

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

На правах рукописи

**ЗАПАРИНА ОКСАНА ГЕННАДЬЕВНА**

**РОЛЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В РАЗВИТИИ НЕОПЛАЗИИ  
ХОЛАНГИОЦИТОВ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ  
ОПИСТОРХОЗА**

1.5.22. - клеточная биология

Диссертация на соискание ученой степени  
Кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
Доктор биологических наук  
Пахарукова Мария Юрьевна

Новосибирск

2022

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Описиорхоз .....	12
1.1.1. Жизненный цикл описиорхид.....	15
1.1.2. Эпидемиология.....	16
1.2. Структурно-функциональные изменения в печени при описиорхозе ...	18
1.2.1. Морфологические изменения в печени при описиорхозе .....	16
1.2.2. Регуляторные пути, вовлеченные в развитие изменений в печени при описиорхозе.....	18
1.2.3. Секреторно-эксекреторный продукт <i>O.felineus</i> .....	23
1.3. Окислительный стресс .....	24
1.3.1. Активные формы кислорода в тканях.....	25
1.3.2. Защита организма от активных форм кислорода.....	28
1.3.3. Активные формы кислорода в неспецифическом иммунитете и при воспалении.....	30
1.3.4. Роль окислительного стресса в повреждении биомолекул.....	32
1.4. Природные и синтетические низкомолекулярные антиоксиданты .....	34
1.4.1. Природный антиоксидант – ресвератрол.....	35
1.4.2. Митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1.....	36
Заключение.....	37
2. ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	39
2.1. Выделение метацеркарий.....	39
2.2. Работа с животными .....	39
2.2.1. Оценка антигельминтных свойств антиоксидантов <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	40
2.2.2. Получение образцов печени, сыворотки крови и мочи хомяков.....	42
2.3. Гистологические исследования печени.....	42
2.4. Иммуногистохимическое исследование печени .....	43
2.5. Приготовление лизатов из клеток печени хомяков.....	44
2.6. Клеточная культура.....	44
2.6.1. Влияние антиоксидантов на клеточную культуру HepG2.....	44
2.6.2. Приготовление лизатов из культуры клеток.....	45
2.7. Вестерн блот анализ.....	45
2.8. Выделение мРНК и синтез кДНК.....	46
2.8.1. Создание библиотек.....	47
2.8.2. Анализ транскриптома печени.....	47
2.8.3. Выявление кластеров генов.....	48
2.8.4. Функциональный анализ ДЭГ.....	48
2.8.5. ПЦР с детекцией в режиме реального времени.....	49
2.9. Оценка биохимических показателей сыворотки крови.....	49
2.10. Оценка уровня 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина в моче.....	50
2.11. Статистическая обработка данных.....	50
3. ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	51
3.1. Динамика структурных изменений в печени животных в зависимости от срока инвазии описиорхоза.....	51

3.1.1. Оценка накопления окислительных повреждения в печени хомяков при экспериментальном описторхозе.....	51
3.1.2. Оценка морфологических изменений печени при экспериментальном описторхозе .....	55
3.2. Анализ секвенирования транскриптомов печени хомячков при экспериментальном описторхозе.....	57
3.3. Влияние антиоксидантов на структурное и функциональное состояние печени при описторхозе.....	63
3.3.1. Оценка динамики влияния антиоксидантов на маркеры воспаления, уровень клеточной дисплазии и структурное состояние печени.....	63
3.3.2. Влияние антиоксидантов на уровни мРНК генов, участвующих в регуляции процессов воспаления и фиброгенеза.....	69
3.3.3. Оценка влияния антиоксидантов на содержание белков, участвующих в процессах воспаления и фиброгенеза .....	73
3.3.4. Оценка влияния антиоксидантов на уровень 8-OHdG в моче и маркеры перекисного окисления липидов в печени инфицированных животных.....	75
3.4. Биохимические показатели сыворотки крови животных получавших антиоксиданты.....	80
3.5. Комбинаторный эффект антиоксидантов при совместном применении с празиквантелом на структурное состояние печени и уровень экспрессии мРНК генов, участвующих в регуляции процессов воспаления и фиброгенеза .....	82
ОБСУЖДЕНИЕ.....	91
ВЫВОДЫ.....	98
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	99
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	101

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

8-OHdG – 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина

$\alpha$ -SMA – альфа актин гладких мышц

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АОС – антиоксидантная система организма

АСТ – аспаратаминотрансфераза

АФК – активные формы кислорода

ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены

ЕМТ – эпителиально – мезенхимальный переход

ПОЛ – перекисное окисление липидов

*Alox5* – липоксигеназа 5

ARE – элемент антиоксидантного ответа

CD 68 – кластер дифференцировки 68

CD 163 – кластер дифференцировки 163

СК7 – цитокератин 7

GCL – глутамат-цистеин лигаза

GO – (англ. Gen ontology) – платформа по созданию унифицированной терминологии для аннотации генов и генных продуктов всех биологических видов

HNE – 4 гидрокси-2-ноненаль

НО-1 – гемоксигеназа 1

IkB $\alpha$  – ядерный фактор транскрипции каппа В-альфа

IKK – IkB-киназа

*Inos* – индуцибельная синтаза азота (NO-синтаза)

Keap1 – Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1

KEGG - Киотская энциклопедия генов и геномов

MDA – малондиальдегид, малоновый диальдегид

NQO1 – НАД(Ф)Н хинон дегидрогеназа-1

NRF2 – ядерный фактор (эритроидного происхождения 2)

PZQ – празиквантел

SkQ1 – *10-(6'-Plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium*

SOD – супероксиддисмутаза 2

TGF $\beta$  – трансформирующий ростовой фактор *бета*

TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа

WBR – снижение паразитарной нагрузки

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность исследования.** Кошачья двуустка *Opisthorchis felineus* (*O. felineus*) (Rivolta, 1884), трематода семейства Opisthorchiidae, широко распространена на территории России и стран Восточной Европы (Pozio et al., 2013). *O. felineus* паразитирует в гепатобилиарной системе рыбоядных млекопитающих, включая человека (Ильинских и др., 2007). Основной очаг этого заболевания находится на территории Западной Сибири, в бассейне реки Обь, где по разным оценкам заражено до 60 % населения сельских районов (Fedorova et al., 2020). Количество случаев заражения описторхозом в России составляет 78,5% от общего числа заражения всеми биогельминтозами (Роспотребнадзор, 2018). Описторхоз сопровождается формированием очагов хронического воспаления в печени, фиброзом и неоплазией 3-й степени клеток эпителия желчных протоков (Pozio et al., 2013; Gouviea et al., 2017). Неоплазия является преканцерогенным изменением и может привести к злокачественной трансформации клеток. Родственные виды семейства Opisthorchiidae *O. viverrini* (Poirier, 1886) и *C. sinensis* (Looss, 1907) признаны биологическими канцерогенами и основными факторами развития рака эпителия желчных протоков в эндемичных регионах Юго-Восточной Азии (Sripa B. et al., 2007). В настоящее время недостаточно данных подтверждающих канцерогенность *O. felineus* для человека (Maksimova et al., 2017). Более того, молекулярные механизмы, ведущие к развитию неоплазии эпителия желчных протоков при инфицировании печеночными сосальщиками также неизвестны.

По данным, полученным при описторхозе *O. viverrini* принято считать, что ключевую роль в генерации осложнений играют несколько факторов: механическое повреждение клеток описторхами; повреждающее действие активных форм кислорода, генерируемых иммунными клетками хозяина; действие экскреторно-секреторного продукта гельминта, в состав которого входят белки и низкомолекулярные специфические метаболиты холестерина (Pakharukova et al., 2019b; Gouviea et al., 2017), которые, по-видимому, обладают провоспалительными и генотоксичными свойствами. Существует гипотеза, что паразит-специфические оксистеролы вызывают в клетках эпителия окислительные повреждения в ДНК, которые приводят к мутациям в процессе ее репликации. В результате накопления

мутаций возникает неоплазия клеток, которая является преканцерогенным изменением и может привести к злокачественной трансформации. Однако, на сегодняшний день, прямых доказательств воздействия секреторного продукта на увеличение продукции активных форм кислорода в клетках печени не показано. Кроме того, неизвестно, играют ли активные формы кислорода важную роль в неоплазии холангиоцитов и других патологиях печени при описторхозе.

Имеющиеся косвенные доказательства вовлеченности окислительного стресса в структурные изменения печени позволяют предположить, что ингибирование свободных радикалов может положительно сказаться на состоянии тканей печени при описторхозе. Для того, чтобы проверить эту гипотезу, было решено провести ингибиторный анализ с помощью двух антиоксидантов с разным механизмом действия (SkQ1 и ресвератрол). SkQ1(-10-(6'-Plastoquinonyl)decyltriphenylphosphonium) – это искусственно синтезированное соединение митохондриально-направленный антиоксидант, который, за счет своих физико-химических свойств способен проникать напрямую в митохондрии и нейтрализовать свободные радикалы непосредственно в месте их образования (Skulachev et al., 2009). Ресвератрол- природный антиоксидант, полифенол, который обладает широким спектром действия. Так, известно о его антиоксидантном, противовоспалительном, противораковом свойствах. Более того, имеются данные о том, что ресвератрол способен снижать образование оксистеролов и ДНК-аддуктов (Cavalieri, Rogan, 2010). Кроме этого, вещества с антиоксидантными свойствами рассматриваются в качестве сопутствующих препаратов, которые, потенциально, можно применять при терапии описторхоза. Основным препаратом для лечения пищевых трематодозов является празиквантел. Этот препарат обладает достаточно высокой эффективностью (Pakharukova et al., 2015), однако существуют противоречивые данные о его токсичности для печени (LiverTox, 2020).

Эксперименты в данной работе были проведены на модели - сирийские хомячки *Mesocricetus auratus*. Выбор данной модели обусловлен схожестью протекания описторхоза у человека и у этих животных, что подтверждается биохимическими показателями и структурными изменениями в печени. Более того, схожесть фенотипа взрослых особей описторхов и длительность этапов созревания этих особей в хомячках и диких рыбаобразных млекопитающих также говорят в пользу

выбора этой экспериментальной модели. Необходимо отметить также, что на территории Западной Сибири основным окончательным хозяином в естественных условиях является ондатра (*Ondatra zibethicus*) из семейства хомяковых.

### **Цель и задачи исследования**

**Цель работы:** Поиск клеточных путей в развитии неоплазии и выявление маркеров окислительного стресса при экспериментальном описторхозе на модели сирийских хомячков *M. auratus*.

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

1. Оценить накопление окислительных повреждений ДНК и липидов, а также морфологические изменения в печени (неоплазия эпителия желчных протоков, перидуктальный фиброз, воспалительный инфильтрат) и в организме сирийских хомячков *M. auratus* в динамике инфекции описторхоза (от 1 до 18 месяцев).
2. Выявить дифференциально-экспрессирующиеся гены в печени инфицированных *O. felinus* хомячков через 1 и 3 месяца инфекции с помощью анализа транскриптома печени.
3. Провести функциональный анализ дифференциально экспрессирующихся генов в печени инфицированных *O. felinus* животных через 1 и 3 месяца инфекции и подтвердить активацию наиболее представленных клеточных путей с помощью иммуногистохимии и Вестерн-блот анализа.
4. Исследовать влияние антиоксидантов разного механизма действия (Ресвератрол и SkQ1(-10-(6'-Plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium)) на экспрессию генов *Tnf*, *Inos*, *Alox5*, *Ck7*, *Tgfb*, *Acta2*, на структуру гепатобилиарной системы золотистых хомячков на фоне экспериментального описторхоза через 1 и 3 месяца диеты с антиоксидантами.

**Научная новизна работы.** Данная работа является первым комплексным исследованием роли окислительного стресса в развитии воспаления, неоплазии холангиоцитов и общего структурно-функционального состояния печени при описторхозе, вызванном *O. felinus*. Впервые показана взаимосвязь между маркерами окислительного стресса в тканях печени и выраженностью неоплазии холангиоцитов у сирийских хомячков при инфекции *O. felinus*. Динамика накопления малонового диальдегида и 4-гидрокси-2-ноненаля в тканях печени носит линейный характер и зависит от срока инфекции.

Впервые изучены изменения транскриптома в печени инфицированных *O. felinus* хомячков через 1 и 3 месяца инфекции. Эпителиально-мезенхимальный переход, IL6/JAK/STAT3 сигнальный путь, TNF- $\alpha$ , HIPPO пути передачи сигнала, а также клеточные пути развития воспалительного ответа, взаимодействия с внеклеточным матриксом и регуляция клеточного цикла были наиболее представленными в печени инфицированных животных.

Используя ингибиторный анализ с антиоксидантами ресвератролом и SkQ1, впервые было показано снижение уровня неоплазии эпителия желчных протоков и снижение уровня маркеров перекисного окисления липидов у инфицированных *O. felinus* хомячков. Таким образом, в работе нам удалось сформировать первые представления о механизмах, которыми может быть обусловлено повреждение печени и развитие неоплазии в результате инфицирования *O. felinus*.

**Теоретическая и практическая значимость.** Результат данной работы расширяет представления о молекулярных механизмах взаимоотношений в системе “паразит-хозяин” при описторхозе, вызванном *O. felinus*, в том числе в области изучения молекулярных механизмов возникновения канцерогенеза при инфицировании паразитическими организмами, являющимися биологическими канцерогенами.

В ходе исследования, также, был установлен гепатопротекторный эффект антиоксидантов вне зависимости от механизма их действия, следовательно, эти соединения могут быть использованы в комплексной терапии с празиквантелом при лечении описторхоза.

**Методология и методы диссертационного исследования.** В работе был использован комплексный подход к выявлению клеточных путей и исследованию структурно-функционального состояния печени при описторхозе. Были использованы молекулярные, биоинформатические, биохимические и гистологические методы.

**Степень достоверности результатов.** Статистическую обработку результатов и их сравнение проводили в программе Statistica 6.0. Применяли однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с поправкой на множественные сравнения Tukey; критерий Фишера, метод Манна-Уитни, достоверными считали отличия при уровне значимости больше 95%. Для создания тепловых карт

использовали пакет *heatmap.2* (v.2.38) R. Нормальность распределения определяли с помощью критерия Шапиро-Уилкоксона *W*.

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

1. Степень развития неоплазии эпителия желчных протоков (холангиоцитов) у сирийских хомячков, инфицированных печеночными трематодами *Opisthorchis felineus*, соотносится с динамикой накопления малонового диальдегида и 4-гидрокси-2-ноненаля (маркеров перекисного окисления липидов) в печени и увеличивается от времени инфекции.
2. Увеличение экспрессии мезенхимальных (*Cdh2*, *Vim*, *Acta2*, *Colla1* и *Mmp9*) и эпителиальных (*Cdh1*) маркерных генов и соответствующих белков эпителиально-мезенхимального перехода предшествует изменениям структуры ткани печени у хомячков, инфицированных *O. felineus*.
3. Антиоксиданты ресвератрол и SkQ1 снижают степень неоплазии эпителия желчных протоков печени и подавляют экспрессию генов и продукцию белков, ассоциированных с воспалением (TNF- $\alpha$ , CD68) и фиброгенезом (CK7,  $\alpha$ SMA) на экспериментальной модели описторхоза.

**Структура и объем работы.** Работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемых источников. Объем работы составляет 118 страниц. Работа включает 6 таблиц и 19 рисунков.

**Личный вклад автора.** Основные результаты получены автором самостоятельно. Работа с животными выполнялась совместно со старшими лаборантами лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов Голубевой Н.М и Красовской Г.М. Гистологические и иммуногистохимические исследования выполнены на базе ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН совместно с сотрудниками лаборатории к.б.н. Ковнер А.В., Багинской Н.В. и Рахметовой А.Ш. Антиоксидант SkQ1 был любезно предоставлен д.б.н. г.н.с. лаборатории молекулярных механизмов старения Колосовой Н.Г. Подготовка ДНК-библиотек для транскриптома печени проведена совместно с к.б.н. с.н.с. сектора молекулярной нейробиологии стресса Бондарь Н.П. Биоинформатический анализ был выполнен д.б.н. в.н.с. Пахаруковой М.Ю. Тест на подвижность гельминтов был проведен совместно с к.б.н. Пономаревым Д.В.

