везикулы, которые проникают в холангиоциты с помощью эндоцитоза. В составе этих везикул было определено 108 белков, из них 42 являются гомологами белков экзосом млекопитающих и 13 белков присутствуют в ЭСП *O. viverrini*, описанном ранее (Mulvenna et al., 2010; Chaiyadet et al., 2015a). Масс-спектрометрический анализ показал присутствие белков – компонентов везикул в образцах желчи инфицированных людей и лабораторных животных. Культивирование холангиоцитов Н69 с экзосомоподобными везикулами *O. viverrini* активировало клеточную пролиферацию и секрецию цитокина ИЛ-6 (Chaiyadet et al., 2015a).

В ЭСП *C. sinensis* определено 39 индивидуальных белков с известной функцией, относящихся к ферментам (антиоксидантные, протеолитические, углеводного обмена и др.), структурным белкам и ряду мембранных белков RAB семейства, а также 71 белок с неизвестной функцией (Zheng et al., 2011). При этом антигенными свойствами в ЭСП *C. sinensis* обладали легумаин, цистеиновые протеазы и фруктозо-1,6-бисфосфатаза (Ju et al., 2009; Zheng et al., 2011).

Молекулярную массу белков ЭСП *O. felineus* исследовали с помощью метода одномерного электрофореза белков в полиакриламидном геле (Котелкин и др., 1998). Было показано, что ЭСП *O. felineus* имеет сложный полипептидный состав, и выявлено не менее 11 белков с молекулярной массой 105, 80, 74, 70, 66, 50, 40, 34, 33, 24, 10 кДа, из которых белки с массой 105, 50, 24, 10 кДа являлись мажорными. Для выявления спектра белков *O. felineus*, взаимодействующих с антителами, содержащимися в иммунных сыворотках инфицированных людей и животных, был проведен иммуноблотинг. Кроличья иммунная сыворотка взаимодействовала с белками с молекулярной массой 116, 105, 80, 70, 60, 50, 44, 40 кДа ЭСП *O. felineus* (мажорные – 116, 80, 70), крысиная сыворотка – с 5 белками (мажорные 116, 66, 50, 24).

Иммунные сыворотки, полученные от инфицированных людей, связывались только с белком с молекулярной массой 105 кДа (Котелкин и др., 1998). По их мнению, наиболее перспективными для дальнейшего более детального изучения с целью совершенствования

иммунодиагностики описторхоза, вызванного *O. felineus*, являлся белок с молекулярной массой 105 кДа. Этой же группой авторов была определена локализация основных антигенов гельминта на ультраструктурном уровне с использованием иммунной сыворотки человека, инфицированного *O. felineus* (Котелкин и др., 2001). Сыворотка наиболее хорошо связывалась со слизеподобным веществом в полости матки, ламеллами кишечника и наружной оболочкой яиц, при этом структурные компоненты тегумента взаимодействовали с иммунной сывороткой человека значительно слабее. Полученные результаты позволили авторам предположить, что основная часть В-клеточного ответа у хозяина формируется на постоянно выделяемые продукты жизнедеятельности паразита, тогда как сам гельминт и его поверхностные структуры вызывают более слабый иммунный ответ организма, что указывает на то, что иммунный ответ формируется в основном на экскреторно-секреторный продукт паразита. (Котелкин и др., 2001). Это согласуется с данными о том, что гельминты, могут адсорбировать на поверхности тегумента хозяйские антигены, тем самым уходят от иммунного контроля организма хозяина (Golan et al., 1986; Loukas et al., 2001). Другие исследования ЭСП *O. felineus* отсутствуют.

Значительная часть секретируемых гельминтами белков – это **протеолитические ферменты**. Они играют ключевую роль в поддержании жизнеспособности паразита, так как облегчают проникновение и миграцию паразитов через ткани хозяина, обеспечивают питание, расщепляя белки хозяина, участвуют в модифицировании или избегании иммунного ответа хозяина (Berasain et al., 1997; Delcroix et al., 2006; Robinson et al., 2009; Hall et al., 2011; Skelly et al., 2014). В секретах трематод были найдены протеазы, относящиеся к таким классам как сериновые, аспарагиновые, цистеиновые (Delcroix et al., 2006; Morales et al., 2008; Hall et al., 2011). Гены цистеиновых протеаз являются одними из наиболее экспрессируемых у трематод. Так они составляют весомую часть транскриптома у *F. hepatica*, *C. sinensis* и *O. felineus* (Cho et al., 2006; Robinson et al., 2009; Pomaznoy et al., 2015). Количество и спектр катепсинов зависят от вида паразита, его стадии развития и значительно варьирует у различных гельминтов (Robinson et al., 2009).

Наиболее представленными цистеиновыми протеазами в секретах трематод являются катепсины L, В, и F. Описана их первостепенная роль в отношениях паразит-хозяин (Robinson et al., 2009). На сегодняшний момент определено изменение состава секретируемых катепсинов в зависимости от стадии развития *F. hepatica*. У только что эксцистированной ювенильной мариты *F. hepatica* преобладают катепсины L3 и В, которые обеспечивают пенетрацию стенки двенадцатиперстной кишки, выход гельминта в брюшную полость хозяина, а затем миграцию и проникновение в желчные протоки

печени через ее фиброзную капсулу. Была также показана необходимость цистеиновых протеаз для успешного эксцистирования и «заселения» хозяина у других гельминтов на ювенильной стадии (Tort et al., 1999; Kaewpitoon et al., 2008).

На стадии взрослой половозрелой мариты протеолитические ферменты необходимы трематодам для питания и обеспечения репродуктивной функции (пластический материал). Так как *F. hepatica* является гематофагом, то катепсины L1, 2 и 5, представленные в секретоме взрослой особи, играют важную роль в расщеплении гемоглобина и других белков крови хозяина (Robinson et al., 2009). Для *S. mansoni* показано, что в расщеплении белков крови в кишечнике паразита участвуют наряду с цистеиновыми и аспарагиновые протеазы (Delcroix et al., 2006; Morales et al., 2008). Мультиферментный каскад деградации гемоглобина у *S. mansoni* начинается с фрагментации глобина, которая осуществляется в основном катепсином D (аспарагиновая протеаза), далее катепсины B1 и L1 осуществляют расщепление до олигопептидов, и, наконец, катепсины C (дипептидилпептидаза) и аминопептидазы расщепляют их до ди-, три- пептидов и аминокислот, которые всасываются в кишечнике гельминта (Delcroix et al., 2006). В содержимом кишечника *S. mansoni* помимо белков крови хозяина обнаружены все катепсины, участвующие в переваривании гемоглобина, а также аспарагинил эндопептидаза (легумаин) (Hall et al., 2011). Предполагается, что этот фермент участвует в активации катепсина B, секретируемого в виде профермента, или совместно с катепсинами B и L напрямую расщепляет гемоглобин и другие белки крови (Brindley et al., 1997; Delcroix et al., 2006).

Для человеческого легумаина показана протеолитическая активность в отношении компонентов внеклеточного матрикса (фибронектин, коллаген I типа) (Shen et al., 2016). Пока ничего не известно о такой активности для легумаина трематод, однако было показано, что в ЭСП *F. hepatica* присутствуют протеазы способные расщеплять компоненты межклеточного матрикса, а именно I, III, IV типы коллагена, фибронектин, ламинин (Berasain et al., 1997). Для *O. viverrini* и *C. sinensis* описаны аспарагинил эндопептидазы, которые локализуются в кишечнике гельминтов и, вероятно, принимают участие в процессе питания и активации других ферментов. Антигенные свойства этих ферментов у обоих гельминтов делают их перспективными белками для совершенствования иммунодиагностики соответствующих гельминтозов (Ju et al., 2009; Laha et al., 2008).

Другими важными белками, присутствующими в большинстве секретомов, являются **антиоксидантные ферменты**: супероксиддисмутаза (SOD), тиоредоксин пероксидаза (TRx) и глутатион-S-трансферазы (GSTs), выполняющие защитную,

детоксикационную функцию, обезвреживая АФК, продуцируемые в процессе жизнедеятельности паразитов, а также клетками иммунной системы хозяина (Callahan et al., 1988; Dzik, 2006; Donnelly et al., 2008). SOD катализирует дисмутацию супероксид-аниона в перекись водорода: $O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. У трематод отсутствует каталаза – основной фермент, обезвреживающий перекись водорода у млекопитающих. Дальнейшее обезвреживание пероксида водорода, из которого может образовываться гидроксильный радикал (OH^{\cdot}), происходит с помощью фермента GPx, который окисляется, а затем восстанавливается с помощью белка тиоредоксина. GSTs – обширное семейство белков, которые связывают глутатион и эндогенные или экзогенные электрофильные компоненты, такие как лекарства или токсические метаболиты, продуцируемые при окислительном стрессе. О важности антиоксидантных ферментов говорит тот факт, что при инкубации шистосомул *S. mansoni* или эксцистированных ювенильных марит *F. hepatica* с ингибиторами пероксидаз и метаболизма глутатиона существенно повышается их смертность под действием фагоцитов, стимулированных липополисахаридом (ЛПС) (Dzik, 2006). Для *O. viverrini* иммуногистохимически определена повсеместная локализация GPx в органах и тканях гельминта, а также присутствие этого фермента в желчи и эпителии желчных протоков печени хозяина, окружающих паразита, со второй недели после инфицирования лабораторных животных (Suttiaprapa et al., 2008). Для ЭСП этого гельминта показана сходная с GPx эпителиальная локализация (Sripa, Kaewkes, 2000b). На модели мышей продемонстрировано, что рекомбинантные белки GPx *S. mansoni* и *F. hepatica* вызывают альтернативную активацию макрофагов (повышение экспрессии гена *ym1*) и развитие Th2 ответа (повышение секреции ИЛ-4 и отсутствие интерферона гамма). При этом активация макрофагов не связана с антиоксидантной активностью этих белков (Donnelly et al., 2005; Donnelly et al., 2008).

Другим компонентом ЭСП *F. hepatica*, обладающими иммуномодулирующими свойствами является небольшой белок 8 кДа, относящийся к новому **классу защищающих гельминта молекул** (HDM – Helminth Defense Molecule) – FhHDM–1 (Robinson et al., 2011). Такое название белок получил из-за структурного и функционального сходства с белками млекопитающих, относящихся к классу защищающих хозяина пептидов (Host Defense Peptides). Это небольшие белки, которые классифицируются по особенностям третичной структуры на дифензины и кателицидины. FhHDM–1 сходен с кателицидинами по структуре (линейная молекула, имеющая на C-конце пептид длиной 21 аминокислота, представляющий собой амфипатическую α -спираль) и некоторым иммуномодулирующим свойствам: (i) – связывается с ЛПС, препятствуя его взаимодействию с рецепторами макрофагов, (ii) – влияет на секрецию

иммуноглобулинов активированными В лимфоцитами. В отличие от кателицидинов, FhHDM-1 не обладает цитолитической активностью в отношении бактерий, ингибирует секрецию провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β и ФНО α макрофагами, нарушает процесс презентации антигена, ингибируя вакуолярные Н⁺-АТФазы в лизосомах, тем самым нарушая процессинг антигена (Robinson et al., 2013).

Так как состав ЭСП *O. felineus* не определен, работы по исследованию свойств, локализации отдельных секретируемых белков, их роли в системе взаимоотношений «паразит – хозяин» практически отсутствуют. Как было упомянуто ранее, иммунные сыворотки людей, инфицированных *O. felineus*, взаимодействовали в иммуноблоте только с белком молекулярной массы 105 кДа экскреторно-секреторного и соматического антигена *O. felineus* (Котелкин и др., 1998). Было сделано предположение, что этим белком может быть парамиозин, так как он соответствующей молекулярной массы и для многих гельминтов описана его выраженная иммуногенность. Получен рекомбинантный белок фрагмента гена парамиозина *O. felineus* с 812 по 1501 пн, так как на этом участке находятся антигенные эпитопы. Мышиные поликлональные антитела, к рекомбинантному белку, показали взаимодействие с белком молекулярной массой около 105 кДа соматического антигена *O. felineus*. В иммуноферментном анализе продемонстрировано взаимодействие гипериммунных сывороток лабораторных животных с рекомбинантным белком парамиозина *O. felineus* (Shustov et al., 2002). Таким образом, несмотря на активное изучение секретомов трематод, и описторхид в частности, ЭСП *O. felineus* остается наименее изученным.

Заключение

Описторхоз/клонорхоз – природно-очаговые заболевания, вызываемые трематодами семейства Opisthorchiidae: *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*. Описторхоз остается одной из серьезных проблем современной медицины ввиду его широкого распространения в странах Европы и Азии, а также высокой интенсивности поражения населения в эндемичных районах. Этот гельминтоз, поражающий преимущественно гепатобилиарную систему и поджелудочную железу, характеризуется длительным течением (десятки лет) и развитием тяжелых осложнений. Основным осложнением *O. viverrini*-описторхоза является развитие холангиокарциномы, тогда как при *O. felineus*-описторхозе это стриктуры желчных протоков.

Структурные изменения гепатобилиарной системы при описторхозе, вызванном *O. felineus* и *O. viverrini*, имеют как сходные (воспаление, клеточная инфильтрация, различные изменения эпителия желчных протоков, фиброз), так и специфические черты

(наличие в просвете желчных протоков и холангиоэктазов не только особей *O. felineus*, но и специфического темного содержимого) у инфицированных людей и животных. Очевидно, что сравнительное патогистологическое исследование изменений печени при экспериментальной моноинвазии *O. felineus* или *O. viverrini*, поможет оценить наличие видоспецифических особенностей патологии (сроки появления, выраженность различных изменений, степень «агрессивности» конкретных представителей семейства *Opisthorchiidae*), от которых зависит развитие осложнений и разработка подходов медикаментозной терапии в отношении конкретного вида описторхов.

ЭСП вносит значительный вклад в возникновение и развитие патологических изменений гепатобилиарной системы в организме окончательного хозяина при описторхозе. Получены данные о белковых компонентах ЭСП описторхид (*O. viverrini*, *C. sinensis*) и описана их роль в патогенезе изменений печени, в т.ч. при канцерогенезе. Результаты протеомных исследований ЭСП используют для поиска потенциальных кандидатов для получения вакцин и совершенствования иммунодиагностики, а также в качестве мишеней для разработки новых лекарственных средств. Для ЭСП *O. felineus* такие данные отсутствуют. Идентификация компонентов ЭСП (белки и содержимое кишечника) *O. felineus* внесет весомый вклад в понимание патогенеза формирующихся нарушений, а также будет полезна для разработки новых подходов к диагностике и лечению описторхоза, вызванного этим гельминтом.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы и реактивы

В работе были использованы следующие реактивы: пепсин («Белмедпрепараты», Белоруссия), бромфеноловый синий («Диаэм», Россия), трис (2-карбокситетил) фосфин гидрохлорид (ТСЕР; «Pierce», США), Трипсин («Promega», США), обезжиренное молоко («AppliChem», Германия), ацетонитрил, муравьиная кислота («Вектон», Россия), Sephadex G100 («Pharmacia», Швеция), трифторуксусная кислота («Fluka», США), 10% формалиновый буфер, гематоксилин Майера, Эрлиха, 1% водный раствор эозина («BioVitrum», Россия), синтетическая покровная среда Bio Mount («BioOptica», Италия), парафин, полный адъювант Фрейнда, неполный адъювант Фрейнда, RPMI-1640, бромистый этидий, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, бычий сывороточный альбумин, дитиотреитол (ДТТ), 25% водный раствор глутаральдегида, Na-какодилатный буфер, лошадиная сыворотка, йодацетамид, натриевая соль гепарина, ортофенилендиамин (ОФД), четырехокись осмия, пенициллин/стрептомицин, ампициллин, АТФ, диаминобензидин (DAB) («Sigma», США), Трис, глицин, моногидратная лимонная кислота, Coomassie Brilliant Blue R-250, Na_2CO_3 , NaHCO_3 , NH_4HCO_3 , NaCl, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), глицерин, натрия додецилсульфат (SDS), бакто-триптон («Amresco», США), акриламид, бисакриламид, β -меркаптоэтанол, персульфат аммония (ПСА), TEMED, («Bio-Rad», США), этанол, метанол, ацетон, ортоксиллол, перекись водорода, хлороформ, серная кислота, соляная кислота, уксусная кислота, NaOH, уранила ацетат, цитрат свинца («Serva», Германия), 2,5-дигидроксibenзойная кислота, α -циано-4-гидрокси- коричной кислоты («Bruker», Германия), Твин 20, агароза, бакто-дрожжевой экстракт, бакто-агар, KH_2PO_4 , («Хеликон», Россия), изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (ИПТГ), дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), маркер молекулярного веса ДНК – лямбда ДНК/BssT1 I (Sty I) (11 фрагментов от 74 п.н. до 19329 п.н.) («СибЭнзим», Россия), маркер молекулярного веса белка (Prestained Protein MW Marker), («Pierce», США).

Праймеры для ПЦР (см. соответствующие разделы главы 2 «Материалы и методы») были синтезированы в ООО «Биоссет» (Новосибирск) на автоматическом синтезаторе АСМ-2000.

2.2. Животные

2.2.1. Получение метацеркарий

Метацеркарии *O. felinus*, *O. viverrini* и *C. sinensis* выделяли из естественно инфицированных язей (*Leuciscus idus*) (Linnaeus, 1758), обитающих в реке Обь в черте г.

Новосибирска, пунтиусов (*Puntius brevis*) (Bleeker, 1849), обитающих в реках провинции Кхон Кен, Таиланд и голянов (*Phoxinus phoxinus mantschuricus*) (Berg, 1907), обитающих в бассейне реки Большая Уссурка, соответственно. Рыбный фарш подвергали ферментативной обработке (11,0 мл концентрированной HCl, 7 г пепсина на 1,0 л дистиллированной H₂O) в течение ночи при 37°C, фильтровали и промывали несколько раз осадок физиологическим раствором. После выделения метацеркарии идентифицировали под световым микроскопом.

2.2.2 Инфицирование лабораторных животных

Хомячков (*M. auratus*) в возрасте 2 - 3 мес инфицировали перорально по 50 метацеркарий *O. felineus*, *O. viverrini* или *C. sinensis* (см. раздел 1.3 Обзор литературы). Эксперимент по сравнению патоморфологических изменений печени хомячков, зараженных *O. felineus* и *O. viverrini*, проводили на базе вивария медицинского факультета, Университета Кхон Кена по протоколу биоэтической комиссии № АЕККУ 05/2550 (Кхон Кэна, Таиланд). Эксперименты по определению белкового состава ЭСП *O. felineus* и анализу содержимого кишечника гельминтов (*O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*) проводили на базе конвенционального вивария ИЦиГ СО РАН по протоколу биоэтической комиссией №7 от 19.12.2011 (Новосибирск, Россия). Животных содержали в стандартных условиях: при световом режиме 12/12 ч (свет/темнота), температуре воздуха 23–24°C, при достаточном количестве гранулированного корма и воды. Все процедуры были проведены согласно принципам гуманности, изложенными в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) от 24 ноября 1986 г.

2.3. Сравнительное гистологическое исследование печени

Для проведения эксперимента по сравнению патоморфологических изменений печени хомячков, инфицированных *O. felineus* и *O. viverrini*, было сформировано 3 группы животных: интактные животные (n = 35), инфицированные *O. felineus* (n = 35), инфицированные *O. viverrini* (n = 35). Через 1, 2, 3, 4, 8, 12 и 24 недели после инфицирования из эксперимента выводили по 5 животных из каждой группы путем декапитации. Для светооптического исследования полученные образцы печени фиксировали в 10% водном нейтральном растворе формалина в течение 16 – 18 часов. После фиксации полученные образцы подвергали гистологической проводке в работе карусельного типа STP120 («Thermo Scientific», США) по стандартному протоколу. Далее образцы заключали в парафиновые блоки, с использованием станции для заливки Microm EC 350 («Thermo Scientific», Германия). Срезы толщиной 4 мкм получали с использованием ротационного микротомы MICROM («Carl Zeiss», Германия). Окраску срезов проводили гематоксилином и эозином с использованием стандартного протокола.

Анализ гистологических препаратов проводили на микроскопе Olympus BX51 (Япония) с объективами UPLanFL x4, x10, x20, x40 и окуляром SWH x10, микрофото съемку – цифровой камерой Olympus XC30. В ходе выполнения работы была проведена оценка следующих патологических изменений в тканях печени хомячков: клеточная инфильтрация (выраженность воспаления), скопление лимфоидных клеток, изменения в строении эпителия желчных протоков (гиперплазия, дисплазия), формирование специфических гранул вокруг яиц паразитов, холангиоэктазы, холангиофиброз, перидуктальный фиброз.

Для оценки степени выраженности этих изменений использовали полуколичественный анализ (Bhamarapravati et al., 1978) с помощью закрытой тестовой площади на 100 точек при увеличении 200:

0 – отсутствие патологических изменений в тканях печени,

1 – слабо выраженное патологическое изменение тканей печени (незначительное изменение строения печени, занимающее менее 25% поля зрения),

2 – умеренно выраженное патологическое изменение тканей печени (заметное изменение, искажающие строение печени, занимающее 25-50% поля зрения),

3 – выраженное патологическое изменение тканей печени (от 50 до 75% поля зрения),

4 – сильно выраженное патологическое изменение тканей печени (изменение, преобладающие в печени, значительно нарушающие её строение, занимающие более 75% поля зрения).

Оценка гистопатологических изменений в тканях печени была проведена для каждого животного (оценивали 50 полей зрения из всех долей печени) с использованием программы ImageJ (США), с дальнейшим вычислением среднего значения исследуемого параметра по группе. При среднем значении, превышающем 1,5; 2,5 и 3,5, ему присваивалась оценка 1*; 2* и 3* соответственно.

2.4. Окраска парафиновых срезов печени иммуногистохимическим методом

Имуногистохимический (ИГХ) анализ распределения экскреторно-секреторного антигена и тиоредоксин пероксидазы (ТРх) *O. felinus* проводили с помощью непрямого пероксидазного метода с применением специфических кроличьих поликлональных антител.

Для проведения ИГХ исследования срезы печени хомячков, инфицированных *O. felinus*, толщиной в 4 мкм депарафинизировали в ксилоле, гидратировали в серии спиртов (от 95% до 70%) и дистиллированной воде. Для демаскировки антигенов стекла нагревали до 95-98°C в 10 мМ цитратном буфере, pH 6,0 («Биомедикал Системс», Россия) в микроволновой печи мощностью 700 Вт, в течение 2-5 мин. После остывания

промывали в дистиллированной воде и однократном фосфатном буфере (PBS) (137 мМ NaCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1,76 мМ KH₂PO₄, pH 7,2). Для блокирования эндогенной пероксидазной активности срезы обрабатывали раствором 3% перекиси водорода в метаноле в течение 30 мин. После промывки водой и PBS проводили обработку срезов блокирующей сывороткой (лошадиная сыворотка в разведении 1/20 в PBS) в течение 30 мин во влажной камере. После удаления сыворотки и промывки в PBS срезы инкубировали с поликлональными кроличьими антителами к ЭСП или TPx *O. felineus* в разведении 1/500 при комнатной температуре 2 часа во влажной камере. Затем, после промывания в PBS, срезы инкубировали с вторичными антителами mouse anti-rabbit IgG-HRP («Santa Cruz Biotechnology», США) в разведении 1/1000 в PBS в течение 1 часа во влажной камере. После промывания в PBS, срезы обрабатывали раствором хромогена (0,5 мг/мл DAB в 50 мМ Tris-HCl буферном растворе, pH 7,4, содержащем 0,02% перекиси водорода) 1-5 мин и дополнительно докрашивали гематоксилином Майера. Затем проводили по спиртам возрастающей концентрации, ксилолам, и заключали под покровное стекло.

2.5. Выделение марит *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*

Через 3 месяца после инфицирования хомячки были эвтаназированы путем декапитации в асептических условиях. Половозрелых марит выделяли из желчных протоков. Далее их несколько раз аккуратно промывали стерильным физиологическим раствором, содержащим пенициллин (100 Ед/мл)/стрептомицин (100 мкг/мл) для отмывки остатков тканей хозяина и крови, а также для предотвращения бактериального загрязнения. Целостность гельминтов оценивали с помощью световой микроскопии. Полностью жизнеспособных особей использовали для получения ЭСП *O. felineus*, кристаллов пигмента, содержащегося в кишечнике паразитов и для дальнейших исследований методами электронной микроскопии.

2.6. Получение экскреторно-секреторного продукта *O. felineus* и выделение белков

Марит *O. felineus* культивировали в чашках Петри (10 особей в 1 мл) в среде RPMI-1640, содержащей пенициллин (100 Ед/мл)/стрептомицин (100 мкг/мл), при 37°C и 5% CO₂ в течение 24 часов аналогично протоколу получения ЭСП для *O. viverrini* (Mulvenna et al., 2010). После инкубации среду собирали, добавляли коктейль ингибиторов протеаз Proteoblock («Fermentas», США) (Itoh et al., 1990) и центрифугировали (15 мин, 700g, при 4°C), затем супернатант еще раз центрифугировали (30 мин, 15000g, при 4°C) для того, чтобы избавиться от яиц паразитов.

Для получения экскреторно-секреторного антигена, дальнейшей иммунизации и наработки поликлональных антител к ЭСП *O. felineus* использовали метод, предложенный

В. Sripa и S. Kaewkes (2000a). Супернатант, полученный после центрифугирования, концентрировали с помощью концентраторов Amicon 5kDa («Millipore», США) диализовали против стерильного PBS при 4°C 2 раза и хранили при – 80°C.

Для проведения масс-спектрометрии белки ЭСП *O. felineus* выделяли с помощью метода, описанного в работе (Wessel, Flügge, 1984): к 1 мл среды с ЭСП добавляли 4 мл метанола, перемешивали, добавляли 1 мл хлороформа, перемешивали и затем добавляли 3 мл дистиллированной воды для разделения фаз. Полученную смесь перемешивали и центрифугировали (1 мин, 9000g). Затем интерфазу и нижнюю фазу аккуратно переносили в 1,5 мл пробирки, добавляли 0,3 мл метанола. Белки осаждали центрифугированием (2 мин, 9000g). Полученные осадки растворяли в 40 мМ аммоний бикарбонатном буфере.

Концентрацию белка оценивали с помощью красителя Кумасси Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad Protein Assay, США) по методу Бредфорда (Bradford, 1976). Поглощение измеряли на многофункциональном микропланшетном ридере Tecan Infinite M200 (Австрия) при длине волны 595 нм. Концентрацию белка оценивали по калибровочной кривой, для построения которой использовали разведения от 1 мкг/мл до 32 мкг/мл (в повторях) стандартного препарата бычьего сывороточного альбумина в соответствующем растворителе (среда RPMI-1640 или аммоний бикарбонатный буфер).

2.6.1. Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Электрофоретическое разделение белков осуществляли согласно ранее опубликованной методике (Laemmli, 1970). В частности, образец (ЭСП *O. felineus*, лизат бактерий или очищенный рекомбинантный белок) содержащий 10 – 15 мкг белка, смешивали с буфером (65,8 мкМ Трис-НСl, рН 6,8; 2,1% SDS; 26,3% глицерин; 20% β-меркаптоэтанол и 0,01% бромфеноловый синий) в пропорции 1:1. Затем смесь прогревали в течение 5 мин при 95°C и наносили на ступенчатый полиакриламидный гель (ПААГ). Белки концентрировали в геле, содержащем 125 мМ Трис-НСl, рН 6,8; 0,1% SDS; 4% акриламид:бисакриламида (37,5:1); 0,05% ПСА; 0,15% ТЕМЕД. Нижний (разделяющий) гель имел следующий состав: 375 мМ Трис-НСl (рН 8,9); 0,1% SDS, 10% - 15% акриламид:бисакриламид (37,5:1), 0,1% ПСА, 0,15% ТЕМЕД. Верхний электродный буфер содержал 25 мМ Трис, 192 мМ глицин (рН 8,3), 0,1% SDS; нижний электродный буфер - 50 мМ Трис-НСl (рН 7,5) и 0,1% SDS. Электрофорез вели при комнатной температуре и силе тока 15 мА на гель в вертикальной электрофоретической камере Mini-PROTEAN® Tetra Cell («BioRad», США). Для визуализации белков, гель окрашивали в течение ночи раствором, содержащим 45% метанола, 10% уксусной кислоты, 3мМ Coomassie Brilliant Blue R-250 при постоянном покачивании, а затем отмывали гель от избытка краски

горячей дистиллированной водой и фотографировали при помощи геля документирующей системы VersaDoc MP4000 («BioRad», США).

2.6.2. Получение поликлональных кроличьих антител

Для получения поликлональных антител использовали стандартный протокол иммунизации кроликов (Cooper, Patterson, 2008). Сначала отобрали 6 мл крови для приготовления нормальной контрольной сыворотки. Далее шли четыре иммунизации с интервалами в две недели. Каждую иммунизацию проводили путем подкожной инъекции в холку животного 1 мл суспензии, содержащей 500 мкг антигена (ЭСП *O. felineus* или рекомбинантный белок TPx). При первой инъекции к раствору антигена добавляли равный объем полного адъюванта Фрейнда. Вторую и третью иммунизации проводили с неполным адъювантом Фрейнда. Четвертая иммунизация была только антигеном. Через две недели после четвертой иммунизации проводили забор крови из ушной вены кролика.

Полученную кровь помещали в термостат (37°C) на 30 мин, до образования сгустка. Сгусток отделяли от стенок стакана и оставляли при 4°C на ночь. Затем сыворотку отбирали в пробирку и центрифугировали 30 мин, 1000g, 4°C. Далее выделяли фракцию IgG из супернатанта (антисыворотки) с помощью аффинной хроматографии на Protein A-sepharose 4B колонке («GE Healthcare Life Sciences», США) по протоколу фирмы-производителя. Очищенные антитела хранили при - 20°C.

2.6.2.1. Иммуноферментный анализ

Определение титра антител, полученных к ЭСП *O. felineus* или рекомбинантному белку, проводили методом непрямого твердофазного иммуноферментного анализа. На планшет Nunc-Immuno™ MicroWell™ («Sigma», США) адсорбировали антиген (ЭСП *O. felineus* или рекомбинантный белок TPx) в концентрации 3 мкг/мл в течение ночи, при 4°C в карбонат/бикарбонатном буфере (15 мМ Na₂CO₃, 30 мМ NaHCO₃, pH 9,6). После удаления иммобилизационного буфера, лунки промыли отмывочным буфером (154 мМ NaCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,2), неспецифическое связывание антител блокировали с помощью карбонат/бикарбонатного буфера pH 9,6, содержащего 5% обезжиренное молоко при 37°C в течение 2 часа. После промывки лунки инкубировали с полученными антителами и контрольной сывороткой неиммунизированного кролика в различных разведениях в инкубационном буфере (137 мМ NaCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 0,8 мМ NaH₂PO₄, 0,05 % Твин 20, pH 7,2), содержащем 2% обезжиренное молоко, 2 часа при 37°C. После промывки лунки инкубировали с конъюгатом goat anti-rabbit IgG -HRP («Sigma», США) в разведении 1:5000 в PBS, 1 час при 37°C в темноте. Промывали планшет отмывочным буфером и PBS. Связывание антиген-антитело определяли с помощью реакции с ортофенилендиамином (ОФД). Свежеприготовленный раствор [8 г ОФД в 20 мл цитратно-

фосфатного буфера (50 мМ моногидратная лимонная кислота, 102 мМ Na₂HPO₄, pH 5,0) с 0,03% перекисью водорода] добавляли по 100 мкл/лунку, инкубировали 30 мин при 37°C, в темноте. Развитие окраски ингибировали добавлением 100 мкл/лунку 0,5 М серной кислоты. Оптическую плотность измеряли на длине волны 492 нм с помощью планшетного анализатора VICTOR X3 Multilabel Plate Reader («Perkin Elmer», Финляндия). На Рисунке 11 представлены результаты иммуноферментного анализа по определению рабочего титра полученных поликлональных антител.

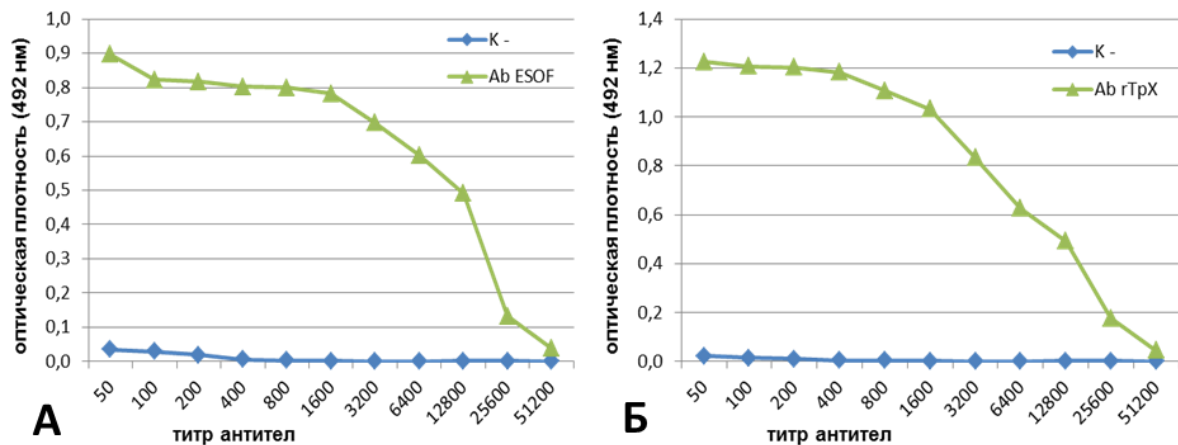


Рисунок 11. Определение титра поликлональных антител к ЭСП *O. felineus* (А) и к рекомбинантному белку TPX (Б) с помощью непрямого твердофазного иммуноферментного анализа. «Ab ESOF» – анти-ЭСП *O. felineus* поликлональные антитела; «Ab rTPX» – анти-рекомбинантный белок TPX поликлональные антитела; «К-» – сыворотка крови неиммунизированного кролика.

2.6.3. Протеолиз отдельных белков экскреторно-секреторного продукта *O. felineus* в полиакриламидном геле

Вырезанные участки полиакриламидного геля (Рисунок 34 в главе Результаты и обсуждение) подвергали протеолизу согласно методу (Rosenfeld et al., 1992) с модификациями. Для этого кусочки геля отмывали от красителя (Кумасси R-250) и SDS в 200 мкл раствора 0,2 М бикарбоната аммония и 50% ацетонитрила три раза по 30 мин при 37°C. Между отмывками кусочки геля обезвоживали, помещая их в 100% ацетонитрил. Для восстановления дисульфидных связей в белках кусочки геля помещали в 10 мМ ДТТ в 0,2 М бикарбонате аммония при 60°C в течение 30 мин, обезвоживали и далее алкилировали остатки цистеина 20 мМ йодацетамидом в 0,2 М бикарбонате аммония при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте. Затем кусочки геля снова обезвоживали в 100% ацетонитриле. Для протеолиза белков к каждому кусочку геля добавляли по 20 мкл раствора, содержащего 2 мкл (250 мкг/мл) трипсина («Promega», США), 40 мМ бикарбонат аммония и инкубировали 30 мин при комнатной температуре при интенсивном помешивании. После этого к кусочкам геля добавляли по 60 мкл буфера для экстракции пептидов (40 мМ бикарбонат аммония pH 8,1; 10% ацетонитрил) и

инкубировали 16-18 часов при 37°C. Пептидные фрагменты белков, экстрагированные из геля, концентрировали и обессоливали на микроколонках Millipore ZIPTIP C18 («Millipore», США). Смесь пептидов элюировали с микроколонки на металлическую мишень масс-спектрометра насыщенным раствором матрикса (10 мг/мл α -циано-4-гидрокси-коричной кислоты в смеси 50% ацетонитрила и 0,1% трифторуксусной кислоты) и высушивали при комнатной температуре.

2.6.4. Протеолиз белков экскреторно-секреторного продукта *O. felineus* в растворе

Трипсинолиз полученных ЭСП белков проводили по стандартной методике, описанной V. Resende с соавторами (2013) с небольшими модификациями: к 2 мкг белка, растворенного в 20 мкл 40 мМ аммоний бикарбонатного буфера (рН 8,0), добавляли ТСЕР («Pierce», США) до конечной концентрации 10 мМ. Белки денатурировали 10 мин при 95°C. После остывания образцов цистеиновые остатки алкилировали 15 мМ йодацетамидом в темноте в течение часа. Трипсин («Promega», США) добавляли в концентрации 30 нг на образец в 40 мМ аммоний бикарбонатном буфере и инкубировали 16 – 18 часов при 37°C.

2.6.5. Масс-спектрометрический анализ белкового состава экскреторно-секреторного продукта *O. felineus*

Анализ белков, элюированных из полосок ПААГ, проводили на масс-спектрометре UltraFlex III MALDI-TOF/TOF («Bruker», Германия) в центре коллективного пользования «Масс-спектрометрические исследования» Международного томографического центра СО РАН (Новосибирск). Масс-спектры пептидных фрагментов снимали в диапазоне молекулярных масс от 200 Да до 4 кДа с точностью до 0,002%, с использованием следующих параметров измерения: отражательный режим, частота импульсов – 25 Гц, детекция положительно заряженных ионов с ускоряющим напряжением – 25 кВ, напряжение на накапливающем электроде – 21,85 кВ, время задержки экстракции ионов – 120 нс. Записывали накопительный спектр, полученный суммированием 20 одиночных спектров. Внешнюю калибровку прибора проводили с использованием точных значений масс калибровочных стандартов смеси пептидов («Bruker», Германия). Тандемные масс-спектры снимались в Lift режиме в диапазоне масс от 40 до 4500 Да. Полученные спектры анализировали в программе FlexAnalysis 3.0 («Bruker», Германия). Масс-листы формировали в автоматическом режиме. Определение белков осуществляли с помощью онлайн версии поисковой программы Mascot (<http://matrixscience.com/home.html>) («Matrix Science», Англия), где выбирался метод анализа на основании полученных пептидных карт или спектров тандемной масс-спектрометрии (MS/MS). Параметры поиска: точность определения масс $\pm 0,05$ Да, гидролизующий фермент – трипсин, допускался 1

пропущенный сайт гидролиза трипсином на пептид, зарядовое состояние ионов пептида 1+, 2+ и 3+, из предполагаемых модификаций в пептидах учитывали карбамидометилирование остатков цистеина и окисление остатков метионина, используемая для поиска база данных – UniProtKB/Swiss-Prot (<http://web.expasy.org/docs/>).

Масс-спектрометрический анализ белковой фракций ЭСП *O. felineus* в растворе проводили на базе лаборатории масс-спектрометрии и аналитической протеомики Канзаского университета (США) методом комбинированного анализа, включающего:

1) разделение гидролизованных пептидов методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) на обращено-фазовой колонке (0,3 x 150 мм, Рермар C₁₈) при скорости потока 5 мкл/мин и линейном градиенте от 5 до 65% ацетонитрила и 0,06% муравьиной кислоты, используя жидкостный хроматограф LC Packings Ultimate Chromatograph («Dionex», США). Пептиды, элюированные с колонки, напрямую отправлялись на ионный источник масс-спектрометра.

2) фрагментацию пептидов (MS/MS), элюированных с колонки, проводили на сопряженном масс-спектрометре ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (LTQ-FT-ICR-масс-спектрометр) («Thermo Finnigan», Германия), сочетающем в себе технологии линейной квадрупольной ионной ловушки и ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием.

2.6.6. Биоинформатический анализ и базы данных

С помощью LTQ-FT-ICR-масс-спектрометрии было получено 6308 масс-спектров пептидов. Их анализ проводили с использованием программы BioWorks 3.2 («Thermo Scientific», США), после чего пептиды/белки идентифицировали с помощью программы Mascot Daemon software версия 2.2.04 («Matrix Science», Англия) с привлечением баз данных, описанных ниже. При поиске использовали следующие параметры: точность определения материнского иона: 0,2 ppm (part per million - миллионных долей), точность определения дочерних ионов: 5,0 ppm, гидролизующий фермент: трипсин, допускался 1 пропущенный сайт гидролиза трипсином на пептид, зарядовое состояние ионов пептида 1+, 2+ и 3+, из предполагаемых модификаций в пептидах учитывали карбамидометилирование остатков цистеина и окисление остатков метионина. Порог значимости в программе Mascot был установлен на значении $p < 0,05$. В программе Mascot, определяющим значением для соотношения белков, с масс-спектрами его пептидов является показатель скор (Score): $\text{Score} = -10 \times \lg P$, где P – вероятность того, что белок, который был сопоставлен масс-спектру по базе данных, является неверным. Пептиды с индивидуальным скором, соответствующим значению ($p < 0,05$), использовали для идентификации белка. Для идентификации белков применяли базу данных ESTs

O. felineus, полученную в нашей лаборатории, состоящую из 2648 последовательностей и 267 контигов (Pomaznoy et al., 2013), а также сформированные нами на основе доступных данных (NCBI nr, SwissProt, январь 2016) специализированные базы данных для близкородственных гельминтов подкласса Digenea. Для определения белков хозяина в ЭСП *O. felineus* все масс-спектры были проанализированы против базы данных, содержащей аминокислотные последовательности белков грызунов, сформированной на основе данных SwissProt (январь 2016).

Предсказание, являются ли секреторными определенные нами белки, осуществляли с помощью программы SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) для поиска классических сигнальных пептидов в белке и SecretomeP 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) – для поиска неклассических секреторных белков. В программе SignalP 4.1 наличие сигнального пептида признавалось при положительном результате при применении обоих алгоритмов (нейронные сети и скрытые Марковские модели) (Emanuelsson et al., 2007). Неклассические секреторные белки предсказывали при получении значения выше 0,5 при использовании алгоритма нейронных сетей и отсутствии предсказанного ранее сигнального пептида (Bendtsen et al., 2004), как это было описано при изучении секрета трематоды *S. japonicum* (Liu et al., 2009). Если белок в ЭСП *O. felineus* определяли с использованием белковых баз данных, то для предсказания использовали аминокислотную последовательность из этих базы данных. При наличии последовательностей EST *O. felineus* определяли соответствующую белку открытую рамку считывания и для выяснения, является ли белок секреторным, брали соответствующую аминокислотную последовательность (Translate tool, <http://web.expasy.org/translate/>). Поиск консервативных доменов и мотивов в аминокислотных последовательностях выполняли с помощью программы InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>). Выравнивание аминокислотных последовательностей белков проводили с помощью программ, представленных на сайте (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/>). Анализ спиральных структур белка (helical wheel analysis) выполняли с помощью программы HeliQuest (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/cgi-bin/ComputParamsV2.py>).

2.6.7. Выделение экзосомоподобных везикул

Из ЭСП *O. felineus* выделяли микровезикулы по стандартному протоколу (Thery et al., 2006) и проводили их электронную микроскопию. Марит *O. felineus* культивировали так же, как описано выше. Среду центрифугировали (10 мин, 300g, 4°C), супернатант переносили в чистые пробирки и центрифугировали (20 мин, 2000g, 4°C), снова переносили супернатант в чистые пробирки и центрифугировали (45 мин, 15000g, 4°C). Далее супернатант

фильтровывали (0,22 мкм), помещали в чистые пробирки и центрифугировали (2 часа, 100000g, 4°C). Перед вторым ультрацентрифугированием удаляли супернатант, в пробирки добавляли стерильный PBS и центрифугировали (2 часа, 100000g, 4°C). Максимально удаляли супернатант и ресуспендировали содержимое с микровезикулами в 50 мкл стерильного PBS. Электронная микроскопия полученных везикул была выполнена совместно с к.б.н. Жуковой М.В. на базе Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН.

2.7. Получение рекомбинантного белка тиоредоксин пероксидазы *O. felineus*

2.7.1. Схема клонирования

Для получения рекомбинантного белка тиоредоксин пероксидазы (r TPx) *O. felineus*, кодирующую этот белок, нуклеотидную последовательность без сигнального пептида клонировали в экспрессирующий вектор pQE-31 («Qiagen», Германия). Схема клонирования и аминокислотная последовательность rTPx *O. felineus* представлены на рисунке 12. В работе для клонирования использовали штамм *E. coli* – XLBlue MRF. Дизайн праймеров выполняли с помощью программы Oligo v. 6.0 (Rychlik, Rhoads, 1989), для теоретического расчета схемы клонирования целевого гена использовали программный пакет Vector NTI 9 («InforMax», США)

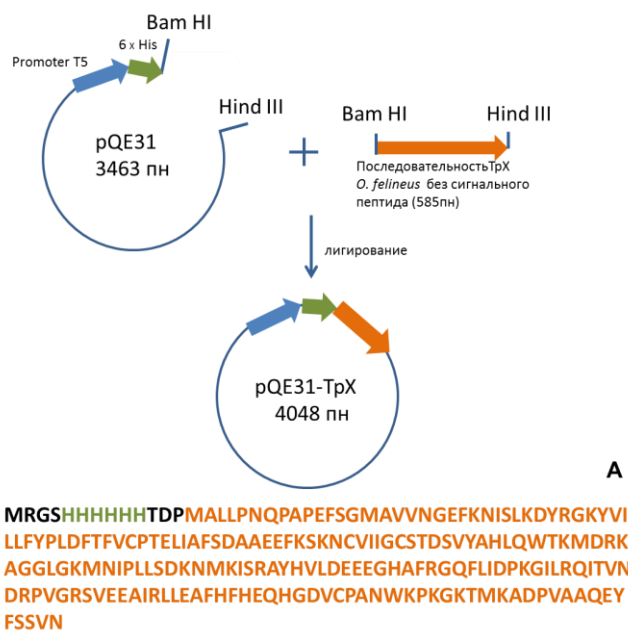


Рисунок 12. А – Схема клонирования последовательности тиоредоксин пероксидазы (без сигнального пептида) в экспрессирующий вектор pQE-31. Вектор pQE-31 и ампликон тиоредоксин пероксидазы (без сигнального пептида) (оранжевая стрелка) были обработаны эндонуклеазами рестрикции BamHI и HindIII и залигированы. Вектор содержит T5 промотор (синяя стрелка), последовательность, кодирующую 6 гистидинов (зеленая стрелка). Б – Аминокислотная последовательность рекомбинантного белка TPx *O. felineus*. Собственно последовательность TPx *O. felineus* выделена оранжевым.

2.7.2. Выделение РНК *O. felineus*, синтез кДНК

Из 20 марит *O. felineus* выделяли РНК с помощью набора Augum™ Total RNA Mini Kit («Bio-Rad», США) согласно протоколу производителя. Концентрацию выделенной РНК, степень ее очистки и целостность определяли на приборе Agilent 2100 bioanalyzer

(США) (RIN >8,7). Для получения кДНК был использован набор RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kits («Fermentas», США) согласно инструкции производителя. Концентрацию ДНК определяли измерением оптической плотности на длине волны 260/280 нм при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000 («Thermo scientific», США).

2.7.3. Получение фрагмента ДНК, соответствующего тиоредоксин пероксидазе *O. felineus* без сигнальной последовательности

С полученной кДНК проводили реакцию амплификации со специфическими для тиоредоксин пероксидазы *O. felineus* праймерами

FTP_xOF -5` cgcggatccGATGGCTCTTCTGCCGCCACC3`,

RTP_xOF -5` cccaagcttCTAGTTAACGGACGAGAAATACTC 3`, содержащими сайты узнавания для эндонуклеаз рестрикции BamHI и HindIII (последовательности подчеркнуты), а также дополнительные нуклеотиды, необходимые для воссоздания правильной рамки трансляции (выделен жирным цветом) и обеспечения эффективного гидролиза ампликона. Объем реакции составлял 50 мкл; реакционная смесь состояла из 25 нг ДНК-матрицы, 0,2 мкМ прямого и обратного праймеров, 0,25 мМ каждого из четырех dNTP, 2 ед. активности ДНК-полимеразы Phusion® («Finnzymes», Финляндия) в соответствующем фирменном однократном реакционном буфере и необходимом объеме деионизированной воды. Для проведения реакций использовали амплификатор Master Cycler gradient («Eppendorf», Германия). Программа амплификации: 1 цикл – 2 мин инкубация при 98°C; 30 циклов – денатурация 20 с при 98°C, отжиг праймеров 30 с при 60°C, элонгация 50 с при 72°C; 1 цикл – элонгация 5 мин при 72°C. Очистку целевых продуктов ПЦР от соли, свободных дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и оставшихся праймеров проводили с помощью набора QIAquick PCR Purification Kit («Qiagen», Германия).

2.7.4. Электрофорез ДНК в агарозном геле

1% агарозный гель готовили на однократном ТАЕ буфере (40 мМ Tris-HCl, 40 мМ CH₃COOH, 2 мМ ЭДТА, pH 8,0) с добавлением бромистого этидия до концентрации 0,5 мкг/мл. Образцы ДНК объемом 5 - 20 мкл смешивали с 1/10 объема буфера для внесения образцов (0,25% бромфеноловый синий в 50% водном растворе глицерина) и помещали смесь в карманы геля. Электрофорез вели в однократном ТАЕ буфере при напряженности электрического поля 5 - 10 В/см в течение 20-50 мин. Изображение геля и детекцию ДНК проводили с помощью системы гель-документации Molecular Imager Gel Doc XR System («BioRad», США). При проведении препаративного гель-электрофореза, необходимые полосы вырезали и фрагменты ДНК элюировали с помощью QIAquick Gel Extraction Kit («Qiagen», Германия) в соответствии с инструкцией производителя. В ходе амплификации

со специфическими праймерами был получен фрагмент, соответствующий по длине открытой рамке считывания гена тиоредоксин пероксидазы (без сигнального пептида), которая составляет 585 нуклеотидов, как показано на рисунке 13.

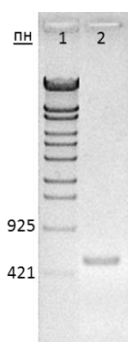


Рисунок 13. Электрофореграмма ПЦР фрагмента тиоредоксин пероксидазы (без сигнального пептида) *O. felineus*. 1 – маркер лямбда ДНК/BssT1 I (Sty I) («СибЭнзим», Россия); 2 – фрагмент ДНК 585 нуклеотидов. пн – пары нуклеотидов.

2.7.5. Получение плазмидной конструкции, экспрессирующей рекомбинантный белок тиоредоксин пероксидазу *O. felineus*

Плазмиду pQE-31 переводили в линейную форму гидролизом соответствующими эндонуклеазами рестрикции BamHI и HindIII («СибЭнзим», Россия): 1 мкг вектора, по 5 ед. активности каждой рестриктазы, в буфере SE-буфер W (10x SE-буфер W: 10 mM Tris-HCl, pH 8,5; 10 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 1 mM DTT) 1 час при 37°C. Реакцию ингибировали нагреванием смеси до 65°C в течение 20 мин. Линейную плазмиду очищали с помощью препаративного электрофорез в 1% агарозном геле. Полученный ампликон тиоредоксин пероксидазы *O. felineus* подвергали гидролизу теми же рестриктазами, и очищали с помощью QIAquick Nucleotide Removal Kit («Qiagen», Германия) согласно инструкции производителя. Далее проводили лигирование полученных фрагментов T4-ДНК-лигазой (100 ед. активности) в течение ночи в буфере (50 mM Tris-HCl pH 7,8; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1 mM АТФ) при 14 – 16°C. Лигазную смесь использовали для трансформации электрокомпетентных клеток *E. coli* (штамм XLBlue MRF).

2.7.6. Приготовление электрокомпетентных клеток и их трансформация

Клетки *E. coli* (штамм XLBlue MRF) помещали в 5 мл стерильной питательной среды LB (Лурия-Бертани) (10 г бакто-триптона, 5 г бакто-дрожжевого экстракта, 10 г NaCl, 1 л воды, pH 7,5) и культивировали в течение ночи при 37°C. Затем 100 мкл ночной культуры переносили в 500 мл среды LB и растили на качалке при 37°C до оптической плотности OЕ₆₀₀ равной 0,6-0,8. После этого клетки охлаждали, осаждали в стерильных пробирках с помощью центрифугирования в течение 3 мин при 1500g. Все дальнейшие процедуры проводили на льду. Осадок ресуспендировали в 50 мл охлажденной бидистиллированной воды и осаждали центрифугированием в течение 10 мин, 1500g при 4°C (процедуру повторяли 2 раза). Затем клетки ресуспендировали в 50 мл 10% глицерина и вновь осаждали. К полученным клеткам добавляли 2 объема 20% глицерина,

суспендировали, делили на аликвоты по 40 мкл и хранили при -70°C . Коэффициент трансформации клеток определяли с помощью эталонной плазмиды pUC19 («СибЭнзим», Россия). Кроме того, электрокомпетентные клетки проверяли на контаминацию посторонними векторами, несущими ген устойчивости к ампициллину.

Трансформацию электрокомпетентных клеток *E. coli* проводили методом электропорации. Оттаивали 40 мкл клеток на льду, добавляли к ним раствор плазмидной ДНК (1 мкл) или продукты реакции лигирования (2 мкл), тщательно перемешивали и переносили смесь в щель (1 мм) кюветы для электропорации. Далее ее помещали в импульсный генератор GenePulser Xcell™ («Bio-Rad», США) и проводили электропорацию ДНК в течение 4-4,8 миллисекунд, при 1800 В. Смесь быстро переносили в пробирку с 1 мл предварительно прогретой до 42°C среды LB и инкубировали 1 час при 37°C . На чашку Петри, содержащую стерильный 1,5% LB агар (к среде LB добавляли 1,5% бакто-агара) с ампициллином (50 мкг/мл), высевали 50 мкл и растили около 16 часов, при 37°C . Полученные отдельные колонии трансформированных клеток использовали для наращивания бактериальной суспензии для скрининга и секвенирования трансформантов.

2.7.7. Скрининг колоний на предмет наличия вставки

ПЦР скрининг колоний (Рисунок 14) проводили в 20 мкл, для этого использовали следующие праймеры: FpQE31 - $5^{\prime}\text{TGAGCGGATAACAATTATAATAG } 3^{\prime}$, RTPxOF - $5^{\prime}\text{ccsaagcttCTAGTTAACGGACGAGAAATACTC } 3^{\prime}$, Taq ДНК-полимеразу («СибЭнзим», Россия) и следующую программу амплификации: 1 цикл - 2 мин инкубация при 95°C ; 25 циклов - денатурация 5 с при 95°C , отжиг праймеров 20 с при температуре 59°C , элонгация 40 с при 72°C ; элонгация 1 цикл - 1 мин 72°C .

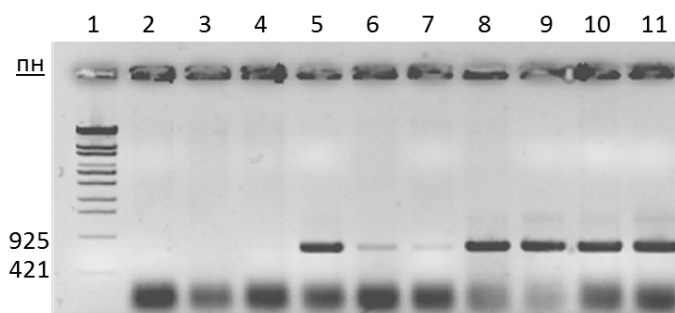


Рисунок 14. Электрофореграмма ПЦР скрининга полученных трансформированных колоний, 1 – маркер лямбда ДНК/BssT1 I (Sty I). 2 - 11 – номера колоний. Несколько колоний, содержащих вставку, были отобраны для секвенирования.

2.7.8. Выделение плазмидной ДНК и секвенирование вставки

Плазмидную ДНК выделяли с помощью GenElute™ Plasmid Miniprep Kit («Sigma», США) согласно протоколу производителя. После очистки плазмидной ДНК проводили реакцию Сэнгера (амплификатор GeneAmp PCR System 9700, «Applied Biosystems», США). Реакционная смесь содержала 1 мкг плазмидной ДНК, 2 пМ праймера (FTPxINOF $5^{\prime}\text{GCAATGGACGAAGATGGATAG } 3^{\prime}$ либо RTPxINOF $5^{\prime}\text{CGAAATGCGTGTCCCTCTT}$

3`), 2 мкл BigDye-буфера и 3 мкл BigDye (Terminator Cycle Sequencing Kit v. 3.1, «Applied Biosystems», США). По окончании реакции образцы ДНК очищали с помощью гель-фильтрации на Sephadex G100. Колонку CentriSep («Applied Biosystems», США) заполняли Sephadex G100, предварительно замоченным в дистиллированной воде на 3 часа, избыток воды удаляли центрифугированием 5 мин, 900g. Колонку переносили в чистую пробирку, наносили образец и центрифугировали 5 мин, 900g. Очищенные образцы ДНК подсушивали на концентраторе Concentrator plus («Eppendorf», Германия) и передавали в Межинститутский центр секвенирования ДНК для анализа на секвенаторе ABI 3100 («Applied Biosystems», США). Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей, полученных после секвенирования, проводили с помощью программы Sequence Scanner Software v1.0 («Applied Biosystems», США).

2.7.9. Получение и очистка рекомбинантного белка тиоредоксин преоксидазы

O. felineus

Для получения рекомбинантного белка тиоредоксин преоксидазы использовали штамм *E. coli* – XLBlue MRF, трансформированный плазмидной ДНК pQE-31-rTPx. Колонию с проверенной секвенированием нуклеотидной последовательностью культивировали в 3 мл среды LB с добавлением ампициллина (50 мкг/мл) при 37°C и постоянном помешивании (180 об/мин). После достижения культуральной суспензией оптической плотности 0,6-0,8 оптических единиц проводили индукцию синтеза рекомбинантного белка добавлением ИПТГ до конечной концентрации 0,6 mM и инкубировали в течение 3 часов при 30°C с постоянным помешиванием (200 об/мин). После этого культуральную суспензию охлаждали и центрифугировали 20 мин, 4000g, при 4°C. Осадок ресуспендировали в лизирующем буфере. Затем его обрабатывали ультразвуком (5 раз по 10 с, 10 Вт, с 30 секундными паузами) с помощью ультразвукового дезинтегратора Vibra Cell™ VCX 130 (Sonics & Materials INC., США) на льду, центрифугировали 15000g, 4°C, 20 мин, полученные супернатант и осадок анализировали на наличие целевого белка с помощью белкового фореа в 10% полиакриламидном геле (Рисунок 38 в главе Результаты и обсуждение). Целевой белок находился в растворимой форме. Далее повторяли культивирование при тех же условиях в объеме 1000 мл среды LB с ампициллином. Очистку рекомбинантного белка, проводили с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA колонке («Qiagen», Германия) согласно рекомендациям производителя, затем диализ против PBS и измеряли концентрацию рекомбинантного белка.

2.8. Анализ содержимого кишечника *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*

2.8.1. Просвечивающая электронная микроскопия кишечника

O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis

Для проведения просвечивающей электронной микроскопии использовали по 5 марит *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*, которых фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида на 0,1 М Na-какодилатном буфере, pH 7,2 в течение 2,5 часов. После этого образцы промывали тем же буфером и дофиксировали в водном растворе 1% OsO₄ в течение часа. Образцы отмывали водой и помещали в 1% водный раствор уранил ацетата на 12 ч при 4°C. Далее образцы обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации, ацетоне и заключали в смолу Agar 100 Resin (Agar Scientific Ltd., Англия). Ультратонкие срезы контрастировали водным раствором уранил ацетата и цитратом свинца по методу (Reynolds, 1963) и анализировали с использованием электронного микроскопа JEM 100 SX (Jeol Ltd., Япония). Микроскопия была выполнена совместно с к.б.н. Жуковой М.В. на базе Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН.

2.8.2. Спектрометрия характеристических потерь энергии электронами кристаллов в кишечнике *O. felineus* и *C. sinensis*

Для спектрометрии характеристических потерь энергии электронами (EELS – Electron energy loss spectroscopy) и их параллельного электронно-спектроскопического изображения (ESI - electron spectroscopic imaging) использовали по 5 марит *O. felineus* и *C. sinensis*. Для этого неокрашенные срезы гельминтов толщиной 70 – 80 нм помещали на медную сеточку и затем напыляли углерод. Образцы анализировали при 120 кВ на микроскопе Libra 120 со встроенным энергетическим Омега-фильтром («Carl Zeiss», Германия). Спектры характеристических потерь энергии электронами получали с образца, ограниченного областью диаметром 0,47 мкм, результирующий спектр являлся усреднением после 15 измерений. Железо идентифицировали по форме спектра в области края ионизации Fe-L_{2,3}. Изображения записывали на цифровую камеру и обрабатывали с использованием программы iTEM («Olympus», Германия). Визуализацию распределения железа получали, используя метод двух окон (the two-window method), время захвата составляло 15 секунд. Спектроскопия была выполнена совместно с к.б.н. Жуковой М.В. на базе Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН.

2.8.3. Выделение и очистка кристаллов из *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*

Выделение кристаллов проводили согласно протоколам M. Chen с соавторами (2001) и M. Truscott с соавторами (2013) с модификациями. По 50 мкг марит *O. felineus*,

O. viverrini и *C. sinensis* в физиологическом растворе последовательно замораживали и размораживали, обрабатывали ультразвуком (10 Вт, 5 с) и центрифугировали 30 мин, при 16000g, 4°C. Осадок ресуспендировали в буфере (2% SDS, 10 mM TrisHCl, pH 8,0), повторно обрабатывали ультразвуком и центрифугировали. К осадку добавляли по 100 мкл (10 mM TrisHCl, pH 8,0) и проводили хлороформ-метанольную экстракцию (Wessel, Flügge, 1984). К 100 мкл образца последовательно добавляли 400 мкл метанола, перемешивали, затем – 100 мкл хлороформа и 300 мкл бидистиллированной воды – для разделения фаз. После тщательного перемешивания центрифугировали (1 мин, 9000g, 25°C). Аккуратно убрали верхнюю фазу, к интерфазе и нижней (хлороформной) фазам добавляли 300 мкл метанола, тщательно перемешивали и центрифугировали (2 мин, 9000g, 25°C). Осадок ресуспендировали в лизирующем буфере (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 25 mM ЭДТА; 100 mM NaCl; 0,5% SDS) и обрабатывали протеиназой К (Boehringer Mannheim GmbH, Германия) (2 мг/мл, при 37°C), в течение 18 часов, затем центрифугировали 10 мин, 21000g. Полученный осадок промывали 3 раза (2% SDS; 10 mM TrisHCl, pH 8,0) и обрабатывали ДНКазой I (Biolabs, Англия) (100 Ед/мл) и РНКазой А (AppliChem, Германия) (1 мг/мл) 2 часа при 37°C. Далее осадок последовательно промывали 3 раза 2% SDS, 3 раза 100 mM бикарбонатом натрия (pH 9,1) в 2% SDS и 3 раза бидистиллированной водой. Так как малярийный пигмент обладает парамагнитными свойствами (Butyukai et al., 2013), далее пробирки с осадком помещали в магнитный планшет DynaMag 2 («Life technologies», Англия) на ночь. Затем удаляли супернатант, а пигмент, который оставался на стенках пробирок, смывали 50 мкл бидистиллированной воды и высушивали на Concentrator Plus («Eppendorf», Германия). В дальнейшем полученные образцы использовали для проведения электронной сканирующей микроскопии, масс-спектрометрии, инфракрасной Фурье-спектроскопии.

2.8.4. Получение β -гематина

Получение β -гематина проводили по методу, описанному С. Fitch и Р. Kanjanangkulpan (1987). 4 мл крови хомячков собирали в пробирку с гепарином (1 Ед/мл крови), разбавляли в два раза физиологическим раствором. Эритроциты осаждали центрифугированием и 3-хратно промывали 10 объемами физиологического раствора. Далее к эритроцитам добавляли 8 объемов дистиллированной воды. Мембраны и клеточный дебрис удаляли с помощью центрифугирования (30 мин, 27000g, 4°C) и к супернатанту добавляли 21% уксусную кислоту. Полученную смесь грели на водяной бане в течение 10 мин при 75°C, затем ее оставляли при комнатной температуре на ночь. Полученный коричневатый преципитат осаждали центрифугированием (30 мин, 27000g, 4°C) и затем осадок промывали 3 раза 1% уксусной кислотой и 3 раза 20 mM TrisHCl, pH

8,0. Далее полученный коричневый осадок обрабатывали так же, как описано выше, начиная хлороформ-метанольной экстракции. Оставшийся на стенках пробирок в магнитном планшете пигмент смывали 50 мкл бидистиллированной воды. Готовили аликвоты по 10 мкл, высушивали их на Concentrator Plus («Eppendorf», Германия) и использовали для проведения электронной сканирующей микроскопии, масс-спектрометрии и инфракрасной Фурье-спектроскопии.

2.8.5. Сканирующая электронная микроскопия выделенных кристаллов

Выделенные кристаллы *O. felineus*, *C. sinensis* и β -гематин ресуспендировали в бидистиллированной воде, обрабатывали ультразвуком 10 с. По 10 мкл каждого образца наносили на углеродную подложку на металлическом столике – держателе, высушивали ночь при комнатной температуре. Затем методом напыления наносили слой золота толщиной 10 нм (Auto Fine Coater JFC-1600, Jeol Ltd., Япония). Изображение было получено на электронном сканирующем микроскопе EVO MA10 («Carl Zeiss», Германия) при ускоряющем напряжении 20 кВ. Сканирующая электронная микроскопия выполнена на базе Центра коллективного пользования Центрального сибирского ботанического сада СО РАН.

2.8.6. Инфракрасная Фурье-спектроскопия выделенных кристаллов

Образец (кристаллы, выделенные из *O. felineus*, *C. sinensis* или β -гематин) в виде тонкого порошка тщательно перемешивали с порошком KBr и прессовали в «таблетку». Инфракрасные спектры поглощения в диапазоне волновых чисел 4000 – 400 cm^{-1} были получены с разрешением 4 cm^{-1} , результирующий спектр являлся усреднением после 32 сканирований на инфракрасном Фурье-спектрометре Tensor 27 («Bruker», Германия). Инфракрасная спектроскопия выделенных кристаллов выполнена на базе Центра коллективного пользования Института органической химии СО РАН.

2.8.7. Масс-спектрометрический анализ кристаллов

Для получения масс-спектров на металлическую мишень масс-спектрометра наносили смесь 1 мкл образца (кристаллы, выделенные из *O. felineus*, *C. sinensis*, то, что было выделено из *O. viverrini* или β -гематин) и 1 мкл матрицы – 2,5-дигидроксibenзойная кислота (10 мг/мл) в 50% ацетонитриле и 0,1% трифторуксусной кислоты и давали высохнуть при комнатной температуре. Анализ проводили на Ultraflex II MALDI-TOF масс-спектрометре («Bruker», Германия) с использованием программного обеспечения FlexControl 3.0 («Bruker», Германия). Спектры снимали в отраженном положительном режиме и анализировали с помощью программы FlexAnalysis 3.3 («Bruker», Германия).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Гистопатологические изменения печени хомячков, инфицированных *O. felineus* и *O. viverrini*

На протяжении всего эксперимента в печени интактных хомячков не обнаружено никаких патологических изменений (Рисунок 15).

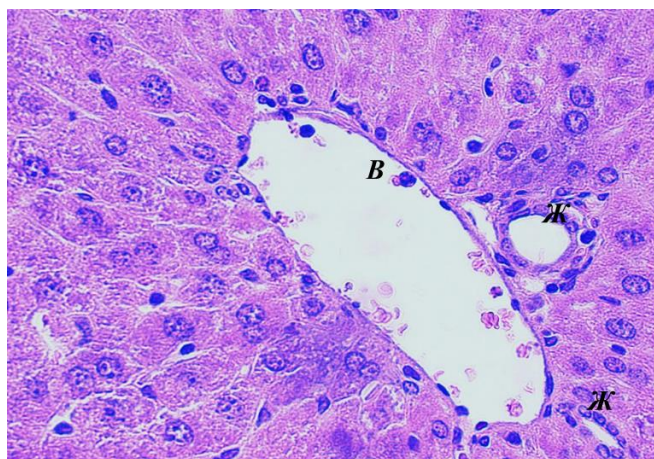


Рисунок 15. Фрагмент печени интактного хомячка. В – вена; Ж – желчный проток; Гематоксилин-эозин. Увеличение x400.

В ранний период заболевания в печени животных, инфицированных этими гельминтами, фиксировали следующие патологические изменения. На 7 сутки после инвазии *O. felineus* и *O. viverrini* у обеих групп животных при макроскопическом исследовании капсула печени была гладкая, блестящая, обычного цвета, на ее висцеральной поверхности отмечались сероватые внепеченочные желчные протоки.³

При микроскопическом исследовании печени животных, инфицированных *O. felineus* или *O. viverrini*, в просвете крупных желчных протоков обнаружены неполовозрелые гельминты. В этих протоках были определены изменения эпителиальной выстилки: участки эрозий (отсутствия эпителия, чаще всего в местах прикрепления гельминтов) сочетались с участками, где холангиоциты отличались полиморфизмом и приобретали вытянутую, призматическую, овальную или округлую форму. В группе животных, инфицированных *O. felineus*, наблюдалась гиперплазия эпителия крупных желчных протоков. В обеих группах соединительная ткань вокруг крупных внутрипеченочных протоков и по ходу ветвей портальной вены становилась отечной.

³ Сравнительный макро и микроскопический анализ печени инфицированных хомячков был проведен на базе Лаборатории патоморфологии Университета Кхон Кен под руководством профессора Vanchoh Sripa, все материалы хранятся в архиве лаборатории.

Вокруг этих протоков, а также мелких междольковых протоков первого порядка, в которых отсутствовали паразиты, начали формироваться клеточные инфильтраты, которые состояли в основном из эозинофилов и мононуклеаров (Рисунок 16).

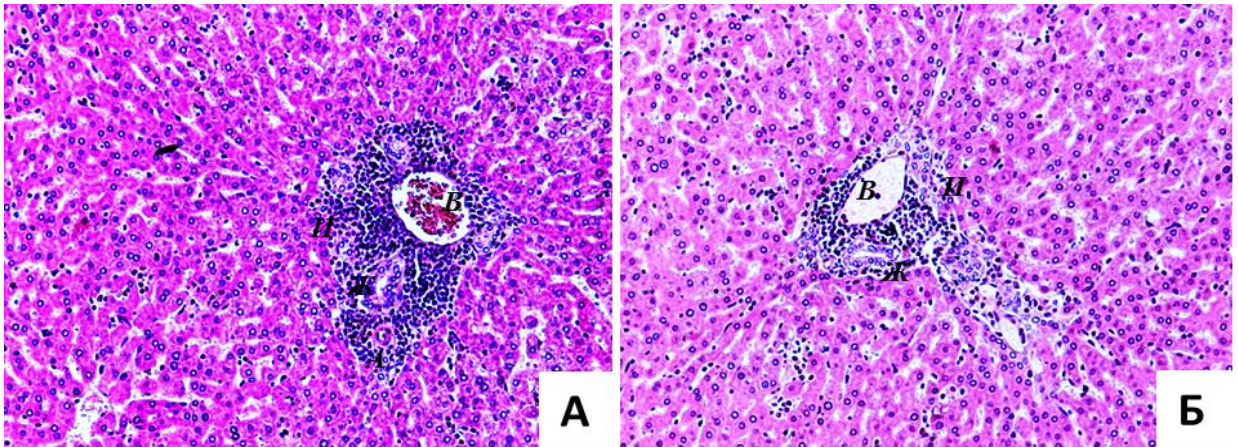


Рисунок 16. Фрагменты печени хомячков, инфицированных *O. felinus* (А) и *O. viverrini* (Б), через 1 неделю после инфицирования. А – артерия; В – вена; Ж – желчный проток; И – воспалительно-клеточная инфильтрация; Гематоксилин-эозин. Увеличение А, Б x200.

Через 2 недели после инфицирования было отмечено нарастание патологических изменений, более выраженное у животных, инфицированных *O. felinus*. Макроскопически на висцеральной поверхности печени под капсулой определялись расширенные внепеченочные желчные протоки с беловатыми стенками, в просвете которых присутствовали гельминты и желчь.

Микроскопически в просвете желчных протоков находились паразиты *O. felinus* или *O. viverrini*, причем только в маритах *O. felinus* определялась матка с яйцами, что свидетельствовало о наступлении их половой зрелости (Рисунок 17). Однако яиц в просвете желчных протоков не было обнаружено, то есть яйцепродукция еще не началась. Таким образом, *O. felinus*, но не *O. viverrini*, в этот период начинали достигать половой зрелости.

В группе животных, инфицированных *O. felinus*, продолжалось увеличение объема клеточных воспалительных инфильтратов, которые распространялись диффузно, захватывая всю толщину междольковой соединительной ткани. В группе животных, инфицированных *O. viverrini*, эти изменения были менее выражены. В обеих группах в составе клеточных инфильтратов, особенно перидуктально, преобладали эозинофилы. Для обеих групп было характерно расширение просвета и утолщение стенок желчных протоков, на некоторых участках отсутствие эпителия (эрозии), а на других эпителиальный пласт становился многорядным, с появлением бухтообразных углублений (участки гиперплазии). Увеличивалось количество бокаловидных клеток. В стенках

желчных протоков особенно крупного калибра, содержащих паразитов, начиналось разрастание соединительной ткани.

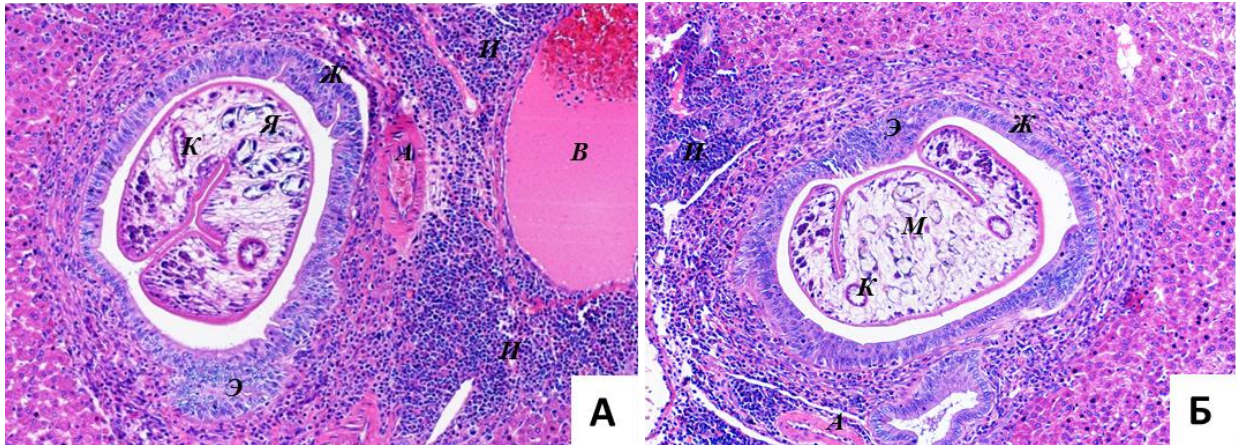


Рисунок 17. Фрагменты печени хомячков, инфицированных *O. felineus* (А) и *O. viverrini* (Б), через 2 неделю после инфицирования. А – артерия; В – вена; Ж – расширенный желчный проток; И – перидуктальная клеточная инфильтрация; Э – гиперплазированный, многорядный эпителий желчного протока; Я – петли матки гельминта, заполненные яйцами; М – петли матки гельминта; К – просвет кишечника гельминта. Гематоксилин-эозин. Увеличение А, Б x100.

В обеих группах к концу 3 недели эксперимента на висцеральной поверхности печени определялись беловатые, расширенные, утолщенные внепеченочные желчные протоки. У животных, инфицированных *O. felineus*, начали появляться единичные подкапсульные холангиоэктазы. В расширенных просветах внутри и внепеченочных желчных протоков были обнаружены половозрелые мариты *O. felineus* или *O. viverrini*, слизь, слущенные клетки эпителия. У животных, инфицированных *O. felineus*, также в просвете желчных протоков присутствовали яйца гельминтов.

Микроскопически в обеих группах в печени прогрессивно нарастали признаки воспаления и фиброза (Рисунок 18). Стенки желчных протоков утолщались за счет разрастания соединительной ткани. Здесь и в перипортальных зонах печени нарастала площадь воспалительных клеточных инфильтратов. Однако эти изменения были более выраженные у животных, инфицированных *O. felineus*.

В группе животных, инфицированных *O. felineus*, в междольковой и перидуктальной соединительной ткани началось формирование новых желчных ходов (холангиол). Интенсивность фиброза была более выражена вокруг крупных желчных протоков. Из-за разрастаний соединительной ткани в паренхиме печени в эти же сроки начинали формироваться ложные дольки. В них и в перипортальных зонах печени продолжалось увеличение площади воспалительных клеточных инфильтратов включающих, лимфоциты, эозинофилы, плазматические клетки, макрофаги и фибробласты, причем они располагались как диффузно, захватывая всю толщину

междольковой соединительной ткани, так и местами имели очаговый характер. При этом в этот период отмечалась максимальная тканевая эозинофилия. Просветы внутрипеченочных желчных протоков в большинстве случаев утрачивали округлый контур, становились фестончатыми за счет участков гиперплазии эпителия и сосочковых выростов соединительной ткани, покрытых высоким призматическим многорядным эпителием (Рисунок 18 А). Появлялись участки с дисплазией эпителия. Также в эпителиальной выстилке протоков встречались эрозии, на дне и по краям которых скапливались яйца гельминтов и клетки воспаления. В толще стенок желчных протоков начиналось формирование гранул из макрофагов, эозинофилов, фибробластов, лимфоцитов и плазматических клеток вокруг яиц паразитов (яйцевые гранулемы), а также паразитарных гранул вокруг погибших гельминтов в просвете желчных протоков, что локально сужало их просвет. В группе животных, инфицированных *O. viverrini*, не было обнаружено гранул, холангиоэктазов и дисплазии эпителия, а остальные патологические изменения были менее выражены.

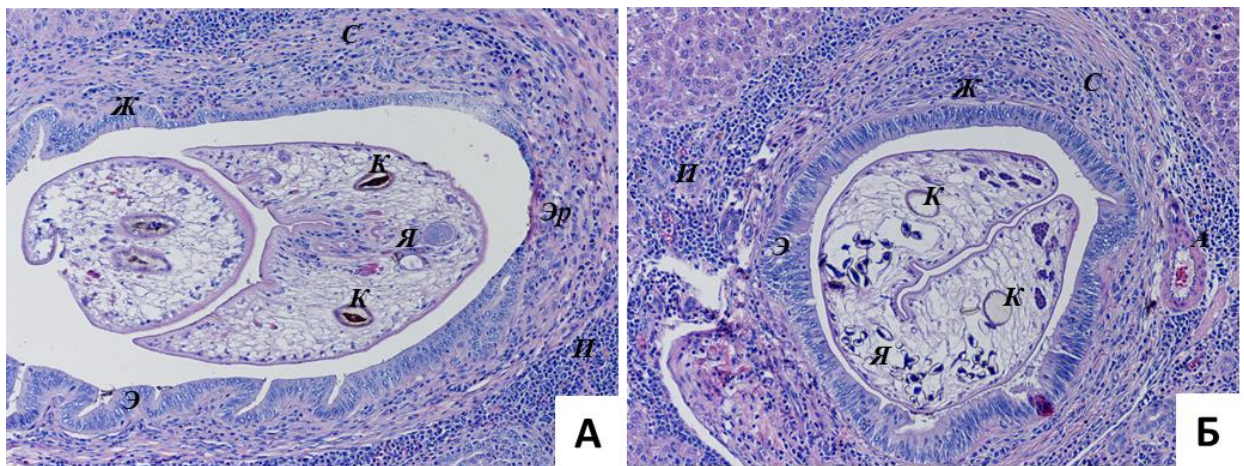


Рисунок 18. Фрагменты печени хомячков, инфицированных *O. felinus* (А) и *O. viverrini* (Б), через 3 недели после инфицирования. А – артерия; В – вена; Ж – расширенный желчный проток; И – перидуктальная клеточная инфильтрация; С – разрастание соединительной ткани; Э – гиперплазированный, многорядный эпителий желчного протока; Я – петли матки гельминта, заполненные яйцами; К – просвет кишечника гельминта. Гематоксилин-эозин. Увеличение А, Б x100.