**Апробация результатов.** Основные результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: Всероссийской конференции с международным участием "Современная паразитология- основные тренды и вызовы (VI Съезд паразитологического общества)" (Россия г. Санкт-Петербург, 2018 г.); 11-ой Международной мультikonференции «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology» - BGRS/SB-2018 (Россия, г. Новосибирск, 2018 г.); «NTDASIA International research network» (Таиланд, г. Кхон Каен, 2019 г.); VI-ой межрегиональной научной конференции с международным участием «Паразитологические исследования в Сибири и на Дальнем Востоке» (Россия, г. Новосибирск, 2019 г.); «VII-ой Молодёжной школе-конференции по молекулярной и клеточной биологии» (Россия, г. Санкт-Петербург, 2020 г.); «29th Annual Meeting of the German Society for Parasitology» (Германия, г. Бонн, 2021 г. онлайн).

**Благодарности.** Выражаю глубокую благодарность г.н.с., доктору биологических наук Мордвинову Вячеславу Алексеевичу (ИЦиГ СО РАН), в.н.с. доктору биологических наук Пахаруковой Марии Юрьевне (ИЦиГ СО РАН) за всестороннюю помощь и поддержку на всех этапах выполнения работы. Выражаю глубокую благодарность к.б.н. Ковнер Анне Владимировне, Багинской Нине Владиславовне, к.б.н. Пономареву Денису Васильевичу, к.б.н. Бондарь Наталье Петровне за помощь в освоении гистологических и иммуногистохимических методов, подготовке и проведении экспериментов. Отдельная благодарность Голубевой Н.М. и Красовской Г.М. за помощь в работе с лабораторными животными. Благодарю всех сотрудников лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов за помощь и поддержку.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Описторхоз

Описторхоз – гельминтозное природно-очаговое заболевание рыбоядных млекопитающих и человека, вызываемое трематодами рода *Opisthorchis*, семейства Opisthorchiidae, подкласс Digenea, класса Trematoda, типа Platyhelminthes и царства Animalia (Беэр, 2005).

Основной очаг распространения этого заболевания находится на территории Западной Сибири в Обь-Иртышском бассейне, где по разным оценкам заражено до 60% населения (Fedorova et al., 2020). В целом, по стране, заражение описторхозом на 2017 год составило 78,5% от общего числа заражения всеми биогельминтозами, при этом в эндемичных регионах показатель заболеваемости значительно превышает среднефедеральные значения (Роспотребнадзор, 2018).

К сожалению, официальная статистика отражает только число случаев, зарегистрированных при обращении больных в медицинские учреждения самостоятельно. Поскольку первые стадии заболевания часто протекают бессимптомно, официальная статистика, как правило, регистрирует только случаи хронического описторхоза с выраженными болезненными проявлениями (Бражникова, Цхай, 2004). О реальном уровне зараженности населения *O. felineus* можно судить по кратковременным скрининговым исследованиям населения некоторых деревень эндемичных регионов. В частности, было показано, что инфицированность сельского населения Томской области составляет 18-20% (обследовано 291 человек), Тюменской - 37% (обследовано 134 человек), Челябинской - 18,6 % (обследовано 129 человек). В данном исследовании для подтверждения диагноза был использован метод Като-Каца и ИФА паразитарных антигенов в образцах стула (Ильинских и др., 2007; Fedorova et al., 2020).

Несмотря на то, что Западная Сибирь является крупнейшей эндемичной территорией по описторхозу, заболевание встречается на территории Украины, Казахстана, Польши, Голландии, Франции, Венгрии, Румынии, Италии, Индии, Таиланда, Вьетнама, Лаоса, Камбоджи и т.д. (Pakharukova M.Y., Mordvinov V.A., 2022; Pozio et al., 2013).

Семейство Opisthorchiidae включает в себя паразитов большинства классов позвоночных, в особенности млекопитающих и птиц. *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884), *O. viverrini* (Poirier, 1886) и *Clonorchis sinensis* (Loos, 1907) – это три эпидемиологически значимых вида из семейства Opisthorchiidae, которые вызывают поражения печени и желчных протоков у людей и рыбоядных млекопитающих (King, Scholz, 2001; Keiser et al., 2009).

Заражение описторхозом происходит при употреблении в пищу слабосоленой, недостаточно термически обработанной, свежемороженой, сырой рыбы семейства карповых, содержащей жизнеспособных личинок паразита - метацеркарий. Заражение может произойти и в случае несоблюдения технологических правил при приготовлении пищи при случайном проглатывании метацеркарий, попавших на руки или кухонный инвентарь при разделке рыбы (Pakharukova M.Y., Mordvinov V.A., 2022; Завойкин В.Д., 1991).

Клинические проявления описторхоза разнообразны. Это зависит от интенсивности и продолжительности заболевания, а также от индивидуальных особенностей организма (Диунов А.Г. и др., 2012).

Для описторхоза характерны аллергические реакции, появление крапивницы, преимущественно в острой фазе; механические повреждения эпителия желчных протоков; скопление паразитов в желчных протоках, следовательно, замедление тока желчи и секрета поджелудочной железы; в некоторых случаях возможна лихорадка, повышение температуры, что также более характерно для ранней фазы. Течение описторхоза сопровождается слабостью, головными болями, болями в эпигастральной области, тошнотой, отмечается боль в правом подреберье, боль в мышцах, возможны желтушность склер и кожи, также отмечается увеличение печени, повышение содержание билирубина, изменение активности трансаминаз печени, наблюдаются изменения в активности трансаминаз, щелочной фосфатазы в печени, эозинофильный лейкоцитоз (Диунов А.Г. и др., 2012; Альперович Б.И., 2010; Цуканов В.В. и др., 2019; Vakshtanovskaia et al., 2005).

Описторхоз, вызываемый *O.felineus*, также сопровождается хроническим, пролиферативным холангитом, панкреатитом поджелудочной железы, фиброзированием ткани, холециститом, дисфункцией желчного пузыря и абсцессами печени (Камышнеков, 2016; Gouviea et al., 2017).

Несмотря на длительные исследования в области описторхоза, многие процессы и механизмы, участвующие в этом заболевании, остаются неизученными.

Диагностика описторхоза осложнена отсутствием строго специфических симптомов, характерных для описторхоза и его возможным бессимптомным течением. Диагностика включает эпидемиологический анамнез, биохимический и развернутый общий анализ крови, однако гельминтоооскопия в дуоденальном содержимом и кале остается наиболее информативной (Цуканов В.В. и др., 2019).

Основным средством для лечения описторхоза и ряда других гельминтозов является празиквантел (PZQ). Празиквантел - противогельминтное средство, гетероциклическое производное пиразинизохинолина, обладает широким спектром действия, в который входят многие трематодозы и цестодозы (Цуканов В.В. и др., 2019; Mordvinov et al., 2017). Действие празиквантела заключается в повышении проницаемости мембран клеток гельминтов для ионов кальция, что приводит к сокращению мускулатуры и, как следствие, параличу; а также повреждению тегумента (Chai, 2013).

PZQ считается нетоксичным препаратом и редко вызывает легкие побочные эффекты (ВОЗ, 1995), тем не менее, к его побочным действиям относят: дискомфорт в области живота, тошноту, рвоту, головокружение, мышечные боли, сонливость, головные боли и усталость, при этом, некоторые симптомы связаны с его воздействием на паразитов. Серьезные нежелательные побочные эффекты включают сердечные аритмии, реакции гиперчувствительности и сыпь (LiverTox, 2020). Существуют данные о том, что лечение празиквантелом пациентов с нарушением функций печени должно проводиться с осторожностью (Hong, 2018; Zwang, Olliago, 2017). Празиквантел в значительной степени метаболизируется в печени через систему цитохрома P450 и может вызывать повреждение печени за счет образования токсичных промежуточных продуктов метаболизма препарата (LiverTox, 2020). Стоит отметить, что эффективность данного препарата на экспериментальной модели описторхоза составляет порядка 80% (Pakharukova et al., 2015).

В связи с широким распространением, тяжелыми последствиями и недостаточной изученностью механизмов развития данного заболевания, существует необходимость проведения оценки достоверности гипотез о факторах

риска, механизмах развития заболевания, определения эпидемиологической, социальной эффективности мер профилактики, так как, несмотря на большое количество исследований в этой области, нет единого мнения по вопросу раннего выявления и эпидемиологического мониторинга за данной инвазией (Завойкин В.Д., 1991).

### 1.1.1. Жизненный цикл описторхид

Впервые цикл развития описторхид был описан Фогелем в 1930-е годы. В это же время он экспериментально доказал, что моллюски являются обязательным промежуточным хозяином в их жизненном цикле. Основной особенностью представителей семейства Opisthorchiidae является их высокая специфичность к первому промежуточному хозяину. Следовательно, только один или несколько близкородственных видов улиток служат первыми промежуточными хозяевами для Opisthorchiidae, а вторыми промежуточными и окончательными хозяевами могут выступать несколько десятков видов. До середины 20-го века считалось, что *Bithynia leachi* единственный первый промежуточный хозяин для *O. felineus*; позже этот вид был разделен на четыре вида - *B. leachi*, *B. troscheli*, *B. inflata*, *B. sibirica*. Первые три вида восприимчивы к *O. felineus* (Беэр, 2005).

*Opisthorchis felineus* – возбудитель описторхоза, имеет сложный жизненный цикл и протекает с участием трех хозяев: двух промежуточных и окончательного. Яйца описторха, попадая в воду с фекалиями животных и людей, поглощаются моллюсками рода *Bithynia*. В их кишечнике из яиц вылупляются подвижные личинки – мирацидии. Далее, через стенку кишечника, они проникают в полость тела моллюска и дают начало спороцистам. Спороцисты выделяют редий – мешковидных образований с крупной глоткой и кишечником. Далее редии мигрируют в гепатопанкреас моллюска, где превращаются в хвостатые подвижные личинки-церкарии. Церкарии, по мере созревания, покидают редию через родильную пору, мигрируют в тело моллюска, а затем выходят в воду, где активно плавают до 50 часов. Вторым промежуточным хозяином *O. felineus* являются рыбы, принадлежащие к семейству карповых: язь, плотва, карась и т.д. (Беэр, 2005). Церкарии прикрепляются к рыбе, отбрасывают хвост и проникают в мышцы, где за

счет секрета цистогенных клеток формируют сначала внутреннюю оболочку, а затем соединительнотканную капсулу - внешнюю оболочку и превращаются в следующую фазу – метацеркарию. Процесс развития церкарии *O. felineus* в метацеркарий в рыбе занимает от 3-х недель до 2-х месяцев. Известно, что в притоках реки Обь метацеркарии становятся инвазионными, т.е. способными инфицировать человека и животных, спустя 30–40 суток после попадания церкарий в рыбу (Сербина, 2011). Время созревания метацеркарий зависит от вида рыбы и температуры воды. Метацеркарии располагаются в подкожной жировой и мышечной ткани рыб на глубине не более 1-2 мм. Однако иногда метацеркарии могут скапливаться в необычных местах, например, грудные плавники, жабры и стенки кишечника (Беэр, 2005). Далее метацеркарии попадают в организм окончательного хозяина. В кислой среде желудка разрушается внешняя оболочка метацеркарий, а в щелочном - внутренняя. Затем ювенильный гельминт мигрирует по желчным протокам в печень и желчный пузырь, где, через 25-30 дней, достигает половой зрелости и может паразитировать в течение нескольких десятков лет (Беэр, 2005). Общий перечень окончательных хозяев этого паразита включает 33 вида и подвида млекопитающих: домашние кошки, собаки, ондатры, волки, лисы, медведи, барсуки и др. (Беэр, 2005).

Зараженная рыба - единственный источник инфекции *O. felineus* для человека и животных. Метацеркарии *O. felineus* достаточно устойчивы к высыханию, высокой концентрации соли, низким температурам, но могут быть обезврежены при достаточной термической обработке (Пельгунов, 2005).

### 1.1.2. Эпидемиология

Описторхоз, вызываемый *O. felineus*, на 95 % укладывается на территории стран бывшего Советского Союза (Беэр, 2005). При этом, на Россию приходится порядка 70%, Украина и Казахстан - примерно по 7-10%, Беларусь – около 3-5%, и оставшиеся проценты приходятся на долю стран Западной Европы, включая страны Балтии. Однако, в последнее время поступает все больше сообщений о случаях описторхоза в западных странах (Pozio et al., 2013; Беэр, 2005). Три вида описторхид: *O. felineus*, *O. viverrini*, *C. sinensis* образуют так называемую "описторхозную триаду" и вызывают сходные заболевания. Их ареалы образуют длинный, почти

непрерывный шлейф в Европе, Западной и Восточной Сибири, дальневосточном регионе и Юго-Восточной Азии (Petney et al., 2013; Sripa et al., 2007). Наиболее высокий уровень инфицированности населения *O. felinus* отмечается в Западной Сибири (Беэр, 2005). В Западной Сибири, на территории Обь-Иртышского бассейна, регулярно проводятся скрининговые исследования по выявлению рыбы, инфицированной метацеркариями *O. felinus*. В 2002-2009 гг. в Тюменской области в Тобольском регионе было проверено 997 карповых рыб 11 видов из пяти мест отлова рыбы в нижнем течении реки Иртыш, а также из 10 мест в регионе Тобольска: озера и притоки реки Иртыш. Было обнаружено, что не все виды рыбы заражены одинаково. В частности, наиболее высокий процент инфицированных особей зарегистрирован у язей *Leuciscus idus* (96,3%) и ельца *L. leuciscus* (98%), гораздо меньше - у леща *Abramis brama* (36,2%) и плотвы (*Rutilus rutilus*) (31,7%). Такие виды, как карп (*Cyprinus carpio*), линь (*Tinca tinca*), золотой карась (*C. auratus gibelio*) и серебряный карась (*Carassius carassius*) практически не были инфицированы *O. felinus* (Пельгунов, 2012; Fedorova et al., 2020). Схожие данные по инфицированности различных видов рыб получены на территории Новосибирской области в среднем течении Оби и ее притоках (Карпенко и др., 2008). Как показали исследования, наиболее зараженные язь (*L. Idus*) - 40,4%, елец (*L. leuciscus*) и верховка (*Leucaspis delineatus*) -43%. Каждая особь язя была инвазирована  $362 \pm 177$  метацеркариями *O. felinus* (Pakharukova, Mordvinov, 2016). Таким образом, на территории Западной Сибири, основным источником инфекции является язь (*Leuciscus idus*). Этот вид обладает высокой численностью и имеет промысловую значимость. Кроме того, источником инфекции является плотва (*R. rutilus*) и елец (*L. leuciscus*), эти виды также употребляются в пищу людьми и используются для корма животных (Pakharukova M.Y., Mordvinov V.A., 2016).

Стоит отметить, что доля зараженных рыб растет вместе с их возрастом. Так, среди одно- и двухлетних ельцов насчитывалось 12% инфицированных особей, среди пятилетних рыб до 96,7% (Пельгунов, 2012). Следовательно, рыба может быть инфицирована в течение всей жизни.