В просвете кишечника марит *O. felinus* впервые с 3 недели был обнаружен темно-коричневое содержимое, которое далее присутствовало на протяжении всего эксперимента (см. Рисунок 18 А). У *O. viverrini* такого содержимого в просвете кишечника не было ни на 3 неделе после инфицирования, ни в течение всего эксперимента (Рисунок 18 Б).

Таким образом, к 3 неделе после инфицирования марины *O. felinus*, в отличие от *O. viverrini*, начали продуцировать яйца, а в их кишечнике было обнаружено темно-

коричневое содержимое. В печени инфицированных животных определялись паразитарные и яйцевые гранулемы, первые холангиоэктазы и участки дисплазии эпителия желчных протоков.

К концу 4 недели после инфицирования *O. felinus* и *O. viverrini* макроскопически в обеих группах хомячков поверхность печени была блестящая, мелкозернистая. На висцеральной поверхности печени стенки желчных протоков утолщены, в группе животных инфицированных *O. felinus* определялись субкапсулярные холангиоэктазы. В просвете желчных протоков обеих групп животных находились гельминты, их яйца, слизь, желчь.

Микроскопически в расширенных внутрипеченочных желчных протоках обеих групп животных находились половозрелые мариты *O. felinus* или *O. viverrini* (Рисунок 19). Отмечались различные нарушения эпителиальной выстилки: эрозии, уплощение однослойного эпителия, гиперплазия с образованием утолщённых многорядных пластов, участки дисплазии. В группе животных, инфицированных *O. felinus*, формирующиеся паразитарные и яйцевые гранулемы частично или полностью облитерировали просвет некоторых желчных протоков (Рисунок 19 А). Проявления воспаления были максимальными в обеих группах, но у животных, инфицированных *O. felinus*, они более выражены. В составе клеточных инфильтратов начинали преобладать мононуклеарные клетки, и уменьшилось число эозинофилов. Наиболее выраженная инфильтрация была обнаружена в зонах с десквамацией эпителия и образования яйцевых и паразитарных гранул (животные, инфицированные *O. felinus*).

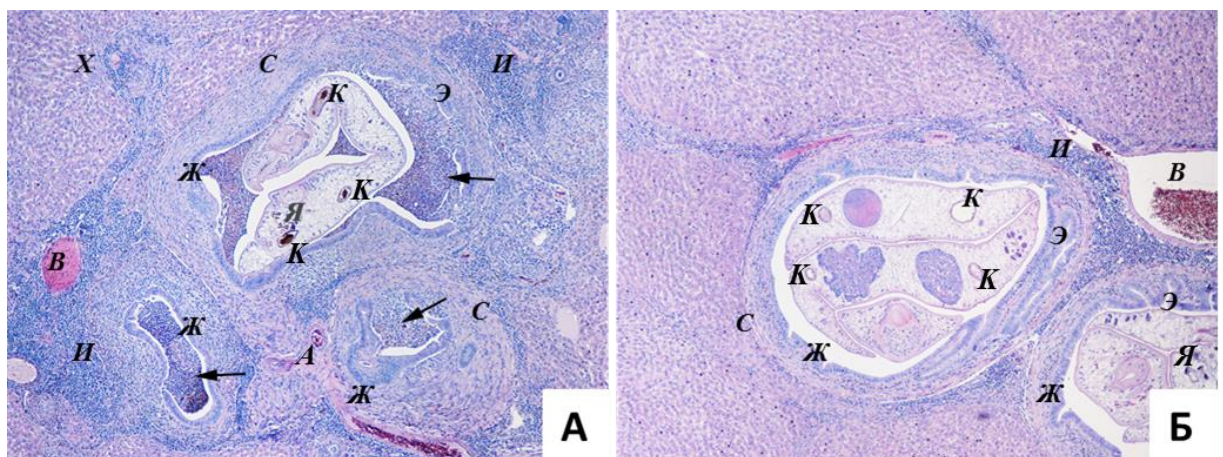


Рисунок 19. Фрагменты печени хомячков, инфицированных *O. felinus* (А) и *O. viverrini* (Б), через 4 неделю после инфицирования. А – артерия; В – вена; Ж – расширенный желчный проток; И – перидуктальная клеточная инфильтрация; С – разрастание соединительной ткани; Э – гиперплазированный многорядный эпителий желчного протока; Х – вновь образованные холангиолы; К – просвет кишечника гельминта; Я – яйца гельминта в полости матки. Стрелки указывают на формирующиеся в просвете желчных протоков гранулемы. Гематоксилин-эозин. Увеличение А, Б х40.

В обеих группах паренхима печени была разделена воспалительными инфильтратами, что подчеркивало ее дольчатое строение. В междольковой соединительной ткани и на периферии соединительной ткани вокруг желчных протоков были вновь образованные холангиолы и артериальные ветви. Отмечался выраженный фиброз вокруг желчных протоков и портальной области. Однако его проявления были более выражены в группе животных, инфицированных *O. felineus*.

Через 2 месяца после инфицирования в обеих группах хомячков поверхность печени была мелкозернистая, местами мелкобугристая, подчеркнуто дольчатое строение. У животных, инфицированных *O. felineus*, внепеченочные желчные протоки были извитыми, с кистозными расширениями, их стенки утолщены, склерозированы. На висцеральной поверхности печени продолжали увеличиваться подкапсульные холангиоэктазы. У животных, инфицированных *O. viverrini*, желчные протоки также были утолщены и расширены. У большинства животных, инфицированных *O. felineus*, имелось кистозное расширение подкапсульного желчного протока на висцеральной поверхности левой медиальной доли печени, заполненное гельминтами и густым, студнеобразным содержимым, включающим темно-коричневое содержимое, по внешнему виду напоминающее темное содержимое кишечника гельминтов (Рисунок 20).

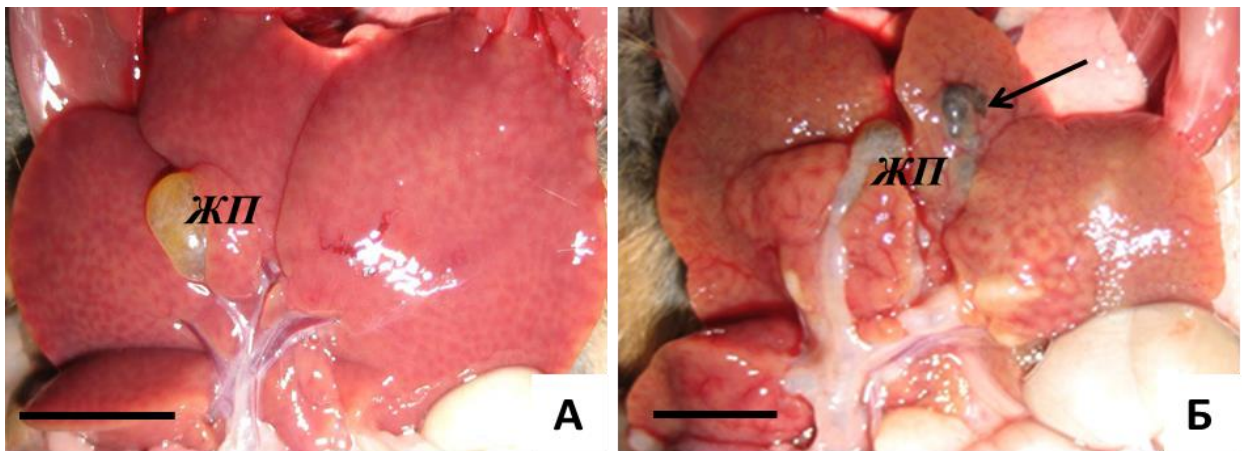


Рисунок 20. Макроскопическая картина висцеральной поверхности печени, желчного пузыря и внепеченочных желчных протоков, у intactных животных (А) и у хомячков через 8 недель после инфицирования *O. felineus* (Б). Стрелка указывает на холангиоэктаз, заполненный темным содержимым. ЖП – желчный пузырь. Шкала 1 см.

При микроскопическом исследовании в просвете крупных, неравномерно расширенных желчных протоков находились гельминты, их яйца, скопления слущенного эпителия, а у животных, инфицированных *O. felineus*, еще темно-коричневое содержимое, аналогичного тому, которое присутствовало в просвете кишечника паразитов.

В печени животных 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 (Рисунок 21, А, Б). В группе животных, инфицированных *O. felinus*, эти изменения были более выраженными.

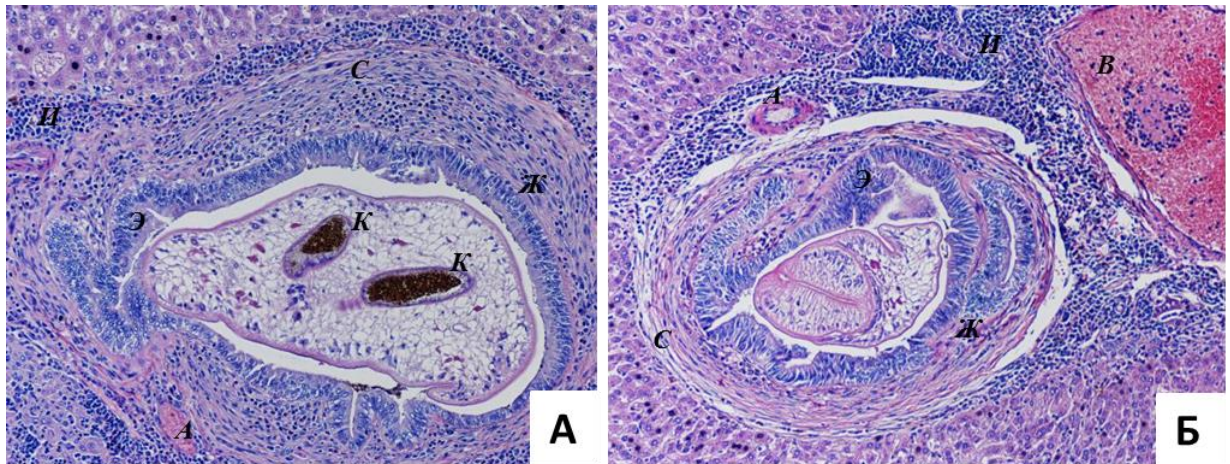


Рисунок 21. Фрагменты печени хомячков, инфицированных *O. felinus* (А) и *O. viverrini* (Б), через 8 недель после инфицирования. А – артерия; В – вена; Ж – расширенный желчный проток; И – перидуктальная клеточная инфильтрация; С – разрастание соединительной ткани; Э – гиперплазированный многорядный эпителий желчного протока; К – просвет кишечника гельминта. Гематоксилин-эозин. Увеличение А, Б x100.

У животных, инфицированных *O. felinus*, встречались участки тонкокишечной метаплазии (Рисунок 22 А).

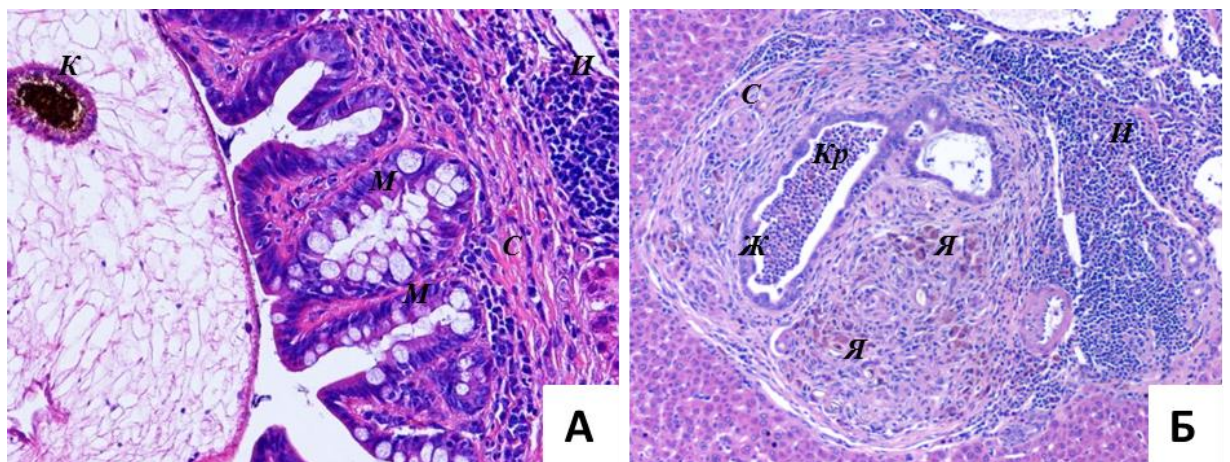


Рисунок 22. Фрагменты печени хомячков через 8 недель после инфицирования *O. felinus*. А – Участок тонкокишечной метаплазии эпителия (М) желчного протока. Б – Склерозированная гранулема, содержащая яйца гельминтов (Я). Ж – частично облитерированный и реканализированный желчный проток; И – перидуктальная клеточная инфильтрация; С – разрастание соединительной ткани; Кр – клетки крови в просвете желчного протока; К – просвет кишечника гельминта. Гематоксилин-эозин. Увеличение А x200, Б x100.

В обеих группах животных вокруг эпителия желчных протоков располагались соединительнотканые волокна с клеточной инфильтрацией, местами перидуктальные клеточные инфильтраты были отодвинуты разросшейся соединительной тканью на периферию. У животных, инфицированных *O. felinus*, перидуктальный фиброз и

клеточная инфильтрация были более выражены. В составе инфильтратов преобладали мононуклеары. Инфильтрация портальных трактов была представлена в виде скоплений лимфоидных клеток.

В печени обеих групп животных отмечались инфильтрация и разрастание соединительной ткани, разделяющее паренхиму на ложные доли, а также большое число вновь образованных холангиол. Гранулемы в стенках желчных протоков, формировавшиеся вокруг яиц паразитов, состояли преимущественно из макрофагов, фибробластов, с единичными эозинофилами, плазматическими клетками и гигантскими многоядерными клетками инородных тел, в которых определялись фагоцитированные яйца. У животных, инфицированных *O. felineus*, наряду с вновь образующимися яйцевыми гранулемами присутствовали и «старые», в которых преобладала соединительная ткань. Паразитарные гранулемы частично или полностью облитерировали просвет желчных протоков (Рисунок 22 Б).

Также у этих животных были обнаружены гранулемы, в которых преобладали клетки с темно-коричневыми гранулами, сходными с темными гранулами в кишечнике *O. felineus* (Рисунок 23).

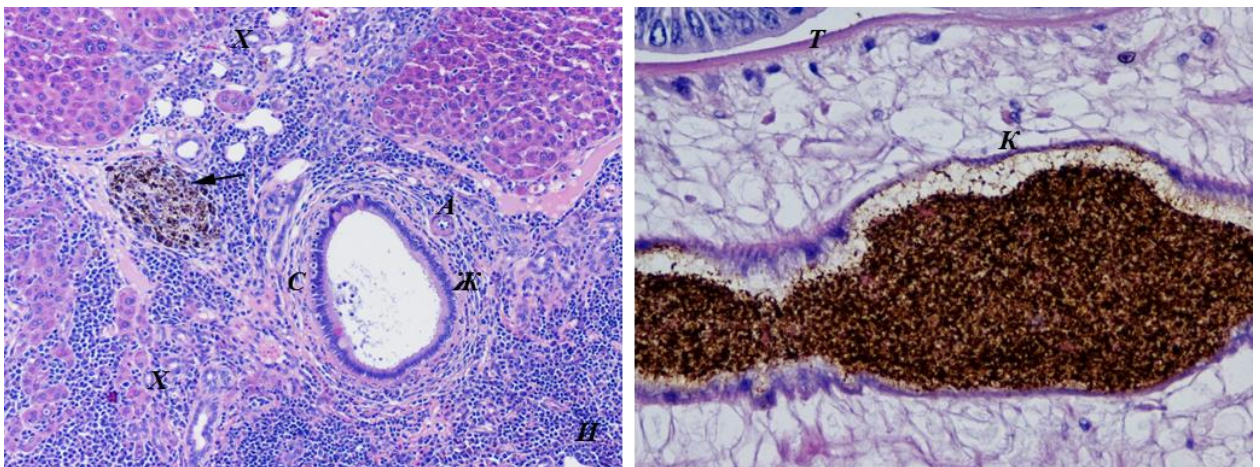


Рисунок 23. А – Фрагмент печени хомячка через 8 недель после инфицирования *O. felineus*. Стрелкой обозначена гранулема с клетками, содержащими темно-коричневые гранулы, сходные с темными гранулами в кишечнике *O. felineus*. Б – просвет кишечника марины *O. felineus* с темно-коричневым содержимым. А – артерия; Ж – расширенный желчный проток; И – перидуктальная клеточная инфильтрация; С – разрастание соединительной ткани; X – вновь образованные холангиолы; К – просвет кишечника гельминта; Т – тегумент гельминта. Гематоксилин-эозин. Увеличение А x100, Б x400

К концу 12 недели в обеих группах инфицированных животных макроскопически печень была увеличена в размере, с мелкобугристой поверхностью, с рисунком, подчеркивающим дольчатое строение. Стенки внепеченочных желчных протоков беловатые, утолщенные. На висцеральной поверхности печени подкапсульные желчные протоки были расширены. У животных, инфицированных *O. felineus*, выраженные

холангиоэктазы, некоторые из которых были заполнены не только паразитами, слизью, желчью, но и черным или темно-коричневым студнеобразным содержимым.

Микроскопически в печени обеих групп животных на первый план в этот период выходил фиброз (Рисунок 24).

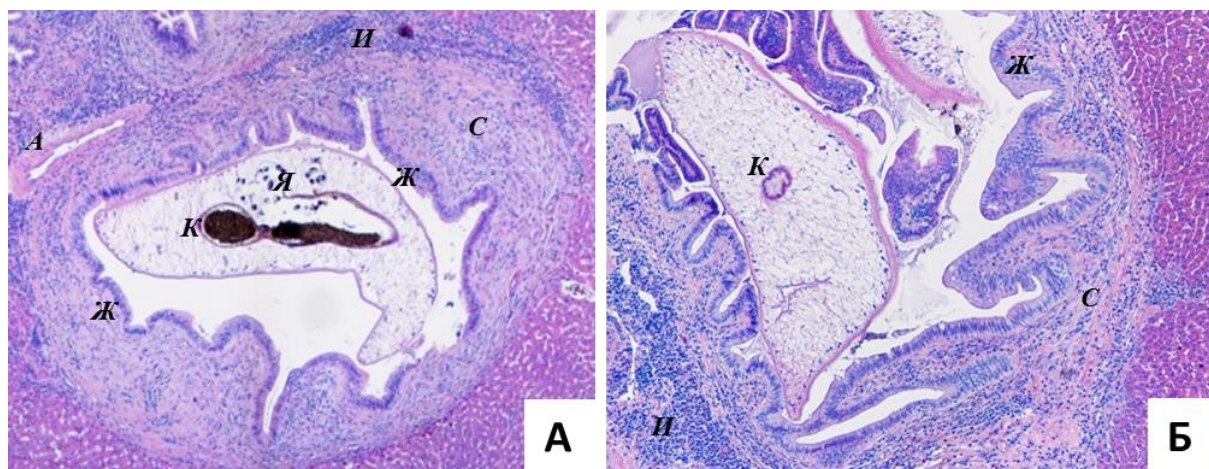


Рисунок 24. Фрагменты печени хомячков, инфицированных *O. felinus* (А) и *O. viverrini* (Б), через 12 недель после инфицирования. А – артерия; Ж – расширенный желчный проток; И – перидуктальная клеточная инфильтрация; С – разрастание соединительной ткани; Я – матка гельминта, заполненная яйцами; К – просвет кишечника гельминта. Гематоксилин-эозин. Увеличение А, Б x100.

У животных, инфицированных *O. felinus*, 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-коричневое содержимое. В обеих группах животных в печени наряду с «созревающими» (подвергающимися фиброзу и кальцификации) появлялись свежие гранулемы. Некоторые гранулемы, располагающиеся в стенке желчного протока, «выбухали» в виде полипов в просвет желчного протока, деформируя и сужая его. Желчные протоки были расширены, имели фестончатый край, выстилавший их эпителий, на большом протяжении был представлен пластами многорядного эпителия с участками дисплазии, местами с участками призматического и уплощенного эпителия или его отсутствием (см. Рисунок 24).

В обеих группах животных, обнаруживались участки тонкокишечной метаплазии эпителия желчных протоков. В клеточных инфильтратах вокруг протоков и сосудов преобладали фибробласты, лимфоциты и другие мононуклеарные клетки, которые располагались как диффузно в толще соединительной ткани, так и с образованием очаговых скоплений на периферии разросшейся соединительной ткани. Выше перечисленные проявления были более выражены в группе животных, инфицированных *O. felinus*, кроме скопления лимфоидных клеток. В паренхиме печени отмечалось

большое количество псевдодолек, в прослойках междольковой соединительной ткани большое количество холангиол.

К 24 неделе после инфицирования в обеих группах животных макроскопически поверхность печени была мелкобугристая, имела сетчатый рисунок. Стенки желчных протоков были беловатого цвета, плотные, утолщенные. В их просвете находились гельминты, слизь, мутная желчь, местами с черными темно-коричневыми студнеобразными массами (у животных, инфицированных *O. felineus*). На висцеральной поверхности печени в обеих группах животных обнаруживались подкапсулярные холангиоэктазы.

В обеих группах животных микроскопически в этот период отмечался перипортальный и перидуктальный фиброз (Рисунок 25).

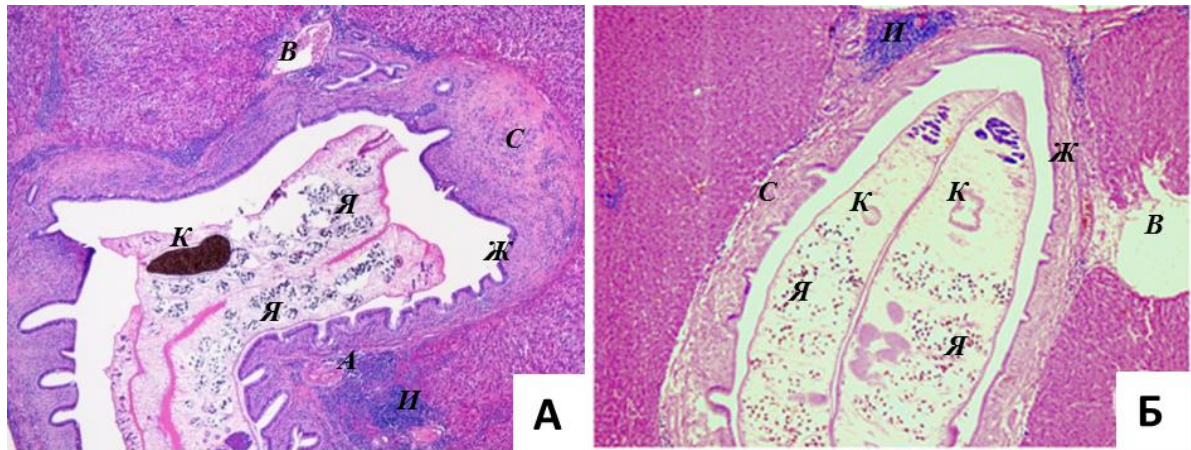


Рисунок 25. Фрагменты печени хомячков, инфицированного *O. felineus* (А) и *O. viverrini* (Б), через 24 недели после инфицирования. А – артерия; В – вена; Ж – расширенный желчный проток; И – перидуктальная клеточная инфильтрация; С – разрастание соединительной ткани; Я – матка гельминта, заполненная яйцами; К – просвет кишечника гельминта. Гематоксилин-эозин. Увеличение А, Б х40.

В группе животных, инфицированных *O. felineus*, фиброз был ярче выражен и его масштабные зоны придавали печени животных сетчатую структуру. В обеих группах инфицированных животных присутствовали как формирующиеся вокруг яиц паразитов, так и подвергающиеся склерозированию гранулемы. Располагавшиеся в стенке мелких протоков они могли быть причиной сужения или облитерации их просвета. Некоторые из протоков подвергались реканализации. В паренхиме склеротические процессы были выражены слабее по сравнению с перидуктальной областью. Желчные протоки были расширены, имели фестончатый край, выстилавший их эпителий, местами был истончен или эрозирован, с многорядными утолщениями гиперплазированного эпителия, с участками дисплазии и тонкокишечной метаплазии (эти проявления более выражены у животных, инфицированных *O. felineus*).

В перидуктальной области клеточные инфильтраты состояли в основном из мононуклеарных клеток и фибробластов. В инфильтратах в перипортальной области преобладали лимфоциты и плазматические клетки, которые располагались как диффузно в толще соединительной ткани, так и образовывали очаговые скопления на периферии разросшейся соединительной ткани. Ложные дольки занимали значительную площадь паренхимы печени. В перидуктальной области и междольковой соединительной ткани было отмечено обилие мелких, ложных холангиол. У животных, инфицированных *O. felinus*, появились очаги холангиофиброза. Следует отметить, что мы не наблюдали ни одного случая развития холангиокарциномы у хомячков в обеих группах на всем протяжении эксперимента.

Для сравнительной оценки спектра патоморфологических изменений и их интенсивности в печени хомячков, инфицированных трематодами *O. felinus* и *O. viverrini*, нами проведен полуколичественный анализ гистологических срезов, полученных через 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24 недели после инфицирования (Рисунок 26).

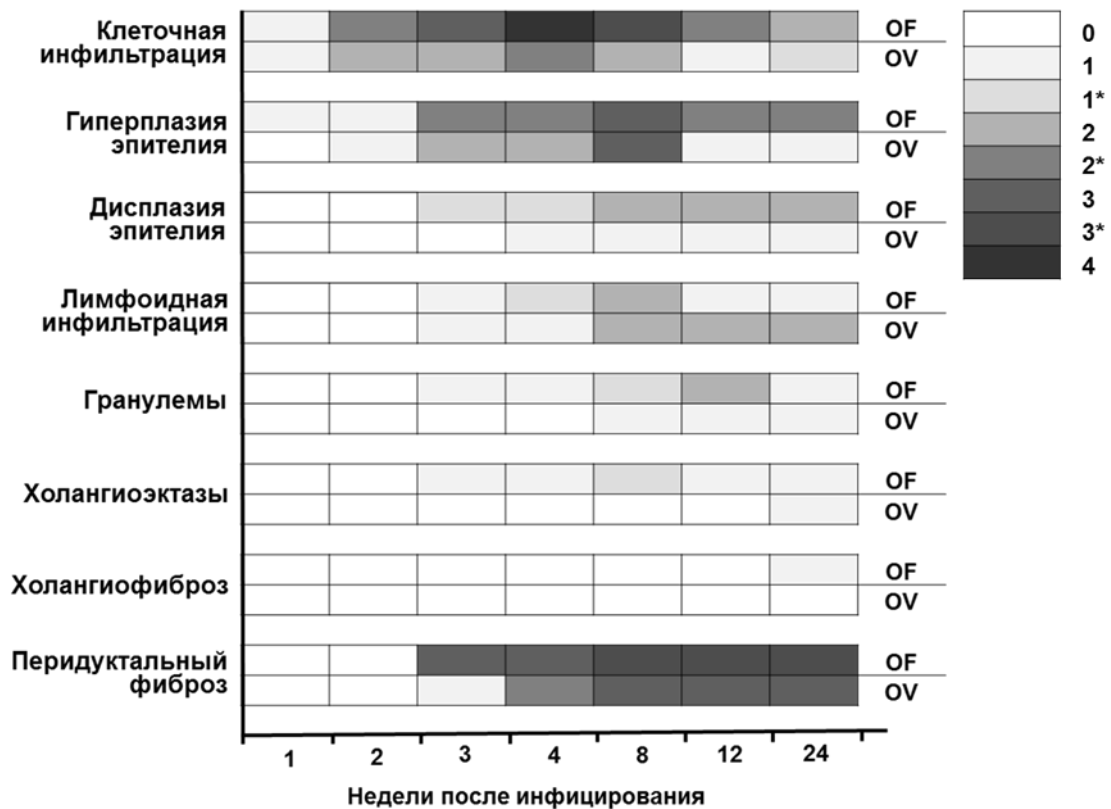


Рисунок 26. Динамика патоморфологических изменений в печени хомячков, инфицированных *O. felinus* (OF) и *O. viverrini* (OV), с 1 по 24 недели после инфицирования. Справа шкала интенсивности проявления изменений от 1 (минимальное) до 4 (максимальное). Звездочкой обозначено увеличение интенсивности проявления.

Сопоставление изменений, наблюдаемых при описторхозе, вызванном этими гельминтами, указывает на схожий характер повреждений, сопутствующих обоим

инфекциям. Это воспаление, клеточная инфильтрация (со сменой доминирующего пула клеток с эозинофильного на ранних этапах инфекции на мононуклеарный позднее), гиперплазия и дисплазия эпителия желчных протоков, образование специфических гранул (паразитарных и вокруг яиц паразита) и, наконец, фиброз. Однако сроки появления этих изменений и степень их выраженности были различны у животных, инфицированных *O. felineus* и *O. viverrini* (см Рисунок 26).

Описанные нами гистопатологические изменения печени хомячков, инфицированных *O. felineus*, согласуются с литературными данными (Яблоков 1979; Тун, Белобородова, 1993; Berger et al., 1998, Kovner et al., 2019), а инфицированных *O. viverrini* – (Bhamarapravati et al., 1978; Riganti et al., 1989; Sripa, Kaewkes, 2002; Sripa 2003; Pinlaor et al., 2004; Wonkchalee et al., 2012). Данное исследование впервые сравнивает патоморфологические изменения гепатобилиарной системы золотистых хомячков, вызванные двумя трематодами рода *Opisthorchis*: *O. felineus* и *O. viverrini*, в одном эксперименте.

На раннем этапе развития описторхоза (1 – 4 недели после инфицирования), вызванного *O. felineus*, наблюдались следующие нарушения. Проявления воспаления, появившись к концу 1 недели инфекции, постепенно нарастали, и к концу 4 недели были максимальными, также на 3 неделе отмечен наивысший подъем тканевой эозинофилии за весь период эксперимента. К этому сроку гельминты достигли половой зрелости, и начиналась яйцепродукция. Впервые на 3 неделе после инфицирования началось формирование паразитарных гранул, и гранул вокруг яиц паразитов, появилось темно-коричневое сдержимое в просвете кишечника *O. felineus*. К 4 неделе нарастали гиперплазия и дисплазия эпителия, разрастание соединительной ткани перидуктально и перипортально, появились ложные дольки. Таким образом, на ранних сроках инвазии, в печени хомячков, были отмечены изменения стенок желчных протоков, соответствующие паразитарному холангиту, иммуноаллергической перестройке организма хозяина.

У животных, инфицированных *O. viverrini*, наблюдалась схожая гистологическая картина повреждений гепатобилиарной системы. Однако, хотя клеточный состав инфильтратов в стенках желчных протоков был идентичен для обеих инфекций, ее объем оказался меньше в тканях хомячков, инфицированных *O. viverrini*. Следует отметить, что у этих животных перидуктальный фиброз также был менее выражен, яйцепродукция у гельминтов начиналась позднее (после 4 недели), а возникновение яйцевых гранул и холангиоэктазов мы отметили только после 8 недели инфицирования. Наши результаты согласуются с литературными данными. Так, Р. Pinlaor с соавторами (2004) отмечали, что перидуктальный фиброз, расширение желчных протоков, формирование холангиол и

гранулематозное воспаление вокруг погибших *O. viverrini*, а также наличие в тканях их яиц было зафиксировано в печени хомячков только после 1 месяца инфицирования 50 метацеркариями *O. viverrini*, при наступлении хронической фазы заболевания.

На поздних сроках инфицирования описторхоз в обеих группах проявляется хроническим продуктивным холангитом с перихолангитическим фиброзом, которые были более выражены в группе животных инфицированных *O. felinus* (см. Рисунок 26).

При описторхозе закономерно повреждение эпителия желчных протоков, так как гельминт непосредственно и постоянно контактирует с ним, подвергая его постоянным механическим повреждениям присосками и на ранних стадиях инфекции шипиками (Sripa, 2003). Десквамация эпителия ведет к гибели этих клеток и высвобождению, ряда биологически активных веществ (цитокины, гистамин, стимуляторы клеточной пролиферации, хемоаттрактанты и др.), имеющих значение в развитии воспаления и регенерации в зоне повреждения стенки желчного протока (Isse et al., 2005; Tabibian et al., 2013). Нарушение целостности эпителия желчных протоков приводит к разрыву лимфатических и кровеносных капилляров, образующих перибилиарные сплетения вокруг протоков (Tabibian et al., 2013), что провоцирует образование геморрагической инфильтрации и создает условия для проникновения в лимфатическую систему печени яиц, компонентов ЭСП гельминтов, желчи, продуктов распада клеток, что может усиливать аллергизацию организма хозяина (Дроздов, Зубов, 1982; Озерецковская, 2000).

Отражением уровня активности аллергических процессов в организме хозяина служит состав воспалительных инфильтратов в печени. Так на ранних этапах инфекции (период миграции и полового созревания паразитов) в обеих группах животных в инфильтратах преобладали эозинофилы. Эозинофилия также отмечалась в крови лабораторных животных и пациентов (Озерецковская, 2000; Wongratanacheewin et al., 2003). Позднее миграция лимфоцитов, моноцитов, и плазматических клеток, к месту инфекции, а также формирование лимфоидных скоплений в обеих группах указывает на вклад иммунного компонента в развитие хронического описторхоза у лабораторных животных. На участие иммунопатологических механизмов в патогенезе описторхоза, вызванного *O. viverrini*, указывает наличие антигена этих гельминтов (соматического и экскреторно-секреторного) в эпителии желчных протоков, в том числе первого порядка, в которых из-за их малого диаметра никогда не было гельминтов, в сочетании с мононуклеарной инфильтрацией (Sripa, Kaewkes, 2000b). Для описторхоза, вызванного *O. felinus*, такая информация отсутствует. Несмотря на схожий клеточный состав, площадь воспалительных инфильтратов и интенсивность воспаления были более выражены в печени животных, инфицированных *O. felinus*.

Также патогномичным для описторхоза является формирование гранулем вокруг паразитов и их яиц. Мариты *O. felineus* раньше достигали половой зрелости (со 2 недели после инфицирования), начинали продуцировать яйца, что соответствовало более раннему и интенсивному образованию гранулем вокруг яиц в печени инфицированных ими животных. В более поздние сроки к 12 – 24 неделям воспалительный процесс ослабевал, и на первый план выходили фибротические изменения (см. Рисунок 26). Это может быть отражением супрессии клеточного иммунного ответа хозяина через иммунопатологические процессы (Sripa, Kaewkes, 2000b). Для пациентов с хроническим описторхозом, вызванным *O. viverrini*, была показана корреляция высокого уровня плеiotропного цитокина – ИЛ-6 (обладающего широким спектром гуморальных и клеточных иммунных эффектов) в крови с интенсивностью перидуктального фиброза (Sripa et al., 2009). Также для животных, инфицированных *O. viverrini*, показано накопление коллагена I и III типов в перидуктальной области в хроническую стадию инфекции (Chotigeat, Ruenwongsa, 1986).

У животных, инфицированных *O. felineus*, наблюдалось значительно более раннее появление холангиоэктазов. Этому способствует больший размер особи *O. felineus* по сравнению с *O. viverrini*, что согласуется с литературными данными (*O. felineus* длина 5,8 – 13 мм, шириной 0,75 – 2,2 мм, *O. viverrini* – длина 5,4 – 10,2 мм и ширина 0,8 – 1,9 мм) (Kaewkes, 2003). Более раннее половое созревание, яйцепродукция и как следствие раннее формирование гранулем в стенках желчных протоков, а также наличие более крупных паразитов в их просвете, участки гиперплазированного эпителия, клеточный дебрис все это создает механические препятствия для оттока желчи. При описторхозе меняется состав и реологические свойства желчи, а также секретируется больше слизи, что также нарушает ток желчи (Степанова и др., 2006). Все это приводит к повышению внутрипротокового давления и кистозному расширению желчных протоков, то есть к формированию холангиоэктазов. К тому же с 8 недели после инфицирования *O. felineus* в просвете желчных протоков и подкапсулярных холангиоэктазов (часто левая медиальная доля печени) присутствует студнеобразное содержимое, включающее темно-коричневый пигмент, по внешнему виду напоминающий темное содержимое кишечника гельминтов (см. Рисунок 20). У пациентов с хроническим описторхозом, вызванным *O. felineus*, также как у хомячков, отмечаются множественные холангиоэктазы, преимущественно локализованные в левой доле печени (Бражникова, Цхай 2004).

Ранее некоторые исследователи в желчных протоках лабораторных животных, инфицированных *O. felineus*, обнаруживали присутствие темно-коричневого пигмента (с 60 суток после инфицирования), позднее это уже были зеленовато-черные

замаскообразные массы (с 90 суток после инфицирования) (Зуевский, 2010). Интересно, что у живых марит *O. viverrini* в просвете кишечника при световой микроскопии обнаруживалось незначительное количество темного содержимого, которого не наблюдалось ни на одном гистологическом срезе. Следует отметить, что в мировой литературе нет упоминаний об обнаружении на гистологических срезах в просвете кишечника *O. viverrini* или в просвете желчных протоков инфицированных животных какого-либо темного содержимого. Природа пигмента, обнаруженного в кишечнике *O. felineus*, будет описана далее.

Более выраженный фиброз желчевыводящей системы и другие особенности развития описторхоза, наблюдаемые у животных, инфицированных *O. felineus* (см. Рисунок 26), описанные выше (раннее появление гранулем в стенках желчных протоков вокруг яиц гельминтов, развитие множественных холангиоэктазов, темное студнеобразное содержимое, нарушающее отток желчи и др.), приводящие к холестазу, а также дальнейшее вероятное присоединение вторичной инфекции, по-видимому, могут быть причиной развития таких осложнений у пациентов, страдающих хроническим описторхозом, вызванным *O. felineus*, как дискинезия и стриктуры желчных протоков, перфорации подкапсулярных холангиоэктазов, холангитические абсцессы печени (Бражникова, Цхай 2004).

На канцерогенный потенциал *O. felineus* могут указывать наличие дисплазии эпителия желчных протоков и появление холангиофиброза (предраковые состояния для холангиоцитов) на 24 неделе наблюдений на фоне хронического воспаления (Sriraj et al., 2016; Shimonishi et al., 2000). При исследовании холангиоканцерогенеза у лабораторных животных, инфицированных *O. viverrini*, холангиофиброз появлялся при индукции развития холангиокарциномы диметилнитрозамином (Thamavit et al., 1978). Наличие холангиофиброза в группе животных, инфицированных *O. felineus*, может подразумевать вероятность дальнейшего развития канцерогенеза. По данным статистики, имеется корреляция между уровнем инфицирования населения описторхозом, вызванным *O. felineus*, и возникновением злокачественных опухолей гепатобилиарной системы. Так по данным на 2001 год в Томской области, занимающей одно из лидирующих мест по заболеваемости населения описторхозом, частота встречаемости рака печени была более чем в два раза выше, чем в среднем по Российской Федерации (Писарева и др., 2003). Однако необходимы дальнейшие исследования, которые расширят наше представление о связи описторхоза, вызванного *O. felineus*, с канцерогенезом, а также прольют свет на механизмы его возникновения в гепатобилиарной системе.