В 1986-1996 гг. на территории Новосибирской области проводилось исследование зараженности улиток описторхидами. В 10 местах сбора материала инфицированность улиток *Bithyniidae* составила всего 2% (Карпенко и др., 2008). В

результате продолжения этих исследований в 1995-2010 гг. было установлено, что уровень зараженности улиток описторхидами в бассейне Оби в районе Новосибирска не превышал 1% (исследовано 3800 особей). На территории ХМАО (нижнее течение рек Обь и Иртыш) *Vithyniidae* были представлены *B. troscheli*, их зараженность в 2006 г. в Оби составила около 1,08% (исследовано 185 особей), в Иртыше - 0,76% - (исследовано 132 особи) (Сербина, 2011). Таким образом, достаточно 1% зараженных улиток для того, чтобы рыба в данном водоеме была заражена на 98% (Pakharukova, Mordvinov, 2016).

## **1.2 Структурно-функциональные изменения в печени при описторхозе**

### **1.2.1. Морфологические изменения в печени при описторхозе**

Описторхоз сопровождается различными морфологическими изменениями в печени. К таким изменениям, в первую очередь, относятся формирование очагов хронического воспаления, образование перидуктального фиброза, холангиофиброза, пролиферации желчных протоков, структурные изменения гепатоцитов, изменения эпителия желчных протоков: гиперплазия (многорядность эпителия с сохранением морфологии клеток), метаплазия (появление муцин-продуцирующих бокаловидных клеток), неоплазия (Gouviea et al., 2017; Vale N. et al. 2013; Sripa et al., 2018; Wonkchalee et al., 2011; Maksimova et al., 2017). Неоплазию, представляющую собой патологический процесс, характеризующийся атипичной трансформацией морфологии клеток, многослойностью, нарушением связей клеток с базальной мембраной, считают предраковым изменением (Zen et al., 2007). Для неоплазии характерны диспластические изменения в эпителии желчных протоков. В зависимости от уровня развития патологических изменений ее подразделяют на 3 степени: неоплазия 1 степени (характеризуется слабой степенью поражений), неоплазия 2 степени (средние поражения), неоплазия 3 степени (высокая степень поражений). Определение степени поражения основывается на гистологическом анализе срезов, окрашенных гематоксилином-эозином, где оценивается потеря

полярности, нарушение соотношения ядра к цитоплазме и его гиперхромазия. Так, желчные протоки хомячков, инфицированных *O.felineus* были выстланы эпителием с вышеперечисленными патологическими изменениями разной степени, в том числе и с неоплазией 3 степени, что наводит на мысль о канцерогенном потенциале *O.felineus* (Gouviea et al., 2017; Vale et al. 2013).

На модели экспериментального описторхоза было показано развитие как острых, так и хронических воспалительных реакций, с образованием гранулем (Motorna et al., 2001). Воспалительный инфильтрат при острой фазе инфекции был представлен нейтрофилами и эозинофилами. В очагах хронического воспаления в первую очередь преобладали моноциты/макрофаги, затем тучные клетки и лимфоциты (Sripa et al., 2018). При хронической инфекции *O. viverrini*, большинство макрофагов, инфильтрированных в печени, было идентифицировано как M2-подобный тип (Bility, Sripa, 2014). Помимо защитных функций, макрофаги играют значимую роль в гомеостазе тканей и заживлении ран, однако при хронической инфекции *O. viverrini*, они продуцируют большое количество медиаторов, потенциально токсичных для паразитов, но также способных повреждать близлежащие ткани хозяина, что может приводить к развитию перидуктального фиброза (Murray, Wynn, 2011; Armignacco, 2013).

Перидуктальный фиброз и холангиофиброз - представляют собой разрастание соединительной ткани вокруг желчных протоков и являются характерными для описторхоза процессами (Wonkchalee et al., 2011; Maksimova et al., 2017).

Фиброз возникает, в ответ на повторяющееся повреждение тканей (Borthwick et al., 2013), что характерно для описторхоза. Систематическое повреждение тканей при описторхозе обусловлено несколькими факторами: механическое повреждение, вызванное питанием гельминта; повышенная продукция активных форм кислорода, продуцируемые иммунными клетками хозяина; развитие воспалительных реакций через врожденный и адаптивный иммунитет хозяина (Sripa et al., 2018a). На описторхозе *O. viverrini*, было показано, что компоненты секреторно-экскреторного продукта проникают в клетки эпителия желчных протоков – холангиоциты, что было связано с повышением экспрессии TLR4, а также IL-6 и IL-8 (Ninlawan et al., 2010). Таким образом, перидуктальный фиброз ассоциирован с хроническим воспалением. Более того, одним из механизмов его образования является

эпителиально-мезенхимальный переход (Ji Q et al., 2015). Отмечается, что фиброз может быть ступенью в развитии холангиокарциномы – рака желчных протоков. Холангиокарцинома – одно из возможных последствий инфекции печеночными сосальщиками. *Opisthorchis viverrini* и *Clonorchis sinensis* признаны Международным агентством по изучению рака (IARC, 2012) биологическими канцерогенами группы 1 и классифицируются как основные факторы риска ССА в эндемичных районах (IARC, 2012). *O. felineus* отнесен к группе 3, объединяющей возможные канцерогенные факторы, для которых, по данным IARC, нет точных доказательств онкогенного действия на человека. Существуют данные, подтверждающие низкий потенциал канцерогенности *O. felineus* (Fedorova et al., 2020). Однако, для развития холангиокарциномы, помимо инфекции, значимую роль играют дополнительные факторы риска, включая табачный дым, алкоголь, продукты, содержащие канцерогенные нитрозамины (Sripa et al., 2012).

На экспериментальной модели описторхоза, у сирийских хомячков, получавших низкие дозы канцерогена – нитрозамина (диметилнитрозамина) развивались опухоли (Maksimova et al., 2017; Mordvinov et al., 2021), которые, по морфологическим и иммуногистохимическим маркерам соответствовали характеристикам холангиокарциномы, вызванной *O. viverrini* или *C. sinensis* (Wonkchalee et al., 2011; Sripa et al., 2012). Эти данные могут свидетельствовать о наличии канцерогенного потенциала у *O. felineus*.

### **1.2.2. Регуляторные пути, вовлеченные в развитие изменений в печени при описторхозе**

Хроническое воспаление, перидуктальный фиброз и неоплазия эпителия желчных протоков являются ключевыми повреждениями, провоцирующими более серьезные нарушения при описторхозе (Gouveia et al., 2017; Pakharukova, Mordvinov, 2022).

Известно, что в процессы воспаления и фиброгенеза вовлечен ряд генов (Coussens et al., 2002). Ранее было показано, что при описторхозе и холангиокарциноме, ассоциированной с описторхозом, значительно повышен уровень продукции цитокератина-7 (Sripa et al., 2007). Цитокератин-7, встречается в

железистом эпителии, эпителиальных клетках легких и молочной железы, а также клетках эпителия желчных протоков (Holtfreter et al., 2014). Антитела к цитokerатину-7 могут быть использованы в иммуногистохимии, чтобы отличать клетки, имеющие эпителиальное происхождение (Vale et al., 2013). Также, при описторхозе, отмечается повышенный уровень альфа-актина гладких мышц (Pakharukova et al., 2019a), который вовлечен в процесс фиброгенеза (Guido et al., 1997). Альфа-актин гладких мышц, экспрессируется активированными миофибробластами, которые широко представлены в микроокружении холангиокарциномы (Cadamuro et al., 2018). Трансформирующий фактор роста-  $\beta$  (TGF $\beta$ ) также является профибротическим цитокином, участвующим в формировании иммунного ответа, эпителиально-мезенхимальном переходе, активно способствующим прогрессированию опухолей (Wynn, 2008). TGF $\beta$  сигнальный путь запускает сигналы через мембранные рецепторы и внутриклеточные белки Smad, которые проникают в ядро при активации рецептора и действуют как факторы транскрипции. TGF-ингибирует онкогенез печени на ранней стадии, индуцируя апоптоз, однако способствует злокачественному прогрессированию на более поздних стадиях, увеличивая выживаемость раковых клеток, EMT, миграцию и инвазию. Было показано, что повышенный уровень TGF $\beta$  наблюдается при холангиокарциноме, в особенности при метастазировании (Roy et al., 2019; Papoutsoglou et al., 2019).

Фактор некроза опухоли-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) - один из медиаторов воспаления. Повышенный уровень TNF- $\alpha$  был отмечен при описторхозе *O. viverrini*. Было показано, что при инфекции *O. viverrini*, эпителиальные клетки желчных протоков могут продуцировать различные цитокины, включая IL-6, IL-8, TGF $\beta$  и TNF- $\alpha$ . Это может вызвать пролиферацию эпителиальных клеток желчных протоков и нарушение функции эпителиального барьера, а также приводить к мутациям (Ninlawan et al., 2010). TNF- $\alpha$  индуцирует звездчатые клетки печени (HSC, клетки Купфера), после чего они продуцируют окислительные радикалы, такие как гидроксильный радикал, оксид азота (NO) и супероксид-анион, что в свою очередь приводит к еще большему воспалению и может быть связано с развитием холангиокарциномы (Roy et al., 2019).

Молекулярные механизмы, участвующие в развитии гиперплазии и неоплазии при описторхозе не известны. Однако, в эти процессы, вероятно могут быть вовлечены сигнальные пути, активирующую, в том числе, пролиферацию клеток, например, Wnt, HIPPO, эпителиально-мезенхимальный переход и др. (Zheng, Pan 2019; Pastushenko, Blanpain 2018).

Эпителиально-мезенхимальный переход (EMT) представляет собой клеточный процесс, при котором клетки теряют свой эпителиальный фенотип и приобретают мезенхимальные характеристики. EMT играет ключевую роль в эмбриогенезе, процессе заживления ран, а также злокачественной трансформации и метастазировании. При эпителиально-мезенхимальном переходе происходит ремоделирование внеклеточного матрикса в следствии чего нарушаются межклеточные контакты между эпителиальными клетками и их связь с базальной мембраной. Активация EMT приводит к экспрессии EMT-индуцирующих транскрипционных факторов (ZEB, SNAIL и TWIST), которые ингибируют экспрессию генов, связанных с эпителиальным фенотипом клеток (E-кадгерин, клаудины, цитокератины, молекулы клеточной адгезии эпителия) и повышают экспрессию генов, связанных с мезенхимальным фенотипом (N-кадгерин, фибронектин, виментин, металлопротеиназы) (Kalluri, Weinberg, 2009). SNAIL снижает экспрессию гена, кодирующего E-кадгерин, ZEB1 индуцирует экспрессию генов, кодирующих виментин и N-кадгерин. Кроме того, SNAIL и ZEB2 активируют экспрессию матриксных металлопротеиназ (MMP), которые способствуют деградации базальной мембраны, способствуя инвазии клеток (Aigner et al., 2007). Следовательно, потеря эпителиальных характеристик клетками сопровождается частичным или полным приобретением ими мезенхимальных характеристик

Эпителиально-мезенхимальный переход, в контексте развития опухолей, повышает метастатический потенциал раковых клеток (Dongre, Weinberg, 2018).

Известно, что степень развития и накопления структурно-функциональных нарушений в печени при описторхозе зависит от интенсивности и длительности инвазии.

На сегодняшний день известно, что значимую роль в развитии морфологических изменений печени, хронического воспаления, а также в развитии холангиокарциномы играет экскреторно-секреторный продукт (ЭСП) гельминтов

(Gouveia et al., 2017; Pakharukova et al., 2017). Поскольку, до конца не известно, какие соединения в составе продукта выделяются экскреторно, а какие секретированы, он называется экскреторно-секреторным продуктом. Компоненты ЭСП способны проникать в холангиоциты и накапливаться внутри клеток (Yongvanit et al., 2012). Также в ЭСП были обнаружены специфические для гельминтов низкомолекулярные метаболиты холестерина, которые, по-видимому обладают генотоксичными и прооксидативными свойствами, а значит могут повреждать ДНК хозяина (Gouveia et al., 2017). Аналогичные соединения были обнаружены и у других гельминтов, некоторые из которых признаны биологическими канцерогенами (Sripa et al., 2018).

### 1.2.3 Экскреторно- секреторный продукт *O. felineus*

Структурно-функциональные изменения в печени возникают из-за механического воздействия гельминта на холангиоциты, которое сопровождается воспалительными процессами, а также возможным развитием вторичных бактериальных инфекций, и за счет воздействия различных биомолекул, выделяемых паразитом на клетки печени (Pakharukova, Mordvinov, 2022). К таким биомолекулам относятся компоненты секреторно-экскреторного продукта *O. felineus*. Экскреторно-секреторный продукт, который гельминты выделяют непрерывно, представляет собой продукты жизнедеятельности, содержимое кишечника, вещества, выделяемые с поверхности тегумента, а также все вещества секретированные и экскретированные паразитом, в том числе экзосомоподобные частицы, везикулы, белки и метаболиты и др. (Gouveia et al., 2017; Pakharukova et al., 2015).

В лизатах, полученных из взрослых гельминтов и из яиц *O. felineus*, были обнаружены многочисленные оксистеролподобные метаболиты и ДНК-аддукты, отсутствующие в контроле. Оксистеролы - это продукты окисления холестерина, возникающие в результате ферментативных (P450) или неферментативных реакций со свободными радикалами, например, кислородом и азотом. Оксистеролы обладают мутагенными, генотоксическими, прооксидантными и провоспалительными свойствами, которые могут способствовать развитию канцерогенных изменений (Jukasul et al., 2011; 2012). Таким образом, оксистеролы,

конъюгируют с азотистыми основаниями ДНК, оставляя в структуре ДНК апуриновый сайт. Генерация большого числа АП-сайтов или ошибки в системе репарации могут приводить к возникновению мутации в ДНК (Brindley et al., 2015).

Оксистеролподобные метаболиты *O. felineus* были схожи с описанными для *O. viverrini*. К ним относятся желчные кислоты, которые составляют большое семейство стероидов, несущих карбоксильную группу в боковой цепи, желчные спирты, которые имеют аналогичные продукты в биосинтезе желчных кислот или в качестве конечных продуктов; свободные желчные кислоты, глицин и сульфаты. В список этих оксистеролов также входили производные катехол-эстрогенов и других компонентов, гидроксильированных по стероидному кольцу (Gouviea et al., 2017).

В рамках этого же исследования было показано наличие оксистеролподобных метаболитов паразита в биологических жидкостях (сыворотка крови, желчь, моча) инфицированных *O. felineus* хомячков. Наличие специфических ДНК-аддуктов, предполагает взаимодействие оксистеролподобных метаболитов и хромосомной ДНК.

Ранее было показано, что в состав секреторно-экскреторного продукта входят белки-антиоксиданты (Cu/Zn супероксиддисмутаза, глутатион-S-трансфераза, тиоредоксин пероксидаза), при этом отмечено наличие 4 –х форм глутатион-S-трансферазы; белки цитоскелета (парамиозин); метаболические ферменты; протеазы; сериновые и цистеиновые ингибиторы протеаз; продукт детоксикации гема- гемозоин; белок OF-HDM-1; белки с неизвестной функцией (Lvova et al., 2012).

Белок OF-HDM-1 гомологичен белкам человека, которые относятся к классу (Host Defence Peptides) – белков, защищающих хозяина. Гомологичный белок Fh- HDM -1 был найден у печеночной двуустки *Fasciola hepatica*. Этот белок оказывает воздействие на работу иммунной системы хозяина: препятствует развитию иммунного ответа (Ryan et al., 2020).

### 1.3. Окислительный стресс

Усиление свободнорадикальных процессов и снижение буферной емкости антиоксидантной системы организма приводит к развитию состояния оксидативного

(окислительного) стресса, являющегося одним из патологических звеньев различных заболеваний, в том числе хронического воспаления. Это связано с тем, что воспалительные клетки секретируют большое количество цитокинов и хемокинов, ответственных за продукцию новых свободных радикалов в фагоцитах и других клетках (Federico et al., 2007). Следовательно, при повышенной продукции активных форм кислорода (АФК) система антиоксидантной защиты организма не способна полностью их инактивировать, в результате чего АФК запускают процессы окисления биомолекул, таких как ДНК, белков и липидов, что приводит к их повреждениям, и, следовательно, к развитию различных патологических процессов (Ighodaro and Akinloye, 2018).