Таким образом, изменения в печени при описторхозе, вызванном трематодами *O. felineus* и *O. viverrini*, были схожими, проявлялись в виде паразитарного холангита, перихолангита, в результате которого развивались склеротические изменения билиарного тракта и паренхимы печени, но отличались по степени тяжести и срокам возникновения. Так у хомячков, инфицированных *O. felineus*, воспаление, дисплазия, тонкокишечная метаплазия эпителия желчных протоков, образование гранулем вокруг яиц паразитов, формирование холангиоэктазов и, наконец, перидуктальный фиброз появлялись на более ранних сроках и были более выраженными. Их сочетание с формированием холангиофиброза на фоне хронического описторхоза (6 месяцев после инфицирования), указывает на большую патогенность *O. felineus* для лабораторных животных с точки зрения структурных изменений печени. Вероятно, формирование более выраженных патологических изменений гепатобилиарной системы животных, инфицированных *O. felineus*, может быть связано с составом ЭСП *O. felineus* и, в частности, с накапливаемым специфическим темно-коричневым содержимым. Появление холангиофиброза – предракового состояния, при хронической описторхозной инвазии, вызванной *O. felineus*, вероятно указывает на то, что *O. felineus*, так же как и *O. viverrini*, может способствовать развитию холангиокарциномы.

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

Поскольку установлено, что гистопатологические изменения печени при описторхозе, вызванном *O. felineus* и *O. viverrini*, отличаются не только по срокам возникновения и тяжести проявлений, но и по наличию у *O. felineus* в просвете кишечника темно-коричневого содержимого, которое отсутствовало у *O. viverrini*, необходимо было исследовать природу этого содержимого. Так как, по данным литературы, в просвете кишечника *C. sinensis* также был обнаружен темный пигмент и клетки крови (Chu et al., 1982), нами проанализировано содержимое кишечника трех представителей семейства Opisthorchiidae.

Прижизненное наблюдение марит *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*, выделенных из желчных протоков хомячков через 3 месяца после инфицирования, показало, что в просвете кишечника у всех паразитов присутствовало темно-коричневое содержимое. Однако у *O. viverrini* его количество было минимальным. Для определения компонентов содержимого слепо замкнутого кишечника представителей семейства Opisthorchiidae проведен его электронно-микроскопический анализ.

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

По данным электронной микроскопии, в просвете кишечника *O. felineus* выявлены деградирующие клетки крови – эритроциты и лимфоциты (Рисунок 27 А). Помимо клеток крови, кишечник *O. felineus* содержал липидные капли, мультимембранные структуры, электронно-плотные кристаллы нерегулярной формы со слоистой структурой (Рисунок 27 Б). Содержимое кишечника *C. sinensis* имело сходную морфологию и включало в себя все указанные компоненты (Рисунок 27 В). Следует отметить, что в просвете кишечника *C. sinensis* липидные капли были наиболее многочисленны по сравнению с двумя другими представителями семейства. В отличие от *O. felineus* и *C. sinensis*, содержимое кишечника *O. viverrini* было более однородным, в нем присутствовали электронно-прозрачные вакуоли с плотными гранулами округлой формы и небольшое количество липидных капель (Рисунок 27 Г). Клеток крови и электронно-плотных кристаллов, наблюдаемых у *O. felineus* и *C. sinensis*, у этого вида трематод выявить не удалось.

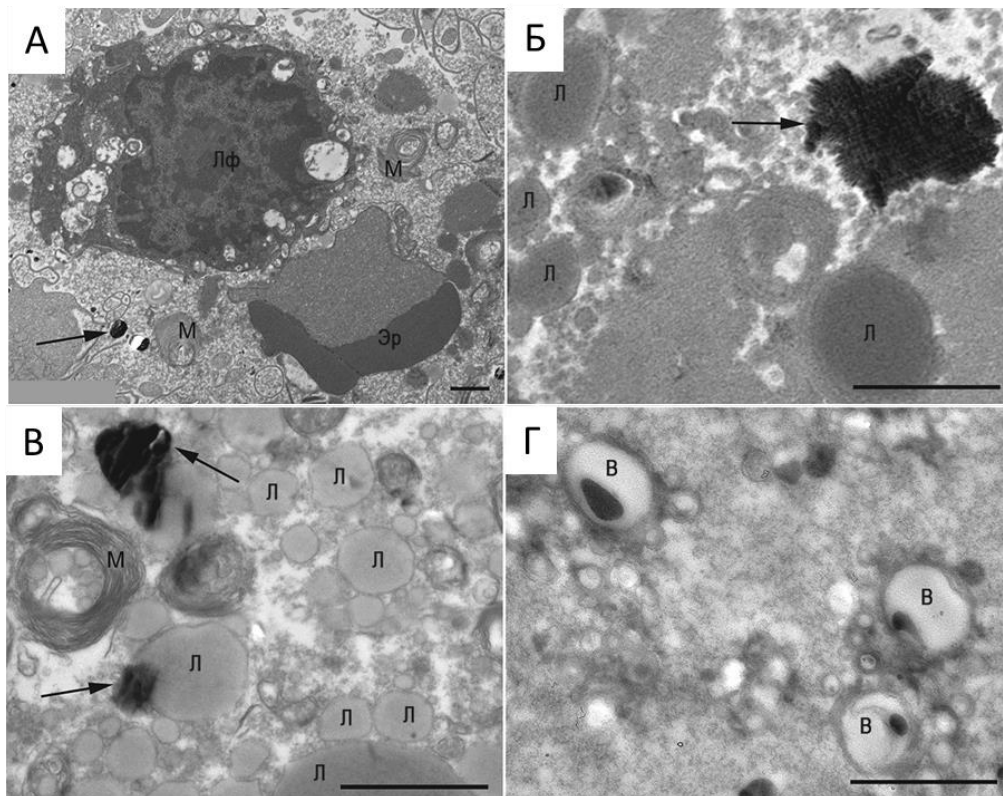


Рисунок 27. Содержимое кишечника *O. felineus* (А, Б), *C. sinensis* (В) и *O. viverrini* (Г) и на ультратонких срезах. А – Разрушающийся лимфоцит (Лф) и эритроцит (Эр) в кишечнике мариты *O. felineus*. Л – липиды, М – мультимембранные структуры, В – электронно-прозрачные вакуоли с плотными гранулами округлой формы. Стрелки указывают на электронно-плотные кристаллы в просвете кишечника *O. felineus* и *C. sinensis*; Шкала 1 мкм.

В просвете кишечника *O. felineus* и *C. sinensis* нами обнаружены деградирующие клетки крови и электронно-плотные кристаллы. Эти данные подтверждают ранее описанные результаты, в которых меченные радиоактивным ^{51}Cr эритроциты были описаны в желчи и в гораздо большем количестве – в просвете кишечника мариит *C. sinensis* (Chu et al., 1982; Kim et al., 1982). Таким образом, полученные нами данные и результаты проведенных ранее исследований указывают на то, что *O. felineus* и *C. sinensis*, так же как и многие другие трематоды (*Schistosoma spp*, *F. hepatica* и т.д.), являются паразитами, питающимися кровью хозяина, т.е. гематофагами.

Следует подчеркнуть, что содержимое кишечника *O. viverrini* значительно отличалось по составу. Нам не удалось обнаружить в нем клетки крови и электронно-плотные кристаллы, несмотря на то, что при световой микроскопии живых мариит незначительное количество темного содержимого присутствовало в просвете кишечника. Эти данные подтверждают описанное в предыдущем разделе гистологическое исследование, в котором в просвете кишечника *O. viverrini*, по сравнению с *O. felineus*, темно-коричневые гранулы не визуализировались (см. Рисунки 18-20, 24, 25). Важно отметить, что подобная ситуация уже была описана для некоторых представителей трематод. Так, у редий *E. caproni*, по сравнению с *E. trivolvis*, также не удалось обнаружить или выделить какое-либо детектируемое количество электронно-плотных, темных кристаллов (гемозоина) (Pisciotta et al., 2005).

Для некоторых паразитов-гематофагов определен спектр протеолитических ферментов, содержащихся в ЭСП, и участвующих в последовательном расщеплении белков крови (Brindley et al., 1997; Delcroix et al., 2006; Robinson et al., 2009; Hall et al., 2011). Хотя в ЭСП *O. viverrini* практически отсутствовали протеазы (Mulvenna et al., 2010), для этого паразита были получены рекомбинантные белки катепсинов F и B1, а также изучена их протеолитическая активность относительно различных субстратов (Pinlaor et al., 2009; Sripa et al 2010). Так оба эти фермента способны фрагментировать как гемоглобин до пептидов, так и расщеплять белки внеклеточного матрикса (фибронектин и ламинин), но катепсин F обладает бóльшей активностью к последним субстратам. Авторы исследования полагают, что *O. viverrini* может питаться кровью, а также повреждать окружающие ткани хозяина, что, вероятно, вносит вклад в развитие холангиокарциномы (Sripa et al., 2010). Очевидно, что особенности питания и метаболизма у *O. viverrini* нуждаются в дальнейшем изучении.

3.2.2 Морфология и химический анализ кристаллов из кишечника *O. felineus* и *C. sinensis*

Методом спектроскопии характеристических потерь энергии электронами, применяемом для определения атомного состава вещества, в составе электронно-плотных кристаллов в просвете кишечника *O. felineus* и *C. sinensis* было выявлено железо по Fe-L_{2,3} спектру (Рисунок 28 А, Б). Характерный спектр был получен на 3-4 кристаллах в каждой из 3 проанализированных марит *O. felineus* и *C. sinensis*. Пики железа были получены только при анализе кристаллов. Сигналов железа не было в областях свободных от кристаллов, а также в плотных округлых гранулах в кишечнике *O. viverrini*. Визуализация распределения железа, полученная с использованием железо-специфических электронов (Electron Spectroscopic Imaging) и представленная на Рисунке 28 В, Г подтверждает локализацию железа только в электронно-плотных кристаллах в кишечнике *O. felineus* и *C. sinensis*.

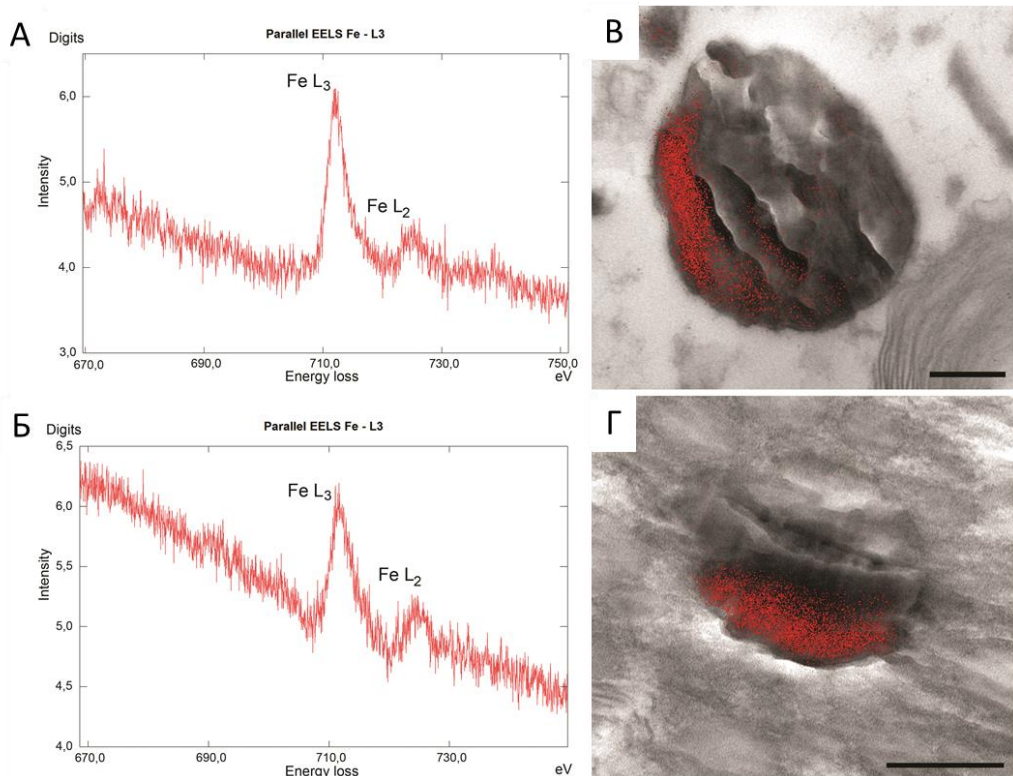


Рисунок 28. Наличие железа в кристаллах в просвете кишечника *O. felineus* (А) и *C. sinensis* (Б) подтверждено с помощью спектроскопии характеристических потерь энергии электронами. На графике указаны пики железа 708 эВ (Fe-L₃) и 721 эВ (Fe-L₂). Наличие и распределение железа в электронно-плотных кристаллах в просвете кишечника *O. felineus* (В) и *C. sinensis* (Г). Шкала 200 нм.

Кристаллы в кишечнике *O. felineus* и *C. sinensis* по морфологии и наличию в их составе железа сходны с кристаллами гемозоина, обнаруженными ранее в кишечнике *S. mansoni* (Oliveira et al., 2005). Для подтверждения того, что обнаруженные нами

гранулы являются кристаллами гемозоина, в дальнейшем их свойства исследовали при параллельном сравнении с синтетическим аналогом гемозоина, β -гематином, полученным нами *in vitro*.

Так как при световой микроскопии нами обнаружено незначительное количество темного содержимого в кишечнике живых марит *O. viverrini*, выделение кристаллов и масс-спектрометрический анализ проводился для трех видов описторхид. Спектры, полученные для образцов, выделенных из *O. felineus*, *C. sinensis* и *O. viverrini*, сравнивали с референсным спектром β -гематина. Присутствие гема в образцах (β -гематина, *O. felineus* и *C. sinensis*) было подтверждено с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии по наличию уникального иона [Fe(III) + porphyrin (C₃₄H₃₂N₄O₄Fe₁)]⁺ с m/z 616.2 Da (Demirev et al., 2002; Whiteaker et al., 2004; Bradshaw et al., 2014). На Рисунке 29 А, Б и В стрелками обозначены пики, соответствующие мономеру гема m/z 616.2 и его димеру m/z 1231.5. В образце, полученном из *O. viverrini*, соответствующих гему пиков не обнаружено (Рисунке 29 Г).

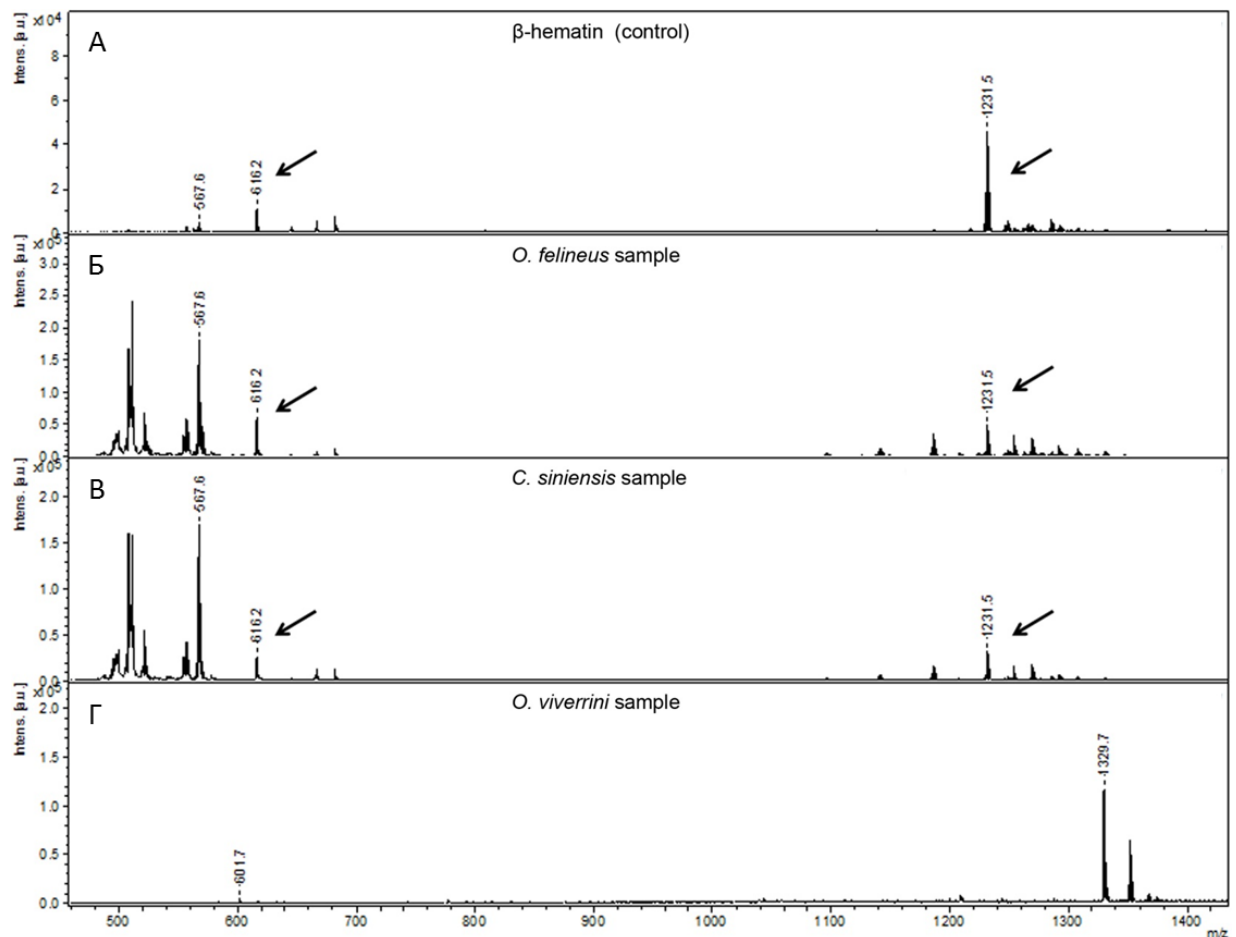


Рисунок 29. MALDI-TOF масс-спектры β -гематина (контроль) (А) и выделенных из *O. felineus* (Б) и *C. sinensis* (В) кристаллов, а также спектр осадка, полученного при использовании описанной выше методики для выделения кристаллов, из *O. viverrini* (Г). На рисунках А, Б и В стрелками обозначены пики, соответствующие гему - m/z 616.2 и димеру гема - m/z 1231.5.

Морфологию кристаллов, выделенных из *O. felineus* и *C. sinensis*, изучали с помощью сканирующей электронной микроскопии. Кристаллы имели округлую форму, аморфную слоистую структуру и были гетерогенны по размеру от 50 нм до 2 мкм (Рисунок 30 А, Б). Образец β-гематина (Рисунок 30 В) представлял собой мелкие кристаллы, собранные в большие агломераты (до 20 мкм) с нерегулярной поверхностью, загрязненные большим количеством аморфного вещества, которые соответствуют морфологии β-гематина, полученного с помощью водного метода (см. Рисунок 10 А, Обзор литературы) (Fitch, Kanjanangulpan, 1987; Bohle et al., 2002).

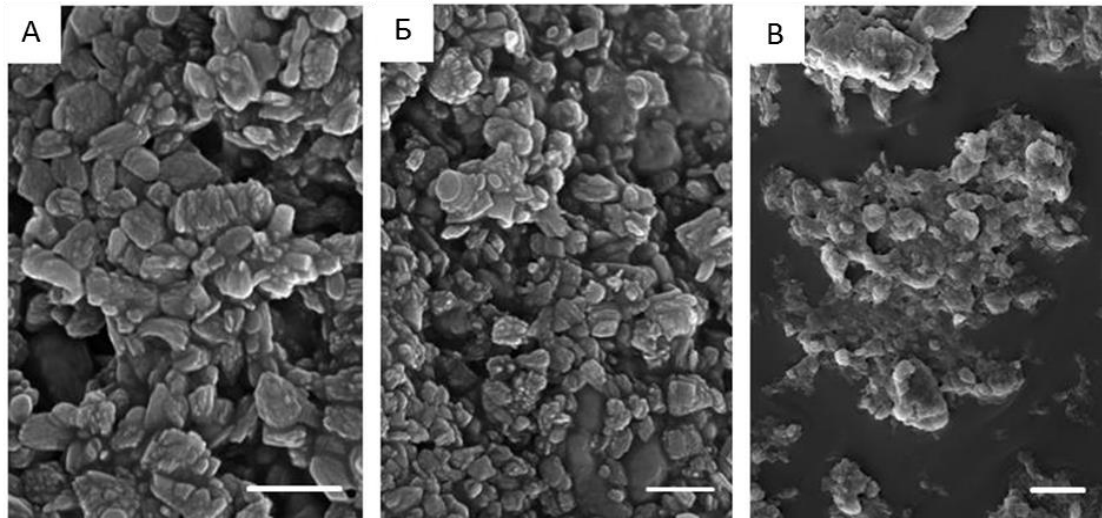


Рисунок 30. Сканирующая электронная микроскопия кристаллов, выделенных из *O. felineus* (А), *C. sinensis* (Б) и β-гематина (Г). Шкала 10 мкм (А, Б) и 100 мкм (Г).

Инфракрасные спектры кристаллов, выделенных из *O. felineus*, *C. sinensis* и β-гематина, идентичны спектрам, описанным для гемозина из *P. falciparum* и *S. mansoni* (Slater et al., 1991; Chen et al., 2001). Специфические пики абсорбции на 1660 cm^{-1} и 1207 cm^{-1} указывают на наличие в кристаллах связей между железом одного гема и карбоксильной группой остатка пропионовой кислоты другого, характерных для димеров гема в структуре гемозина и β-гематина (Рисунок 31) (Slater et al., 1991).

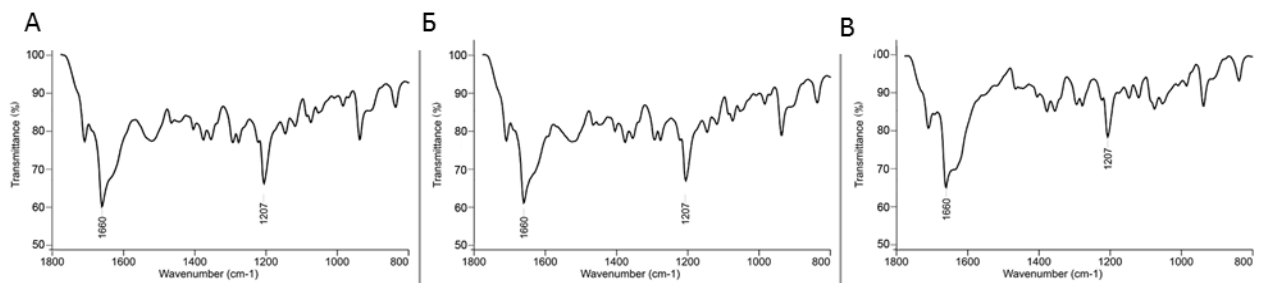


Рисунок 31. Инфракрасные спектры, выделенных из *O. felineus* (А), *C. sinensis* (Б) кристаллов и β-гематина (В). Представлены характерные для гемозина пики поглощения на 1660 cm^{-1} и 1207 cm^{-1} , указывающие на валентные колебания связей С-О и С=О в карбоксильной группе, вызванные ее взаимодействием с трехвалентным железом соседнего гема.

В состав выделенных из *O. felineus* и *C. sinensis* кристаллов входит железо и гем. Они, а также синтезированный β -гематин, проявляют парамагнитные свойства аналогично малярийному пигменту (гемозоину) (Butykai et al., 2013), не растворимы в SDS, ДМСО и бикарбонатном буфере (рН 9.1), в которых растворим мономер гема, что и было использовано при получении образцов (см. разделы 2.8.3; 2.8.4, Материалы и методы). Таким образом, пигмент, выделенный из *O. felineus*, *C. sinensis*, и β -гематин демонстрируют общие химические свойства, аналогичные свойствам гемозоина, полученного из *P. falciparum* и *S. mansoni* (Fitch, Kanjanangulpan, 1987; Chen et al., 2001).

В то же время у кристаллов, выделенных из *O. felineus* и *C. sinensis*, есть свои особенности. Известно, что малярийный пигмент, обнаруженный у *P. falciparum*, имеет форму вытянутых прямоугольных кристаллов с хорошо выраженными гранями (см. Рисунок 7 А, Обзор литературы) (Noland et al., 2003), тогда как кристаллы, выделенные из *O. felineus* и *C. sinensis*, имеют округлую форму, гетерогенную структуру с выраженной слоистостью (Рисунок 30). По внешнему виду кристаллы из *O. felineus* и *C. sinensis* существенно не отличались от гемозоина, выделенного из *S. mansoni* (см. Рисунок 7 Б, В, Обзор литературы) (Oliveira et al., 2005). Разницу в морфологии кристаллов, выделенных из трематод и из малярийного плазмодия, можно объяснить тем, что у плазмодия внутриклеточное пищеварение, и гемозоин накапливается в пищеварительной вакуоли, что, вероятно, требует особой упаковки кристаллов. При этом у перечисленных трематод пищеварение внеклеточное, и содержимое кишечника периодически опорожняется в полость обитания паразита.

3.2.3. Особенности формирования кристаллов гемозоина в кишечнике *O. felineus* и *C. sinensis*

По нашим наблюдениям, кристаллы пигмента, обнаруженные в просвете кишечника *O. felineus* и *C. sinensis*, часто контактировали с внеклеточными липидными каплями. На Рисунке 32 представлена предположительная последовательность формирования кристаллов гемозоина у этих гельминтов. На начальных стадиях видны небольшие электронно-плотные включения на поверхности липидной капли (ядра кристаллизации) (Рисунок 32 А, Г). На рисунках видно, что основание кристалла, контактирующее с липидной каплей, шире, чем его противоположная часть. Это указывает на то, что точка роста и формирования кристалла находится в его основании, то есть на поверхности раздела гидрофобной и гидрофильной сред, что обеспечивает поверхность липидных капель. На поздних стадиях формирования кристаллы окружали

одну или несколько липидных капель, формируя мультикристаллические комплексы (Рисунок 32 В, Е).

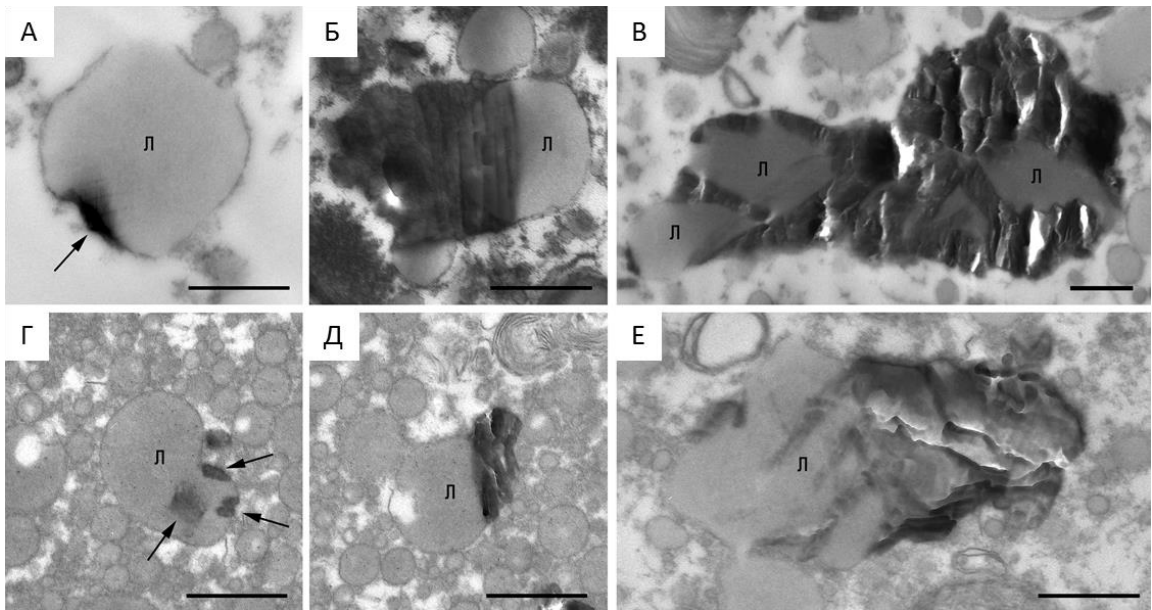


Рисунок 32. Стадии формирования кристаллов гемозоина вблизи липидных капель в кишечнике *O. felineus* (А, Б, В) и *C. sinensis* (Г, Д, Е). Начальная стадия (А, Г), промежуточная стадия (Б, Д), формирование мультикристаллических комплексов вокруг нескольких липидных капель (В, Е). Л – Липидные капли. Стрелки указывают на ядра кристаллизации на поверхности липидных капель. Шкала 500 нм.

Точные механизмы инициации и формирования гемозоина у паразитов-гематофагов до сих пор не описаны. По-видимому, необходим комплекс оптимальных физиологических условий и ряд паразитарных факторов. Существует несколько гипотез, описывающих этот процесс: (i) формирование гемозоина – аутокаталитический процесс, не требующий ферментов или других катализаторов, кроме уже существующих кристаллов (Dorn et al., 1995); (ii) в инициации и формировании гемозоина участвуют специальные белки, например, для *P. falciparum* описаны богатые гистидином белки (HRP II и HRP III) (Sullivan et al., 1996) или даже комплекс белков (см. Рисунок 8, Обзор литературы) (Chugh et al., 2013); (iii) в процесс формирования гемозоина вовлечены липиды (см. Рисунок 9, Обзор литературы) (Egan et al., 2006; Correa Soares et al., 2007).

Для *S. mansoni* показано, что гидрофобно-гидрофильный раздел сред внеклеточных липидных капель в просвете кишечника играет ключевую каталитическую роль в формировании гемозоина (Correa Soares et al., 2007). Более того, M. Ambele с соавторами (2013) показали, что *in vitro* кристаллы β -гематина могут формироваться на поверхности липидных капель, содержащих нейтральные жиры; при физиологических условиях и этот процесс сходен с кристаллизацией гемозоина у *S. mansoni* (Correa Soares et al., 2007). К тому же размер кристаллов β -гематина коррелировал с размером липидных частиц

(Ambele et al., 2013). В просвете кишечника *O. felineus* и *C. sinensis* нами обнаружены одиночные кристаллы и мультикристаллические комплексы гемозоина, тесно связанные с липидными каплями, а также этапы их формирования на поверхности этих капель (см. Рисунок 32). Это свидетельствует о том, что биокристаллизация гемозоина у *O. felineus* и *C. sinensis* происходит аналогично процессу, описанному для *S. mansoni* (см. Рисунок 9 Б, Обзор литературы), а именно путем ассоциации молекул гема с липидными каплями на разделе водной и липидной фаз (Correa Soares et al., 2007).

Липидные капли, плотно контактировавшие с кристаллами, были обнаружены только в просвете кишечника *O. felineus* и *C. sinensis*, тогда как в клетках гастродермиса наблюдались липидные капли, не взаимодействующие с какими-либо электронно-плотными структурами.

Количество липидных капель в клетках гастродермиса отличалось у разных представителей семейства (Рисунок 33). В цитоплазме клеток *O. viverrini* липидные капли встречались достаточно редко и имели небольшой размер (0.5-0.7 мкм в диаметре) (Рисунок 33 А). Гастродермис *O. felineus* содержал умеренное количество липидных капель, которые часто контактировали с апикальной плазматической мембраной клеток (в среднем 1,1 мкм в диаметре) (Рисунок 33 Б). В цитоплазме клеток гастродермиса *C. sinensis* присутствовали крупные липидные капли (до 3,3 мкм в диаметре) (Рисунок 33 В). Морфологические признаки высвобождения липидных капель в просвет кишечника по апокриновому типу обнаружены в кишечнике *C. sinensis* (Рисунок 33 Г – Е). На Рисунке 32 (Г – Е) представлены последовательные стадии этого процесса: липидная капля мигрирует к апикальной мембране клетки гастродермиса (см Рисунок 33 Г), затем происходит локальное разрушение плазматической мембраны клетки гастродермиса и высвобождение капли в просвет кишечника (Рисунок 33 Д, Е).

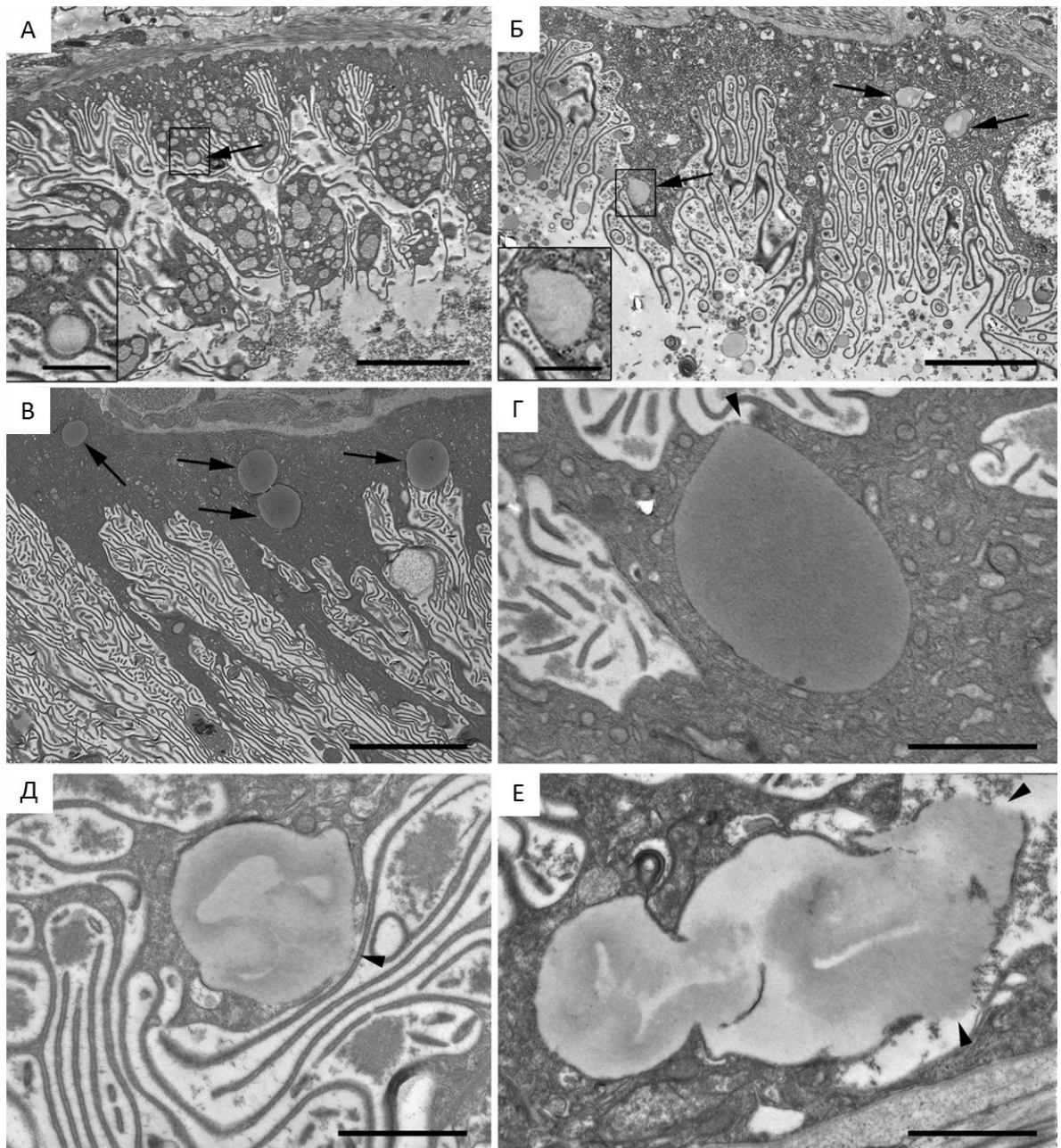


Рисунок 33. Липидные капли в клетках гастродермиса представителей семейства Opisthorchiidae. А – Гастродермис *O. viverrini* содержит лишь небольшое количество липидных капель; Б – Липидные капли вблизи апикальной поверхности клеток гастродермиса *O. felineus*; на вставках (А, Б) – липидные капли на большом увеличении; В – гастродермис *C. sinensis* содержит большое количество липидных капель. Липидные капли в клетках указаны стрелками. (Г – Е) – секреция липидных капель по апокриновому типу в клетках гастродермиса *C. sinensis*. Головками стрелок обозначены участки разрушения апикальной поверхности гастродермиса для выхода липидных капель. Шкала 5 мкм (А – В), 1 мкм (вставки А, Б и Г – Е).

Происхождение этих капель в просвете кишечника трематод неизвестно. Источником их могут быть как разрушающиеся клетки крови, липопротеиновые частицы, так и клетки гастродермиса. У *O. felineus* и *C. sinensis*, так же как и у *S. mansoni*, в клетках кишечника обнаружены только липидные капли без кристаллов. У *S. mansoni* эти капли находились внутри вакуолярных структур, поэтому было выдвинуто предположение об их

формировании путем эндоцитоза/аутофагии (Correa Soares et al., 2007). У *O. felineus* липидные капли не входили в состав вакуолей. Учитывая, что трематоды не способны синтезировать липиды *de novo* (Maule, Marks, 2006) вопрос их происхождения в клетках гастродермиса требует дополнительных исследований. Возможно, так же, как и шистосомы, *O. felineus* поглощает липиды хозяина через тегумент (Van Hellemond et al., 2006).

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. Он аккумулируется клетками хозяина и может оставаться в организме длительное время (Boura et al., 2013). Описаны его иммуномодулирующие свойства, в том числе и для *S. mansoni*, так он принимает участие в альтернативной активации макрофагов и развитии гранулематозной патологии (Carter et al., 2007; Truscott et al., 2012).

В ткани печени экспериментальных животных, инфицированных *O. felineus*, мы обнаружили гранулемы, состоящие из клеток содержащих большое количество темно-коричневого пигмента схожего с гемозоином кишечника паразитов (см. Рисунок 23). Возможно, именно образование и накопление гемозоина, его контакт с клетками иммунной системы хозяина вносит вклад в наблюдаемые различия в интенсивности воспаления, фиброза, гиперплазии эпителия желчных протоков и более раннее их появление при описторхозе, вызванном *O. felineus*, по сравнению с *O. viverrini*. Накопление кристаллов гемозоина в просвете желчных протоков и холангиоэктазов нарушает отток желчи, о чем свидетельствует обнаружение темного густого содержимого с 2 месяцев после инфицирования (эксперимент описанный выше), а также данные литературы, что к 90 суткам после инфицирования *O. felineus* в желчных протоках у хомячков обнаруживали зеленовато-черные замазкообразные массы (Зуевский, 2010).

Есть данные о сочетании интенсивной и длительной инвазии *S. mansoni* с развитием анемии (Friedman et al., 2005). Однако механизм, лежащий в основе ее развития, до сих пор не ясен. Существует несколько гипотез происхождения анемии при шистосомозе: (i) экстракорпоральная потеря железа, в том числе с калом и мочой; (ii) задержка и гемолиз эритроцитов в селезенке; (iii) аутоиммунный гемолиз и (iv) анемия при воспалительных заболеваниях (Friedman et al., 2005). У пациентов, страдающих описторхозом, вызванным *O. felineus*, при интенсивной инвазии также отмечены явное или латентное железодефицитное состояние и угнетение эритропоэза (уменьшение количества клеток эритроидного ряда, нарушение их созревания с задержкой на стадии базофильных или полихроматофильных элементов, уменьшение фигур митоза)

(Limakhina, 1954; Забозлаев, 1974). Можно предположить, что в развитии дефицита железа при хроническом описторхозе, вызванном *O. felineus*, может принимать участие образование гемозоина. Оно происходит путем биокристаллизации молекул гема, содержащих железо, при этом происходят накопление нерастворимых кристаллов и элиминация из организма хозяина железа, что можно рассматривать как вариант экстракорпоральной потери железа. Некоторая потеря крови может идти с желчью, так как *O. felineus* присосками повреждает мелкие кровеносные сосуды. J. Kim с соавторами (1982) обнаружили радиоактивно меченые эритроциты в желчи при клонорхозе у лабораторных животных.