### **1.3.1. Активные формы кислорода в тканях**

Свободные радикалы, в том числе активные формы кислорода, участвуют как в физиологических, так и в патологических процессах, протекающих в организме (Mittler, 2002).

Ниже перечислены основные физиологические эффекты активных форм кислорода в биосистемах: стимуляция неспецифического иммунитета (фагоцитоз), участие в регуляции воспаления; стимуляция специфического иммунитета; стимуляция регенерации; внутриклеточные регуляторы клеточного деления; регуляция апоптоза в клетке; перенос сигналов между клетками; регуляция сосудистого тонуса; регуляция обновления мембран клеток; общеадаптационные эффекты и др. (Cichoz-Lach, Michalak, 2014). Основными ферментами метаболических путей кислорода у млекопитающих являются оксидазы и оксигеназы. Кроме четырех компонентов электронного восстановления  $O_2$  до  $H_2O$  в дыхательной цепи митохондрий, происходит и 1-, 2-, 3-электроное восстановление с образованием АФК. Донорами электронов являются  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  - металлы с переменной валентностью. Активные формы кислорода, с физико-химической точки зрения, в первую очередь, свободные радикалы, которые имеют на внешней электронной оболочке неспаренный электрон, за счет чего они нестабильны и реактивны. АФК генерируются во всех частях клетки. В целом, до 98 % вдыхаемого

кислорода расходуется на выработку энергии и окислительный метаболизм субстратов, от 2-х до 5 % кислорода переходит в активные формы кислорода. Важнейшими АФК считаются: супероксидный радикал  $\cdot - O_2$ , синглетный кислород  $O_2$ , гидроксильный  $\cdot OH$  и пероксидный  $\cdot HO_2$  радикалы, перекись водорода  $H_2O_2$ , пероксидный ион  $HO_2$ , гипохлорит  $HOCl$ . В среднем, концентрация этих радикалов в тканях человека составляет  $10^{-8}$  мМоль (Halliwell, 1996; 2000; Zhang et al., 2016). При снижении эффективности антиоксидантных систем организма АФК могут оказывать повреждающее воздействие на клетки (Ziech et al., 2011).

Известно, что активные формы кислорода способны модифицировать белки, принимать участие в сигнальных путях, способствовать таким патологическим процессам как атеросклероз, диабет, неконтролируемый рост, нейродегенеративные заболевания, воспаление и старение (Zhang et al., 2016).

Основные механизмы генерации АФК связаны с нарушениями функционирования электронно-транспортных цепей митохондрий. Одним из главных источников АФК в организме человека и животных служат клетки-фагоциты: гранулоциты, моноциты, макрофаги, нейтрофилы, эозинофилы. Мембраны фагоцитов содержат ферментативный комплекс (НАДФН-оксидазу), который окисляет НАДФН до НАДФ<sup>+</sup> за счет восстановления  $O_2$  до супероксидного радикала:  $НАДФН + 2O_2 \rightarrow НАДФ^+ + 2 \cdot -$

В фагоцитах комплекс НАДФН-оксидаза обеспечивает «окислительный взрыв» — быстрое избыточное образование  $\cdot - O_2$  в ходе стимуляции неспецифической защиты организма для уничтожения бактерий. Фагоцит выделяет в окружающую среду АФК и ряд ферментов (Ayala et al., 2014).

АФК генерируются в ходе различных процессов в организме.  $O_2$  образуется и в реакциях фотоокисления в присутствии фотосенсибилизаторов: флавины, гематопорфирин и др., а также при дисмутации супероксидных радикалов (Birben et al., 2012). Кислород агрессивен в отношении биосубстратов, в особенности молекул с двойной связью; конечным итогом таких реакций обычно является образование гидроперекисей органических молекул в процессах перекисного окисления ненасыщенных липидов в мембранах. В присутствии металлов с переменной валентностью эти продукты запускают цепные реакции окислительной деградации биомолекул с образованием липидных радикалов, пероксилов и гидропероксидов.

АФК вызывает также окисление липидов, нуклеотидов и нуклеиновых кислот, особенно ДНК и белков. Основное количество  $\bullet - O_2$  образуется в митохондриях, которые используют 85–99 % потребляемого  $O_2$ . Генерация  $\bullet - O_2$  происходит в дыхательной цепи и микросомах при случайных сбоях в цепи переноса электронов, особенно при недостатке кислорода (Assi, 2017; Ayala et al., 2014).

Гидроперексинный радикал  $\bullet HO_2$  — реагирует с линолевой, линоленовой, арахидоновой кислотами, окисляя их до гидроперексидов. Образованию  $\bullet HO_2$  радикала способствует закисление среды, он также свободно проникает через мембраны. В присутствии ионов переходных металлов ( $Fe^{2+}$ ) перекись водорода может давать высоко активный гидроксильный радикал, обладающий наибольшей цитотоксичностью среди АФК. Это определяет его преимущественно местное действие. При этом главными видами повреждений биомолекул являются: отрыв атома водорода; присоединение к молекулам по двойным связям ДНК и РНК и др. Прямое повреждение ДНК при этом характеризуется разрывом цепи, окислением оснований, их модификации, образованием гидропероксидов ДНК, повреждением хромосом. С белками  $\bullet OH$  образует гидропероксиды, что может изменить третичную структуру белков и даже вызывать их агрегацию и денатурацию. С липидами  $\bullet OH$  образует перекисные соединения (Assi, 2017).

Печень является основным органом, который "атакуют" АФК, по причине, в первую очередь, высокого содержания в ней митохондрий (Sanchez-Valle, 2012). Окислительный стресс не только способен нарушать структурно-функциональное состояние печени, за счет повреждения липидов, белков и ДНК, но, что более важно, способен модулировать сигнальные пути, контролирующие нормальные физиологические функции (Li et al., 2015). Поскольку эти пути вовлечены в транскрипцию генов, экспрессию белков, апоптоз клеток и активацию звездчатых клеток печени; оксидативный стресс рассматривается как один из патологических механизмов, приводящих к возникновению и прогрессированию различных заболеваний печени, таких как хронический вирусный гепатит, воспаление, неалкогольный стеатогепатит и др (Mahmood et al., 2004). Также было высказано предположение, что существуют сложные перекрестные взаимодействия между патологическими факторами, воспалением, свободными радикалами и иммунными реакциями (Singal et al., 2011).

### 1.3.2. Защита организма от активных форм кислорода

Все активные формы кислорода являются окислителями клеточных компонентов и в больших количествах необратимо повреждают клетки. Антиоксидантная система направлена на защиту организма от активных форм кислорода (Mittler R., 2002). Антиоксидантная система включает низкомолекулярные антиоксиданты и ферменты. Известно, что в живом организме антиоксиданты могут быть двух типов: экзогенные (антиоксиданты, которые поступают в организм извне, например, с пищей) и эндогенные (антиоксиданты, которые синтезируются непосредственно в самом организме, например, супероксиддисмутаза, каталаза и др.). К основным ферментам антиоксидантной системы относят: супероксиддисмутазу, каталазу, пероксидазу (Petrou et al., 2018).

Супероксиддисмутаза (СОД) является ключевым ферментом системы антиоксидантной защиты организма, трансформирующим супероксидные радикалы  $\bullet - O_2$  в перекись водорода, которая менее активна и разлагается при участии других ферментов (Rosa et al., 2021). Известно, что клетки способны быстро реагировать на окислительный стресс именно повышением СОД и синтезом глутатиона, поэтому в некоторых источниках СОД рассматривается как стресс-белок, синтезируемый в ответ на окислительный стресс. Выделяют несколько форм СОД: в цитозоле клеток Cu и Zn-зависимые СОД, в митохондриях Mn-зависимая СОД, у бактерий Fe-зависимая СОД (Green et al., 2002).

Каталаза.  $H_2O_2$  является предшественником реакционного радикала  $\bullet OH$ . Каталаза прерывает этот процесс, расщепляя  $H_2O_2$  до  $H_2O$  и  $O_2$ . В клетках каталаза в основном сосредоточена в пероксисомах, в которых содержатся и ферменты, продуцирующие перекись водорода, необходимую, в частности, в системах неспецифической иммунной защиты (Nadif et al., 2005; Valko et al., 2006; Nicholls, 2012). Каталаза присутствует в разных тканях организма человека и животных, однако максимальное ее количество обнаруживаются в печени и почках. Каталаза обычно длительно сохраняет свою активность, почти не требует энергии для активации, поэтому скорость действия этого фермента лимитирована лишь скоростью диффузии субстрата к активному центру (Зенков и др., 2001).

Пероксидаза, в особенности глутатион-пероксидаза, еще один ключевой фермент антиоксидантной системы. Глутатион-пероксидаза состоит из 4 субъединиц, в каждой из которых находится по атому селена. В клетках этот фермент находится в цитозоле и матриксе митохондрий. Глутатион-пероксидаза участвует в восстановлении  $H_2O_2$  и органических гидропероксидов свободных жирных кислот, нуклеотидов, нуклеиновых кислот и, возможно, белков, переводя восстановленный глутатион в окисленный. Затем глутатионредуктаза восстанавливает окисленный глутатион. Активность этого фермента зависит от содержания глутатиона в клетке, что, в свою очередь, определяется активностью глутатионредуктазы и концентрацией НАДФ•Н (Margis et al., 2008; Dannenmann et al., 2015).

При этом важно учитывать так называемый баланс про и антиоксидантной системы. Известно, что окислительно-восстановительный статус клетки или редокс-статус определяет судьбу единичной клетки. В зависимости от этого статуса, возможна активация различных процессов (пролиферация, активация сигнальных путей, апоптоз, некроз и т.д.), следовательно, как слишком низкое, так и повышенной содержание АФК может привести к негативным изменениям (Low et al., 2011).

Одним из ключевых сигнальных путей, участвующих в системе антиоксидантной защиты является Keap1/Nrf2/ARE (белок 1, связанный с Kelch-подобным ECH / ядерный фактор (эритроидного происхождения 2) /элемент антиоксидантного ответа). Сигнальный путь Keap1-Nrf2, регулирует экспрессию цитопротекторных генов в ответ на окислительный стресс. Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1 (Keap1) является редокс-чувствительным белком, который при стимуляции позволяет активировать транскрипционный фактор Nrf2. Nrf2 -транскрипционный фактор с высокой чувствительностью к окислительному стрессу. Окислительный стресс вызывает диссоциацию Nrf2 от Keap1 и последующую транслокацию в ядро, что приводит к связыванию Nrf2 с ARE и транскрипции генов-мишеней (McMachon et al., 2003; Ma et al., 2013). К генам мишеням Nrf2 относятся *NQO1* (НАД(Ф)Н хинон дегидрогеназа-1), *HO-1* (гемоксигеназа-1), *GCL* (глутамат-цистеин лигаза) (Chen et al., 2011).

### 1.3.3. Активные формы кислорода в неспецифическом иммунитете и при воспалении

Известно, что неспецифический иммунитет во многом определяет характер и длительность воспалительных процессов. При этом образование АФК является важным защитным механизмом неспецифического иммунитета. Высвобождение АФК в ходе так называемого «дыхательного взрыва» происходит как в фагосомы, так и среду, разрушая бактерии и повреждая старые, а также злокачественные клетки. Снижение активности НАДФ•Н-оксидазы в фагоцитах приводит к инфекции и сепсису. Активация нейтрофилов наблюдается при любых некрозах ткани, в том числе микроинфарктах, с формированием аутоиммунных процессов - в них, видимо, участвуют окисленные липиды, обладающие антигенными свойствами (Murata, 2018).

Воспалительные заболевания - это процесс, в котором активное участие принимают АФК, вмешиваясь в него на самых различных уровнях — инициации, течения и регуляции (Zuo et al., 2019).

Значительная роль окислительного стресса была показана в воспалительных процессах при различных заболеваниях печени, в том числе и при инвазии паразитов. Более того, было доказано, что воспалительные процессы и окислительный стресс тесно взаимосвязаны друг с другом. Известно, что число активных форм кислорода или реакционноспособного азота может увеличивать экспрессию провоспалительных генов посредством активации внутриклеточных сигнальных путей, также приводить к перекисному окислению липидов и способствовать окислительному повреждению ДНК. С другой стороны, воспалительные клетки могут продуцировать свободные радикалы, что приводит к увеличению окислительного стресса при воспалительных повреждениях (Li et. al. 2016). Известно, например, что воздействие экскреторно-секреторного продукта *S. sinensis* на клетки холангиокарциномы человека вызывает повышение генерации свободных радикалов за счет активации НАДФН-оксидазы (NOX), ксантинооксидазы (XO), липоксигеназы (LO), циклооксигеназы (COX) и iNOS (Ohnishi et al., 2013).

Также активные формы кислорода воздействуют на транспортные белки, белки-медиаторы, влияют на уровень внутриклеточного баланса антиоксидантной системы, ионные каналы (Giorgi et al., 2010).

Фактор транскрипции NF- $\kappa$ B имеет ключевое значение в ряде клеточных процессов, включая иммунный и воспалительный ответы, клеточную адгезию, дифференцировку, пролиферацию, аутофагию, старение и апоптоз. Известно, что нарушения в работе NF- $\kappa$ B связаны с раком, артритом, воспалением, астмой, нейродегенеративными и сердечными заболеваниями. Семейство NF- $\kappa$ B состоит из Rel (c-Rel), RelA (p65), RelB, p50 / p105 (NF- $\kappa$ B1) и p52 / p100 (NF- $\kappa$ B2). Сигнальный путь NF- $\kappa$ B может активироваться по меньшей мере двумя различными путями, называемыми каноническими и неканоническими путями. В результате последних исследований, стало известно, что существует взаимосвязь между активными формами кислорода и сигнальным путем NF- $\kappa$ B. Во-первых, АФК влияют на активацию пути NF- $\kappa$ B главным образом посредством ингибирования фосфорилирования I $\kappa$ B $\alpha$  (ядерный фактор транскрипции каппа В-альфа). Ряд исследований показал, что I $\kappa$ B $\alpha$  обычно фосфорилируется на серинах 32 и 36 ИКК (I $\kappa$ B-киназа), что приводит к его убиквитинизации и деградации, а экзогенно добавленная H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> влияет на фосфорилирование I $\kappa$ B $\alpha$  на Tyr42 или другие остатки тирозина и последующую деградацию I $\kappa$ B $\alpha$  и активацию NF- $\kappa$ B пути. Кроме того, ИКК также является основной мишенью для АФК при воздействии NF- $\kappa$ B и S-глутатионилирования ИКК $\beta$  на цистеин 179 и в результате приводит к ингибированию активности ИКК $\beta$ . Далее MEKK1 и киназы ИКК, вероятно могут регулироваться активными формами кислорода. MEKK1 является редокс-чувствительной киназой, которая может быть глутатионилирована при Cys1238, что приводит к ее инактивации. В-третьих, АФК также может нарушить убиквитинизацию и деградацию I $\kappa$ B, а затем активацию NF- $\kappa$ B путем инактивации Ubc12. Кроме того, NIK киназа в неканоническом пути, как предполагается, активируется АФК путем ингибирования фосфатаз и окисления остатков цистеина. Между тем, путь NF- $\kappa$ B также может влиять на уровни АФК, увеличивая экспрессию антиоксидантных белков, таких как Cu-Zn-SOD, Mn-SOD, GPx, GST-pi, MT3 и FHC (Zhang et. al., 2016).