Показана эффективность многих антималярийных препаратов (производные хинолина и артемизинина) в отношении *S. mansoni*. Одним из механизмов действия этих веществ на гельминтов-гематофагов является ингибирование образования гемозоина, и, как следствие, реализуется токсическое действие гема (Xiao et al., 2004; Keiser, Utzinger, 2007; Coronado et al., 2014). Можно предположить активность этих препаратов в отношении описторхоза, вызванного *O. felineus*. Это подкрепляет тот факт, что, с одной стороны, производные артемизинина (Artemether и Artesunate) высокоэффективны в отношении *C. sinensis* (Keiser et al., 2006). При однократном использовании Artemether или Artesunate в дозе 150 мг/кг происходила 100% элиминация гельминтов у лабораторных животных (крысы, инфицированные по 40 – 50 метацеркарий, длительность инфицирования 5 недель) (Keiser et al., 2006). С другой стороны, нами в просвете кишечника *C. sinensis* был обнаружен гемозоин.

В отношении *O. viverrini* эффективность этих препаратов низкая: при однократной дозе 200 мг/кг Artemether или Artesunate элиминация гельминтов у лабораторных животных (хомячки, инфицированные по 45 метацеркарий, длительность инфицирования 4 недели) происходила на 17,2% и 39,7% соответственно (Keiser et al., 2006). При повышении дозы Artemether до 400 мг/кг элиминировалось 65,5% гельминтов, одно животное погибло через 24 часа после введения препарата и Artesunate в дозе 400 мг/кг – 77,6% (Keiser, Utzinger, 2007). Нам не удалось обнаружить гемозоин в просвете кишечника *O. viverrini*. Учитывая высокую эффективность производных артемизинина в отношении инфекций, вызванных гельминтами-гематофагами (*E. caproni*, *S. mansoni* и *F. hepatica*), и низкую в отношении *O. viverrini* (Keiser et al., 2006), эти препараты являются многообещающими в терапии описторхоза, вызванного гематофагом *O. felineus*. Однако для подтверждения антигельминтных свойств этих препаратов в отношении *O. felineus* необходимы дополнительные исследования.

3.3. Экскреторно-секреторный продукт *O. felineus*

Как было показано ранее, патогенез изменений в гепатобилиарной системе при описторхозе, вызванном *O. viverrini*, связан как с механическими повреждениями стенок желчных протоков, так и с действием токсических продуктов жизнедеятельности гельминтов на ткани хозяина. (Sripa, Kaewkes, 2000a; 2000b; Smout et al., 2009; Vale et al., 2013). Для определения *in situ* локализации экскреторно-секреторных антигенов *O. felineus* нами были получены поликлональные кроличьи антитела к ЭСП *O. felineus*, и затем проведено иммуногистохимическое окрашивание срезов печени хомячков, инфицированных *O. felineus*, в сроки через 2, 3 и 4 недели после инфицирования. В качестве отрицательных контролей параллельно была проведена окраска срезов печени животных, инфицированных *O. felineus*, с использованием сыворотки неиммунизированного кролика, а также неинфицированных животных – поликлональными антителами к ЭСП *O. felineus*. Никакого окрашивания в контрольных образцах не наблюдалось.

Через 2 недели после инфицирования положительное иммунопероксидазное окрашивание (т.е. присутствие паразитарного ЭСП) наблюдалось не только в тканях гельминтов (тегумент, кишечник, матка с яйцами и семенники), но и в содержимом желчных протоков хомячков, а также апикальной поверхности единичных холангиоцитов, в местах контакта тегумента паразита с эпителием (Рисунок 34 А). С увеличением срока инфекции интенсивность и площадь окраски на экскреторно-секреторный антиген *O. felineus*, как и площадь клеточной инфильтрации, возрастали (Рисунок 34). Причем ЭСП и признаки воспаления определялись не только в местах непосредственного контакта паразита с желчными протоками хозяина, но и в мелких протоках первого порядка, где никогда не было гельминтов. Это свидетельствует о том, что некоторые продукты жизнедеятельности паразита или его активной секреции (компоненты ЭСП) могут взаимодействовать с эпителием и клетками иммунной системы хозяина вдали от непосредственного места обитания гельминта. Это согласуется с данными, описанными для *O. viverrini*- описторхоза (Sripa, Kaewkes, 2000b). Авторы полагают, что антигены, ассоциированные с гельминтом, и локальный паразит-специфический иммунный ответ играют значительную роль в патогенезе описторхоза (Sripa, Kaewkes, 2000b). Антигены в эпителии желчных протоков животных, инфицированных *O. felineus*, могут активировать иммунный ответ хозяина, что описано для других паразитарных инфекций (Cox, Liew, 1992).

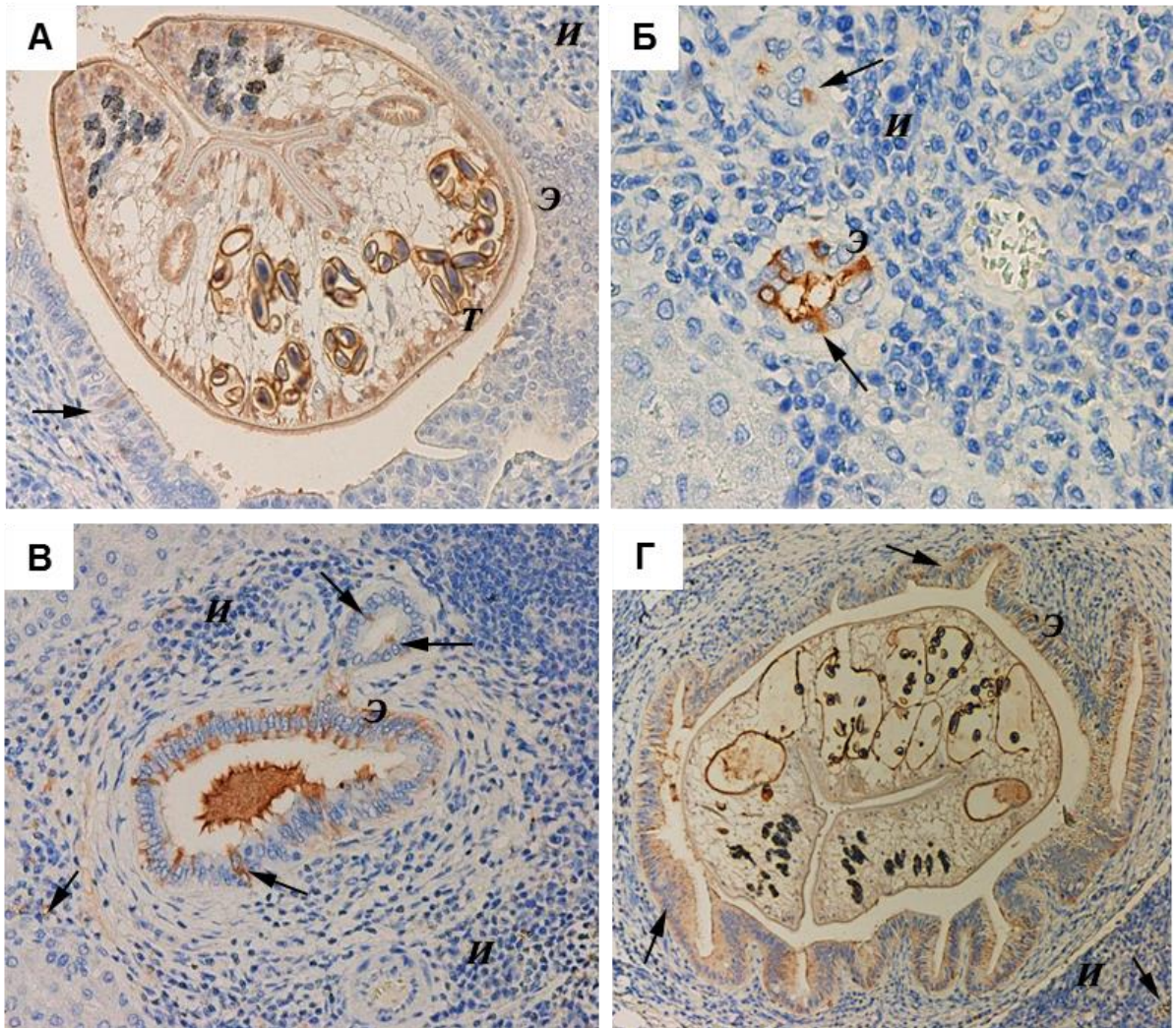


Рисунок 34. Локализация экскреторно-секреторных антигенов в тканях печени хомячков, инфицированных *O. felineus*, (А) – 2 недели после инфицирования, (Б, В) – 3 недели после инфицирования, (Г) – 4 недели после инфицирования. Стрелки указывают на клетки, окрашенные антителами к ЭСП *O. felineus*. И – инфильтрация клетками воспаления. Э – эпителий желчных протоков. Т – тегумент *O. felineus*. Иммунопероксидазное окрашивание. Увеличение А, В – х 200, Б – х 400, Г – х 100.

Наличие специфической окраски эпителия желчных протоков первого порядка, свободных от паразитов, указывает на роль паразитарных антигенов в развитии воспалительной инфильтрации в окружающих тканях. Однако механизмы, с помощью которых вещества, продуцируемые *O. felineus*, попадают в клетки эпителия и способствуют этому, пока не известны. Возможны простая диффузия или эндоцитоз, которые описаны для нормального эпителия желчных протоков грызунов (Ishii et al., 1990). В обзоре литературы упоминалось об эндоцитозе холангиоцитами *in vitro* экзосомоподобных везикул, содержащих белки ЭСП, которые продуцирует марита *O. viverrini* (Chaiyadet et al., 2015a). Также для некоторых белков ЭСП трематод таких как, например, глутатион S-трансфераза и тиоредоксин пероксидаза, показана способность проникать в различные типы клеток (Namiki et al., 2003; Suttiprapa et al., 2008).

Полученные нами результаты подтверждают активное участие иммунопатологических процессов, связанных с ЭСП паразита, в развитии гистологических изменений печени при описторхозе, вызванном *O. felinus*.

Далее белковая часть ЭСП *O. felinus* была проанализирована с помощью электрофореза в 15%-м полиакриламидном геле в денатурирующих условиях для определения состава секретома и молекулярной массы белков. В качестве контроля для электрофореза была взята растворимая часть лизата взрослых особей *O. felinus* (так называемый соматический антиген). На Рисунке 35 представлена типичная электрофореграмма ЭСП и лизата *O. felinus*. Данные одномерного электрофореза показали, что ЭСП *O. felinus* включает в себя более 15 белков, из которых мажорными являются белки 50, 27, 26, 24 кДа, что отличается от белкового состава лизата.

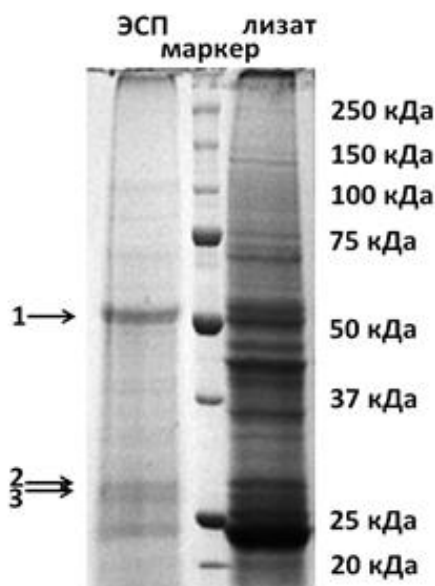


Рисунок 35. Электрофореграмма экскреторно-секреторного продукта (ЭСП) и лизата половозрелых марит *O. felinus* (лизат). Окраска Кумасси. Стрелки указывают на полосы, которые были вырезаны из геля и проанализированы с помощью MALDI-TOF/TOF масс-спектрометрии. Маркер – Precision Plus Protein Unstained Standards (Bio-Rad, США)

Эти данные согласуются с результатами, полученными ранее А. Котелкиным и соавторами (1998). В составе ЭСП *O. felinus* они определили не менее 11 белков (105, 80, 74, 70, 66, 50, 40, 34, 33, 24, 10 кДа), причем мажорную фракцию составляли белки с молекулярной массой (105, 50, 24, 10 кДа).

Для идентификации белков в составе ЭСП *O. felinus* нами были вырезаны полоски геля с тремя мажорными белками (на Рисунке 35 обозначены стрелками) для дальнейшего ферментативного гидролиза с помощью трипсина и анализа методом MALDI-TOF/TOF

масс-спектрометрии. Удалось определить 2 из 3 белков, соответствующих полосам 1 и 3 (Таблица 1).

Таблица 1. Белки ЭСП, которые были определены с помощью масс-спектрометрического анализа в вырезанных фрагментах полиакриламидного геля. Уровень достоверности определения белка (скор) рассчитывался программой Mascot. Достоверным считался скор 50 и больше, соответствующий $p \leq 0,05$.

Образец (номер полосы)	Название белка	Молекулярная масса	Идентификационный номер в базе данных UniProtKB/Swiss-Prot	Вид	Скор
1	Cathepsin F-like cysteine protease	50 кДа	Q5PXS3_9TREM	<i>O. viverrini</i>	50
3	Putative glutathione transferase	26 кДа	Q25595_CLOSI	<i>C. sinensis</i>	72

В Приложении 1 представлен пример MS/MS анализа пептида NSWGESFGEQGYFR с моноизотопной массой 1663.624 Да, принадлежащего катепсину F *O. felineus*, полученного после трипсинолиза полосы геля № 1. Обращает на себя внимание то, что молекулярная масса белка из 1 полосы была около 50 кДа, тогда как катепсин F имеет молекулярную массу 40 кДа. Это может быть связано с тем, что у трематод семейства Opisthorchiidae катепсин F секретируется в качестве профермента с большей молекулярной массой (Pinlaor et al., 2009). На Рисунке 36 представлено выравнивание С-конца катепсинов F, описанных для трематод семейства Opisthorchiidae (Pinlaor et al., 2009; Kang et al., 2010), и пептида, принадлежащего катепсину F *O. felineus*. У *C. sinensis* обнаружено 12 генов, кодирующих белки, входящие в семейство катепсин F подобных белков. Для них показана протеолитическая активность в отношении гемоглобина, альбумина, иммуноглобулинов и коллагена. Эти белки локализируются в эпителии кишечника паразита и в его просвете. (Kang et al., 2010). На Рисунке 36 выделенная рамкой последовательность соответствует мотиву, обладающему гемоглобиназной активностью (Kang et al., 2010). Для *O. viverrini* описан один ген, кодирующий катепсин F, и определена локализация этого белка в кишечнике, вителлиновых железах и семенниках гельминта, а также эпителии желчных протоков хозяина (Pinlaor et al., 2009).

Кроме того, в Приложении 1 представлено картирование последовательностей пептидов, полученных после масс-спектрометрического анализа полосы № 3, на аминокислотную последовательность глутатион S-трансферазы *C. sinensis* (GenBank AAB46369) из базы данных NCBI.

OfCF	NSWGESFGEQGYFR	
CsCF-4	...PYWTVKNSWSTMFGENGYFRIYRGDGTTCGINTLVSTSIIL	320
CsCF-5	...PYWTVKNSWSTMFGENGYFRIYRGDGTTCGINTLVSTSIIL	327
CsCF-12	...PYWIVKNSLGVGFGEKGYFRIFRGAGTTCGINLTVSTAIID	328
CsCF-3	...PYWIVKNSWGVGFGEKGYFRIFRGAGTTCGINLTVSTAIID	328
CsCF-11	...PYWIVKNSWGVGFGEKGYFRIFRGAGTTCGINLTVSTAIID	328
CsCF-8	...PYWIVKNSWGEDFGEKGYFRIYRGDGTTCGINSIVTTARIK	326
CsCF-6	...PYWIVKNSWGEDFGEKGYFRIYRGDGTTCGINSIVTTARIK	326
CsCF-7	...PYWIVKNSWGEDFGEKGYFRIYRGDGTTCGINSIVTTAIK	326
CsCF-2	...PYWIVKNSWGEDFGEKGYFRIYRGDGTTCGINSIVTTAIK	186
CsCF-10	...PYWIVKNSWGEDFGEKGYFRIYRGDGTTCGINSIVTTARIK	326
CsCF-1	...PYWIVKNSWGEDFGEKGYFRIYRGDGTTCGINSIVTTAIK	326
CsCF-9	...PYWIVKNSWGEDFGEKGYFRIYRGDGTTCGINSIVTTARIK	326
OvCF	...PYWIVKNSWGRFGEKGYFRIYRGDGTTCGINRAVTTAVVK	326

** **** ***

Рисунок 36. Выравнивание С-концевого фрагмента аминокислотных последовательностей катепсинов F *C. sinensis* (CsCF1 - CsCF12), *O. viverrini* (OvCF) и пептида *O. felineus* (OfCF). Красным цветом отмечены консервативные остатки аминокислот, которые необходимы для формирования третичной структуры фермента. Рамкой выделен мотив, обладающей гемоглобиназной активностью.

По данным белкового электрофореза, значительная часть ЭСП *O. felineus* представлена катепсином F и глутатион S-трансферазой. Это согласуется с данными, полученными ранее в нашей лаборатории: катепсин F наряду с миоглобином, белком, входящим в состав яиц паразита, и глутатион S-трансферазами являются наиболее транскрибируемыми генами у взрослой особи *O. felineus* (Pomaznoy et al., 2015). Все это указывает на существенное значение этих белков в физиологии *O. felineus* и в его взаимоотношениях с хозяином.

3.3.1. Протеомный анализ экскреторно-секреторного продукта *O. felineus*

Для более полного определения белкового состава ЭСП *O. felineus* был проведен трипсинолиз белков в растворе, а затем полученная смесь пептидов проанализирована с помощью масс-спектрометрии ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье как наиболее подходящего инструмента для анализа малых количеств белка в смеси. Было получено 6308 масс-спектров пептидов. В составе ЭСП *O. felineus* при использовании для анализа последовательностей ESTs *O. felineus* (Pomaznoy et al., 2013) и сформированных баз данных Digenea_nr и Digenea_prot было идентифицировано 45 белков. Эти белки можно разделить на группы в соответствии с их биологической функцией: структурные, антиоксидантные, транспортные белки, протеолитические, метаболические ферменты, ингибиторы протеаз, белки с неизвестной функцией и прочие неклассифицированные белки. В таблице (Приложение 2) представлен белковый состав ЭСП *O. felineus*, а также сравнение протеинового профиля ЭСП *O. felineus* с секретами других трематод, в том числе близкородственных. Наше сравнение было основано на аннотации белков и идентичности аминокислотных последовательностей. Для наиболее корректного

сравнения с секретомом *O. viverrini* мы использовали идентичную схему культивирования половозрелых гельминтов (24 часа в среде RPMI 1640 без сыворотки).

Структурные белки (актин, бета-тубулин, парамиозин), обнаруженные в ЭСП *O. felineus*, характерны для секретомов других трематод (Приложение 2).

Парамиозин – фибриллярный белок, характерный для беспозвоночных. Классически это структурный белок мышц, однако он присутствует в ЭСП многих трематод. Известно, что его тегументальная форма у гельминтов способна играть роль иммуномодулятора (Gobert, McManus, 2005). Хотя механизмы действия парамиозина на иммунную систему хозяина при описторхозе, вызванном *O. felineus*, пока не изучены, для других трематод, в частности, для *C. sinensis* и *S. mansoni*, показано, что он блокирует классический путь активации комплемента через конкурентное связывание коллагеноподобного региона C1q (Laclette et al., 1992), а также связывает белки комплемента C8 и C9, препятствуя формированию мембраноатакующего комплекса (Park et al., 2009).

Показано, что шистосомы адсорбируют на поверхности тегумента большое количество белков хозяина (антигены эритроцитов, иммуноглобулины, основной комплекс гистосовместимости класса I и β 2-микроглобулин) в качестве маскировки от его иммунной системы, а парамиозин выступает в этом случае как Fc-рецептор (Loukas et al., 2001). Парамиозин предлагали в качестве кандидата для разработки вакцин и усовершенствования иммунодиагностики близкородственного вида трематод – *C. sinensis* (Kang et al., 2015; Park et al., 2009). А. Котелкин с соавторами (1997), исследуя антигенный состав ЭСП *O. felineus*, показали, что одним из наиболее перспективных для усовершенствования иммунодиагностики описторхоза, вызванного *O. felineus*, может быть белок 105кДа, который по молекулярной массе может соответствовать парамиозину. Позднее был получен рекомбинантный белок фрагмента парамиозина *O. felineus*. Он обладал антигенными свойствами по отношению к сывороткам инфицированных животных, что позволило авторам предложить использование полученных ими результатов для усовершенствования иммунодиагностики и разработки противоописторхозной вакцины (Shustov et al., 2002).

Актин является необходимым белком для обеспечения обновления тегумента и выживания трематод в организме хозяина, присутствует на поверхности тегумента *S. mansoni*, а также в содержимом ее кишечника (Braschi, et al., 2006; Braschi, Wilson, 2006; Delcroix et al., 2007). Присутствие структурных белков в ЭСП может свидетельствовать и о попадании в него белков из организма гельминта. Хотя, с другой стороны, актин, бета-тубулин и парамиозин были обнаружены в составе секретируемых экзосомоподобных

везикул, в том числе и *O. viverrini* (Bernal et al., 2006; Sotillo et al., 2010b; Chaiyadet et al., 2015a; Cwiklinski et al., 2015).

Следующая группа – **антиоксидантные белки** (Cu/Zn супероксиддисмутаза (SOD), глутатион-S-трансферазы (GSTs), тиоредоксин пероксидаза (TRx), тиоредоксин (Trx). Из этой группы заслуживают особого внимания GSTs, так как в ЭСП *O. felinus* их содержится 4 изоформы: мю класса – 26 кДа; сигма класса – 28 кДа и 24 кДа и GST омега-1. Это больше, чем у близкородственных видов (см Приложение 2). Так у *O. viverrini* в ЭСП было определено 3 GSTs (Mulvenna et al., 2010), у *C. sinensis* – 2 (Ju et al., 2009).

GSTs - обширное семейство белков, классически являющихся внутриклеточными белками II фазы метаболизма ксенобиотиков. Предполагают, что GSTs – это основная система детоксикации у паразитов, которая, как правило, характеризуется единичными ферментами I фазы метаболизма ксенобиотиков и наличием нескольких GSTs (Cvilinear et al., 2009; Pakharukova et al., 2012). К тому же они способны уменьшать перекисное окисление липидов, препятствуя структурным повреждениям, вызываемым свободными радикалами. Хроническая описторхозная инфекция способствует развитию холестаза и, как следствие, повышению концентрации в желчи (среде обитания паразитов) желчных кислот. Они, в свою очередь, обладают цитотоксическим действием, вызывая образование свободных кислородных радикалов (Sokol et al., 1993; Lechner et al., 2002). Экспрессия и секреция GSTs *C. sinensis* возрастает в ответ на добавление в культуральную среду 10% желчи хозяина в эксперименте *in vitro* (Bae et al., 2013).

Как и большинство белков, обнаруженных в ЭСП гельминтов, GSTs многофункциональны. Протеомными методами была выделена фракция ЭСП *O. viverrini*, а в ней определена GST 28 кДа, обладающая митогенной активностью *in vitro*, которая реализуется через сигнальные пути ERK (один из каскадов с участием митоген-активируемых протеинкиназ) и АКТ (каскад, осуществляемый через белки семейства протеинкиназ B), в отношении клеточной линии мышечных фибробластов NIH-3T3 и линии человеческих холангиоцитов MMNK1 (Daorueang et al., 2012). Ранее на линии NIH-3T3 была показана активация пролиферации фибробластов под действием ЭСП *O. viverrini* (Thuwajit et al., 2006). У ряда трематод GST, принадлежащие к классу сигма, обладают простагландин D₂ синтазной активностью (Herve et al., 2003; La Course et al., 2012). Уровень экспрессии такой GST у *S. mansoni*, наиболее высокий на стадии шистосомулы. Продукция простагландина D₂ *S. mansoni* ингибирует миграцию эпидермальных клеток Лангерганса в регионарные лимфоузлы, что важно для паразитов на ранних этапах инфекции при проникновении через кожу в организм окончательного хозяина (Angeli et al., 2001; Herve et al., 2003). Кроме того, у различных гельминтов GSTs

мю и сигма классов показали хорошие антигенные свойства, и их рекомбинантные аналоги предлагаются в качестве перспективных мишеней для разработки вакцин и совершенствования иммунодиагностики различных трематодозов (Sexton, et al., 1990; Capron et al., 2001; Wei et al., 2010; Prasopdee et al., 2019).

Тиоредоксин пероксидаза присутствует в ЭСП всех трех представителей семейства Opisthorchiidae, а также у других трематод (*Schistosoma spp*, *F. hepatica*) (Delcroix et al., 2007; Di Maggio et al., 2016; Liu et al., 2009; Mulvenna et al., 2010; Zheng et al., 2011). Так как у трематод отсутствует фермент каталаза, который у млекопитающих расщепляет перекись водорода до молекулярного кислорода и воды, эту функцию выполняют тиоредоксин пероксидазы (Dzik, 2006). По-видимому, тиоредоксин пероксидаза в ЭСП *O. felineus* также участвует в обезвреживании перекиси водорода. Кроме того, для *F. hepatica* было показано, что этот белок проявляет иммуномодулирующие свойства и вызывает альтернативную активацию макрофагов, связанную с поляризацией иммунного ответа в сторону Th2 (Donnelly et al., 2005).

Тиоредоксин присутствует в составе ЭСП многих трематод (Delcroix et al., 2007; Mulvenna et al., 2010; Di Maggio et al., 2016). Однако у *O. viverrini* этот белок был обнаружен только в 7-суточном ЭСП (Mulvenna et al., 2010). С помощью иммуногистохимии определена его локализация в тканях *O. viverrini* и эпителии желчных протоков, непосредственно примыкающих к паразиту (Suttiyapara et al., 2012). Показано, что рекомбинантный тиоредоксин *O. viverrini* ингибирует редокс-зависимый апоптоз и активирует антиапоптотические гены в холангиоцитах, тем самым возможна его роль в холангиоканцерогенезе (Matchimakul et al., 2015).

Антиоксидантные ферменты семейства GST, SOD, тиоредоксин пероксидаза и тиоредоксин широко представлены в ЭСП паразитов-гематофагов, защищая их от АФК, продуцируемых не только клетками иммунной системы хозяина, но и образующихся в процессе переваривания гемоглобина (Callahan et al., 1988; Oliveira, Oliveira, 2002; Donnelly et al., 2008). Вероятно, такое многообразие антиоксидантных ферментов и особенно GSTs в ЭСП *O. felineus* связано с особенностями его питания.

К следующей группе белков относятся **метаболические ферменты** (уроканат гидратаза, глутаматдегидрогеназа, ретинол-дегидрогеназа), в том числе ферменты углеводного обмена (фруктозо-1,6-бисфосфатаза, фосфоенолпируват-карбоксикиназа, фруктозо-1,6-бисфосфат альдолаза, лактатдегидрогеназа, триозофосфатизомераза, енолаза). Хотя это традиционно цитозольные ферменты, многие из них определяются в ЭСП у трематод, в том числе представителей семейства Opisthorchiidae (см Приложение 2) (Knudsen et al., 2005; Marcilla et al., 2012; Mulvenna et al., 2010; Zheng et al., 2011). Для

некоторых из этих ферментов наряду с метаболическими описаны дополнительные функции. Например, енолаза (фермент гликолиза, присутствующий в большинстве описанных ЭСП трематод) способна присоединять плазминоген, что, вероятно, помогает паразитам осуществлять протеолиз внеклеточного матрикса (Marcella et al., 2007). Белок фруктозо-1,6-бисфосфатаза (также классически является ферментом гликолиза) *C. sinensis* может специфически связываться с плазматической мембраной звездчатых клеток печени *in vitro* (клеточная линия LX-2), вызывая их пролиферацию и повышая уровень экспрессии ключевых факторов развития фиброза (α -актин гладких мышц, коллаген I и III типов), иммуногистохимически показана его локализация в эпителии желчных протоков (Liang et al., 2013). Функции метаболических ферментов *O. felineus* еще предстоит исследовать.

В ЭСП *O. felineus* идентифицированы следующие **протеолитические ферменты**: катепсины F и B1, цистеиновая протеаза и лейцинаминопептидаза 2. Кроме того, по данным анализа одномерного гель-электрофореза (см. Рисунок 34 и Таблицу 1), катепсин F является одним из мажорных белков в ЭСП *O. felineus*. Это говорит о важной роли этого белка в выживании *O. felineus* в окончательном хозяине. В ЭСП *F. hepatica* ведущим компонентом являются несколько протеаз семейства катепсинов L, и это единственные белки, которые были обнаружены при исследовании состава ЭСП не только после культивирования *in vitro*, но и *in vivo* в желчи инфицированных овец (Morphew et al., 2007).

Важно отметить, что спектр протеаз в ЭСП у представителей семейства Opisthorchiidae заметно различается (см. Приложение 2) (Ju et al., 2009; Mulvenna et al., 2010; Zheng et al., 2011). Например, у *O. viverrini* в 24-х часовой фракции ЭСП, несмотря на широкую представленность протеаз в транскриптом (Young et al., 2010) и использование масс-спектрометрического метода мониторинга множественных реакций (высококчувствительный метод для количественного анализа пептидов), был определен только катепсин D. Лишь в ЭСП, который собирали в течение 7 суток культивирования паразитов *in vitro*, с помощью вестерн-блот анализа, используя антитела к рекомбинантным белкам (катепсин F и легумаин) *O. viverrini*, удалось определить присутствие соответствующих протеаз. Это позволило авторам предположить, что протеазы не являются основным компонентом ЭСП *O. viverrini* в отличие от других трематод, в том числе и описторхид (Mulvenna et al., 2010). Низкое содержание протеолитических ферментов в ЭСП *O. viverrini* может быть связано, как с метаболическими особенностями этого гельминта, так и с низким уровнем экспрессии генов протеаз при культивировании *in vitro* в бессывороточной среде (отсутствует

субстрат), а также с ограниченной регургитацией содержимого кишечника паразита в культуральную среду (Mulvenna et al., 2010).

В секрете *C. sinensis* большее разнообразие протеаз: катепсины В, В2, F, цистеиновая протеаза, аминопептидаза, легумаин (Ju et al., 2009; Zheng et al., 2011). Легумаин при этом отмечен как мажорный антиген ЭСП, и его рекомбинантная форма рекомендована для усовершенствования иммунодиагностики клонорхоза (Ju et al., 2009). Хотя в EST-библиотеке (Romaznoy et al., 2013) присутствует несколько соответствующих этому белку транскриптов, легумаин не был обнаружен в ЭСП *O. felineus*. Его отсутствие может быть связано с особенностями локализации и секреции, что требует дальнейшего исследования.

Помимо обеспечения паразитов питательными веществами (катаболических функций) и процессинга их белков, протеазы выполняют дополнительные функции, в том числе связанные с взаимоотношениями в системе «паразит – хозяин». Например, они участвуют в эксцистировании, избегании атак иммунной системы (расщепление иммуноглобулинов) и деградации окружающих тканей, что вносит вклад в развитие патологии при гельминтозах (Sajid, McKerrow 2002; Williamson et al., 2003; Dzik, 2006; McKerrow et al., 2006; Кнох 2007). Учитывая это, можно предположить, что более сложный состав протеаз в ЭСП *O. felineus*, по сравнению с таковым *O. viverrini*, может быть одной из причин более выраженной патогенности *O. felineus*, обнаруженной в сравнительном исследовании гистологических изменений печени хомячков.

Наряду с протеазами, в ЭСП *O. felineus* присутствовали их ингибиторы, принадлежащие к семействам сериновых (leukocyte elastase inhibitor) и цистеиновых (putative cys1 protein, cystatin) **ингибиторов протеаз**. Показано, что эти белки у гельминтов ингибируют активность как их собственных протеаз, так и протеаз хозяина, а также обладают иммуномодулирующими свойствами (Dzik, 2006; Vray et al., 2002).

Другими важными компонентами секрета *O. felineus* являются **«транспортные белки»**: миоглобин, ферритин, белки, связывающий жирные кислоты (FABP, fatty acid binding proteins). Эти белки также характерны для ЭСП других трематод, в том числе и представителей семейства Opisthorchiidae (см. Приложение 2) (Ju et al., 2009; Liu et al., 2009; Mulvenna et al., 2010; Zheng et al., 2011).

У *O. viverrini* миоглобин присутствует в экзосомоподобных везикулах (Chaiyadet et al., 2015a). *In vitro* показано, что при добавлении рекомбинантного миоглобина *C. sinensis* к активированным с помощью ЛПС макрофагам RAW264.7, у них снижается уровень экспрессии индуцибельной NO-синтазы, Cu-Zn SOD1 и Mn SOD2, а также продукция перекиси водорода и NO (Ren et al., 2014). Как и многие другие трематоды, *O. felineus*

является факультативным анаэробом (Голубева, 1945; Gasser et al., 2016); обитая в желчных протоках окончательного хозяина, он испытывает дефицит кислорода. Миоглобин трематод участвует в резервировании кислорода, обладая большим сродством к кислороду, чем гемоглобин хозяина (Brook, 1989; Rashid et al., 1997), что может быть важным фактором обеспечения выживания *O. felineus* в обедненной кислородом среде. По данным, полученным при изучении транскриптома мариты *O. felineus*, мРНК миоглобина является одной из наиболее экспрессируемых, в отличие от транскриптома метацеркарии (Pomaznou et al., 2015). Наличие миоглобина в ЭСП и высокая экспрессия его гена указывают на важность этого белка для выживания мариты *O. felineus* в окончательном хозяине.

Ферритин играет центральную роль в поддержании молекул железа в растворимой и нетоксичной форме, минимизируя свободно-радикальные реакции и предотвращая повреждение клеток. Этот белок присутствует в ЭСП у всех описторхид, причем у *O. viverrini* только через 7 суток после культивирования. Эти данные согласуются с тем, что *O. felineus* и *C. sinensis* являются гематофагами, следовательно, контактируют с большим количеством гема и железа в том числе, в отличие от *O. viverrini*. Показано, что рекомбинантный белок тяжелой цепи ферритина *C. sinensis* повышает уровень провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6 через NF- κ B зависимый путь (один из важных путей для развития воспаления) при добавлении к линии LX-2 (человеческие печеночные звездчатые клетки) (Мао et al., 2014).

ФАВР, кроме жирных кислот, связывают стеролы, лизофосфолипиды, гем и желчные пигменты, выполняя и детоксикационную функцию (Glatz, van der Vusse, 1996). Известно, что трематоды не могут синтезировать жирные кислоты *de novo* и должны получать их от хозяина, поэтому ФАВР принимают участие в широком спектре биологических процессов паразитов (формирование мембран, созревание половой системы, продукция/ созревание яиц и т.д.). Учитывая важность ФАВР, их используют как мишени для разработки новых лекарств и вакцин против различных трематодозов (McManus, Loukas, 2008; Wei et al., 2010; Driguez et al., 2016).

В ЭСП *O. felineus* нами были определены такие белки, как циклофилин А, коллаген альфа-1 и белок теплового шока 70 кДа, характерные для ЭСП других трематод (Delcroix et al., 2007; Liu et al., 2009; Mullvena et al., 2010) (см. Приложение 2). Впервые для описторхид в секретоме *O. felineus* были идентифицированы гликозилфосфатидилинозитол (ГФИ) - якорный гликопротеин (GPI-anchored surface glycoprotein), перлекан (basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein, гепарансульфат протеогликан) и периостин. ГФИ-якорный гликопротеин,

выделяемый *S. mansoni*, связывается с липопротеиновыми частицами хозяина. Антитела, атакующие белок паразита, образуют с ними иммунные комплексы. Клетки, несущие рецепторы к Fc-фрагменту иммуноглобулинов, захватывают эти комплексы, что приводит к накоплению в них значительного количества липопротеинов и нарушению липидного гомеостаза. В частности, это способствует снижению жизнеспособности нейтрофилов и, таким образом, вносит вклад в развитие неэффективного иммунного ответа против паразита (Sprong et al., 2006). Вероятно, ГФИ-якорный гликопротеин может выполнять защитную функцию у *O. felineus* при атаке клеток иммунной системы хозяина.

Роль некоторых белков в жизнедеятельности гельминтов мало изучена. Например, периостин – это хорошо изученный белок человека, лиганд для интегринов, обеспечивает адгезию и миграцию эпителиальных клеток, участвует в ранозаживлении, отмечается его повышенная экспрессия в ряде опухолей, в том числе в холангиокарциноме показано его значительное накопление в клетках стромы и опухоли (Mogga, Moch, 2011). Роль периостина у гельминтов неизвестна.

Для 1276 масс-спектров пептидов (20,2%) из 6308, полученных при масс-спектрометрическом анализе ЭСП *O. felineus*, так и не удалось выявить значимого сходства с какими-либо белками. Аналогичная ситуация описана и другими авторами при исследовании белкового состава ЭСП трематод, проводимого с разделением смеси белков в полиакриламидном геле с последующим масс-спектрометрическим анализом полученных пятен (Curwen et al., 2004; Knudsen et al., 2005; Ju et al., 2009).

При анализе транскриптома *O. felineus* из 12665 последовательностей с предсказанной открытой рамкой считывания удалось аннотировать 11,059 (87,3%) и 7,753 (61,2%) транскриптов с использованием баз данных NCBI и Swissprot соответственно (Pomaznoy et al., 2015). При исследовании транскриптомов близкородственных видов *O. viverrini* и *C. sinensis* около 70% белковых последовательностей у каждого вида не имеют гомологов в существующих базах данных (Young et al., 2010). Авторы исследования предполагают, что именно эти белки являются специфичными для биологии этих печеночных сосальщиков, для их длительного существования в организме окончательного хозяина и, скорее всего, именно среди них следует искать потенциальные мишени для разработки новых лекарств и вакцин (Young et al., 2010). Следовательно, после полной аннотации транскриптомов описторхид можно рассчитывать на определение дополнительных белков в ЭСП *O. felineus*.

Наше внимание привлек белок из 24-х часовой фракции ЭСП *O. felineus*, гомологичный белку *C. sinensis* (GenBank номер AAM55183) с неизвестной функцией. Мы установили, что этот белок с молекулярной массой 8 кДа содержит 90 аминокислот,

причем первые 20 аминокислот являются сигнальным пептидом. Анализ аминокислотной последовательности этого белка с помощью ресурса InterPro показал отсутствие каких-либо консервативных доменов или мотивов. Однако предсказанная вторичная структура была схожа с такой у белка FhHDM-1 (*F. hepatica* Helminth Defense Molecule-1) (GenBank номер CCA61804.1), и проведенное выравнивание аминокислотных последовательностей этих двух белков подтвердило их гомологию (Рисунок 37 А). Анализ спиральных структур белка показал, что пептиды на С-конце (с 67 по 89 аминокислоту) обоих белков формируют четкую амфипатическую альфа-спираль, что является особенностью белков семейства HDMs (Helminth Defense Molecules) (Рисунок 37 Б). На момент проведения нашего исследования это было первое описание белка HDM семейства в секретах описторхид (Львова и др., 2014). Позднее представители этого семейства были обнаружены в составе секретируемых экзосомоподобных везикул *O. viverrini* (Chaiyadet et al., 2015a).