Баланс между клеточным и гуморальным ответами регулируется CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеточными популяциями. CD4<sup>+</sup> популяция подразделяется на две субпопуляции – Th1 и Th2, различие между которыми проявляется в спектре цитокинов, продуцируемых этими клетками. В общем случае, иммунный ответ при инвазии гельминтами развивается по типу Th2-ответа с увеличением интерлейкина-4 (IL-4) и других цитокинов (IL-5, IL-9, IL-13 и IL-21), активацией и экспансией CD4<sup>+</sup>Th2-клеток, плазматических клеток, секретирующих IgE, эозинофилов, тучных клеток и базофилов. При гельминтозных инфекциях, однако, характерно образование гранулем, традиционно ассоциируемых с Th1-ответом, развивающимся в очаге воспаления. Для Th-1 ответа характерна продукция провоспалительных IF-гамма, TNF-альфа, IL-2. В частности, тиоредоксин пероксидаза может ингибировать иммунный ответ Th1-типа и активировать Th2. Для белка HDM гельминта *Fasciola hepatica* показано, что он ингибирует презентацию антигена макрофагами из-за его сродства к мембране макрофагов хозяина (Robinson et al., 2012). Классически активированные макрофаги синтезируют провоспалительные цитокины, активные кислородные радикалы, NO, что при неконтролируемой продукции ведет к развитию воспаления и разрушению клеточного матрикса. В некоторых исследованиях отмечалось, что стойкая лейкоцитарная инфильтрация, включая моноциты / макрофаги и связанное с ними хроническое воспаление, способствует развитию фиброза и рака в различных тканях, включая печень (Robinson et al., 2012; Harris et al., 2017).

#### **1.3.4. Роль окислительного стресса в повреждении биомолекул**

Как уже упоминалось ранее, активные формы кислорода играют значимую роль в молекулярных процессах различных нейродегенеративных, воспалительных и онкологических заболеваниях. Было показано, что в опухолевых тканях по сравнению со здоровыми, продукция H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> повышена. Кроме того, повышенные уровни 4-гидроксиноненала (HNE) (маркер перекисного окисления липидов) и 8-оксогуанина (8-OHdG) (маркер окислительного повреждения ДНК) (Dizdaroglu M., Jaruga P., 2012) отмечались в крови и моче больных онкологией. При этом, чем выше были уровни содержания этих соединений, тем тяжелее была стадия заболевания. 8-охоG, который является маркером окислительного повреждения ДНК, способен

вызывать мутации соседних оснований ДНК. Более того, вторичные продукты перекисного окисления липидов, такие как HNE (Peter et al., 2006), могут нарушить репарацию ДНК, за счет встраивания в остатки цистеина, лизина и гистидина белков, участвующих в системе эксцизионной репарации нуклеотидов. Накопление 8-OHdG и дефицит репарации ДНК способны вызывать мутации в различных генах (Valavanidis et al., 2009; Kaneko et al., 2000). Известно, что негативные эффекты перекисного окисления липидов обусловлены цитотоксическими и мутагенными свойствами их вторичных продуктов - альдегидных соединений (MDA и HNE), которые образуются в результате цепных окислительно-восстановительных реакций, которые служат маркерами степени окислительного стресса в тканях (Aggarwal et al., 2019). В настоящее время имеются данные о том, что при описторхозе, вызванном *O. viverrini*, *S. sinensis* наблюдается увеличение окислительных повреждений ДНК. Окислительное повреждение ДНК (8-нитрогуанин и 8-oxodG) было обнаружено в эпителии желчных протоков хомяков, инфицированных этими гельминтами. В желчных протоках была повышена экспрессия генов индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) и NF-kB (Pinlaor et al., 2008). Было показано, что оксид азота (NO) не только цитотоксичен, но также может быть генотоксичным. Несмотря на то, что iNOS участвует в защите хозяина от инфекции печеночными сосальщиками, чрезмерное образование iNOS может приводить к развитию окислительного стресса. Основная роль оксида азота (синтезируемого iNOS) во время воспаления заключается в запуске канцерогенеза за счет накопления повреждений ДНК путем ингибирования системы репарации ДНК и стимуляции экспрессии циклооксигеназы-2 (Qiao et al., 2019). Циклооксигеназа-2 стимулируется цитокинами и липополисахаридом и в основном экспрессируется во время воспаления. Дополнительной важной связью между хроническим воспалением и развитием рака является метаболизм арахидоновой и линолевой кислот, катализируемый циклооксигеназой (COX) и липоксигеназой (LOX) (Maeng et al., 2016).

Увеличение накопления продуктов перекисного окисления липидов (малонового диальдегида и 4-гидрокси-2-ноненал) и увеличение экспрессии циклооксигеназы-2 (Cox-2) и 5-липоксигеназы (Alox5), отмечались в печени при инфицировании *S. sinensis*, что свидетельствует о наличии окислительного стресса.

(Sejung Maeng et. al., 2016). Так, недавно в сыворотке крови, желчи и моче зараженных *O.felineus* хомяков были обнаружены метаболиты холестерина-оксистеролы. Наличие различных форм ДНК- аддуктов позволяет предположить, что связанные с инфекцией оксистеролы могут участвовать в хромосомных повреждениях клеток хозяина (Gouviea et al., 2017).

Однако при описторхозе, вызванном *O. felineus* связь между продукцией АФК и наличием окислительных повреждений полностью не изучена.

#### **1.4. Природные и синтетические низкомолекулярные антиоксиданты**

Антиоксиданты – природные или искусственно синтезированные соединения, способные уменьшать интенсивность свободнорадикального окисления, нейтрализовать свободные радикалы за счет обмена своего атома водорода на кислород свободных радикалов. Антиоксиданты, имеют подвижный атом водорода в связи с наличием в молекуле нестойкой связи с углеродом (C– H) или серой (S – H). В результате взаимодействия со свободными радикалами возникают малоактивные радикалы самого антиоксиданта, не способные к продолжению цепи (Sies, 1997). Таким образом антиоксиданты можно разделить на два типа и три класса: 1. Эндогенные антиоксиданты (билирубин, каталаза, ферритин, супероксиддисмутаза, глутатион, кофермент Q, l-карнитин, альфа-липоевая кислота, глутатионпероксидаза (GPx), мелатонин, металлотионин, тиоредоксины, пероксиредоксины, мочевая кислота); 2. Природные антиоксиданты (аскорбиновая кислота, флавоноиды, β-каротин, витамин E и витамин A); 3. Синтетические антиоксиданты (антиоксиданты семейства SkQ, тирон, пируват, селен и N-ацетилцистеин (NAC)). Несмотря на необходимость защищать организм от активных форм кислорода, очень важно, при этом, соблюдать баланс между концентрацией активных форм кислорода и антиоксидантами (Aggarwal et al., 2019).

Стоит принимать во внимание и тот факт, что многие антиоксиданты, в определенных условиях и концентрациях, могут проявлять и прооксидантные свойства, например, аскорбиновая кислота, эпигаллокатехин-3-галлат (EGCG) (H.-S. Kim et al., 2014; Zhang et al., 2015).

### 1.4.1. Природный антиоксидант – ресвератрол

Ресвератрол (3,4',5-тригидроксистильбен) является природным фитоалексином (полифенол стильбена), в большом количестве встречающимся в косточках и кожуре красного винограда (Baur et al., 2006). Впервые он был идентифицирован как биологически активное вещество в 1992 году. Это соединение привлекло внимание исследователей после того, как в 1997 году впервые были опубликованы данные о его противоопухолевом эффекте (Jang et al., 1997). Впоследствии многочисленные исследования данного соединения подтвердили его способность модулировать множество сигнальных путей, связанных с ростом и делением клеток, апоптозом, ангиогенезом, инвазией и метастазами. Так было показано, что ресвератрол способен снижать экспрессию генов – мишеней *c-Myc*, *MMP-7*, и *MALAT1*, что может приводить к уменьшению локализации  $\beta$ -катенина в ядре, таким образом, ослабляя передачу сигналов Wnt/ $\beta$ -катенина, что приводит к ингибированию инвазии и метастазирования (Ji et al., 2013; Ko et al., 2017).

Доклинические исследования продемонстрировали ингибирующее действие ресвератрола на различные виды рака и его способность действовать как дополнение к традиционной химиотерапии. На данном этапе известно, что ресвератрол является природным антиоксидантом, обладает противоопухолевыми, противовирусными, противовоспалительными свойствами, защищает от инфекций, предотвращает ожирение и обладает геропротекторным эффектом (Nichelle C. Whitlock, 2012). Как было показано, ресвератрол является мощным активатором SIRT1 (Сиртуин 1)-НАД-зависимую деацетилазу сиртуин-1. В литературе имеются данные о том, что SIRT1 снижает экспрессию провоспалительных цитокинов, таких как TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6 за счет деацетилирования гистонов факторов транскрипции NF- $\kappa$ B и AP-1. Однако роль SIRT1 в процессах канцерогенеза остается неоднозначной. SIRT1 подавляет развитие опухоли за счет запуска апоптоза, и наоборот, способствует росту опухоли, ингибируя p53 и FOXO3a и активируя эпителиально-мезенхимальный переход (Byles et al., 2012; Giannakou, Partridge, 2004; Kume et al., 2006). Ресвератрол снижал окислительный стресс за счет активации сигнального пути SIRT1/AMPK/PGC-1 $\alpha$ . Его противовоспалительные свойства проявлялись,

также, за счет деацетилирования субъединицы NF-κB RelA/p65 и снижает воспаление, через активацию SIRT1 (Zhang et al., 2015; Chao et al., 2017).

Также, было показано, что ресвератрол увеличивает и экспрессию хиноноксидоредуктазы-1 (NQO1), которая является геном-мишенью ядерного фактора эритроидного происхождения 2 (Nrf2), а также повышает экспрессию гемоксигеназы-1 (HO-1) и снижает образование ДНК-аддуктов (Zakhid et al., 2008).

#### 1.4.2 Митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1

SkQ— это класс митохондриально-направленных антиоксидантов, разработанных под руководством академика Владимира Скулачёва.

SkQ1-10-((6'-Plastoquinonyl)decyltriphenylphosphonium) - представляет собой липофильный катион, соединенный через насыщенный углеводородный фрагмент с антиоксидантом (пластохинон). Благодаря липофильности SkQ1 эффективно проникает через мембраны клетки. При этом положительный заряд обеспечивает направленную доставку присоединенного антиоксиданта в отрицательно заряженный матрикс митохондрий (Skulachev et al. 2009).

SkQ1 проявляет антиоксидантные свойства благодаря своим характерным особенностям: он способен напрямую проникать через липидный бислой мембран в митохондрии благодаря своей липофильности. Движение, при этом, происходит по электрическому потенциалу за счет наличия положительного заряда. Митохондрии являются главным источником активных форм кислорода и SkQ1 способен, проникая в митохондрии, ингибировать активные формы кислорода двумя способами. Во-первых, напрямую за счет окисления пластохинона, во-вторых за счет снижения потенциала мембраны митохондрий (Skulachev et al. 2011).

Показано, что SkQ1 обладает антиоксидантными свойствами, замедляет старение мышечной ткани, значительно ускоряет заживление диабетических ран, помогает в борьбе с аутоиммунным артритом у крыс, снижает риск развития глаукомы, обладает сильным антибактериальным действием, а также ингибирует перекисное окисление липидов и белков (Nazarov et al. 2017; Kagan et al., 2009). Также было показано, что SkQ1 оказывает терапевтический эффект при развитии различных

патологий, связанных с хроническим или острым воспалением (Chelombitko et al., 2017). SkQ1 способен ингибировать АФК, поддерживать окислительно-восстановительный баланс в митохондриях и, за счет этого, снижать степень проявления воспаления (Chelombitko, М.А., 2016, 2017; Antonenko, 2008), а также снижать синтез PGE2 (Wei et al., 2019); влиять на экспрессию Nrf2 и, следовательно, на экспрессию генов антиоксидантной системы (супероксиддисмутазу, каталазу) при гипероксии (Vnukov et al., 2015). Как показали исследования *in vitro*, SkQ1 снижает образование супероксид аниона и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в клетках HepG2 (Jan et al., 2017).

### Заключение

В настоящее время имеются данные о том, что при описторхозе вне зависимости от инфекции млекопитающих одним из трех эпидемиологически значимых видов трематод семейства Opisthorchiidae (*O. viverrini*, *O. felinus* и *C. sinensis*) наблюдается выраженные неопластические процессы в желчных протоках, в частности, у всех животных наблюдается неоплазия холангиоцитов, которая выражается в усилении процессов пролиферации и дисплазии клеток. Этот процесс считается предраковым и при определенных условиях может приводить к развитию холангиокарциномы, или рака желчных протоков. В связи с этим, два вида семейства *O. viverrini* и *C. sinensis* признаны биологическими канцерогенами. Механизмы развития неоплазии при описторхозе и клонорхозе неизвестны, однако большая роль отводится секреторному продукту трематод, который содержит в своем составе белки и низкомолекулярные метаболиты холестерина, которые обладают прооксидативным и промутагенным эффектом. Ранее было показано, что такие метаболиты холестерина были найдены как в биологических жидкостях зараженного хозяина, так и внутри взрослых особей описторхов *O. felinus* и *O. viverrini*. Наличие различных форм ДНК- аддуктов позволяет предположить, что связанные с инфекцией оксистеролы могут участвовать в хромосомных повреждениях клеток хозяина. Кроме того, было показано наличие окислительных повреждений липидов в печени при инфицировании *C. sinensis* и *O. viverrini*. Таким образом, накоплены косвенные свидетельства в пользу участия секреторного продукта гельминтов и окислительных повреждений ДНК в патогенезе описторхоза, однако до сих пор

ничего неизвестно о связи окислительных повреждений ДНК с неоплазией эпителия желчных протоков, не показана также связь между продукцией АФК и наличием окислительных повреждений при описторхозе, вызванном *O. felineus*.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Выделение метацеркарий

Метацеркарии *Opisthorchis felineus* были выделены из подкожных мышечных тканей зараженных рыб семейства Карповых (язь) из р. Обь. Для проверки выловленной рыбы на наличие метацеркарий делали срезы мышц толщиной 2-4 мм и проводили визуализацию под биноклем. Затем все зараженные срезы подвергались ферментативному перевариванию (HCl, пепсин) при 37 °С в течение 12-24 часов. Супернатант удаляли, а осадок промывали в чашке Петри большим количеством физиологического раствора (0,9% р-р NaCl). Метацеркарии отбирали под биноклем. Для получения ювенильных марит, метацеркарии выдерживались в течении 30 минут в растворе трипсина (0,1% р-р трипсина в PBS, pH 7.6).

### 2.2. Работа с животными

Сирийские хомячки (*Mesocricetus auratus*) (аутбредная линия) были получены из вивария конвенциональных животных Института Цитологии и Генетики СО РАН. Хомячки *Mesocricetus auratus* в возрасте 6-8 недель были распределены в группы по 5 животных и перорально заражены 75-метацеркариями *Opisthorchis felineus*. По истечению срока эксперимента (через 1, 3, 6, 11, 18 месяцев) экспериментальных хомячков подвергали эвтаназии посредством ингаляции CO<sub>2</sub> в течении 3-4 мин. Протокол экспериментальных работ с животными был одобрен этической комиссией ИЦиГ СО РАН (Протокол № 42 от 25.05.2018).

Антиоксиданты ресвератрол (Sigma-Aldrich, США) и SkQ1 (любезно предоставлен д.б.н. г.н.с. лаборатории молекулярных механизмов старения Колосовой Н.Г.) на фоне острого и хронического описторхоза применяли в течение 1 и 3 месяцев, соответственно. Хомячки были разделены на 12 групп (по 6 групп для 1 и 3 месяцев) по 5 животных в каждой: 1) контрольные (неинфицированные) животные; 2) неинфицированная группа с ресвератролом (ежедневно давали ресвератрол в концентрации 1 мг/кг); 3) неинфицированная группа с SkQ1 (ежедневно давали SkQ1 в концентрации 1 микромоль/кг); 4) животные,

инфицированные *Opisthorchis felineus*; 5) инфицированные животные, получавшие ресвератрол (1 мг/кг, ежедневно); 6) инфицированные животные, получавшие SkQ1 (1 микромоль /кг ежедневно).