CCA61804.1FhHDM-1 Of-HDM	<u>MRFIVLLCLAVVLLAAYVEARPSEESREKLRESGRKMVKALRDAVTKAYE</u> 50 <u>MRLTVFICLVLVLFVANAEARPNEETRAKLRESGQKLWAAVLSAVKKCAE</u> 50 *:*:*:* *****:*: *: .***. *
CCA61804.1FhHDM-1 Of-HDM	KARDRAMAYLAKDNLGK ETEVITILLNRLTDRLEKYAGN 90 RFKQRVVEEYLEKDNLGK LAETIKILSERLTKRIENYVKE 90 : ::* . ** *****:*:*.* ** :***.*:*:* . : A

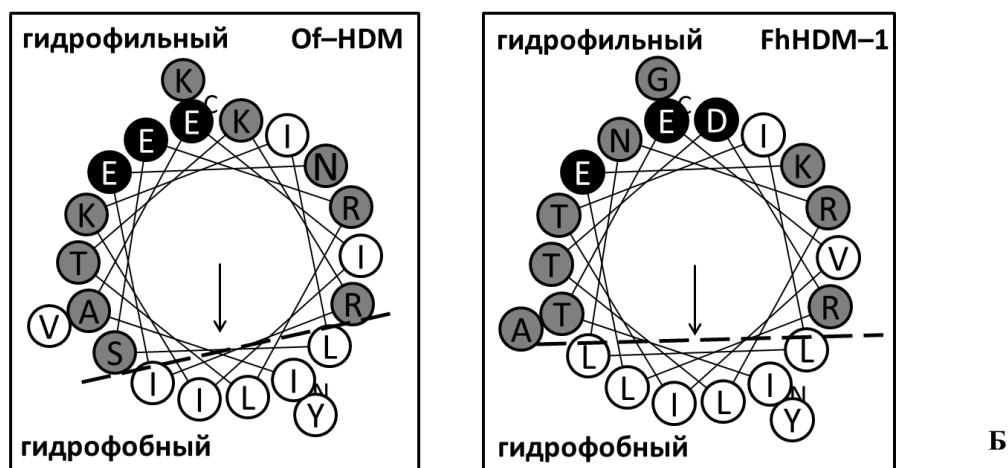


Рисунок 37. Сравнительный анализ белков Of-HDM из ЭСП *O. felineus* и FhHDM-1 (GenBank номер CCA61804.1). А – выравнивание аминокислотных последовательностей белков. Подчеркнуты сигнальные пептиды, в рамку выделены гомологичные участки с 67 по 89 аминокислоты на С-конце белков, имеющие вторичную структуру альфа-спирали. Звездочками обозначены идентичные аминокислоты, двоеточием и точкой – разная степень физико-химического сходства аминокислот. Б – анализ спиральной структуры белка. Показана четкая амфипатическая структура С-концевых пептидов обоих белков (выделенных рамкой на рисунке А), состоящая из гидрофобного и гидрофильного участков. Гидрофобные аминокислоты обозначены черными буквами в белых кружках, гидрофильные - белыми буквами в черных кружках, стрелка указывает на гидрофобный участок. Буквы С и N указывают на С и N концы пептида соответственно.

В транскриптомах большинства медицински значимых трематод обнаружены последовательности, гомологичные FhHDM-1 (Robinson et al., 2011), причем у мариты *O. felineus* их две, и обе относятся к числу высоко экспрессируемых (Pomaznou et al., 2015). Белки семейства HDM характеризуются схожестью функций и биохимических свойств с человеческими защитными пептидами (host defence peptides – HDP) – кателицидинами. Наиболее изученным белком у гельминтов, относящимся к семейству HDM, является пептид 8 кДа – FhHDM-1, секретируемый трематодой *F. hepatica* (Robinson et al., 2011). Как человеческий, так и паразитарный белки содержат пептиды из 21 аминокислоты, формирующие амфипатическую альфа-спираль, которая обладает значительным структурным сходством с биоактивным антимикробным пептидом человека LL-37 (37 аминокислотный C-концевой пептид белка CAP18) (Robinson et al., 2011).

FhHDM-1 обладает иммуномодулирующими свойствами: препятствует процессингу антигенов в макрофагах хозяина, что, в свою очередь, нарушает презентацию антигенов на поверхности макрофага (блокирует вакуолярную АТФазу), нарушая развитие эффективного иммунного ответа; препятствует развитию воспаления, индуцированного эндотоксином бактерий, связывая и нарушая его взаимодействие с Толл-подобными рецепторами на поверхности макрофагов и предотвращая секрецию медиатора воспаления – ФНО- α . Однако в отличие от кателицидинов хозяина, FhHDM-1 не обладает прямой антимикробной и гемолитической активностью (Robinson et al., 2013). Также для FhHDM-1 была показана способность связывать свободный гем, что крайне важно для питающихся кровью паразитов, так как свободный гем обладает высокой токсичностью (Martine-Sernandez et al., 2013).

Несмотря на то, что *O. felineus* и *O. viverrini* являются близкородственными видами, а ЭСП обоих гельминтов был получен по одинаковой методике, из наших и литературных данных видно, что белковый состав их ЭСП заметно отличается. Во-первых, в ЭСП *O. viverrini* наибольший удельный вес имеет белок с неизвестной функцией, гомологичный экспериментальному аутоиммунному антигену простаты, который не удалось определить у *O. felineus*. Во-вторых, в ЭСП *O. viverrini* меньше антиоксидантных белков, в-третьих, практически отсутствуют протеазы (см. Приложение 2) (Mulvenna et al., 2010; Chaiyadet et al., 2015a). Все это может свидетельствовать об особенностях анализа секретомы, так и о специфических особенностях биологии паразитов, принадлежащих к разным видам. В 7-дневном ЭСП *O. viverrini* был обнаружен гранулин (гомолог ростового фактора человека), для которого показано, что в условиях *in vitro* его рекомбинантная форма является митогеном даже в очень низких концентрациях, способствует

ранозаживлению и ангиогенезу (Smout et al., 2015; Suttiaprapa et al., 2018). Несмотря на то, что у животных, инфицированных *O. felineus*, наблюдался более выраженный фиброз, гиперплазия, метаплазия эпителия, нам не удалось определить этот белок в секретоме. Можно предположить, что он секретируется в незначительных количествах (был определен в 7-дневном ЭСП *O. viverrini*), и в нашем 24-часовом исследовании его количество осталось за гранью чувствительности метода. Однако в транскриптоме *O. felineus*, проанализированном в нашей лаборатории, было обнаружено пять гранулиноподобных транскриптов. Из них два новых и специфичных для *O. felineus*. Причем четыре из пяти транскриптов являлись высоко экспрессируемыми на стадии половозрелой мариты (Pomaznou et al., 2015), что свидетельствует о важной роли этого белка в жизнедеятельности *O. felineus*.

Как и в других исследованиях секретомов трематод, мы обнаружили в составе ЭСП *O. felineus* большое количество несекретируемых белков – 20 (44%) (см. Приложение 2), т.е. белков, не имеющих сигнальных пептидов, например, изоформы GST, цитозольные и структурные белки. Похожая картина наблюдается при изучении многих секретомов трематод. Это можно объяснить следующим образом. Хотя мариты *O. felineus* могут выживать в культуральной среде длительное время (1 месяц и более) (Кондинский, 1974), условия *in vitro* для них не оптимальны. В естественных условиях постоянно обновляется поверхностный слой тегумента, что необходимо для избегания паразитом иммунного ответа хозяина (Dalton et al., 2004; Robinson et al., 2009). В условиях *in vitro*, возможно, нет полноценной замены десквамированным участкам поверхности тегумента, вследствие чего в культуральную среду могут попадать («подтекать») и накапливаться цитозольные и цитоскелетные белки (Morphew et al., 2007).

С другой стороны, наличие «несекреторных» белков в ЭСП может быть связано с новыми механизмами секреции у *O. felineus*. Так, для дрожжей с помощью различных экспериментальных подходов (генетических, цитологических и протеомных) было убедительно показано, что енолаза даже в отсутствие типичного сигнального пептида секретируется на поверхность, вероятно, с помощью новых секреторных механизмов (Lopez-Villar et al., 2006). Для енолазы *E. caproni*, не имеющей сигнального пептида, но являющейся компонентом ЭСП этого паразита, показано наличие на N-конце белка высоко консервативного региона, гомологичного таковому у нематоды *Trichinella spiralis* (Owen 1835), который является альтернативой сигнальному пептиду (Nakada et al., 2005; Marcilla et al., 2007). С помощью программы SecretomeP в ЭСП *O. felineus* было определено 18 белков с неклассическим путем секреции (см. Приложение 2).

Наконец, в последнее время широко исследуется секреция с помощью внеклеточных микровезикул, в том числе экзосом. Экзосомы – везикулы округлой формы, диаметром 30-100 нм, окруженные двойной мембраной, участвующие в секреции белков у различных организмов, в том числе и паразитов (Marcilla et al., 2012). У *E. caproni*, *F. hepatica* и *O. viverrini* большинство белков ЭСП секретируются в пространство между паразитом и хозяином с помощью экзосомоподобных везикул, которые затем попадают в клетки хозяина (Marcilla et al., 2012; Chaiyadet et al., 2015a). Таким образом, эти везикулы играют значительную роль во взаимоотношениях между паразитами и хозяином (Silverman, Reiner, 2011; Marcilla et al., 2012).

Тегумент мариты *O. felineus* обладает высокой секреторной активностью, и в его толще находится большое количество везикул и полиморфных электронно-плотных включений, выход которых на поверхность осуществляется мерокриновым способом (Куперман и др., 1991). Это позволяет предположить наличие у *O. felineus* секреции с помощью экзосомоподобных везикул. Для проверки этой гипотезы по стандартному протоколу (They et al., 2006) были выделены микровезикулы из ЭСП *O. felineus*, и проведен электронно-микроскопический анализ. Это позволило обнаружить внеклеточные микровезикулы диаметром 80 - 200 нм, окруженные двойной мембраной (Рисунок 38). По ультраструктуре они идентичны экзосомоподобным везикулам, которые были определены для других гельминтов (Marcilla et al., 2012; Chaiyadet et al., 2015a). Полученные нами данные указывают на то, что несекретируемые белки могут попадать в культуральную среду в составе микровезикул. Состав и возможная роль этих везикул во взаимоотношениях марит *O. felineus* с окончательным хозяином нуждается в дальнейшем исследовании.

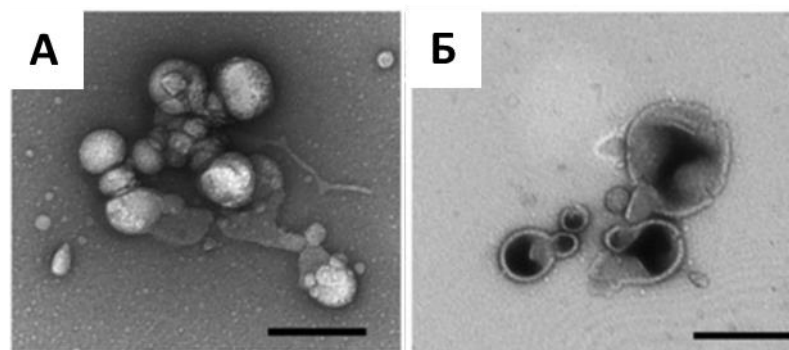


Рисунок 38. Микровезикулы, выделенные из ЭСП *O. felineus*. А, Б – негативное контрастирование везикул, выделенных из среды, в которой культивировали марит *O. felineus*. Шкала: 200 нм.

Для трематод описан способ избегания иммунного ответа хозяина с помощью маскировки поверхности белками хозяина (Tarleton, Kemp, 1981; Loukas et al., 2001; Liu et al., 2009), причем в содержимом кишечника этих гельминтов присутствуют белки и пептиды

хозяина как источник аминокислот (Delcroix et al., 2007). Учитывая это и то, что во многих секретах трематод содержатся белки хозяина, нами был проведен поиск таких белков в ЭСП *O. felineus*. Для определения этих белков все масс-спектры были проанализированы с помощью базы данных, содержащей аминокислотные последовательности белков грызунов, сформированной на основе данных SwissProt. Во избежание ложноположительных результатов все пептиды, которые были определены как «хозяйские», проверялись на принадлежность к паразиту. Нами определено 8 белков (Таблица 2), принадлежащих хомячку. Небольшое количество определённых нами белков может свидетельствовать о том, что в процесс «отмывки» гельминтов (при подготовке к культивированию *in vitro*) часть белков могла потеряться, а те, которые остались и были определены, попали в ЭСП в основном вместе с содержимым кишечника *O. felineus*.

Таблица 2. Белки хозяина (*Mesocricetus auratus*), присутствующие в ЭСП *O. felineus* по базе данных SwissProt.

SwissProt ID	Название белка	Вид	Масса белка, Да	Скор	Количество обнаруженных уникальных пептидов
A6YF56	Albumin	<i>Mesocricetus auratus</i>	68181	643	15
Q9Z2L4	Apolipoprotein A-I	<i>Mesocricetus auratus</i>	30720	334	12
P06337	Complement C3	<i>Rattus norvegicus</i>	50165	333	9
P01026	Ig mu chain C region	<i>Mesocricetus auratus</i>	186342	223	3
P01945	Hemoglobin subunit alpha	<i>Mesocricetus auratus</i>	15239	152	4
P02094	Hemoglobin subunit beta	<i>Mesocricetus auratus</i>	15981	137	4
Q921I1	Serotransferrin precursor	<i>Mus musculus</i>	76674	128	1
O35086	Haptoglobin	<i>Mesocricetus auratus</i>	38577	63	1

Обнаруженные нами субъединицы гемоглобина (Hemoglobin), альбумин (Albumin), гаптоглобин (Haptoglobin) и др. хомячка в ЭСП *O. felineus* подтверждают полученные нами ранее данные о том, что этот гельминт является гематофагом, и в его рационе присутствует кровь хозяина. Вероятно, вышеперечисленные белки попали в ЭСП с содержимым кишечника. Известно, что для паразитов, питающихся кровью (*Schistosoma spp.*, *F. hepatica*), гемоглобин и альбумин являются основными поставщиками аминокислот (Delcroix et al., 2007; Hall et al., 2011). Транспортные белки: серотрансферрин (Serotransferrin) – переносчик ионов Fe^{3+} и аполипопротеин А-1 (Apolipoprotein A-I) – основной транспортер холестерина в

липопротеинах высокой плотности, также являются белками плазмы. Обнаружение белков, относящихся к иммунной системе хозяина [компонент системы комплемента C3 (Complement C3), C регион цепи IgM (Ig mu chain C region)] указывает на тесную связь иммунной системы хозяина и паразита.

Питание гельминтов и, в частности, деградация белков хозяина, это ключевой катаболический процесс для поддержания жизнедеятельности паразита, а также продукции яиц (Delcroix et al., 2006). Протеазы, питающихся кровью паразитов, участвуют в гидролизе гемоглобина. Для *S. mansoni* и *F. hepatica* показано, что катепсин B1 обладает гемоглибиназной активностью. Также для гельминтов-гематофагов был определен набор протеаз, участвующих в деградации гемоглобина, который включает катепсины B, L, C, D, легумаин и аминопептидазы (лейцинаминопептидаза и карбоксипептидаза) (Delcroix et al., 2006; Dzik, 2006). Часть из перечисленных ферментов нами обнаружена в секрете *O. felineus* (см Приложение 2). В нем присутствуют катепсины B1 и F и лейцинаминопептидаза, а катепсин F является мажорным белком, и в его аминокислотной последовательности есть мотив, обладающий гемоглибиназной активностью.

В транскриптоме марицы *O. felineus* дополнительно были определены легумаин и карбоксипептидаза (Romaznoy et al., 2015). Учитывая, что в ЭСП *O. felineus* находятся белки крови хозяина, и в просвете кишечника гельминта обнаружены деградирующие эритроциты, можно предположить, что протеазы, обнаруженные в секрете, участвуют в гидролизе гемоглобина. Интересно, что для *O. viverrini* были получены рекомбинантные катепсины B1 и F, и определена их ферментативная активность в отношении гемоглобина, причем при совместной работе этих ферментов гидролиз шел более эффективно (Stipa et al., 2010). Катепсин F локализован в семенниках, матке, вителлиновых железах и кишечнике *O. viverrini* (Pinlaor et al., 2009). У некоторых гельминтов, например, *H. contortus*, ферментные комплексы, участвующие в переваривании крови, заякорены на мембране клеток кишечника (Dalton et al., 2004). Однако в просвете кишечника у *O. viverrini* наличие клеток крови нам обнаружить не удалось, поэтому способ питания *O. viverrini* нуждается в дальнейшем исследовании.

Сочетание определенных нами белков хозяина и паразита в ЭСП *O. felineus* определяет ряд ключевых взаимоотношений в системе «паразит – хозяин». Деградация протеолитическими ферментами белков крови и, в частности, гемоглобина, ведет к образованию большого количества гема и железа, которые в свободном состоянии высокотоксичны для гельминтов. Этим можно объяснить присутствие в ЭСП *O. felineus* ферритина (депо железа), белка Of-HDM – гомолога FhHDM-1, способного связывать

гем, и широкого спектра антиоксидантных ферментов, препятствующих образованию АФК (см. Рисунок 37 и Приложение 2).

Большинство паразитов-гематофагов являются ауксотрофами, то есть у них частично или полностью отсутствуют ферменты синтеза какого-либо метаболита. У трематод, в том числе описторхид, частично или полностью отсутствуют ферменты синтеза гема *de novo* (Rao et al., 2005). Однако в нашей лаборатории было определено, что одной из наиболее экспрессируемых мРНК в транскриптоме мариты *O. felineus* является мРНК миоглобина (Pomaznou et al., 2013; Pomaznou et al., 2015), который также присутствует и в ЭСП этого гельминта. Простетической группой миоглобина является гем. Неясно, используют ли описторхи гем хозяина для синтеза своих гемсодержащих белков, и с помощью каких механизмов это происходит. В ЭСП *O. felineus* был определен всего один белок, для гомолога которого показана способность связывать гем – это Of-HDM (Martínez-Sernandez et al., 2009).

В исследованиях секретомов трематод авторы использовали разные методики получения ЭСП и анализировали его с помощью различных масс-спектрометрических подходов. Тем не менее, сравнение секрета *O. felineus* с ранее описанными ЭСП других трематод показало, что около 67% определенных нами белков идентичны белкам, по крайней мере, одного из перечисленных в Приложении 2 секретомов. Это согласуется с данными, полученными при сравнении секрета *S. japonicum* с ЭСП большого количества трематод и нематод (Liu et al., 2009), и свидетельствует о наличии общих молекулярных механизмов, вовлеченных во взаимоотношения «паразит – хозяин», их консервативности (универсальности) среди различных видов паразитов. Наиболее широко представленными в секретах различных трематод оказались антиоксидантные белки (GSTs, TPx, Trx, SOD), метаболические ферменты (енолаза, фруктозо-1,6-бисфосфат альдолаза, триозофосфатизомераза), катепсин В, миоглобин, ферритин, FABP и HSP70.

3.4. Рекомбинантный белок тиоредоксин пероксидаза *O. felineus*

Специфическое иммунопероксидазное окрашивание антителами к суммарному ЭСП антигену *O. felineus* наблюдалось не только в тканях гельминта, но и в эпителии желчных протоков, в том числе мелких (см. Рисунок 34). В этих протоках никогда не было гельминтов, однако присутствие ЭСП антигена способствовало формированию воспалительной инфильтрации, что указывает на роль ЭСП *O. felineus* в патоморфогенезе изменений, наблюдаемых в печени. Аналогичную картину наблюдали при описторхозе, вызванном *O. viverrini* (Sripa, Kaewkes, 2000b). *In vitro* показана активация пролиферации фибробластов под действием ЭСП *O. viverrini* (Thuwajit et al., 2006). Нормальные

холангиоциты человека (клеточная линия H69) в условиях *in vitro* захватывают белки ЭСП *O. viverrini* с помощью эндоцитоза экзосомоподобных везикул, они накапливаются в цитоплазме, активируют пролиферацию клеток и секрецию ИЛ-6 (Chaiyadet et al., 2015a; b). Секретируемые белки определяют механизмы взаимодействия в системе «паразит – хозяин». Для животных, инфицированных *O. viverrini*, показано участие ряда белков ЭСП (тиоредоксин пероксидаза, тиоредоксин, GST 28 кДа, гранулин и др.) в патогенезе наблюдаемых в печени изменений при описторхозе, в том числе канцерогенезе (Suttiprapa et al., 2008; Daogueang et al., 2012; Matchimakul et al., 2015; Suttiprapa et al., 2018).

Роль белков – компонентов ЭСП у *O. felineus* не изучена. В ЭСП *O. felineus* присутствует широкий спектр антиоксидантных ферментов. Вероятно, они защищают гельминтов от АФК, которые секретируют клетки иммунной системы хозяина, такие как эозинофилы, нейтрофилы и макрофаги, а также от АФК, которые образуются в процессе переваривания гемоглобина. Тиоредоксин пероксидаза (ТРх) – основной фермент, катализирующий расщепление перекиси водорода у трематод в отсутствие каталазы (Dzik, 2006).

Нами был получен растворимый рекомбинантный белок тиоредоксин пероксидазы *O. felineus* (компонента ЭСП) в прокариотической системе экспрессии. На Рисунке 39 представлена электрофореграмма анализа экспрессии целевого белка и его растворимости.

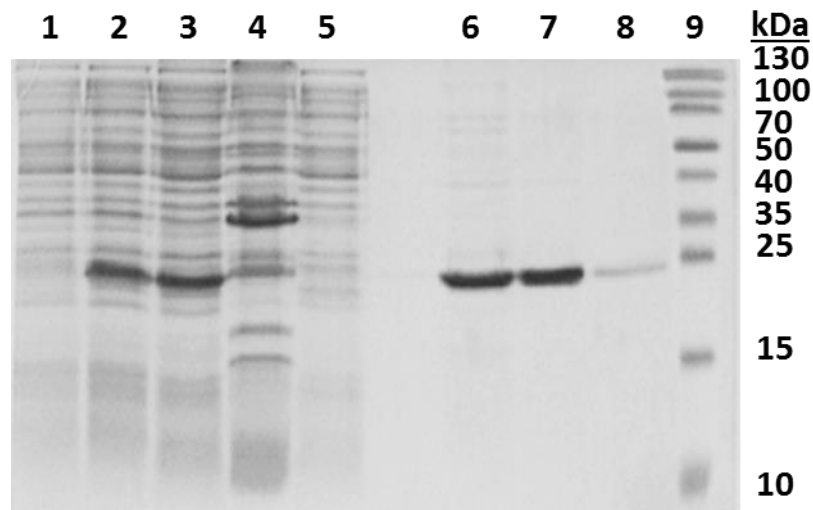


Рисунок 39. Анализ экспрессии, растворимости и очистки рекомбинантного белка тиоредоксин пероксидазы *O. felineus* с помощью 10%-го полиакриламидного гелевого электрофореза. 1 – осадок лизата *E. coli* до индукции ИПТГ, 2 – осадок лизата *E. coli* после индукции ИПТГ, 3 – супернатант лизата *E. coli* после индукции ИПТГ, 4 – осадок лизата *E. coli* после индукции ИПТГ, 5 – промывка, 6 – 9 очищенный рекомбинантный белок тиоредоксин пероксидазы *O. felineus*, 9 – маркер Prestained Protein MW Marker, («Pierce», США).

Для определения роли ТРх *O. felinus* в патогенезе описторхоза и возможного его распределения в тканях хозяина нами были получены поликлональные кроличьи антитела к рекомбинантному белку ТРх. С помощью вестерн-блот анализа в нашей лаборатории было продемонстрировано, что при моделировании окислительного стресса *in vitro* мариты *O. felinus* увеличивают секрецию ТРх в инкубационную среду (Пахарукова и др., 2017), что демонстрирует антиоксидантную роль ТРх в ЭСП *O. felinus*.

На Рисунке 40 представлены результаты иммуногистохимического окрашивания образцов печени хомячков на сроках 2 и 8 недель после инфицирования *O. felinus*. На срезах печени неинфицированных животных специфической окраски не наблюдалось.

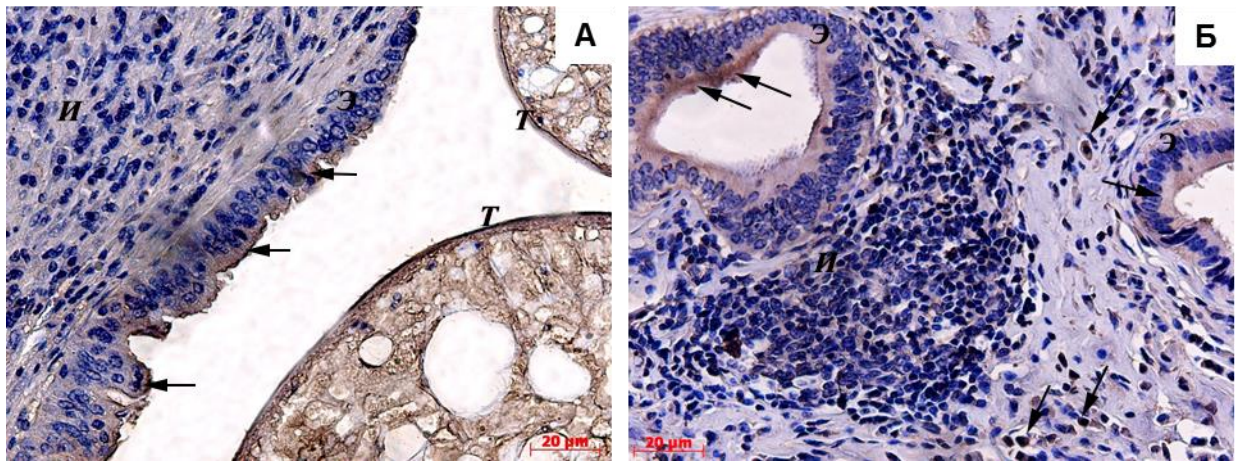


Рисунок 40. Локализация тиоредоксин пероксидазы *O. felinus* в тканях печени хомячков, инфицированных *O. felinus*, (А) – 2 недели после инфицирования, (Б) – 8 недель после инфицирования. Стрелки указывают на клетки, окрашенные антителами к ТРх *O. felinus*. И – инфильтрация клетками воспаления. Э – эпителий желчных протоков. Т – тегумент *O. felinus*. Иммунопероксидазное окрашивание. Увеличение x200.

У инфицированных животных иммунопероксидазное окрашивание показало наличие ТРх не только в теле гельминта, но и в эпителии желчных протоков. Причем на ранних сроках инфекции (2 недели после инфицирования) белок присутствовал в апикальной части холагиоцитов и с течением времени (8 недель после инфицирования) равномерно распределялся по холангиоцитам и присутствовал в клетках перидуктальных инфильтратов (см. Рисунок 40). Эти данные согласуются с исследованием распределения ТРх *O. viverrini* в тканях печени инфицированных животных (Suttiprapa et al., 2008).

В нашей лаборатории было проведено иммуногистохимическое исследование с помощью антител к ТРх *O. felinus* ткани желчного пузыря пациентов (после холецистэктомии) с диагнозом «калькулезный холецистит в сочетании с описторхозом» (Пахарукова и др., 2017). Было продемонстрировано присутствие ТРх *O. felinus* в клетках эпителия жечного пузыря инфицированных людей. Это указывает на высокую иммуногенность ТРх *O. felinus*. Учитывая то, что *O. felinus* секретирует этот белок в

окружающую среду, полученные антитела можно использовать для возможного обнаружения ТРх в биологических жидкостях (кровь, желчь) пациентов, страдающих описторхозом (Пахарукова и др., 2017). На основании полученных нами результатов можно предложить использование рекомбинантной ТРх *O. felineus* и антител к ней для усовершенствования иммунодиагностики описторхоза, вызванного *O. felineus*.

Учитывая длительность описторхозной инфекции и развитие тяжелых осложнений вплоть до холангиокарциномы, накопление ЭСП и, в частности, ТРх *O. felineus* в холангиоцитах свидетельствует о их важной роли в патогенезе заболевания и возникновении осложнений. Таким образом, полученные нами результаты расширяют наши представления о роли ЭСП и ТРх в патогенезе описторхоза, вызванного *O. felineus* у человека и инфицированных лабораторных животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе впервые проведено сравнительное гистологическое исследование изменений печени хомячков, инфицированных двумя эпидемиологически значимыми видами *O. felineus* и *O. viverrini*. Были выявлены специфические различия, связанные с видом гельминта, по интенсивности и срокам возникновения патологических проявлений при развитии экспериментального описторхоза. Более ранние и выраженные изменения при описторхозе, вызванном *O. felineus*, такие как воспаление, гиперплазия и дисплазия эпителия, гранулемы вокруг яиц паразита, холангиоэктазы, перидуктальный фиброз и холангиофиброз, накопление в гепатобилиарной системе депозитов гемозоина, сочетались с особенностями биологии (гематофагия) этого гельминта.

Впервые доказано, что *O. felineus*, а также близкородственный вид *C. sinensis* являются паразитами-гематофагами. В кишечнике *O. felineus* обнаружены деградирующие клетки крови и темно-коричневый пигмент гемозоин – продукт обезвреживания гема, образующийся в процессе переваривания гемоглобина. Биокристаллизация гемозоина у *O. felineus* и *C. sinensis* происходит аналогично процессу, описанному для *S. mansoni*, а именно путем ассоциации молекул гема с липидными каплями на разделе водной и липидной фаз. В кишечнике *O. viverrini* клетки крови и гемозоин используемыми нами методами обнаружить не удалось. Так как блокирование процесса формирования гемозоина является одним из механизмов действия противомаларийных препаратов, которые показали свою эффективность в отношении трематод-гематофагов (*C. sinensis*, *S. mansoni* и др.), следует ожидать подобной активности и в отношении описторхоза, вызванного *O. felineus*. Блокирование процесса формирования гемозоина может быть ключевым звеном при разработке эффективных антигельминтных средств в отношении трематод-гематофагов, что было показано на примере противомаларийных препаратов.

Впервые продемонстрировано присутствие экскреторно-секреторного антигена *O. felineus* и его компонента тиоредоксин пероксидазы не только в тканях гельминта, но и в эпителии желчных протоков хозяина, в том числе мелких, свободных от паразитов. Наличие специфической иммуногистохимической окраски данной локализации, сочетающейся с инфильтрацией клетками воспаления, подтверждает роль ЭСП и его компонента ТРх *O. felineus* в патогенезе возникающих при описторхозе изменений печени.

С помощью различных протеомных подходов впервые был определен белковый состав ЭСП *O. felineus*. Идентифицировано 45 белков, которые можно разделить на группы в соответствии с их биологической функцией: структурные, антиоксидантные, транспортные белки, протеолитические, метаболические ферменты, ингибиторы протеаз,

белки с неизвестной функцией и прочие. Особого внимания заслуживают широко представленные в секрете *O. felineus* антиоксидантные белки. В ЭСП *O. felineus* присутствует весь спектр ферментов необходимых для обезвреживания АФК. У *O. felineus* определено 4 изоформы GST – это больше, чем в секретах других описторхид. По данным анализа белков ЭСП *O. felineus*, разделенных с помощью одномерного гель-электрофореза, одними из наиболее секретируемых являются GST и катепсин F. Кроме катепсина F, в состав ЭСП *O. felineus* входят катепсин B, цистеиновая протеаза и аминокатаптаза. Это отличает секретом *O. felineus* от секрета близкородственного вида *O. viverrini*, у которого протеазы не являются основным компонентом ЭСП. На момент проведения исследования нами впервые было продемонстрировано присутствие белка HDM семейства в секретах описторхид.

Наряду с белками паразита, в ЭСП *O. felineus* обнаружены белки крови хозяина, которые попали в ЭСП, вероятно, с содержимым кишечника гельминтов. Особенности питания (гематофагия) и белкового состава ЭСП (преобладание антиоксидантных и протеолитических ферментов, а также белков крови хозяина), безусловно, играют специфическую роль в патогенезе описторхоза, вызванного *O. felineus*, и, по сравнению с *O. viverrini*, могут обуславливать его большую патогенность для лабораторных животных. Как и в других исследованиях секретомов трематод, в составе ЭСП *O. felineus* обнаружено большое количество несекретируемых белков – 20 (44%), которые могут транспортироваться в составе микровезикул (диаметр 80-200 нм). Состав и возможная роль этих везикул во взаимоотношениях мартит *O. felineus* с окончательным хозяином нуждаются в дальнейшем исследовании.

Таким образом, полученные нами сравнительные данные о гистологических изменениях гепатобилиарной системы при моноинвазии двумя представителями рода *Opisthorchis*, об особенностях биологии и составе ЭСП *O. felineus* расширяют представления о взаимоотношениях гельминта и хозяина, о формировании осложнений и вносят вклад в дальнейшее совершенствование диагностики и лечения описторхоза, вызванного *O. felineus*.

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 ЛИТЕРАТУРЫ

- Астафьев Б.А., Яроцкий Л.С., Лебедев М.Н. Экспериментальные модели паразитозов в биологии и медицине. – М.: Наука, 1989. – 275 с.
- Афтаева, Л.Н., Мельнико, В.Л., Никольская, М. В. Описторхоз в аспекте тяжелых осложнений // Известия ВУЗов. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2018. – №. 4. – С. 160–172.
- Ахрем-Ахремович Р.М. Описторхоз человека (клиника, лечение и профилактика). – М.: Медгиз, 1963. – 147 с.
- Байкова О.А., Николаева Н.Н., Грищенко Е.Г., Николаева Л.В. Холангиокарцинома, ассоциированная с хроническим описторхозом и клонорхозом // Здоровье и образование в XXI веке. – 2018. – №. 4. – С. 27–32.
- Безр С.А. Биология возбудителя описторхоза. – М.: КМК, 2005. – 336 с.
- Бражникова Н.А., Толкаева М.В. Рак печени, желчных путей и поджелудочной железы при хроническом описторхозе // Бюл. сиб. мед.. – 2002. – №. 2. – С. 71–76.
- Бражникова Н.А., Цхай В.Ф. Клиника, диагностика и лечение осложнений описторхоза // Анналы хирургической патологии. – 2004. – Т. 9, №. 2. – С. 40–44.
- Герман С.М., Безр, С.А. Метод определения жизнеспособности яиц описторхисов, основанный на выходе мирацидиев в экспериментальных условиях // Мед. паразитол. и паразит. болезни. – 1984. – №. 1. – С. 57 – 60.
- Гинецинская Т.А. Трематоды – их жизненный цикл, биология и экология. – Ленинград: Наука, 1968. – Т 3. – 337 с.
- Голубева Н.А. К вопросу об обмене веществ у *Opisthorchis felineus* // Мед. паразитол. и паразит. болезни. – 1945. – №. 4 – С. 45–48.
- Горчакова Н.Г., Быков В.П., Усенков А.В. Функционирование открытых паразитарных систем на примере описторхоза. – Нижний Новгород: Издательство Ю.А. Николаева, 2003. – 174 с.
- Дроздов В.Н., Зубов Н.А. Острый описторхоз у детей. – Кемерово: Кемер. кн. изд-во, 1982. – 71 с.
- Забозлаев А.Г. Изменения в системе крови у больных дифиллоботриозом и описторхозом // Мед. паразитол. и паразит. болезни. – 1974. – Т 43. – №. 6 – С. 685–689.
- Звягина В.В., Начева Л.В. Состояние гликогена в органах и тканях метацеркарий *Opisthorchis felineus* // Мед. паразитол. и паразит. болезни. – 1993. – №. 5 – С. 23–26.

- Зуевский В.П. Патоморфология печени при различных формах описторхоза. – Ханты-Мансийск: ООО «Типография печатное дело», 2010. – 299 с.
- Кондинский В.Г. О культивировании половозрелых описторхисов / В сб.: Вопросы краевой инфекционной патологии. Тюмень. 1974. – С. 169–170.
- Котелкин А.Т., Колесникова Л.В., Рябчикова Е.И., Локтев В.Б. Выявление локализации иммунодоминантных антигенов в маритах *Opisthorchis felineus* с помощью иммунной электронной микроскопии // Вестник РАМН. – 2001. – №. 3 – С. 34–39.
- Котелкин А.Т., Разумов И.А., Локтев В.Б. Полипептидный состав основных антигенов и выявление доминирующих иммуногенных белков *Opisthorchis felineus* // Вестник РАМН. – 1998. – №. 4 – С. 29–33.
- Котелкин А.Т., Разумов И.А., Покровский И.В., Локтев В.Б. Сравнительное изучение соматического, экскреторно-секреторного и яичного антигенов *Opisthorchis felineus* // Мед. паразитол. и паразит. болезни. 1997. – Т. 1. – №. 3. – С. 12–16.
- Кужель Д.К., Бекиш В.Я., Зорина В.В. Генотоксическое и цитотоксическое воздействие марит кошачьего сосальщика на соматические клетки хозяина // Вестник ВГМУ. – 2013. – №. 3. – С. 106–115.
- Куперман Б.И., Гиновкер А.Г., Володин А.В., Поддубная Л.Г., Кривенко В.В. Ультраструктура взрослых трематод *Opisthorchis felineus* // Докл. Академии наук СССР. – 1991. – Т. 317 – №. 2. – С. 462–464.
- Озерецковская Н.Н. Органная патология в острой стадии тканевых гельминтозов: роль эозинофилии крови и тканей, иммуноглобулинемии E, G4 и факторов, индуцирующих иммунный ответ // Мед. паразитол. и паразит. болезни. – 2000. – №. 3. – С. 3–8.
- Пальцев А.И. Хронический описторхоз с позиций системного подхода. Клиника, диагностика, патоморфоз, лечение // Приложение РМЖ «Болезни Органов Пищеварения». – 2005. – №. 2. – С. 96–101.
- Пальцев А.И., Яхина С.В. Эпидемиология описторхидозов // Тер. Архив. – 2008. – Т. 80 – №. 2. – С. 89 – 92.
- Пахарукова М.Ю., Ковнер А.В., Триголубов А.Н., Федин Е.Н., Михайлова Е.С., Штофин С.Г., Аутеншлюс А.И., Мордвинов В.А. Механизмы патогенеза трематодозов: присутствие секреторных белков кошачьей двуустки *Opisthorchis felineus* в тканях желчного пузыря у больных хроническим описторхозом // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2017. – Т. 21 – №. 3. – С. 312–316.

- Писарева Л.Ф., Чойнзонов Е.Л., Бояркина А.П., Одинцова И.Н., Гольдин В.Д., Мартынова Н.А., Тахауов Р.М. Особенности онкологической заболеваемости населения Томской области (1990-2001 гг.) // Бюл. сиб. мед. – 2003. – №. 4 – С. 86–95.
- Роспотребнадзор. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году // Государственный доклад. Москва: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2019. – 254 с.
- Соловьева О.Г., Хадиева Е.Д., Бычков В.Г. Роль метаболитов паразита в патогенезе болезней легких при суперинвазивном описторхозе // Пермский медицинский журнал. – 2011. – №. 2. – С. 104–107.
- Степанова Т.Ф., Бакштановская И.В., Степанова К.Б., Чирко Ю.В., Арапова О.Н. Особенности биохимии желчи при описторхозной инвазии // Фундаментальные исследования. – 2006. – №. 1. – С. 37–38.
- Сыскова Т.Г. Паразитарные заболевания в Российской Федерации в условиях миграции населения // Мед паразитология и паразитарные болезни. – 2004. – №. 1. – С. 3–5.
- Тун М.А., Белобородова Э.И. Морфологическая диагностика поражения печени при хроническом описторхозе // Мед. паразитол. и паразит. болезни. – 1993. – №. 3. – С. 19–21.
- Фаттахов Р.Г. Зараженность рыб личинками возбудителя описторхоза на территории России и некоторых сопредельных стран (по материалам кадастра очагов описторхоза России, 1994) // Мед. паразитол. и паразит. болезни. – 2002. – №. 1. – С. 25–27.
- Шмырева Т.А. Морфологические изменения внутрипеченочных желчных протоков при описторхозе // Архив патологии. – 1966. – №. 6. – С. 40–45.
- Яблоков Д.Д. Описторхоз человека. – Томск: Изд-во ТГУ, 1979. – 237 с.
- Abath F.G., Werkhauser R.C. The tegument of *Schistosoma mansoni*: functional and immunological features // Parasite Immunol. – 1996. – Vol. 1. – P. 15–20.
- Adams P.A., Egan T.J., Ross D.C., Silver J., Marsh P.J. The chemical mechanism of beta-haematin formation studied by Mossbauer spectroscopy // Biochem J. – 1996. – Vol. 318. – P. 25–27.
- Allan D., Payares G., Evans W.H. The phospholipid and fatty acid composition of *Schistosoma mansoni* and of its purified tegumental membrane // Mol Biochem Parasitol. – 1987. – Vol. 2. – P. 123–128.

- Ambele M.A., Sewell B.T., Cummings F.R., Smith P.J., Egan T.J. Synthetic Hemozoin (beta-Hematin) Crystals Nucleate at the Surface of Neutral Lipid Droplets that Control Their Sizes // *Cryst Growth Des.* 2013. – Vol. 13. №. 10.
- Angeli V., Faveeuw C., Roye O., Fontaine J., Teissier E., Capron A., Wolowczuk I., Capron M., Trottein F. Role of the parasite-derived prostaglandin D2 in the inhibition of epidermal Langerhans cell migration during schistosomiasis infection // *J Exp Med.* – 2001.– Vol. 10. – P. 1135–1147.
- Anyona S.B., Kempaiah P., Raballah E., Davenport G.C., Were T., Konah S.N., Vulule J.M., Hittner J.B., Gichuki C.W., Ong'echa J.M., Perkins D.J. Reduced systemic bicycloprostaglandin-E2 and cyclooxygenase-2 gene expression are associated with inefficient erythropoiesis and enhanced uptake of monocytic hemozoin in children with severe malarial anemia // *Am J Hematol.* – 2012. – Vol. 8. – P. 782–789.
- Apinhasmit W., Sobhon P., Saitongdee P., Menayotin S., Upatham E. S. *Opisthorchis viverrini*: ultrastructure of the tegument of the first-week juveniles and adult flukes. *Int J Parasitol.* – 1994. – Vol. 5. – P. 613–621.
- Apinhasmit W., Sobhon P., Tarasub C., Mothong W., Saitongdee P., Sretarugsa P., Wanichanon C., Upatham E. S. *Opisthorchis viverrini*: ultrastructure and cytochemistry of the glycocalyx of the tegument // *J Helminthol.* 2000. – Vol. 1. – P. 23–29.
- Asare K.K., Boampong J.N., Ameyaw E.O., Thomford A.K., Afoakwa R., Kwakye-Nuako G., Thomford K.P., Quashie N.B. Microscopic identification of possible *Clonorchis/Opisthorchis* infection in two Ghanaian women with undiagnosed abdominal discomfort: two case reports // *J Med Case Rep.* – 2014. – Vol. 8. – P. 369.
- Atamna H., Ginsburg H. Heme degradation in the presence of glutathione. A proposed mechanism to account for the high levels of non-heme iron found in the membranes of hemoglobinopathic red blood cells // *J Biol Chem.* – 1995. – Vol. 42. – P. 24876–24883.
- 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: Study of blood cell composition, hematopoiesis, and startle reflex in laboratory animals // *Russian Journal of Genetics: Applied Research.* – 2017. – Vol. 1. – P. 82–92.
- Bae Y.A., Ahn D.W., Lee E.G., Kim S.H., Cai G.B., Kang I., Sohn W.M., Kong Y. Differential activation of diverse glutathione transferases of *Clonorchis sinensis* in response to the host bile and oxidative stressors // *PLoS Negl Trop Dis.* – 2013. Vol. 5. :e2211.
- Barrett J., Jefferies J.R., Brophy P.M. Parasite proteomics // *Parasitol Today.* – 2000. – Vol. 9. – P. 400–403.

- Bendrat K., Berger B.J., Cerami A. Haem polymerization in malaria // *Nature*. – 1995. – Vol. 378. № 6553. – P. 138–139.
- Bendtsen J.D., Jensen L.J., Blom N., Von Heijne G., Brunak S. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion // *Protein Eng Des Sel*. – 2004. – Vol. 17. – №. 4. – P. 349–356.
- Berasain P., Goni F., McGonigle S., Dowd A., Dalton J.P., Frangione B., Carmona C. Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components // *J Parasitol*. – 1997. – Vol. 83. – №. 1. – P. 1–5.
- Berger I., Simon G., Bychkov V. Hepatic cell reactions in experimental (hamster) and natural invasion (cat) by *Opisthorchis felinus*: a light and electron microscopical study // *Parasitol Int*. – 1998. – Vol. 47. (Suppl) – P. 204.
- Bernal D., Carpena I., Espert A.M., De la Rubia J.E., Esteban J.G., Toledo R., Marcilla A. Identification of proteins in excretory/secretory extracts of *Echinostoma friedi* (Trematoda) from chronic and acute infection // *Proteomics*. – 2006. – Vol. 6. – №. 9. – P. 2835–2843.
- Bernal D., Trelis M., Montaner S., Cantalapiedra F., Galiano A., Hackenberg M., Marcilla A. Surface analysis of *Dicrocoelium dendriticum*. The molecular characterization of exosomes reveals the presence of miRNAs // *J Proteomics*. – 2014. – Vol. 105. – P. 232–41.
- Bhamarapravati N., Thammavit W., Vajrasthira S. Liver changes in hamsters infected with a liver fluke of man, *Opisthorchis viverrini* // *Am J Trop Med Hyg*. – 1978. – Vol. 27. – №. 4. – P. 787–94.
- Bility M.T., Sripa B. Chronic *Opisthorchis viverrini* infection and associated hepatobiliary disease is associated with iron loaded M2-like macrophages // *Korean J Parasitol*. – 2014. – Vol. 52. – №. 6. – P. 695–9.
- Bogitsh B.J. An overview of surface specializations in the digenetic trematodes // *Hydrobiologia*. – 1986. – Vol. 132. – №. 1. – P. 305–10
- Bohle D.S., Dinnebier R.E., Madsen S.K., Stephens P.W. Characterization of the products of the heme detoxification pathway in malarial late trophozoites by X-ray diffraction // *J Biol Chem*. – 1997. – Vol. 272. – №. 2. – P. 713–6.
- Bohle D.S., Kosar A.D., Stephens P.W. Phase homogeneity and crystal morphology of the malaria pigment beta-hematin // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. – 2002. – Vol. 58 – P. 1752–6.

- Botelho M.C., Alves H., Richter J. Wound healing and cancer progression in *Opisthorchis viverrini* associated cholangiocarcinoma // *Parasitol Res.* – 2016. – Vol. 115. – №. 7. – P. 2913–4.
- Boura M., Frita R., Gois A., Carvalho T., Hanscheid T. The hemozoin conundrum: is malaria pigment immune-activating, inhibiting, or simply a bystander? // *Trends Parasitol.* – 2013. – Vol. 29. – №. 10. – P. 469–76.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248–54.
- Bradshaw R., Bleay S., Clench M.R., Francese S. Direct detection of blood in fingermarks by MALDI MS profiling and imaging // *Sci Justice.* – 2014. – Vol. 54. – №. 2. – P. 110–7.
- Braschi S., Borges W.C., Wilson R.A. Proteomic analysis of the schistosome tegument and its surface membranes // *Mem Inst Oswaldo Cruz.* – 2006. – Vol. 101. – Suppl 1. – P. 205–12.
- Braschi S., Wilson R.A. Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation // *Mol Cell Proteomics.* – 2006. – Vol. 5. – №. 2. – P. 347–56.
- Brindley P.J., Kalinna B.H., Dalton J.P., Day S.R., Wong J.Y., Smythe M.L., McManus D.P. Proteolytic degradation of host hemoglobin by schistosomes // *Mol Biochem Parasitol.* – 1997. – Vol. 89. – №. 1. – P. 1–9.
- Brook I. Aerobic and anaerobic microbiology of biliary tract disease // *J Clin Microbiol.* – 1989. – Vol. 27. – №. 10. – P. 2373–5.
- Butykai A., Orban A., Kocsis V., Szaller D., Bordacs S., Tatrai-Szekeres E., Kiss L.F., Bota A., Vertessy B.G., Zelles T., Kezsmarki I. Malaria pigment crystals as magnetic micro-rotors: key for high-sensitivity diagnosis // *Sci Rep.* – 2013. – Vol. 3. – P. 1431.
- Callahan H.L., Crouch R.K., James E.R. Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants? // *Parasitol Today.* – 1988. – Vol. 4. – №. 8. – P. 218–25.
- Cameron G.R., Ganguly N.C. An Experimental Study of the Pathogenesis and Reversibility of Schistosomal Hepatic Fibrosis // *J Pathol Bacteriol.* – 1964. – Vol. 87. – P. 217–37.
- Capron A., Capron M., Dombrowicz D., Riveau G. Vaccine strategies against schistosomiasis: from concepts to clinical trials // *Int Arch Allergy Immunol.* – 2001. – Vol. 124. – №. 1–3. – P. 9–15.

- Carter M.D., Reese Harry S, Wright D.W. Identification of hydroxyeicosatetraenoic acid components of schistosomal hemozoin // *Biochem Biophys. Res Commun.* – 2007. – Vol. 363. – №. 3. – P. 867–72.
- Chaiyadet S., Smout M, Johnson M., Whitchurch C., Turnbull L., Kaewkes S., Sotillo J., Loukas A., Sripa B. Excretory/secretory products of the carcinogenic liver fluke are endocytosed by human cholangiocytes and drive cell proliferation and IL6 production // *Int J Parasitol.* – 2015a. – Vol. 45. – №. 12. – P. 773–81.
- Chaiyadet S., Sotillo J., Krueajampa W., Thongsen S., Brindley P.J., Sripa B., Loukas A., Laha T. Vaccination of hamsters with *Opisthorchis viverrini* extracellular vesicles and vesicle-derived recombinant tetraspanins induces antibodies that block vesicle uptake by cholangiocytes and reduce parasite burden after challenge infection // *PLoS Negl Trop Dis.* – 2019. – Vol. 13. – №. 5 :e0007450.
- Chaiyadet S., Sotillo J., Smout M., Cantacessi C., Jones M.K., Johnson M.S., Turnbull L., Whitchurch C.B., Potriquet J., Laohaviroj M., Mulvenna J., Brindley P.J., Bethony J.M., Laha T., Sripa B., Loukas A. Carcinogenic Liver Fluke Secretes Extracellular Vesicles That Promote Cholangiocytes to Adopt a Tumorigenic Phenotype // *J Infect Dis.* – 2015b. – Vol. 212. – №. 10. – P. 1636–45.
- Charoensuk L., Subrungruang I., Mungthin M., Pinlaor S., Suwannahitatorn P. Comparison of stool examination techniques to detect *Opisthorchis viverrini* in low intensity infection // *Acta Trop.* – 2019. – Vol. 191. – P. 13–6.
- Chen M.M., Shi L., Sullivan D.J Jr. *Haemoproteus* and *Schistosoma* synthesize heme polymers similar to *Plasmodium* hemozoin and beta-hematin // *Mol Biochem Parasitol.* 2001. – Vol. 113. № 1. – P. 1–8.
- Chiabrando D., Vinchi F., Fiorito V., Mercurio S., Tolosano E. Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes // *Front Pharmacol.* – 2014. – Vol. 5. – P. 61.
- Cho P.Y., Lee M.J., Kim T.I., Kang S.Y., Hong S.J. Expressed sequence tag analysis of adult *Clonorchis sinensis*, the Chinese liver fluke // *Parasitol Res.* – 2006. – Vol. 99. № 5. – P. 602–8.
- Chotigeat W., Ruenwongsa P. Types of collagen in *Opisthorchis viverrini* infected hamster liver // *Mol Biochem Parasitol.* – 1986. – Vol. 18. – №. 3. – P. 377–87.
- Chou A.C., Fitch C.D. Heme polymerase: modulation by chloroquine treatment of a rodent malaria // *Life Sci.* 1992. – Vol. 51. № 26. – P. 2073–8.
- Chu D.S., Jeong K.H., Rim H. Studies on the blood intake activity by *Clonorchis sinensis* in experimental animals // *Korea Univ. Med. J.* – 1982. – Vol. 19. – P. 71–80.

- Chugh M., Sundararaman V., Kumar S., Reddy V.S., Siddiqui W.A., Stuart K.D., Malhotra P. Protein complex directs hemoglobin-to-hemozoin formation in *Plasmodium falciparum* // Proc Natl Acad Sci USA. – 2013. – Vol. 110. – № 14. – P. 5392–7.
- Combrinck J.M., Mabothe T.E., Ncokazi K.K., Ambele M.A., Taylor D., Smith P.J., Hoppe H.C., Egan T.J. Insights into the role of heme in the mechanism of action of antimalarials // ACS Chem Biol. – 2013. – Vol. 8. – № 1. – P. 133–7.
- Cooper H.M., Patterson Y. Production of polyclonal antisera // Curr Protoc Immunol. 2008. Chapter 2:Unit 2 4 1–2 4 10.
- Coppens I., Vielemeyer O. Insights into unique physiological features of neutral lipids in Apicomplexa: from storage to potential mediation in parasite metabolic activities // Int J Parasitol. – 2005. – Vol. 35. – № 6. – P. 597–615.
- Coronado L.M., Nadovich C.T., Spadafora C. Malarial hemozoin: from target to tool // Biochim Biophys Acta. – 2014. – Vol. 1840. – № 6. – P. 2032–41.
- Correa Soares J.B., Maya-Monteiro C.M., Bittencourt-Cunha P.R., Atella G.C., Lara F.A., d'Avila J.C., Menezes D., Vannier-Santos M.A., Oliveira P.L., Egan T.J., Oliveira M.F. Extracellular lipid droplets promote hemozoin crystallization in the gut of the blood fluke *Schistosoma mansoni* // FEBS Lett. – 2007. – Vol. 581. – № 9. – P. 1742–50.
- Correa Soares J.B., Menezes D., Vannier-Santos M.A., Ferreira-Pereira A., Almeida G.T., Venancio T.M., Verjovski-Almeida S., Zishiri V.K., Kuter D., Hunter R., Egan T.J., Oliveira M.F. Interference with hemozoin formation represents an important mechanism of schistosomicidal action of antimalarial quinoline methanols // PLoS Negl Trop Dis. – 2009. – Vol. 3. – № 7. e477.
- Cox F.E., Liew F.Y. T-cell subsets and cytokines in parasitic infections // Immunol Today. – 1992. – Vol. 13. – № 11. – P. 445–8.
- Curwen R.S., Ashton P.D., Johnston D.A., Wilson R.A. The *Schistosoma mansoni* soluble proteome: a comparison across four life-cycle stages // Mol Biochem Parasitol. – 2004. – Vol. 138. – № 1. – P. 57–66.
- Cvilink V., Lamka J., Skalova L. Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths // Drug Metab Rev. – 2009. – Vol. 41. – № 1. – P. 8–26.
- Cwiklinski K., de la Torre-Escudero E., Trelis M., Bernal D., Dufresne P.J., Brennan G.P., O'Neill S., Tort J., Paterson S., Marcilla A., Dalton J.P., Robinson M.W. The Extracellular Vesicles of the Helminth Pathogen, *Fasciola hepatica*: Biogenesis Pathways and Cargo Molecules Involved in Parasite Pathogenesis // Mol Cell Proteomics. – 2015. – Vol. 14. – № 12. – P. 3258–73.

- Dalton J.P. Fasciolosis. – United Kingdom, CABI Publishing, 1999.
- Dalton J.P., Skelly P., Halton D.W. Role of the tegument and gut in nutrient uptake by parasitic platyhelminths // *Can. J. Zool.* – 2004. – Vol. 82. – P. 211–32.
- Daorueang D., Thuwajit P., Roittrakul S., Laha T., Kaewkes S., Endo Y., Thuwajit C. Secreted *Opisthorchis viverrini* glutathione S-transferase regulates cell proliferation through AKT and ERK pathways in cholangiocarcinoma // *Parasitol Int.* – 2012. – Vol. 61. – №. 1. – P. 155–61.
- de Sousa Abreu R., Penalva L.O., Marcotte E.M., Vogel C. Global signatures of protein and mRNA expression levels // *Mol Biosyst.* – 2009. – Vol. 5. – №. 12. – P. 1512–26.
- Delcroix M., Medzihradsky K., Caffrey C.R., Fetter R.D., McKerrow J.H. Proteomic analysis of adult *S. mansoni* gut contents // *Mol Biochem Parasitol.* – 2007. – Vol. 154. – №. 1. – P. 95–7.
- Delcroix M., Sajid M., Caffrey C.R., Lim K.C., Dvorak J., Hsieh I., Bahgat M., Dissous C., McKerrow J.H. A multienzyme network functions in intestinal protein digestion by a platyhelminth parasite // *J Biol Chem.* – 2006. – Vol. 281. – №. 51. – P. 39316–29.
- Demirev P.A., Feldman A.B., Kongkasuriyachai D., Scholl P., Sullivan D., Jr., Kumar N. Detection of malaria parasites in blood by laser desorption mass spectrometry // *Anal Chem.* – 2002. – Vol. 74. – №. 14. – P. 3262–6.
- Deponte M., Becker K. Glutathione S-transferase from malarial parasites: structural and functional aspects // *Methods Enzymol.* – 2005. – Vol. 401. – P. 241–53.
- Devenport M., Alvarenga P.H., Shao L., Fujioka H., Bianconi M.L., Oliveira P.L., Jacobs-Lorena M. Identification of the *Aedes aegypti* peritrophic matrix protein AeIMUCI as a heme-binding protein // *Biochemistry.* – 2006. – Vol. 45. – №. 31. – P. 9540–9.
- Di Maggio L.S., Tirloni L., Pinto A.F., Diedrich J.K., Yates Iii J.R., Benavides U., Carmona C., da Silva Vaz I., Jr., Berasain P. Across intra-mammalian stages of the liver fluke *Fasciola hepatica*: a proteomic study // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 32796.
- Ditrich O., Giboda M., Scholz T., Beer S.A. Comparative morphology of eggs of the Haplorchiinae (Trematoda: Heterophyidae) and some other medically important heterophyid and opisthorchiid flukes // *Folia Parasitol.* – 1992. – Vol. 39. – №. 2. – P. 123–32.
- Donnelly S., O'Neill S.M., Sekiya M., Mulcahy G., Dalton J.P. Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages // *Infect Immun.* 2005. – Vol. 73. – №. 1. – P. 166–73.

- Donnelly S., Stack C.M., O'Neill S.M., Sayed A.A., Williams D.L., Dalton J.P. Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages // *FASEB J.* – 2008. – Vol. 22. – № 11. – P. 4022–32.
- Dorn A., Stoffel R., Matile H., Bubendorf A., Ridley R.G. Malarial haemozoin/beta-haematin supports haem polymerization in the absence of protein // *Nature.* – 1995. – Vol. 374. – №. 6519. – P. 269–71.
- Dorn A., Vippagunta S.R., Matile H., Bubendorf A., Vennerstrom J.L., Ridley R.G. A comparison and analysis of several ways to promote haematin (haem) polymerisation and an assessment of its initiation *in vitro* // *Biochem Pharmacol.* – 1998. – Vol. 55. – №. 6. – P. 737–47.
- Driguez P., McManus D.P., Gobert G.N. Clinical implications of recent findings in schistosome proteomics // *Expert Rev Proteomics.* – 2016. – Vol. 13. №. 1. – P. 19–33.
- Dzik J.M. Molecules released by helminth parasites involved in host colonization // *Acta Biochim Pol.* – 2006. – Vol. 53. – № 1. – P. 33–64.
- Egan T.J. Haemozoin formation // *Mol Biochem Parasitol.* – 2008a. – Vol. 157. – №. 2. – P. 127–36.
- Egan T.J. Recent advances in understanding the mechanism of hemozoin (malaria pigment) formation // *J Inorg Biochem.* – 2008b. – Vol. 102. – №. 5–6. – P. 1288–99.
- Egan T.J., Chen J.Y., de Villiers K.A., Mabothe T.E., Naidoo K.J., Ncokazi K.K., Langford S.J., McNaughton D., Pandiancherri S., Wood B.R. Haemozoin (beta-haematin) biomineralization occurs by self-assembly near the lipid/water interface // *FEBS Lett.* – 2006. – Vol. 580. – №. 21. – P. 5105–10.
- Egan T.J., Ross D.C., Adams P.A. Quinoline anti-malarial drugs inhibit spontaneous formation of beta-haematin (malaria pigment) // *FEBS Lett.* – 1994. – Vol. 352. – №. 1. – P. 54–7.
- Emanuelsson O., Brunak S., von Heijne G., Nielsen H. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools // *Nat Protoc.* – 2007. – Vol. 2. – №. 4. – P. 953–71.
- Ershov N.I., Mordvinov V.A., Prokhortchouk E.B., Pakharukova M.Y., Gunbin K.V., Ustyantsev K., Genaev M.A., Blinov A.G., Mazur A., Boulygina E., Tsygankova S., Khrameeva E., Chekanov N., Fan G., Xiao A., Zhang H., Xu X., Yang H., Solovyev V., Lee S.M., Liu X., Afonnikov D.A., Skryabin K.G. New insights from *Opisthorchis felineus* genome: update on genomics of the epidemiologically important liver flukes // *BMC Genomics.* – 2019. – Vol. 20. – №. 1. :399.
- Fedorova O.S., Fedotova M.M., Sokolova T.S., Golovach E.A., Kovshirina Y.V., Ageeva T.S., Kovshirina A.E., Kobyakova O.S., Ogorodova L.M., Odermatt P. *Opisthorchis felineus*

- infection prevalence in Western Siberia: A review of Russian literature // *Acta Trop.* – 2018. – Vol. 178. – P. 196–204.
- Fitch C.D., Cai G.Z., Chen Y.F., Shoemaker J.D. Involvement of lipids in ferriprotoporphyrin IX polymerization in malaria // *Biochim Biophys Acta.* – 1999. – Vol. 1454. – №. 1. – P. 31–7.
- Fitch C.D., Kanjanangulpan P. The state of ferriprotoporphyrin IX in malaria pigment // *J Biol Chem.* – 1987. – Vol. 262. – №. 32. – P. 15552–5.
- Friedman J.F., Kanzaria H.K., McGarvey S.T. Human schistosomiasis and anemia: the relationship and potential mechanisms // *Trends Parasitol.* – 2005. – Vol. 21. – №. 8. – P. 386–92.
- Gasser R.B., Tan P., Teh B.T., Wongkham S., Young N.D. Genomics of worms, with an emphasis on *Opisthorchis viverrini* – opportunities for fundamental discovery and biomedical outcomes // *Parasitol Int.* – 2017. – Vol. 66. – №. 4. – P. 341–345
- Glatz J.F., van der Vusse G.J. Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance // *Prog Lipid Res.* – 1996. – Vol. 35. – №. 3. – P. 243–82.
- Gobert G.N., McManus D.P. Update on paramyosin in parasitic worms // *Parasitol Int.* – 2005. – Vol. 54. – №. 2. – P. 101–7.
- Gobert G.N., Stenzel D.J., McManus D.P., Jones M.K. The ultrastructural architecture of the adult *Schistosoma japonicum* tegument // *Int J Parasitol.* – 2003. – Vol. 33. – №. 14. – P. 1561–75.
- Golan D.E., Brown C.S., Cianci C.M., Furlong S.T., Caulfield J.P. Schistosomula of *Schistosoma mansoni* use lysophosphatidylcholine to lyse adherent human red blood cells and immobilize red cell membrane components // *J Cell Biol.* – 1986. – Vol. 103. – №. 3. – P. 819–28.
- Govorun V.M., Archakov A.I. Proteomic technologies in modern biomedical science // *Biochemistry.* – 2002. – Vol. 67. – №. 10. – P. 1109–23.
- Grimaud J.A., Borojevic R., Araujo Dos Santos H. Schistosomal pigment in human and murine infections with *Schistosoma mansoni* // *Trans R Soc Trop Med Hyg.* – 1976. – Vol. 70. – №. 1. – P. 73–7.
- Guillou F., Roger E., Mone Y., Rognon A., Grunau C., Theron A., Mitta G., Coustau C., Gourbal B.E. Excretory–secretory proteome of larval *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni*, two parasites of *Biomphalaria glabrata* // *Mol Biochem Parasitol.* – 2007. – Vol. 155. – №. 1. – P. 45–56.

- Hall S.L., Braschi S., Truscott M., Mathieson W., Cesari I.M., Wilson R.A. Insights into blood feeding by schistosomes from a proteomic analysis of worm vomitus // *Mol Biochem Parasitol.* – 2011. – Vol. 179. – №. 1. – P. 18–29.
- Harinasuta C., Harinasuta T. *Opisthorchis viverrini*: life cycle, intermediate hosts, transmission to man and geographical distribution in Thailand // *Arzneimittelforschung.* – 1984. – Vol. 34. – №. 9B. – P. 1164–7.
- Harwaldt P., Rahlfs S., Becker K. Glutathione S-transferase of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: characterization of a potential drug target // *Biol Chem.* – 2002. – Vol. 383. – №. 5. – P. 821–30.
- Hempelmann E., Motta C., Hughes R., Ward S.A., Bray P.G. *Plasmodium falciparum*: sacrificing membrane to grow crystals? // *Trends Parasitol.* – 2003. – Vol. 19. – №. 1. – P. 23–6.
- Herve M., Angeli V., Pinzar E., Wintjens R., Faveeuw C., Narumiya S., Capron A., Urade Y., Capron M., Riveau G., Trottein F. Pivotal roles of the parasite PGD2 synthase and of the host D prostanoid receptor 1 in schistosome immune evasion // *Eur J Immunol.* – 2003. – Vol. 33. – №. 10. – P. 2764–72.
- IARC. A review of human carcinogens. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Biological agents. – 2012. Lyon. – 441 S.
- Inatomi S., Tongu Y., Sakumoto D., Suguri S., Itano K. The ultrastructure of helminth. VI. The body wall of *Opisthorchis viverrini* (Poirier, 1886) // *Acta Med Okayama.* – 1971. – Vol. 25. – №. 2. – P. 129–42.
- Ishii M., Vroman B., LaRusso N.F. Fluid-phase endocytosis by intrahepatic bile duct epithelial cells isolated from normal rat liver // *J Histochem Cytochem.* – 1990. – Vol. 38. – №. 4. – P. 515–24.
- Isse K., Harada K., Zen Y., Kamihira T., Shimoda S., Harada M., Nakanuma Y. Fractalkine and CX3CR1 are involved in the recruitment of intraepithelial lymphocytes of intrahepatic bile ducts // *Hepatology.* – 2005. – Vol. 41. – №. 3. – P. 506–16.
- Itoh M., Sato S., Moriyama A., Sasaki M. Effective pretreatment by cysteine proteinase inhibitor for improved analysis of protein components of trematodes on SDS-PAGE // *J Helminthol.* – 1990. – Vol. 64. – №. 3. – P. 175–9.
- Jani D., Nagarkatti R., Beatty W., Angel R., Slebodnick C., Andersen J., Kumar S., Rathore D. HDP—a novel heme detoxification protein from the malaria parasite // *PLoS Pathog.* – 2008. – Vol. 4. – №. 4. e1000053.

- Jefferies J.R., Campbell A.M., van Rossum A.J., Barrett J., Brophy P.M. Proteomic analysis of *Fasciola hepatica* excretory-secretory products // *Proteomics*. – 2001. – Vol. 1. – №. 9. – P. 1128–32.
- Jeney V., Balla J., Yachie A., Varga Z., Vercellotti G.M., Eaton J.W., Balla G. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme // *Blood*. – 2002. – Vol. 100. – №. 3. – P. 879–87.
- Jones M.K., Gobert G.N., Zhang L., Sunderland P., McManus D.P. The cytoskeleton and motor proteins of human schistosomes and their roles in surface maintenance and host-parasite interactions // *Bioessays*. – 2004. – Vol. 26. – №. 7. – P. 752–65.
- Jones M.K., McManus D.P., Sivadorai P., Glanfield A., Moertel L., Belli S.I., Gobert G.N. Tracking the fate of iron in early development of human blood flukes // *Int J Biochem Cell Biol*. – 2007. – Vol. 39. – №. 9. – P. 1646–58.
- Ju J.W., Joo H.N., Lee M.R., Cho S.H., Cheun H.I., Kim J.Y., Lee Y.H., Lee K.J., Sohn W.M., Kim D.M., Kim I.C., Park B.C., Kim T.S. Identification of a serodiagnostic antigen, legumain, by immunoproteomic analysis of excretory-secretory products of *Clonorchis sinensis* adult worms // *Proteomics*. – 2009. – Vol. 9. – №. 11. – P. 3066–78.
- Kaewkes S. Taxonomy and biology of liver flukes // *Acta Trop*. – 2003. – Vol. 88. – №. 3. – P. 177–86.
- Kaewpitoon N., Laha T., Kaewkes S., Yongvanit P., Brindley PJ., Loukas A., Stripa B. Characterization of cysteine proteases from the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini* // *Parasitol Res*. – 2008. – Vol. 102. – №. 4. – P. 757–64.
- Kamal K.A., Fata J.S., Kilroy S., Skelly R.R., Ansari A.A. Modulatory effects of *Schistosoma mansoni* infection on bone marrow granulopoietic and erythropoietic activity in mice // *Ann Clin Lab Sci*. – 1989. – Vol. 19. – №. 1. – P. 56–64.
- Kang J.M., Bahk Y.Y., Cho P.Y., Hong S.J., Kim T.S., Sohn W.M., Na B.K. A family of cathepsin F cysteine proteases of *Clonorchis sinensis* is the major secreted proteins that are expressed in the intestine of the parasite // *Mol Biochem Parasitol*. – 2010. – Vol. 170. – №. 1. – P. 7–16.
- Kang J.M., Ju H.L., Lee J., Kim T.I., Cho S.H., Kim T.S., Sohn W.M., Na B.K. Mapping of the putative epitope domain of *Clonorchis sinensis* paramyosin (CsPmy) recognized by CsPmy-specific immunoglobulin G in sera of human clonorchiasis // *Mol Biochem Parasitol*. – 2015. – Vol. 201. – №. 1. – P. 66–71.
- Keiser J., Shu-Hua X., Jian X., Zhen-San C., Odermatt P., Tesana S., Tanner M., Utzinger J. Effect of artesunate and artemether against *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini* in rodent models // *Int J Antimicrob Agents*. – 2006. – Vol. 28. – №. 4. – P. 370–3.

- Keiser J., Utzinger J. Artemisinins and synthetic trioxolanes in the treatment of helminth infections // *Curr Opin Infect Dis.* – 2007. – Vol. 20. – №. 6. – P. 605–12.
- Keiser J., Utzinger J. Food-borne trematodiasis // *Clin Microbiol Rev.* – 2009. – Vol. 22. – №. 3. – P. 466–83.
- Kim J.R., Rim H.J., Lee M.J. Experimental studies on the blood loss and the intake of ^{51}Cr labelled red cells by *Clonorchis sinensis* in rabbits // *Korea Univ Med J.* – 1982. – Vol. 19. – P. 63–70.
- King S., Scholz T. Trematodes of the family Opisthorchiidae: a minireview // *Korean J Parasitol.* – 2001. – Vol. 39. – №. 3. – P. 209–21.
- Knox D.P. Proteinase inhibitors and helminth parasite infection // *Parasite Immunol.* – 2007. – Vol. 29. – №. 2. – P. 57–71.
- Knudsen G.M., Medzihradzky K.F., Lim K.C., Hansell E., McKerrow J.H. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* cercarial secretions // *Mol Cell Proteomics.* – 2005. – Vol. 4. – №. 12. – P. 1862–75.
- Kovner A.V., Pakharukova M.Y., Maksimova G.A., Mordvinov V.A. Characteristics of liver fibrosis associated with chronic *Opisthorchis felinus* infection in Syrian hamsters and humans // *Exp Mol Pathol.* – 2019. – Vol. 110. :104274.
- Laclette J.P., Shoemaker C.B., Richter D., Arcos L., Pante N., Cohen C., Bing D., Nicholson-Weller A. Paramyosin inhibits complement C1 // *J Immunol.* – 1992. – Vol. 148. – №. 1. – P. 124–8.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – Vol. 227. – №. 5259. – P. 680–5.
- Lara F.A., Lins U., Paiva-Silva G., Almeida I.C., Braga C.M., Miguens F.C., Oliveira P.L., Dansa-Petretski M. A new intracellular pathway of haem detoxification in the midgut of the cattle tick *Boophilus microplus*: aggregation inside a specialized organelle, the hemosome // *J Exp Biol.* – 2003. – Vol. 206. – P. 1707–15.
- Larsen R., Gouveia Z., Soares M.P., Gozzelino R. Heme cytotoxicity and the pathogenesis of immune-mediated inflammatory diseases // *Front Pharmacol.* – 2012. – Vol. 3. – P. 77.
- Lechner S., Muller-Ladner U., Schlottmann K., Jung B., McClelland M., Ruschoff J., Welsh J., Scholmerich J., Kullmann F. Bile acids mimic oxidative stress induced upregulation of thioredoxin reductase in colon cancer cell lines // *Carcinogenesis.* – 2002. – Vol. 23. – №. 8. – P. 1281–8.
- Leksomboon R., Chaijaroonkhanarak W., Arunyanart C., Umka J., Jones MK., Sripan B. Organization of the nervous system in *Opisthorchis viverrini* investigated by

- histochemical and immunohistochemical study // *Parasitol Int.* – 2012. – Vol. 61. – №. 1. – P. 107–11.
- Liang P., Sun J., Huang Y., Zhang F., Zhou J., Hu Y., Wang X., Liang C., Zheng M., Xu Y., Mao Q., Hu X., Li X., Xu J., Lu G., Yu X. Biochemical characterization and functional analysis of fructose-1,6-bisphosphatase from *Clonorchis sinensis* // *Mol Biol Rep.* – 2013. – Vol. 40. – №. 7. – P. 4371–82.
- Limakhina M.A. Blood and hemopoiesis in the bone marrow in opisthorchiasis // *Med Parazitol.* – 1954. – Vol. 23. – №. 4. – P. 309–11.
- Liu F., Cui S.J., Hu W., Feng Z., Wang Z.Q., Han Z.G. Excretory/secretory proteome of the adult developmental stage of human blood fluke., *Schistosoma japonicum* // *Mol Cell Proteomics.* – 2009. – Vol. 8. – №. 6. – P. 1236–51.
- Lopez-Villar E., Monteoliva L., Larsen MR., Sachon E., Shabaz M., Pardo M., Pla J., Gil C., Roepstorff P., Nombela C. Genetic and proteomic evidences support the localization of yeast enolase in the cell surface // *Proteomics.* – 2006. – Vol. 6. – Suppl. 1. – P. S107–18.
- Loukas A., Jones M.K., King L.T., Brindley P.J., McManus D.P. Receptor for Fc on the surfaces of schistosomes // *Infect Immun.* – 2001. – Vol. 69. – №. 6. – P. 3646–51.
- Lynn A., Chandra S., Malhotra P., Chauhan V.S. Heme binding and polymerization by *Plasmodium falciparum* histidine rich protein II: influence of pH on activity and conformation // *FEBS Lett.* – 1999. – Vol. 459. – №. 2. – P. 267–71.
- Maksimova G.A., Pakharukova M.Y., Kashina E.V., Zhukova N.A., Kovner A.V., Lvova M.N., Katokhin A.V., Tolstikova T.G., Sripa B., Mordvinov V.A. Effect of *Opisthorchis felineus* infection and dimethylnitrosamine administration on the induction of cholangiocarcinoma in Syrian hamsters // *Parasitol Int.* – 2017. – Vol. 66. – №. 4. – P. 458–63.
- Mambula S.S., Stevenson M.A., Ogawa K., Calderwood S.K. Mechanisms for Hsp70 secretion: crossing membranes without a leader // *Methods.* – 2007. – Vol. 43. – №. 3. – P. 168–75.
- Mao Q., Xie Z., Wang X., Chen W., Ren M., Shang M., Lei H., Tian Y., Li S., Liang P., Chen T., Liang C., Xu J., Li X., Huang Y., Yu X. *Clonorchis sinensis* ferritin heavy chain triggers free radicals and mediates inflammation signaling in human hepatic stellate cells // *Parasitol Res.* – 2014. – Vol. 114. – №. 2. – P. 659–70.
- Marcilla A., Perez-Garcia A., Espert A., Bernal D., Munoz-Antoli C., Esteban J.G., Toledo R. *Echinostoma caproni*: identification of enolase in excretory/secretory products, molecular cloning and functional expression // *Exp Parasitol.* – 2007. – Vol. 117. – №. 1. – P. 57–64.

- Marcilla A., Trelis M., Cortes A., Sotillo J., Cantalapiedra F., Minguez M.T., Valero M.L., Sanchez del Pino M.M., Munoz-Antoli C., Toledo R., Bernal D. Extracellular vesicles from parasitic helminths contain specific excretory/secretory proteins and are internalized in intestinal host cells // PLoS One. – 2012. – Vol. 7. №. 9. e45974.
- Martine-Sernandez V., Mezo M., Gonzalez-Warleta M., Perteguer M.J., Muino L., Guitian E., Garate T., Ubeira F.M. The MF6p/FhHDM-1 major antigen secreted by the trematode parasite *Fasciola hepatica* is a heme-binding protein // J Biol Chem. – 2013. – Vol. 289. – №. 3. – P. 1441–56.
- Matchimakul P., Rinaldi G., Suttiprapa S., Mann V.H., Popratiloff A., Laha T., Pimenta R.N., Cochran C.J., Kaewkes S., Sripa B., Brindley P.J. Apoptosis of cholangiocytes modulated by thioredoxin of carcinogenic liver fluke // Int J Biochem Cell Biol. – 2015. – Vol. 65. – P. 72–80.
- Maule A.G., Marks N.J. Parasitic Flatworms: Molecular Biology, Biochemistry, Immunology and Physiology. – London, CABI. 2006. – 448 S
- McKerrow J.H., Caffrey C., Kelly B., Loke P., Sajid M. Proteases in parasitic diseases // Annu Rev Pathol. – 2006. – Vol. 1. – P. 497–536.
- McManus D.P., Loukas A. Current status of vaccines for schistosomiasis // Clin Microbiol Rev. – 2008. – Vol. 21. – №. 1. – P. 225–42.
- Moloney N.A., Hinchcliffe P., Webbe G. The simple laboratory maintenance of a highly productive *Schistosoma japonicum* life cycle // Trans R Soc Trop Med Hyg. – 1987. – Vol. 81. – №. 1. – P. 67–8.
- Morales M.E., Rinaldi G., Gobert GN., Kines KJ., Tort J.F., Brindley P.J. RNA interference of *Schistosoma mansoni* cathepsin D, the apical enzyme of the hemoglobin proteolysis cascade // Mol Biochem Parasitol. – 2008. – Vol. 157. – №. 2. – P. 160–8.
- 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. – Vol. 10. – №. 5. – P. 385–401.
- Morphew R.M., Wright H.A., LaCourse E.J., Woods D.J., Brophy P.M. Comparative proteomics of excretory-secretory proteins released by the liver fluke *Fasciola hepatica* in sheep host bile and during in vitro culture ex host // Mol Cell Proteomics. – 2007. – Vol. 6. – №. 6. – P. 963–72.
- Morra L., Moch H. Periostin expression and epithelial-mesenchymal transition in cancer: a review and an update // Virchows Arch. – 2011. – Vol. 459. – №. 5. – P. 465–75.