Антиоксиданты давали хомякам ежедневно, капая 20 мкл на сухарик размером 5X5 мм. Ресвератрол разводили в этаноле до концентрации 50 мг/мл непосредственно перед использованием, затем растворе в PBS (pH 6.11) до 5 мг/мл, избегая попадания прямых солнечных лучей; SkQ1 (162 мкмоль/мл) в спирте хранили на -20°C также избегая попадания прямых солнечных лучей, перед использованием разводили до 5% спиртового раствора в воде.

Для оценки возможности комбинаторного воздействия антиоксидантов и основного антигельминтного препарата – празиквантела, дополнительно было добавлено четыре группы животных по 5 хомяков в каждой: 1. Неинфицированные животные, пролеченные празиквантелом (PZQ); 2. Инфицированные животные, пролеченные PZQ; 3. Инфицированные животные, получавшие в течении месяца ресвератрол (1 мг/кг ежедневно) и пролеченные PZQ; 4. Инфицированные животные, получавшие в течении месяца SkQ1 (1 микромоль/кг ежедневно) и пролеченные PZQ. Лечение PZQ проводили у животных однократно через один месяц диеты с антиоксидантами в дозе 400 мг/кг, в суспензии, содержащей этанол (3%) и Твин 80 (7%). Через неделю после лечения проводили забор образцов печени, сыворотки крови и мочи.

### **2.2.1. Оценка антигельминтных свойств антиоксидантов *in vitro* и *in vivo***

Для оценки антигельминтной эффективности SkQ1 и ресвератрола *in vitro*, взрослых червей *O.felineus* извлекали из печени инфицированных хомяков, объединяли и тщательно промывали стерильным физиологическим раствором (0,9% NaCl). Червей инкубировали при 37°C в течение 24 ч в культуральной среде RPMI 1640 (Life Technologies, Carlsbad, США) с добавлением 100 ЕД/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина В (Sigma-Aldrich, St. Louis, США) и 1% глюкозы в CO<sub>2</sub>-инкубаторе.

Жизнеспособность червей оценивали под инвертированным микроскопом (Axiovert 40CFL) с камерой (Axiosam ICC3, Zeiss) через 24 ч после лечения. В качестве положительного контроля был использован празиквантел (PZQ) (Sigma-Aldrich, США). PZQ, ресвератрол и SkQ1 растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) (Sigma-Aldrich, США) с получением 10 мМ стоковых растворов. Для расчета концентрации полумаксимального ингибирования ( $IC_{50}$ ) были протестированы следующие концентрации препаратов: 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 и 500 мкМ, коэффициент разбавления 1:200. Концентрация растворителя при разных концентрациях соединения составляла 0,5%. На лунку использовали от четырех до пяти взрослых червей. Опыты повторяли трижды с тремя биологическими повторами для каждой концентрации. В качестве контрольной группы инкубировали червей *O.felineus* в среде с 0,5% ДМСО. Через 24 часа подвижность оценивали по шкале подвижности от 0 до 3 (0 = неподвижность, 1 = очень низкая подвижность, 2 = низкая подвижность, 3 = нормальная подвижность) (Mordvinov et al., 2021). Черви считались мертвыми, если у них была темная окраска и отсутствие подвижности в течении 2-х минут. Данные, полученные в отдельных экспериментах, были усреднены и скорректированы с данными, полученными в контрольных группах без лечения. Для расчета  $IC_{50}$  использовали пакет R «drc 3.0-1».

Для оценки антигельминтной эффективности SkQ1, 13 самцов –хомячков в возрасте 2-х месяцев были заражены 75-метацеркариями *O.felineus*. Группа (*O.felineus* + SkQ1) была пролечена SkQ1 (1 микромоль /кг), как и в других группах, описанных ранее, в течении 1 месяца. В качестве контрольной группы были инфицированные *O.felineus* животные без обработки. Хомячков из группы *O.felineus* + PZQ пролечили однократной дозой празиквантела (400 мг/кг) как описано ранее.

Червей, оставшихся в гепатобилиарной системе на 7-й день после лечения празиквантелом, подсчитывали после умерщвления хомячков ( $CO_2$ ). Эффективность препарата выражали в снижении количества гельминтов (WBR), как было описано ранее (Mordvinov et al., 2019). WBR рассчитывали следующим образом:  $((a - b)/a) \times 100$ , где  $a$  — среднее количество червей в контрольной группе при вскрытии,  $b$  — среднее количество червей в обработанной группе при вскрытии. Значимость WBR оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни в программе STATISTICA 6.0 (StatSoft).

### **2.2.2. Получение образцов печени, сыворотки крови и мочи хомяков**

Образцы печени, сыворотки крови и мочи были получены через 1,3,6,11,18 месяцев после инфекции и через 1 и 3 месяца после инфицирования животных при сочетанном воздействии антиоксидантов (ресвератрол и SKQ1) и лечения PZQ. На каждом сроке проводили вскрытие и извлекали печень. Часть печени была зафиксирована в 10% нейтральном формалине с фосфатным буфером (Biovitrum, Россия) для проведения гистологических исследований. Небольшую часть печени помещали в фиксатор IntactRNA (Евроген, Россия) и хранили на  $-20^{\circ}\text{C}$  для дальнейшего выделения РНК. Часть печени замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$  для дальнейшего изготовления лизатов.

Для получения сыворотки, кровь хомячков собирали с помощью сердечной пункции, а затем центрифугировали на центрифуге Eppendorf 5415R в течение 20 минут, при температуре  $+4^{\circ}\text{C}$  на 3000 g. Мочу забирали посредством пункции мочевого пузыря. Полученные сыворотку и мочу делили на аликвоты и хранили на  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **2.3. Гистологические исследования печени**

Для исследования структурных изменений, печень фиксировали в забуференном 10% формалине (Biovitrum, Россия). После фиксации в течение 15 ч образцы обезвоживали в серии возрастающего градиента этилового спирта и ксилола (Союзхимпром, Россия) в карусели для автоматической проводки (Thermo Scientific Spin Tissue Processor Microm STP 120) и заключали в парафин с использованием гистологического комплекса Microm (Microm, Великобритания), далее заливали парафиновые блоки (Biovitrum, Россия) с использованием гистологического комплекса Microm (Microm, Великобритания). Срезы толщиной 4-3,5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином (Biovitrum, Россия), методом окрашивания по Ван-Гизону (Biovitrum, Россия) и методом ШИК-реакции (Labiko LLC, Россия). Готовые препараты исследовали под световым микроскопом Axioskop 2 Plus (Zeiss, Германия). Полуколичественный анализ проводили с помощью программы ImageJ (морфометрия). На каждое поле зрения накладывали

морфометрическую сетку из 100 квадратов. Оценивали все поля зрения (30-40 полей зрения на каждый гистологический срез, окрашенный гематоксилином и эозином) из двух долей печени каждого животного (Gibson-Corley et al., 2013). Гиперплазию, неоплазию, дистрофию паренхимы, воспалительную инфильтрацию и перидуктальный фиброз (срезы, окрашенные по Ван Гизону) оценивали в зависимости от площади, занимаемой в поле зрения среза.

#### **2.4. Иммуногистохимическое исследование печени**

Для иммуногистохимического анализа печень фиксировали в забуференном 4% параформальдегиде при температуре +4° С в течение 12 часов, затем фиксировали в 30 % сахарозе в течение 24 часов при +4° С и хранили на -80° С. Криосрезы толщиной 7-10 мкм были изготовлены на Microm HM-505 N. Иммуногистохимический анализ был проведен в соответствии со стандартным протоколом (Pakharukova et al., 2019).

Для определения маркеров перекисного окисления липидов, маркеров воспаления и маркеров фиброгенеза использовали первичные антитела 4-гидрокси-2-ноненал (разведение 1: 150; кат. № ab48506, Abcam), малоновый диальдегид (1: 300; кат. № ab6463, Abcam); альфа-актин гладких мышц (1: 150; кат. № ab7817, Abcam), анти-MMP9 (1:200; кат. № ab228402, Abcam), анти-коллаген 1 альфа (1:200; кат. № ab34710; Abcam), анти-E-кадгерин (1:200; кат. № ab76055, Abcam), анти-N-кадгерин (1:200; кат. № ab76011, Abcam) с соответствующими вторичными антителами: Gt Anti-Ms IgG (H+L) (1: 500; кат. № M30010 Invitrogen, США) или GFP-конъюгированные Gt Anti-Rb IgG AffiniPure (H + L) (1: 1000; кат. № 111-095-003, Джексон, США). Срезы были обработаны средой, содержащей 40,6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI; кат. № F6057, Sigma-Aldrich, США) и заключены под покровное стекло. Исследования проводились под микроскопом AxioPlan 2 (Zeiss, Германия). Для окрашивания нейтральных триглицеридов и липидов использовали краситель Oil red O (Sigma, США) на криосрезах в соответствии с инструкциями производителя, полученные препараты исследовали под микроскопом AxioPlan 2 (Zeiss, Германия).

## 2.5. Приготовление лизатов из клеток печени хомячков

Для получения белковых лизатов небольшой кусочек печени (1×2мм) гомогенизировали с помощью пластикового гомогенизатора в 300 мкл лизирующего буфера (150мМ NaCl, 50мМ ТрисHCl pH 8.0, 0,1% SDS, 0,1% Тритон X-100) + 1мМ PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) и обрабатывали ультразвуком (10 секунд, 2 раза, 30% - амплитуда) (Vibra-Cell VCX130) на льду. Затем добавляли 1х протеазный ингибиторный коктейль фирмы Amresco (США) и помещали на ротатор на 1,5-2 ч при +4° С. Далее лизаты центрифугировали в течение 20 минут при 12,5 грм и температуре +4° С. Супернатант делили на аликвоты и замораживали при -80° С. Концентрацию белков определяли с помощью набора BCA Protein Assay (Thermo Scientific, США) согласно протоколу производителя. Измерения проводили на спектрофотометре Eppendorf BioPhotometer plus.

## 2.6. Клеточная культура

Клеточная линия гепатоцитов HepG2 представляет собой коммерчески доступную клеточную линию, которая была получена из гепатоцеллюлярной карциномы человека (Культура клеток была любезно предоставлена Т.А. Шнайдер, ИЦиГ СО РАН, Россия). Клетки HepG2 выращивали в специальной среде, содержащей: DMEM/F12, 10% FBS, 100 МЕ/мл пенициллин, 100 мкг/мл стрептомицин, 0,4 мкг/мл гидрокортизон, 5 мкг/мл инсулин.

### 2.6.1. Влияние антиоксидантов на клетки HepG2

Влияния SkQ1 на клетки HepG2 определяли *in vitro*. Вкратце,  $4 \times 10^3$  клеток высевали в 6-луночный планшет и наращивали до 80% монослоя. К клеткам добавляли растворенный в этаноле SkQ1 до концентрации 1 мМ (0,2% от конечного объема среды), и культивировали 4 часа и 24 часа (в 2 повторах на каждую временную точку). Контрольные клетки инкубировали с 0,2% этанолом. В качестве положительного контроля клетки HepG2 4 часа инкубировали с ресвератролом в концентрации 2,5 мМ (0,2% от конечного объема среды).

### 2.6.2. Приготовление лизатов из культуры клеток

Клетки обрабатывали 0,25% раствором Трипсин-ЭДТА и снимали с культурального планшета. Далее все манипуляции проводили на льду. К клеткам добавляли 1 мл ледяного x1 PBS и центрифугировали 5 мин на 400 g при +4° С. Супернатант сливали, к клеточному осадку добавляли 100 мкл RIPA буфера (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 150 mM NaCl; 0,1 % SDS; 0,5% Triton X100; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM PMSF) и тщательно ресуспендировали. Далее гомогенизировали с помощью шприца. Инкубировали на льду в течении 30 мин. Центрифугировали 10 мин при 12000 rpm при +4° С. Супернатант делили на аликвоты, добавляли 1x протеазный ингибиторный коктейль фирмы Amresco (AEBSF, Aprotinin, E-64, Bestatin and Leupeptin), тщательно ресуспендировали и замораживали при -80° С. Концентрацию белков определяли с помощью набора BCA Protein Assay (Thermo Scientific. США) согласно протоколу производителя. Измерения проводили на спектрофотометре Eppendorf BioPhotometer plus.

### 2.7. Вестерн блот анализ

Разделение белков по молекулярной массе проводили в 10% SDS-полиакриламидном геле (концентрирующий гель содержал: акриламид/бисакриламид в соотношении 29:1 – 5%, Трис –HCl pH 6,8- 130 mM, персульфат аммония -0,1%, додецилсульфат натрия (SDS) -0,1%, TEMED- 1мкл/мл; разделяющий гель содержал: акриламид/бисакриламид в соотношении 29:1 – 5%, Трис –HCl pH 8,8- 375 mM, персульфат аммония -0,1%, додецилсульфат натрия (SDS) -0,1%, TEMED- 0.08%) по методу Лэммли. Лизаты, полученные из печени, смешивали с 2x буфером Лэммли (Laemmli Sample buffer, Bio-Rad, кат. № 161-0737) и инкубировали 5 мин при 95° С, затем наносили в карманы полиакриламидного геля в концентрации 30 мкг белка на пробу для лизатов печени и 15 мкг белка на пробу для клеточных лизатов. Электрофорез проводили в буфере, содержащем 25 mM Трис, 190mM глицин, 0,1% SDS при 90 V в камере (Mini Protean Tetra System, Bio-Rad). Влажный перенос на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham Biosciences) проводили в буфере, содержащем 25 mM Трис, 190 mM глицин, 20% этанол с

помощью прибора для влажного переноса Bio-Rad, США при 30 V в течении 2 часов. Мембрану блокировали в Трис-солевом буфере, содержащем 1% Tween-20 и 5% БСА (бычий сывороточный альбумин), в течение 1 часа при комнатной температуре. Далее мембрану инкубировали с первичными антителами  $\beta$ -актин (1: 2000; кат. № ab8226, Abcam), альфа-актин гладких мышц (1: 2000; кат. № ab7817, Abcam), цитокератин 7 (1: 2000; кат. № ab9021, Abcam), TNF- $\alpha$  (1: 2000; кат. № 3114560, Sony), CD68 (1: 2000; кат. № ab201340, Abcam), Nrf2 (1:4000; кат. № ab62352, Abcam), NQO1 (1:4000; кат. № ab213239, Abcam) в Трис-солевом буфере с твином при + 4° C в течение 24 часов на качалке, отмывали трижды по 10 мин в 40 мл Трис-солевого буфера с твином на качалке и далее проводили инкубацию со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Gt Anti-Rb IgG (HRP) кат. № ab 205718 Abcam; Rb Anti-Ms IgG (HRP) кат. № 1114. Santacruz, США), в разведение 1:10 000 в течение 40-50 минут при комнатной температуре, также отмывали трижды в 40 мл буфера на качалке по 10 мин. Сигнал детектировали с использованием реагента для хемилюминесцентной реакции ECL (Amersham Biosciences, Великобритания) на рентгеновской пленке. Количественный денситометрический анализ проводили на оцифрованных изображениях иммуноблотов в программе Quantity One (Bio-Rad, США).

## **2.8. Выделение мРНК и синтез кДНК**

Выделение мРНК из печени животных проводили с помощью набора Aurum™ Total RNA Mini Kit (Bio-Rad, США.) согласно рекомендациям производителя. Концентрацию выделенной РНК определяли с помощью NanoDrop. РНК (A260/A280 = 1.9–2.1) использовали для получения кДНК с помощью набора RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kits (ThermoScientific, США). РНК и кДНК хранили при -80° C.

### 2.8.1. Создание библиотек

ДНК-библиотеки были подготовлены из печени хомяков в соответствии с протоколом New England Biolabs. В частности, полиА-mRNA были выделены из общего пула 1  $\mu\text{g}$  РНК с помощью NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module. Затем, ДНК-библиотеки были приготовлены с помощью NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit для Illumina. Отбор по размеру был выполнен с помощью Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, USA). Обогащение библиотек с лигированными адаптерами было выполнено с помощью ПЦР (6 циклов). Размер и качество ДНК-библиотек подтверждали с помощью Agilent Bioanalyzer, и затем библиотеки были просеквенированы ( $2 \times 150$  п.о.) на платформе Illumina HiSeq 2500 (Genewiz LLC, USA).

### 2.8.2. Анализ транскриптома печени

В среднем  $\sim 37$  миллионов прочтений (32–50 миллионов прочтений) были получены из каждого образца с помощью секвенирования. Полученные данные секвенирования были предварительно обработаны с помощью программы Trimmomatic 0.36 для удаления адаптеров и последовательностей низкого качества (Bolger et al., 2014). Качество данных секвенирования оценивали с помощью инструментов FastQC (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). Предварительно обработанные данные были выравнены на геном хомячка *M. auratus* GCF\_000349665.1\_MesAur1.0 с помощью HISAT2 версии 2.1.0 (Kim et al., 2015; Pertea et al., 2016). Сборку, количественную оценку и сборку транскриптома проводили с использованием Stringtie версии 1.3.6 (Pertea et al., 2016). Затем данные были преобразованы в таблицы количества ридов, прочитанных с соответствующих генов с помощью StringTie версии 1.3.6. Затем гены с числом прочтений не менее 10 подвергали анализу дифференциальной экспрессии генов с помощью R-пакета DESeq2 (Love et al., 2014). К полученным значениям  $p$  применяли поправку Бенджамини-Хохберга для множественных сравнений, и гены со скорректированным значением  $p$  ( $p_{adj}$ )  $< 0,1$  обозначали как дифференциально-экспрессирующиеся гены (ДЭГ). Тепловая карта была построена с использованием

R-пакета `heatmap.2` (v.2.38). Диаграмма Эйлера была сгенерирована с помощью R-пакета `eulerr` (v.6.1.0).

### 2.8.3. Выявление кластеров генов

Идентификацию кластеров генов, проявляющих специфические закономерности в образцах, проводили с помощью R-пакета `DEGreport` (Pantano, 2021). Rlog-преобразованные нормализованные прочтения использовали для идентификации DEG ( $p_{adj} < 0,05$ ), затем функция `degPatterns` использовалась для поиска наборов генов, которые демонстрируют сходные паттерны экспрессии в группах образцов. Группы генов из кластеров были подвергнуты дальнейшему функциональному анализу для выявления функций.

### 2.8.4. Функциональный анализ ДЭГ

Анализ обогащения наборами генов (терминами) из базы данных Gene Ontology (GO) был проведен с использованием веб-инструмента PANTHER (Mi et al., 2013). В качестве набора сравнения использовали гены из набора данных RNA-seq с количеством  $> 10$  (16 768 генов).

Анализ обогащения терминами GO был проведен с помощью теста на обогащение PANTHER (база данных Gene Ontology, DOI: 10.5281/zenodo.4735677, выпущена 01 мая 2021 г.) и точного теста Фишера, а термины GO с коэффициентом ложного обнаружения (FDR)  $< 0,05$  считали значимо обогащенными. Анализ обогащения путями базы данных генов и геномов Киото (KEGG) был выполнен с помощью веб-инструмента функциональной аннотации Enrichr (обогащенные KEGG пути) (Kuleshov et al., 2016). Пути KEGG с  $p_{adj} < 0,05$  считали значимо обогащенными. Анализ обогащения списками генов базы данных молекулярных сигнатур (MSigDB) был выполнен с помощью веб-инструмента аннотации ENRICHR (MSigDB\_Hallmark\_2020 база данных) (Kuleshov et al., 2016). Отличительные признаки с  $p_{adj} < 0,05$  считали значимо обогащенными.

### 2.8.5. ПЦР с детекцией в режиме реального времени

ПЦР с детекцией в режиме реального времени проводили, используя смесь реагентов для постановки ПЦР и краситель EVA Green (Синтол, Россия). В качестве амплификатора использовался CFX96 (Bio-Rad, США). Для оценки уровня мРНК был использован ген *Gapdh*.

Последовательность ген специфичных праймеров, используемых в реакции:

GAPDH 5'GAACATCATCCCTGCATCCACT3' (Gapdh, F, 22 н)

5'ATGCCTGCTTCACCACCTTCTT3' (Gapdh, R, 22 н)

TNF- $\alpha$  5'TCTTCAGAGTCCATCTCCCTC3' (TNF- $\alpha$ , F, 21 н)

5'GGGAATTCTGGAAACCGTTTG3' (TNF- $\alpha$ , R, 21 н)

INOS 5'R6G-CGGCACCCAAACACCAAGGTC-BHQ23' (21 н)

5'CATGACTTCCAGAACAGAGGG3' (iNOS, F, 21 н)

5'GCCATCTCCTGCATCTCTTC3' (iNOS, R, 20 н)

Acta2 5'R6G-TTCATGGTGCTGGGTGCGAGA-BHQ23' (21 н)

5'GGATGCAGAAGGAGATCACAG3' (Acta2, F, 21 н)

5'TGGAAGGTAGACAGAGACGC3' (Acta2, R, 20 н)

TGF $\beta$  5'CCAACTATTGCTTCAGCTCCAC3' (TGF $\beta$ , F, 22 н)

5'CAGGGCCAGGACCTTGCT3' (TGF $\beta$ , R, 18 н)

СК-7 5'AGCTTCCCCGGATCTTTGAG3' (СК-7, F, 20 н)

5'CGTCCTTCTTCAGCAACACAAAC3' (СК-7, R, 22 н)

ALOX5 5'R6G-AATGCCACACTGCGCCTAGA-BHQ23' (21 н)

5'AGATC GTGGC TACTC TACCA G3' (ALOX5, F, 21 н)

5'TCCTT CACTG GCTTC TCAAT G3' (ALOX5, R, 21 н)

Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения для CFX96 (Bio-Rad, США).

### 2.9. Оценка биохимических показателей сыворотки крови

Был проведен биохимический анализ сыворотки крови хомяков на активность АЛТ (аланинаминотрансфераза), АСТ (аспартатаминотрансфераза), содержание общего билирубина и холестерина. Для этого были использованы наборы фирмы

«Вектор-Бест»: Билирубин-Ново (В-8020), АЛТ-Ново (В-8078), АСТ-Ново (В-8080), Холестерин-Ново (В-8068), данные были получены с помощью спектрофотометра Eppendorf BioPhotometer plus согласно инструкциям производителя.

Полученные данные сравнивали с нормальными физиологическими показателями лабораторных животных (Van Hoosier, Pherson, 1987; Field, Sibold, 1998).

### **2.10. Оценка уровня 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина в моче**

Уровень 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина (8-OHdG) в моче измеряли с использованием набора 8-OHdG ELISA (кат. № ab201734, Abcam) в соответствии с рекомендациями производителя.

### **2.11. Статистическая обработка данных**

Анализ результатов, полученных при выполнении экспериментов, был проведен в программе Statistica 6.0. Для проверки статистической гипотезы применяли однофакторный дисперсионный анализ с поправкой на множественные сравнения, достоверность результатов которого оценивали с помощью критерия Фишера - ANOVA, post Hoc Tukey.

В случае, если выборка не отвечала критериям нормальности распределения, статистические различия между выборками оценивали по методу Манна-Уитни.

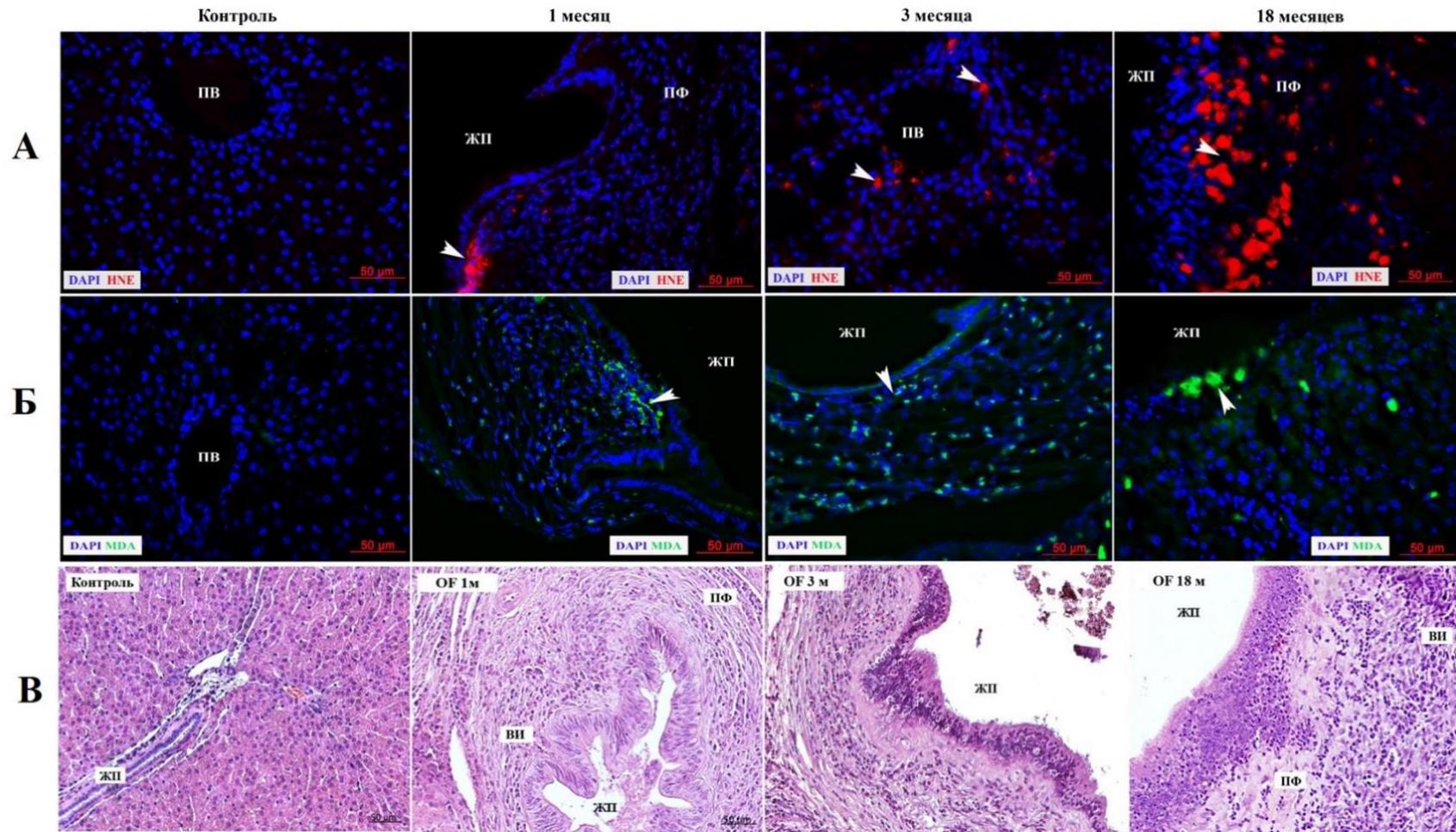
Нормальность распределения определяли с помощью критерия Шапиро-Уилкоксона W.

## Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

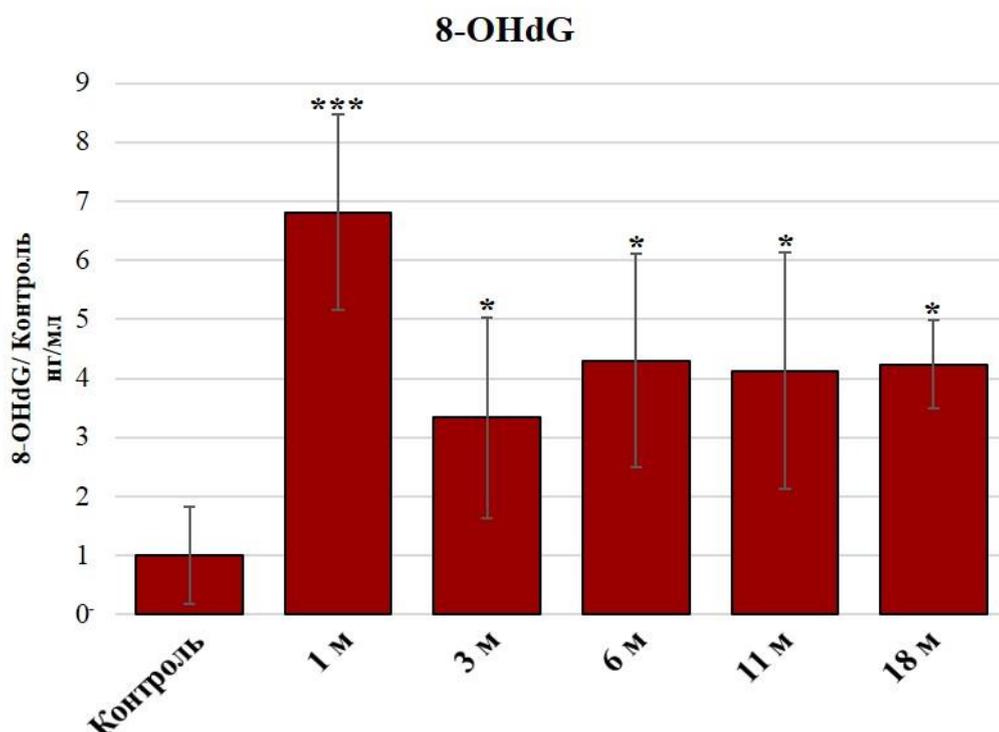
### 3.1 Динамика структурных изменений в печени животных в зависимости от срока инвазии описторхоза

#### 3.1.1. Оценка накопления окислительных повреждений в печени хомяков при экспериментальном описторхозе

В данной работе был оценен уровень содержания продуктов перекисного окисления липидов и окислительных повреждений ДНК. Негативные эффекты перекисного окисления липидов обусловлены цитотоксическими и мутагенными свойствами их вторичных продуктов - альдегидных соединений (MDA и HNE), которые образуются в результате цепных реакций (Assi, 2017). В ходе проведения иммуногистохимического анализа HNE в печени неинфицированных животных обнаружен не был. В то время как в печени хомячков с описторхозом его накопление отмечали уже через 1 месяц после инфицирования (Рис. 1(А, Б) и Рис. 2). Специфический сигнал HNE в основном был обнаружен вблизи кровеносных сосудов и эпителия желчных протоков. Интенсивность сигнала увеличивалась с продолжительностью течения инфекции. Наибольшее накопление HNE было обнаружено через 18 месяцев после инфицирования, к тому же специфический сигнал присутствовал не только в перидуктальной области, но и в паренхиме печени. Накопление MDA в печени инфицированных животных также носило время-зависимый характер. В печени неинфицированных животных специфического сигнала не было, однако начиная с 1 месяца инфекции, отмечали накопление MDA, особенно в перидуктальной области. Наиболее высокая интенсивность накопления MDA, также была обнаружена в печени хомячков через 1,5 года инфицирования, вторичный продукт перекисного окисления липидов отмечался как в перидуктальной области, так и в паренхиме печени. Наличие этих продуктов у инфицированных животных свидетельствует о повышенной продукции АФК в печени при описторхозе. Кроме того, накопление продуктов ПОЛ увеличивалось прямо пропорционально срокам заражения.