- Mulvenna J., Hamilton B., Nagaraj S.H., Smyth D., Loukas A., Gorman J.J. Proteomics analysis of the excretory/secretory component of the blood-feeding stage of the hookworm, *Ancylostoma caninum* // Mol Cell Proteomics. – 2009. – Vol. 8. – №. 1. – P. 109–21.
- Mulvenna J., Sripa B., Brindley P.J., Gorman J., Jones M.K., Colgrave M.L., Jones A., Nawaratna S., Laha T., Suttiprapa S., Smout MJ., Loukas A. The secreted and surface proteomes of the adult stage of the carcinogenic human liver fluke *Opisthorchis viverrini* // Proteomics. – 2010. – Vol. 10. – №. 5. – P. 1063–78.
- Nakada T., Nagano I., Wu Z., Takahashi Y. Molecular cloning and functional expression of enolase from *Trichinella spiralis* // Parasitol Res. – 2005. – Vol. 96. – №. 6. – P. 354–60.
- Namiki S., Tomida T., Tanabe M., Iino M., Hirose K. Intracellular delivery of glutathione S-transferase into mammalian cells // Biochem Biophys Res Commun. – 2003. – Vol. 305. – №. 3. – P. 592–7.
- Newman D.M., Matelon R.J., Wears M.L., Savage L.B. The *In Vivo* Diagnosis of Malaria: Feasibility Study Into a Magneto-Optic Fingertip Probe // IEEE J Sel Top Quant Electron. – 2010. – Vol. 16. – №. 3. – P. 573–80.
- Noland G.S., Briones N., Sullivan D.J. Jr. The shape and size of hemozoin crystals distinguishes diverse *Plasmodium* species // Mol Biochem Parasitol. – 2003. – Vol. 130. – №. 2. – P. 91–9.
- Nakatani K., Ishikawa H., Aono S., Mizutani Y. Identification of essential histidine residues involved in heme binding and Hemozoin formation in heme detoxification protein from *Plasmodium falciparum* // Sci Rep. – 2014. – Vol. 4 – P. 6137.
- Okada K. The novel heme oxygenase-like protein from *Plasmodium falciparum* converts heme to bilirubin IXalpha in the apicoplast. FEBS Lett. – 2009. – Vol. 583. – №. 2. – P. 313–9.
- Oliveira M.F., d'Avila J.C., Tempone A.J., Soares J.B., Rumjanek F.D., Ferreira-Pereira A., Ferreira S.T., Oliveira P.L. Inhibition of heme aggregation by chloroquine reduces *Schistosoma mansoni* infection // J Infect Dis. – 2004. – Vol. 190. – №. 4 :843-52.
- Oliveira M.F., d'Avila J.C., Torres CR., Oliveira P.L., Tempone A.J., Rumjanek F.D., Braga C.M., Silva J.R., Dansa-Petretski M., Oliveira M.A., de Souza W., Ferreira S.T. Haemozoin in *Schistosoma mansoni* // Mol Biochem Parasitol. – 2000. – Vol. 111. – №. 1. – P. 217–21.
- Oliveira M.F., Gandara A.C., Braga C.M., Silva J.R., Mury F.B., Dansa-Petretski M., Menezes D., Vannier-Santos M.A., Oliveira P.L. Heme crystallization in the midgut of triatomine insects // Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. – 2007. – Vol. 146. – №. 1–2. – P. 168–74.

- Oliveira M.F., Kycia S.W., Gomez A., Kosar A.J., Bohle D.S., Hempelmann E., Menezes D. – 2005. – Vol. 579. – №. 27. – P. 6010–6.
- Oliveira P.L., Oliveira M.F. Vampires, Pasteur and reactive oxygen species. Is the switch from aerobic to anaerobic metabolism a preventive antioxidant defence in blood-feeding parasites? // FEBS Lett. – 2002. – Vol. 525. – №. 1–3. – P. 3–6.
- Pagola S., Stephens P.W., Bohle D.S., Kosar A.D., Madsen S.K. The structure of malaria pigment beta-haematin // Nature. – 2000. – Vol. 404. – №. 6775. – P. 307–10.
- Pakharukova M.Y., Ershov N.I., Vorontsova E.V., Katokhin A.V., Merkulova T.I., Mordvinov V.A. Cytochrome P450 in fluke *Opisthorchis felineus*: identification and characterization // Mol Biochem Parasitol. – 2012. – Vol. 181. – №. 2. – P. 190–4.
- Panton L.J., McPhie P., Maloy W.L., Wellemes T.E., Taylor D.W., Howard R.J. Purification and partial characterization of an unusual protein of *Plasmodium falciparum*: histidine-rich protein II // Mol Biochem Parasitol. – 1989. – Vol. 35. – №. 2. – P. 149–60.
- Parapini S., Basilico N., Pasini E., Egan T.J., Olliaro P., Taramelli D., Monti D. Standardization of the physicochemical parameters to assess in vitro the beta-hematin inhibitory activity of antimalarial drugs // Exp Parasitol. – 2000. – Vol. 96. – №. 4. – P. 249–56.
- Park T.J., Kang J.M., Na B.K., Sohn W.M. Molecular cloning and characterization of a paramyosin from *Clonorchis sinensis* // Korean J Parasitol. – 2009. – Vol. 47. – №. 4. – P. 359–67.
- Pascoa V., Oliveira P.L., Dansa-Petretski M., Silva J.R., Alvarenga P.H., Jacobs-Lorena M., Lemos F.J. *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion // Insect Biochem Mol Biol. – 2002. – Vol. 32. – №. 5. – P. 517–23.
- Perez-Sanchez R., Ramajo-Hernandez A., Ramajo-Martin V., Oleaga A. Proteomic analysis of the tegument and excretory-secretory products of adult *Schistosoma bovis* worms // Proteomics. – 2006. – Vol. 6. – Suppl 1. – P. S226–36.
- Pinlaor P., Kaewpitoon N., Laha T., Sripa B., Kaewkes S., Morales M.E., Mann V.H., Parriott S.K., Suttiprapa S., Robinson M.W., To J., Dalton J.P., Loukas A., Brindley P.J. Cathepsin F cysteine protease of the human liver fluke, *Opisthorchis viverrini* // PLoS Negl Trop Dis. – 2009. – Vol. 3. – №. 3. e398.
- Pinlaor S., Sripa B., Sithithaworn P., Yongvanit P. Hepatobiliary changes, antibody response, and alteration of liver enzymes in hamsters re-infected with *Opisthorchis viverrini* // Exp Parasitol. – 2004. – Vol. 108. – №. 1–2. – P. 32–9.
- Pisciotta J.M., Ponder E.L., Fried B., Sullivan D. Hemozoin formation in *Echinostoma trivolvis* rediae // Int J Parasitol. – 2005. – Vol. 35. – №. 10. – P. 1037–42.

- Pomaznoy M., Tatkov S., Katokhin A., Afonnikov D., Babenko V., Furman D., Brusentsov I., Belavin P., Najakshin A., Gusel'nikov S., Vasiliev G., Sivkov A., Prokhortchouk E., Skryabin K., Mordvinov V. Adult *Opisthorchis felinus* major protein fractions deduced from transcripts: comparison with liver flukes *Opisthorchis viverrini* and *Clonorchis sinensis* // Exp Parasitol. – 2013. – Vol. 135. – №. 2. – P. 297–306.
- Pomaznoy M.Y., Logacheva M.D., Young N.D., Penin A.A., Ershov N.I., Katokhin A.V., Mordvinov V.A. Whole transcriptome profiling of adult and infective stages of the trematode *Opisthorchis felinus* // Parasitol Int. – 2015. – Vol. 65. – №. 1. – P. 12–9.
- 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. – Vol. 126. – №. 1. – P. 54–62.
- Prasanphanich N.S., Mickum M.L., Heimburg-Molinaro J., Cummings R.D. Glycoconjugates in host-helminth interactions // Front Immunol. – 2013. – Vol. 4. – P. 240.
- Prasopdee S., Thitapakorn V., Sathavornmanee T., Tesana S. A comprehensive review of omics and host-parasite interplays studies, towards control of *Opisthorchis viverrini* infection for prevention of cholangiocarcinoma // Acta Trop. – 2019. – Vol. 196. – P. 76–82.
- Ranganathan S., Garg G. Secretome: clues into pathogen infection and clinical applications. Genome Med. – 2009. – Vol. 1. – №. 11. – P. 113.
- Rashid A.K., Van Hauwaert M.L., Haque M., Siddiqi A.H., Lasters I., De Maeyer M., Griffon N., Marden M.C., Dewilde S., Clauwaert J., Vinogradov S.N., Moens L. Trematode myoglobins, functional molecules with a distal tyrosine // J Biol Chem. – 1997. – Vol. 272. – №. 5. – P. 2992–9.
- Ren M., He L., Huang Y., Mao Q., Li S., Qu H., Bian M., Liang P., Chen X., Ling J., Chen T., Liang C., Wang X., Li X., Yu X. Molecular characterization of *Clonorchis sinensis* secretory myoglobin: delineating its role in anti-oxidative survival // Parasit Vectors. – 2014. – Vol. 7. – P. 250.
- Resende V.M., Vasilj A., Santos K.S., Palma M.S., Shevchenko A. Proteome and phosphoproteome of Africanized and European honeybee venoms // Proteomics. – 2013. – Vol. 13. – №. 17. – P. 2638–48.
- Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // J Cell Biol. – 1963. – Vol. 17. – P. 208–12.
- Rim H.J. The current pathobiology and chemotherapy of clonorchiasis // Kisaengchunghak Chapchi. – 1986. – Vol. 24 – Suppl. – P. 1–141.
- Rim H.J. Clonorchiasis: an update // J Helminthol. – 2005. – Vol. 79. – №. 3. – P. 269–81.

- Robinson M.W., Donnelly S., Dalton J.P. Helminth defence molecules—immunomodulators designed by parasites! // *Front Microbiol.* – 2013. – Vol. 4. – P. 296.
- Robinson M.W., Donnelly S., Hutchinson A.T., To J., Taylor N.L., Norton R.S., Perugini M.A., Dalton J.P. A family of helminth molecules that modulate innate cell responses via molecular mimicry of host antimicrobial peptides // *PLoS Pathog.* – 2011. – Vol. 7. – №. 5. e1002042.
- Robinson M.W., Menon R., Donnelly S.M., Dalton J.P., Ranganathan S. An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: proteins associated with invasion and infection of the mammalian host // *Mol Cell Proteomics.* – 2009. – Vol. 8. – №. 8. – P. 1891–907.
- Rosenfeld J., Capdevielle J., Guillemot J.C., Ferrara P. In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis // *Anal Biochem.* – 1992. – Vol. 203. – №. 1. – P. 173–9.
- Rychlik W., Rhoads R.E. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and *in vitro* amplification of DNA // *Nucleic Acids Res.* – 1989. – Vol. 17. – №. 21. – P. 8543–51.
- Saijuntha W., Sithithaworn P., Kiatsopit N., Andrews R.H., Petney T.N. Liver Flukes: *Clonorchis* and *Opisthorchis* // *Adv Exp Med Biol.* – 2019. – Vol. 1154. – P. 139–80.
- Sajid M., McKerrow J.H. Cysteine proteases of parasitic organisms // *Mol Biochem Parasitol.* – 2002. – Vol. 120 – P. 1–21.
- Saltykova I.V., Petrov V.A., Logacheva M.D., Ivanova P.G., Merzlikin N.V., Sazonov A.E., Ogorodova L.M., Brindley P.J. Biliary Microbiota, Gallstone Disease and Infection with *Opisthorchis felinus* // *PLoS Negl Trop Dis.* – 2016. – Vol. 10. – №. 7. e0004809.
- Saunders N., Wilson R.A., Coulson P.S. The outer bilayer of the adult schistosome tegument surface has a low turnover rate *in vitro* and *in vivo* // *Mol Biochem Parasitol.* – 1987. – Vol. 25. – №. 2. – P. 123–31.
- Schmitt T.H., Frezzatti W.A. Jr., Schreier S. Hemin-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cell lysis // *Arch Biochem Biophys.* – 1993. – Vol. 307. – №. 1. – P. 96–103.
- Schwarzer E., Kuhn H., Valente E., Arese P. Malaria-parasitized erythrocytes and hemozoin nonenzymatically generate large amounts of hydroxy fatty acids that inhibit monocyte functions // *Blood.* – 2003. – Vol. 101. – №. 2. – P. 722–8.
- Sexton J.L., Milner A.R., Panaccio M., Waddington J., Wijffels G., Chandler D., Thompson C., Wilson L., Spithill T.W., Mitchell G.F. Glutathione S-transferase. Novel vaccine against

- Fasciola hepatica* infection in sheep // J Immunol. – 1990. – Vol. 145. – №. 11. – P. 3905–10.
- Shen L., Li H., Shi Y., Wang D., Gong J., Xun J., Zhou S., Xiang R., Tan X. M2 tumour-associated macrophages contribute to tumour progression via legumain remodelling the extracellular matrix in diffuse large B cell lymphoma // Sci Rep. – 2016. – Vol. 6. – P. 30347.
- Shimonishi T., Sasaki M., Nakanuma Y. Precancerous lesions of intrahepatic cholangiocarcinoma // J Hepatobiliary Pancreat Surg. 2000. – Vol. 7. №. 6. – P. 542–50.
- Shustov A.V., Kotelkin A.T., Sorokin A.V., Ternovoi V.A., Loktev V.B. The *Opisthorchis felineus* paramyosin: cDNA sequence and characterization of its recombinant fragment // Parasitol Res. – 2002. – Vol. 88. – №. 8. – P. 724–30.
- Silverman J.M., Reiner N.E. Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes // Cell Microbiol. – 2011. – Vol. 13. – №. 1. – P. 1–9.
- Skelly P.J., Da'dara A.A., Li X.H., Castro-Borges W., Wilson R.A. Schistosome feeding and regurgitation // PLoS Pathog. – 2014. – Vol. 10. – №. 8. e1004246.
- Skorokhod O.A., Caione L., Marrocco T., Migliardi G., Barrera V., Arese P., Piacibello W., Schwarzer E. Inhibition of erythropoiesis in malaria anemia: role of hemozoin and hemozoin-generated 4-hydroxynonenal // Blood. – 2010. – Vol. 116. – №. 20. – P. 4328–37.
- Slater A.F., Cerami A. Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites // Nature. – 1992. – Vol. 355. – №. 6356. – P. 167–9.
- Slater A.F., Swiggard W.J., Orton B.R., Flitter W.D., Goldberg D.E., Cerami A., Henderson G.B. An iron-carboxylate bond links the heme units of malaria pigment // Proc Natl Acad Sci USA. – 1991. – Vol. 88. – №. 2. – P. 325–9.
- Smout M.J., Laha T., Mulvenna J., Sripa B., Suttiprapa S., Jones A., Brindley P.J., Loukas A. A granulins-like growth factor secreted by the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*, promotes proliferation of host cells // PLoS Pathog. – 2009. – Vol. 5. – №. 10. e1000611.
- Smout M.J., Sotillo J., Laha T., Papatpremsiri A., Rinaldi G., Pimenta R.N., Chan L.Y., Johnson M.S., Turnbull L., Whitchurch C.B., Giacomini P.R., Moran C.S., Golledge J., Daly N., Sripa B., Mulvenna J.P., Brindley P.J., Loukas A. Carcinogenic Parasite Secretes Growth Factor That Accelerates Wound Healing and Potentially Promotes Neoplasia // PLoS Pathog. – 2015. – Vol. 11. – №. 10. e1005209.
- Smyth J.D. *In vitro* Cultivation of Parasitic Helminths. – Boston. CRC Press, 1990.

- Smyth J.D., Halton D.W. The Physiology of Trematodes. 2nd. edition. – Cambridge. Cambridge University Press, 1983. – 445S
- Sokol R.J., Devereaux M., Khandwala R., O'Brien K. Evidence for involvement of oxygen free radicals in bile acid toxicity to isolated rat hepatocytes // *Hepatology*. – 1993. – Vol. 17. – №. 5. – P. 869–81.
- Sotillo J., Pearson M., Potriquet J., Becker L., Pickering D., Mulvenna J., Loukas A. Extracellular vesicles secreted by *Schistosoma mansoni* contain protein vaccine candidates // *Int J Parasitol*. – 2016. – Vol. 46. – №. 1. – P. 1–5.
- Sotillo J., Trudgett A., Halferty L., Marcilla A., Esteban JG., Toledo R. *Echinostoma caproni*: differential tegumental responses to growth in compatible and less compatible hosts // *Exp Parasitol*. – 2010a. – Vol. 125. – №. 3. – P. 304–9.
- Sotillo J., Valero M.L., Sanchez Del Pino M.M., Fried B., Esteban J.G., Marcilla A., Toledo R. Excretory/secretory proteome of the adult stage of *Echinostoma caproni*. *Parasitol Res*. – 2010b. – Vol. 107. – №. 3. – P. 691–7.
- Sprong H., Suchanek M., van Dijk S.M., van Remoortere A., Klumperman J., Avram D., van der Linden J., Leusen J.H., van Hellemond J.J., Thiele C. Aberrant receptor-mediated endocytosis of *Schistosoma mansoni* glycoproteins on host lipoproteins // *PLoS Med*. – 2006. – Vol. 3. – №. 8. e253.
- Sripa B. Pathobiology of opisthorchiasis: an update // *Acta Trop*. – 2003. – Vol. 88. – №. 3. – P. 209–20.
- Sripa B., Haswell-Elkins M.R., Sinawat P. Histological analysis of gallbladder diseases in relation to opisthorchiasis in endemic areas of Thailand // *Acta Trop*. – 2003. – Vol. 88. – №. 3. – P. 239–46.
- Sripa B., Kaewkes S. Gall bladder and extrahepatic bile duct changes in *Opisthorchis viverrini*-infected hamsters // *Acta Trop*. – 2002. – Vol. 83. – №. 1. – P. 29–36.
- Sripa B., Kaewkes S. Localisation of parasite antigens and inflammatory responses in experimental opisthorchiasis // *Int J Parasitol*. – 2000b. – Vol. 30. – №. 6. – P. 735–40.
- Sripa B., Kaewkes S. Relationship between parasite-specific antibody responses and intensity of *Opisthorchis viverrini* infection in hamsters // *Parasite Immunol*. – 2000a. – Vol. 22. – №. 3. – P. 139–45.
- 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. – Vol. 4. – №. 7. e201.

- Sripa B., Mairiang E., Thinkhamrop B., Laha T., Kaewkes S., Sithithaworn P., Tessana S., Loukas A., Brindley P.J., Bethony J.M. Advanced periductal fibrosis from infection with the carcinogenic human liver fluke *Opisthorchis viverrini* correlates with elevated levels of interleukin-6 // *Hepatology*. – 2009. – Vol. 50. – №. 4. – P. 1273–81.
- Sripa J., Laha T., To J., Brindley P.J., Sripa B., Kaewkes S., Dalton J.P., Robinson M.W. Secreted cysteine proteases of the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini*: regulation of cathepsin F activation by autocatalysis and trans-processing by cathepsin B // *Cell Microbiol*. – 2010. – Vol. 12. – №. 6. – P. 781–95.
- Sriraj P., Boonmars T., Aukkanimart R., Songsri J., Sripan P., Ratanasuwan P., Boonjaraspinyo S., Wongchalee N., Laummaunwai P. A combination of liver fluke infection and traditional northeastern Thai foods associated with cholangiocarcinoma development // *Parasitol Res*. – 2016. – Vol. 115. – №. 10. – P. 3843–52.
- Stenger R.J., Warren K.S., Johnson E.A. An electron microscopic study of the liver parenchyma and schistosome pigment in murine hepatosplenic schistosomiasis mansoni // *Am J Trop Med Hyg*. – 1967. – Vol. 16. – №. 4. – P. 473–82.
- Sullivan D.J. Jr., Gluzman I.Y., Goldberg D.E. Plasmodium hemozoin formation mediated by histidine-rich proteins // *Science*. – 1996. – Vol. 271. – №. 5246. – P. 219–22.
- Sun J., Hu W., Li C. Beyond heme detoxification: a role for hemozoin in iron transport in *S. japonicum* // *Parasitol Res*. – 2013. – Vol. 112. – №. 8. – P. 2983–90.
- Sun J., Wang S.W., Jin C.L., Zeng X.L., Piao X.Y., Bai L., Tang D.L., Ji C.L. Can hemozoin alone cause host anaemia? // *Parasitol Res*. – 2016. – Vol. 115. – №. 12. – P. 4611–6.
- Suttiwapa S., Loukas A., Laha T., Wongkham S., Kaewkes S., Gaze S., Brindley P.J., Sripa B. Characterization of the antioxidant enzyme, thioredoxin peroxidase, from the carcinogenic human liver fluke, *Opisthorchis viverrini* // *Mol Biochem Parasitol*. – 2008. – Vol. 160. – №. 2. – P. 116–22.
- Suttiwapa S., Matchimakul P., Loukas A., Laha T., Wongkham S., Kaewkes S., Brindley P.J., Sripa B. Molecular expression and enzymatic characterization of thioredoxin from the carcinogenic human liver fluke *Opisthorchis viverrini* // *Parasitol Int*. – 2012. – Vol. 61. – №. 1. – P. 101–6.
- Suttiwapa S., Sotillo J., Smout M., Suyapoh W., Chaiyadet S., Tripathi T., Laha T., Loukas A. *Opisthorchis viverrini* Proteome and Host-Parasite Interactions // *Adv Parasitol*. – 2018. – Vol. 102. – P. 45–72.
- Suwannatrai A., Saichua P., Haswell M. Epidemiology of *Opisthorchis viverrini* Infection // *Adv Parasitol*. – 2018. – Vol. 101. – P. 4–67.

- Tabibian J.H., Masyuk A.I., Masyuk T.V., O'Hara S.P., LaRusso N.F. Physiology of cholangiocytes // *Compr Physiol.* – 2013. – Vol. 3. – №. 1. – P. 541–65.
- Tao J., Cai W.M., Zhang B.B., Huang Y., Xiang Q., Liu R.H. Pigment deposit in liver of BALB/c mice infected by *Schistosoma japonicum* and its relation to the effect of praziquantel treatment // *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.* – 2006. – Vol. 24. – №. 1. – P. 79–80.
- Tarleton R.L., Kemp W.M. Demonstration of IgG-Fc and C3 receptors on adult *Schistosoma mansoni* // *J Immunol.* – 1981. – Vol. 126. – №. 1. – P. 379–84.
- Taylor M.C., Kelly J.M. Iron metabolism in trypanosomatids, and its crucial role in infection // *Parasitology.* – 2010. – Vol. 137. – №. 6. – P. 899–917.
- Tekwani B.L., Walker L.A. Targeting the hemozoin synthesis pathway for new antimalarial drug discovery: technologies for in vitro beta-hematin formation assay // *Comb Chem High Throughput Screen.* – 2005. – Vol. 8. – №. 1. – P. 63–79.
- Thamavit W., Bhamarapravati N., Sahaphong S., Vajrasthira S., Angsubhakorn S. Effects of dimethylnitrosamine on induction of cholangiocarcinoma in *Opisthorchis viverrini*-infected Syrian golden hamsters // *Cancer Res.* – 1978. – Vol. 38. – №. 12. – P. 4634–9.
- Thawani N., Tam M., Bellemare M.J., Bohle D.S., Olivier M., de Souza J.B., Stevenson M.M. Plasmodium products contribute to severe malarial anemia by inhibiting erythropoietin-induced proliferation of erythroid precursors // *J Infect Dis.* – 2013. – Vol. 209. – №. 1. – P. 140–9.
- Thery C., Amigorena S., Raposo G., Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids // *Curr Protoc Cell Biol.* 2006. – Chapter 3:Unit 3 22.
- Thuwajit C., Thuwajit P., Uchida K., Daorueang D., Kaewkes S., Wongkham S., Miwa M. Gene expression profiling defined pathways correlated with fibroblast cell proliferation induced by *Opisthorchis viverrini* excretory/secretory product // *World J Gastroenterol.* – 2006. – Vol. 12. – №. 22. – P. 3585–92.
- Tjalsma H., Bolhuis A., Jongbloed J.D., Bron S., van Dijk J.M. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2000. – Vol. 64. – №. 3. – P. 515–47.
- Toh S.Q., Glanfield A., Gobert G.N., Jones M.K. Heme and blood-feeding parasites: friends or foes? // *Parasit Vectors.* – 2010. – Vol. 3. – P. 108.

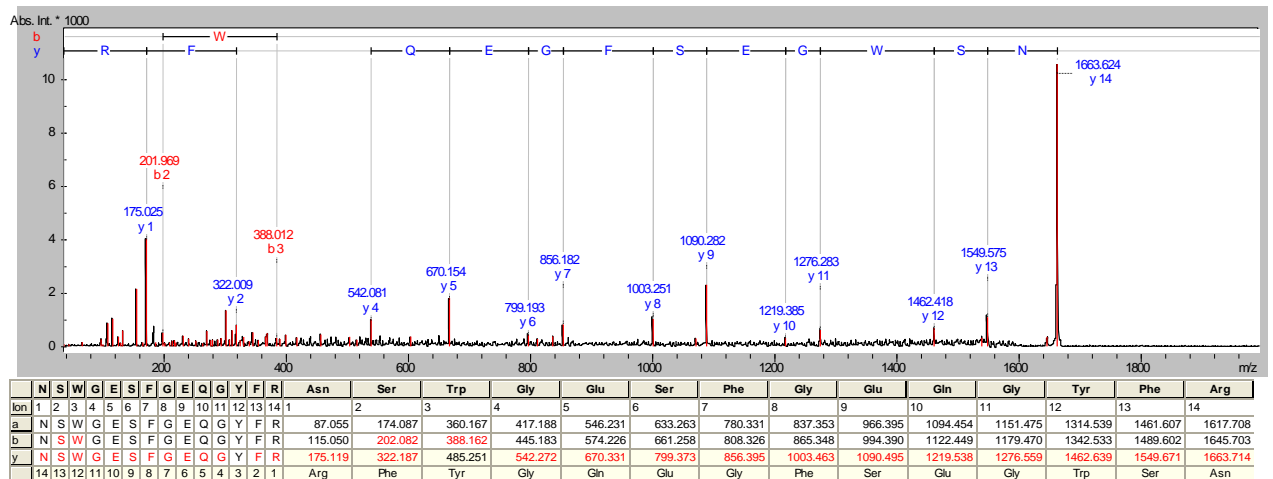
- Toh S.Q., Gobert G.N., Malagon Martinez D., Jones M.K. Haem uptake is essential for egg production in the haematophagous blood fluke of humans, *Schistosoma mansoni*. FEBS J. – 2015. – Vol. 282. – №. 18. – P. 3632–46.
- Toledo R., Fried B. Echinostomes as experimental models for interactions between adult parasites and vertebrate hosts // Trends Parasitol. – 2005. – Vol. 21. – №. 6. – P. 251–4.
- Tort J., Brindley P.J., Knox D., Wolfe K.H., Dalton J.P. Proteinases and associated genes of parasitic helminths // Adv Parasitol. – 1999. – Vol. 43. – P. 161–266.
- Truscott M., Evans D.A., Gunn M., Hoffmann K.F. *Schistosoma mansoni* hemozoin modulates alternative activation of macrophages via specific suppression of Retnla expression and secretion // Infect Immun. – 2013. – Vol. 81. – №. 1. – P. 133–42.
- Tuti S., Vichasri S., Sirisinha S. Effect of culture media on production of excretory-secretory products and egg output of *Opisthorchis viverrini* in vitro // J Parasitol. – 1982. – Vol. 68. – №. 5. – P. 892–7.
- Uddin M.H., Li S., Bae Y.M., Choi M.H., Hong S.T. In vitro maintenance of *Clonorchis sinensis* adult worms // Korean J Parasitol. – 2012. – Vol. 50. – №. 4. – P. 309–15.
- Vale N., Gouveia M.J., Botelho M., Sripa B., Suttiprapa S., Rinaldi G., Gomes P., Brindley P.J., Correia da Costa J.M. Carcinogenic liver fluke *Opisthorchis viverrini* oxysterols detected by LC-MS/MS survey of soluble fraction parasite extract // Parasitol Int. – 2013. – Vol. 62. – №. 6. – P. 535–42.
- van der Kleij D., Yazdanbakhsh M. Control of inflammatory diseases by pathogens: lipids and the immune system // Eur J Immunol. – 2003. – Vol. 33. – №. 11. – P. 2953–63.
- Van Hellemond J.J., Retra K., Brouwers J.F., van Balkom B.W., Yazdanbakhsh M., Shoemaker C.B., Tielens A.G. Functions of the tegument of schistosomes: clues from the proteome and lipidome // Int J Parasitol. – 2006. – Vol. 36. – №. 6. – P. 691–9.
- van Rossum A.J., Jefferies J.R., Rijsewijk F.A., LaCourse E.J., Teesdale-Spittle P., Barrett J., Tait A., Brophy P.M. Binding of hematin by a new class of glutathione transferase from the blood-feeding parasitic nematode *Haemonchus contortus*. // Infect Immun. – 2004. – Vol. 72. – №. 5. – P. 2780–90.
- Vermeer H.J., van Dam G.J., Halkes K.M., Kamerling J.P., Vliegthart J.F., Hokke C.H., Deelder A.M. Immunodiagnostically applicable monoclonal antibodies to the circulating anodic antigen of *Schistosoma mansoni* bind to small, defined oligosaccharide epitopes // Parasitol Res. – 2003. – Vol. 90. – №. 4. – P. 330–6.
- Vincent S.H. Oxidative effects of heme and porphyrins on proteins and lipids // Semin Hematol. – 1989. – Vol. 26. – №. 2. – P. 105–13.

- Vray B., Hartmann S., Hoebeke J. Immunomodulatory properties of cystatins // *Cell Mol Life Sci.* – 2002. – Vol. 59. – №. 9. – P. 1503–12.
- Wang X., Chen W., Huang Y., Sun J., Men J., Liu H., Luo F., Guo L., Lv X., Deng C., Zhou C., Fan Y., Li X., Huang L., Hu Y., Liang C., Hu X., Xu J., Yu X. The draft genome of the carcinogenic human liver fluke *Clonorchis sinensis* // *Genome Biol.* – 2011. – Vol. 12. – №. 10. R107.
- Wei F., Zhai Y., Jin H., Shang L., Men J., Lin J., Fu Z., Shi Y., Zhu XQ., Liu Q., Gao H. Development and immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing Sj26GST and SjFABP from *Schistosoma japonicum* // *Vaccine.* – 2010. – Vol. 28. – №. 32. – P. 5161–6.
- Wessel D., Flugge U.I. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids // *Anal Biochem.* – 1984. – Vol. 138. – №. 1. – P. 141–3.
- Whiteaker J.R., Fenselau C.C., Fetterolf D., Steele D., Wilson D. Quantitative determination of heme for forensic characterization of bacillus spores using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry // *Anal Chem.* – 2004. – Vol. 76. – №. 10. – P. 2836–41.
- Williamson A.L., Brindley P.J., Knox D.P., Hotez P.J., Loukas A. Digestive proteases of blood-feeding nematodes // *Trends Parasitol.* – 2003. – Vol. 19. – №. 9. – P. 417–23.
- Wongpaitoon V., Thuvasethakul P., Kurathong S., Techanugorn S. Biliary bile acids and lipids composition in *Opisthorchiasis viverrini* // *J Med Assoc Thai.* – 1988. – Vol. 71. – №. 7. – P. 394–9.
- Wongratanacheewin S., Sermswan R.W., Sirisinha S. Immunology and molecular biology of *Opisthorchis viverrini* infection // *Acta Trop.* – 2003. – Vol. 88. – №. 3. – P. 195–207.
- Wonkchalee O., Boonmars T., Kaewkes S., Chamgramol Y., Aromdee C., Wu Z., Juasook A., Sudsarn P., Boonjaraspinyo S., Pairojkul C. Comparative studies on animal models for *Opisthorchis viverrini* infection: host interaction through susceptibility and pathology // *Parasitol Res.* – 2012. – Vol. 110. – №. 3. – P. 1213–23.
- Woollard K.J., Sturgeon S., Chin-Dusting J.P., Salem H.H., Jackson S.P. Erythrocyte hemolysis and hemoglobin oxidation promote ferric chloride-induced vascular injury // *J Biol Chem.* – 2009. – Vol. 284. – №. 19. – P. 13110–8.
- Wykoff D.E., Harinasuta C., Juttijudata P., Winn M.M. *Opisthorchis viverrini* in Thailand—the Life Cycle and Comparison with *O. felineus* // *J Parasitol.* – 1965. – Vol. 51. – P. 207–14.

- Xiao S.H., Guo J., Chollet J., Wu J.T., Tanner M., Utzinger J. Effect of artemether on *Schistosoma mansoni*: dose-efficacy relationship, and changes in worm morphology and histopathology // *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.* – 2004. – Vol. 22. – №. 3. – P. 148–53.
- Xiao S.H., Sun J. *Schistosoma* hemozoin and its possible roles // *Int J Parasitol.* – 2017. – Vol. 47. – №. 4. – P. 171–83.
- Yoneva A., Mizinska-Boevska Y. *In vitro* cultivation of helminths and establishment of cell cultures // *Experimental pathology and parasitology.* – 2001. – Vol. 4. – №. 7. – P. 3 – 8.
- Yossepowitch O., Gotesman T., Assous M., Marva E., Zimlichman R., Dan M. Opisthorchiasis from imported raw fish // *Emerg Infect Dis.* – 2004. – Vol. 10. – №. 12. – P. 2122–6.
- Young N.D., Campbell B.E., Hall R.S., Jex A.R., Cantacessi C., Laha T., Sohn W.M., Sripa B., Loukas A., Brindley P.J., Gasser R.B. Unlocking the transcriptomes of two carcinogenic parasites, *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini* // *PLoS Negl Trop Dis.* – 2010. – Vol. 4. – №. 6. e719.
- Young N.D., Nagarajan N., Lin S.J., Korhonen P.K., Jex A.R., Hall R.S., Safavi-Hemami H., Kaewkong W., Bertrand D., Gao S., Seet Q., Wongkham S., Teh B.T., Wongkham C., Intapan P.M., Maleewong W., Yang X., Hu M., Wang Z., Hofmann A., Sternberg P.W., Tan P., Wang J., Gasser R.B. The *Opisthorchis viverrini* genome provides insights into life in the bile duct // *Nat Commun.* – 2014. – Vol. 5. – P. 4378.
- Yurlova N.I., Yadrenkina E.N., Rastyazhenko N.M., Serbina E.A., Glupov V.V. Opisthorchiasis in Western Siberia: epidemiology and distribution in human, fish, snail, and animal populations // *Parasitology International.* – 2017. – V. 66. – №. 4. – P. 355–364.
- Zhan B., Liu S., Perally S., Xue J., Fujiwara R., Brophy P., Xiao S., Liu Y., Feng J., Williamson A., Wang Y., Bueno LL., Mendez S., Goud G., Bethony J.M., Hawdon J.M., Loukas A., Jones K., Hotez P.J. Biochemical characterization and vaccine potential of a heme-binding glutathione transferase from the adult hookworm *Ancylostoma caninum* // *Infect Immun.* – 2005. – Vol. 73. – №. 10. – P. 6903–11.
- Zheng M., Hu K., Liu W., Hu X., Hu F., Huang L., Wang P., Hu Y., Huang Y., Li W., Liang C., Yin X., He Q., Yu X. Proteomic analysis of excretory secretory products from *Clonorchis sinensis* adult worms: molecular characterization and serological reactivity of a excretory-secretory antigen-fructose-1,6-bisphosphatase // *Parasitol Res.* – 2011. – Vol. 109. – №. 3. – P. 737–44.
- Zhou M., Yu L.R. Proteomic analysis by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis // *Adv Protein Chem.* – 2003. – Vol. 65. – P. 57–84.

Приложение 1

А Тандемная масс-спектрометрия пептида (NSWGESFGGEQGYFR) с моноизотопной массой 1663.624 Да, принадлежащего катепсину F *O. felineus*, на рисунке показаны ионы b и y, полученные с N- и C-конца пептида, соответственно, с соответствующей информацией о последовательности с использованием 1-буквенного аминокислотного кода. Ось X: величины масс компонентов (m/z), ось Y: интенсивность в относительных единицах (а. у.).



Приложение 2

Результаты определения белкового состава 24-х часовой фракции ЭСП *O. felineus* в программе Mascot при использовании баз данных EST *O. felineus* (Pomaznoy et al., 2013) и собранных баз данных для близкородственных гельминтов подкласса Digenea.

№	Аннотация	NCBI ID	вид ¹	С ²	КП ³	%П ⁴	ДБ ⁵	МБ ⁶	СБ ⁷	Трематоды ⁸								
										Ov	OvEx	Cs1	Cs2	Fh	Sj	Sm1	Sm2	Ec
Структурные белки																		
1	Tubulin beta	GAA38205	<i>Cs</i>	172	10	14	483	54203	NC	7 ⁹	-	-	-	+	+	-	-	-
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	-	7	+	-	-	-	+	-	-	-
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 ₂ D-isomerase)	JK626354	<i>Of</i>	611	89	46,6	213	24552	-	7	-	-	-	+	-	-	-	-
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	7	-	-	-	+	-	+	+	-
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	7	-	-	-	-	-	-	-	-
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	7	-	+	-	+	+	-	+	+
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	Cs	214	12	3,1	1611	185461	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
29	Leukocyte elastase inhibitor (serpin)	GAA48350	Cs	84	6	36,1	405	46049	NC	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Транспортные белки																		
30	Myoglobin	JK624892	Of	3444	247	47,5	150	16938	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
31	Ferritin heavy chain	GAA37250	Cs	708	55	57,5	173	20124	NC	7	-	-	+	+	-	+	+	-
32	Fatty acid-binding protein	JK624428	Cs	74	4	13,7	133	15220	NC	+	-	-	-	+	+	+	-	-
33	Cyclophilin A	JK626045	Of	439	20	38,8	162	17554	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
Шапероны/белки теплового шока																		
34	Heat shock cognate 71 kDa protein	GAA52732	Cs	70	7	3,8	347	38181	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-
Другие																		
35	RutC family protein PH0854	GAA48115	Cs	481	12	9,7	355	39932	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	Perlecan	GAA54374	Cs	283	53	19,3	981	109041	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	Collagen alpha-1(IV) chain	GAA31679	Cs	107	52	10,7	1720	170414	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	Protein FAM115C	GAA55952	Cs	89	10	20,6	568	64153	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	GPI-anchored surface glycoprotein	GAA49598	Cs	51	22	8,4	1591	177595	SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	Periostin	GAA53413	Cs	51	14	3,1	1052	117785	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Белки с неизвестной функцией																		
41	Hypothetical protein	JK624591	Of	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	30ш	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	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание.

¹ *Of* – *Opisthorchis felineus*; *Cs* – *Clonorchis sinensis*; *Sm* – *Schistosoms mansoni*; *Sj* – *Schistosoma japonicum*; *Fh* – *Fasciola hepatica*.

² С – Скор программы Mascot («Matrix Science», Великобритания). Указан лучший скор, из поисков против всех баз данных.

³ КП – количество пептидов, которые были определены в белке.

⁴ %П – процент покрытия аминокислотной последовательности.

⁵ ДБ – длина белка, количество аминокислот.

⁶ МБ – масса белка в Да.

⁷ СБ – Предсказание способности секретироваться. Наличие сигнального пептида в белке обозначено SP, неклассического сигнального пептида NC, отсутствие сигнального пептида «-».

⁸ Секретом *O. felineus* в сравнении с секретами других трематод: *Ov* – *Opisthorchis viverrini* данные из статьи (Mulvenna et al., 2010), *OvEx* – белки идентифицированные в экзосомоподобных везикулах *O. viverrini* данные из статьи (Chaiyadet et al., 2015a), *Cs1* – *Clonorchis sinensis* данные из статьи (Zheng et al., 2011), *Cs2* – *Clonorchis sinensis* (Ju et al., 2009), *Fh* – *Fasciola hepatica* (Di Maggio et al., 2016), *Sj* – *Schistosoma japonicum* (Liu et al., 2009), *Sm1* – «рвотное» содержимое *Schistosoms mansoni* (Hall et al., 2011), *Sm2* – содержимое кишечника *Schistosoms mansoni* (Delcroix et al., 2007), *Ec* – *Echinostoma caproni* (Sotillo et al., 2010b). Плюс обозначает, что белок, который определен в ЭСП *O. felineus*, присутствует и в ЭСП соответствующего гельминта, минус – отсутствует.

⁹ цифра 7 обозначает присутствие этого белка в ЭСП *O. viverrini*, полученного за 7 суток культивирования.