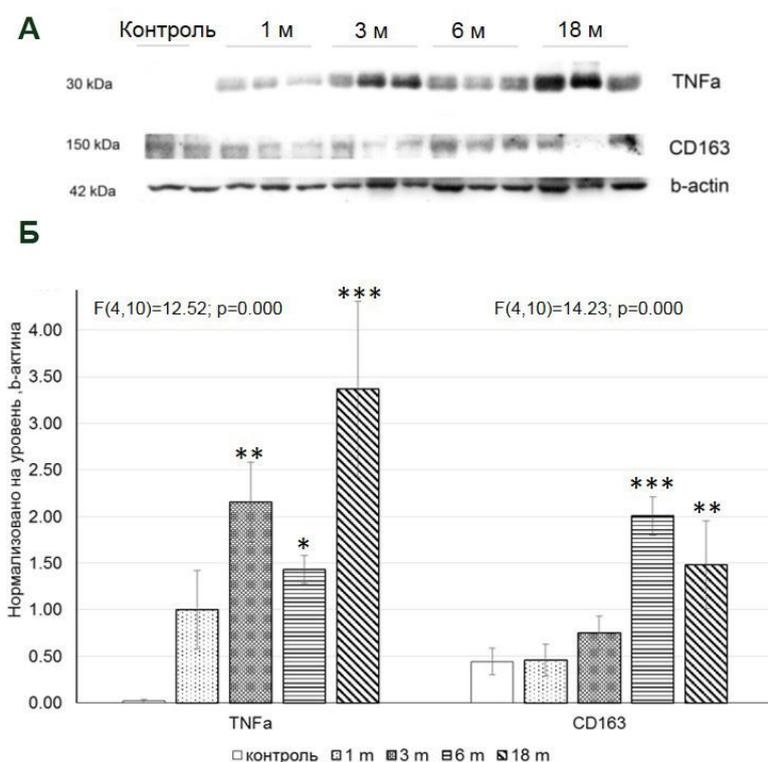
**Рисунок. 1. (А) Накопление ННЕ (4 гидрокси-2-ноненаль) и (Б) MDA (малоновый диальдегид) в печени контрольных и зараженных животных через 18 месяцев после инфекции. Специфический сигнал (указан стрелками) ННЕ (красный), MDA (зеленый), DAPI (синий). ННЕ -4-гидрокси-2-ноненаль, MDA – малондиальдегид, ЖП- желчный проток, ПВ- портальная вена, ПФ перидуктальный фиброз; *OF*- *Opisthorchis felineus*; (В) Морфологические изменения в печени контрольных и инфицированных хомячков на разных сроках заражения (окрашивание гематоксилином и эозином).**



**Рисунок 2. Накопление 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина (8-OHdG) в моче хомяков на разных сроках инфицирования. ИФА. ANOVA+ Tukey post Hoc, Mean  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .**

Уровень содержания окислительных повреждений ДНК оценивали с помощью иммуноферментного анализа в моче животных с антителами против 8-оксо гуанина (8-OHdG). Установлено, что уровень 8-OHdG в моче, повышался у инфицированных животных начиная с 1 месяца инфекции (в 6,8 раз;  $p < 0,001$ ) и оставался повышенным на всех сроках инфекции (Рис.2).

В качестве контроля на Рис 1. Представлены репрезентативные фотографии печени неинфицированных хомяков в возрасте 5 мес. Нами была проведена оценка накопления маркеров окислительного стресса у неинфицированных животных разных возрастных групп: 1,2,3,10 месяцев. В литературе имеются данные об увеличении MDA и HNE в зависимости от возраста пациентов (Gil et al., 2006), так, содержание малонового диальдегида и гидроксиноненала у пациентов в возрасте 70-84 года было в 1,5 раза выше, чем у пациентов в возрасте 18-29 лет. В нашем исследовании изменения между группами разных возрастов были незначительными, поэтому они были объединены в одну контрольную группу. Аналогичные результаты были отмечены при анализе 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина в моче инфицированных хомячков.



**Рисунок 3. Изменение уровней белков (А) и денситометрический анализ (Б) TNF- $\alpha$  и CD163 в печени хомячков, инфицированных *O. felinus* в течение 18 месяцев** Представлены репрезентативные иммуноблоты. Иммуноблоттинг проводили трижды. Результаты денситометрии (количественная оценка интенсивности исследуемого белка относительно  $\beta$ -актина) белков TNF- $\alpha$  (фактор некроза опухоли  $\alpha$ ), CD163 (кластер дифференцировки 163). Данные выражены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ .

Повышенное содержание белков TNF- $\alpha$  и CD163 было отмечено в группах инфицированных животных на всех сроках инфекции (Рис. 3). В группах неинфицированных животных уровень TNF- $\alpha$  был незначительным, а CD163 вовсе отсутствовал. Начиная с 3-х месяцев инфекции, количество белка TNF- $\alpha$  было достоверно повышено по сравнению с контрольными животными ( $p = 0,007$ ). Максимальный уровень этого белка был отмечен у животных через 18 месяцев инфекции ( $p = 0,0005$ ) (Рис. 3 Б). Уровень белка CD163 в печени инфицированных хомячков достоверно повышался (в 4 раза) по сравнению с неинфицированными хомячками через 6 месяцев после заражения (Рис. 3 Б,  $p = 0,0009$ ) и оставался повышенным через 18 месяцев инфекции ( $p = 0,009$ ). Линейный регрессионный анализ показал, что увеличение количества TNF- $\alpha$  ( $R = 0,79$ ;  $p < 0,001$ ) и CD163 ( $R = 0,58$ ;  $p = 0,022$ ) линейно зависло от сроков инфекции. При этом, снижение TNF- $\alpha$  через 6 месяцев инфекции было

незначительным ( $p = 0,62$ ). Контрольная группа была объединена по тому же принципу, который описан выше для ИГХ и ИФА анализов.

### **3.1.2. Оценка морфологических изменений печени при экспериментальном описторхозе**

Для печени здоровых хомячков характерен нормальный портальный тракт: желчные протоки не расширены, выстланы кубическим или призматическим эпителием, отмечены единичные случаи инфильтрации воспалительными клетками, что характеризуется как физиологическая норма (Быков, 1999). Начиная с 1-го месяца инфекции были обнаружены расширенные желчные протоки, ядра холангиоцитов были увеличены, теряли полярность, наблюдались гиперплазия и метаплазия эпителия. За гиперплазию эпителия желчных протоков принимали увеличение числа холангиоцитов и, как следствие, многорядность эпителия. Под метаплазией понимали изменение эпителиальных клеток кубического эпителия на бокаловидные секреторные клетки. Неоплазия, которая представляет собой атипичное изменение клеток эпителия, была отмечена через 3 месяца ( $3,3 \pm 0,8$ ;  $p=0,001$ ) инфекции и увеличивалась прямо пропорционально срокам инфекции ( $7 \pm 3,4$ ;  $p=0,001$ ).

Кроме того, наблюдали формирование очагов воспаления с инфильтрацией мононуклеарными и эозинофильными клетками, как в портальной, так и в перидуктальной областях. В ходе эксперимента была отмечена пролиферация желчных протоков, утолщение перидуктального фиброза, что согласуется с изменениями печени при описторхозе, вызванном *O.viverrini* (Sripa et al., 2018a). Очаги воспаления были отмечены с 1-го месяца инфекции и сохранялись на протяжении всего срока инфицирования. Также было показано, что степень патологических изменений зависела от сроков инфекции (Рис.1 (В) и Таблица 1).

**Таблица 1. Морфометрический анализ гистологических препаратов печени хомяков, инфицированных *O.felineus* 1, 3 и 18 месяцев.**

Группа	Неоплазия	Гиперплазия	Перидуктальный фиброз	Воспаление
Контроль	0	0	0	0,1
1 месяц	0	8,7 ± 1,8***	46,7±7 ***	14,4±1,3 ***
3 месяц	3,3±0,8 ***	8,3±1,3***	46,1±3,1 ***	24,8±2,3 ***
18 месяц	7±3,4***	11±4,2***	49,2±12***	15,2±8,3 ***

\*-  $P \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ ; Mean±SD; Манна-Уитни

В качестве контроля было выбрано по 3-5 неинфицированных хомяков из нескольких возрастных групп: 1, 2, 3 и 10 месяцев. С помощью статистического анализа с использованием ANOVA + Tukey post Hoc не было выявлено достоверного отличия между контрольными группами животных на ранних и поздних сроках инфекции. В частности, не было статистически значимых различий по следующим показателям: неоплазия и гиперплазия эпителия желчных протоков, воспаление, перидуктальный фиброз. Поскольку оцениваемые морфологические изменения характерны для описторхоза, следовательно, они не могли возникать или меняться в группах неинфицированных животных. В связи с этим, все неинфицированные животные были объединены в одну контрольную группу и использовались в качестве единого контроля для инфицированных групп на разных сроках инфекции.

Как уже упоминалось ранее, развитие неоплазии может быть спровоцировано различными факторами и обусловлено различными механизмами, включая окислительный стресс, воспаления, активацию эндотелиально-мезенхимального перехода, клеточное окружение и т.д. (Derkacz and Komosińska-Vassev, 2017).

### 3.2. Анализ секвенирования транскриптомов печени хомячков при экспериментальном описторхозе

В результате секвенирования транскриптома печени (высокопроизводительное секвенирование мРНК), были показаны изменения в экспрессии генов в печени интактных и инфицированных *O. felineus* хомячков через 1 и 3 месяца инфекции.

В общей сложности были обнаружены различия ( $p_{\text{adj}} < 0,1$ ,  $|\log_2\text{FC}| > 1$ ) в экспрессии 2151-го дифференциально экспрессирующихся гена (ДЭГ) у интактных и инфицированных хомячков (группа «инфекция») (1330 активируются и 822 подавляются более чем в 2 раза по сравнению с неинфицированной группой).

Анализ главных компонент выявил кластеризацию образцов на два отдельных кластера, разделенных по первой главной компоненте между неинфицированными и инфицированными животными (Рис. 4А). Необходимо отметить, что вклад данной компоненты отражал 54% изменений дисперсии. По четвертой компоненте мы также обнаружили разделение на два кластера (7% дисперсии) группы инфицированных животных, которые соответствовали образцам через 1 и 3 месяца инфекции, соответственно (фактор «время» в образцах инфицированных животных) (Рис. 4А). Кроме того, при сравнении всех образцов по параметру «время» выявлен 71 ДЭГ более чем в 2 раза,  $|\log_2\text{FC}| > 1$ . В этой группе была повышена экспрессия 45 генов, понижена - у 26 генов. Проверка на наличие обогащения с помощью баз данных KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) и GO (Gene Ontology) не выявила никаких обогащенных процессов среди этих 71 генов ( $\text{FDR} < 0,05$ ).

При анализе взаимодействия факторов «время – инфекция» отличия ( $p_{\text{adj}} < 0,1$ ) наблюдали в экспрессии 371 ДЭГ (252 ДЭГ, если экспрессия изменена более чем в два раза,  $|\log_2\text{FC}| > 1$ ). Из них 186 генов были активированы, а 66 — подавлены.

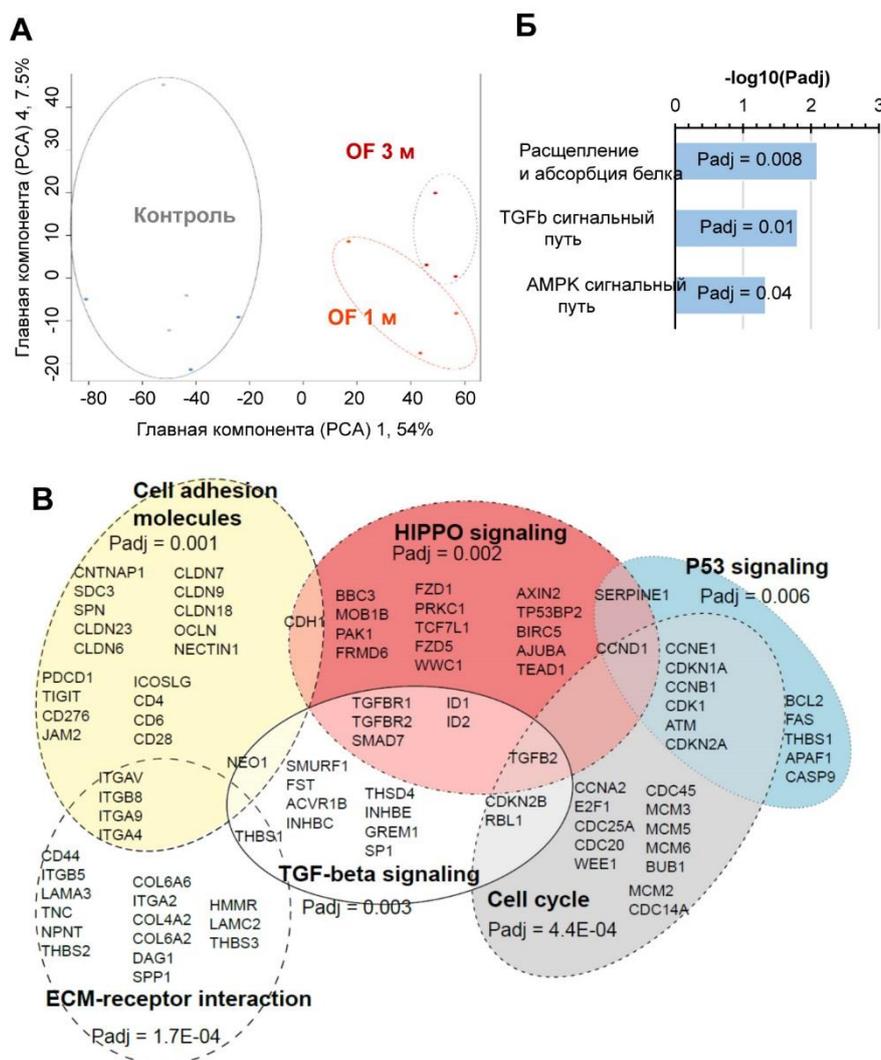
Функциональный анализ ДЭГ на предмет обогащения теми или иными клеточными путями, активированными в печени OF-инфицированных животных, показал 15 значимо обогащенных ( $p_{\text{adj}} < 0,05$ ) путей KEGG (Рис.4Б и В); 31 значимо перепредставленных ( $\text{FDR} < 0,05$ ) биологических процессов (GO Biological Processes) и 13 значительно обогащенных (значение q-value  $< 0,05$ ) клеточных путей

в соответствии с базой данных молекулярных маркеров (MSigDB, Molecular Signatures Database).

Наиболее представленными среди обогащенных MSigDB путей в дифференциально экспрессирующихся генов были эпителиально-мезенхимальный переход, IL6/JAK/STAT3 сигнальный путь, TNF- $\alpha$ , HIPPO пути передачи сигнала, а также клеточные пути развития воспалительного ответа, взаимодействия с внеклеточным матриксом и регуляция клеточного цикла.

Наиболее обогащенные KEGG-пути представлены на Рис. 4В и включали пути клеточной адгезии, Hippo клеточный путь передачи сигналов, взаимодействие с внеклеточным матриксом, регуляцию клеточного цикла, путь передачи сигналов через TGF $\beta$  и P53 путь. Более подробный анализ генов, вовлеченных в регуляцию этих клеточных путей показал, что они существенно перекрываются между собой. В частности, на Рис. 3В представлена диаграмма Эйлера для ДЭГ (логарифмическое 2-кратное изменение  $>1$ ;  $p_{adj} < 0,05$ ), входящих в регуляцию основных активированных путей KEGG в печени животных при инфекции.

В другой группе ДЭГ, выявленных при взаимодействии факторов «время – инфекция» (Рис. 4Б) только три пути KEGG были значительно обогащены ( $p_{adj} < 0,05$ ), в частности, расщепление и абсорбция белков (hsa04974), сигнальный путь TGF $\beta$  (hsa04350) и сигнальный путь АМПК (hsa04152). Фактор TGF $\beta$  (TGF $\beta$ ) вовлечен в регуляцию многих клеточных процессах и является одним из основных факторов, способствующих развитию фиброза. Этот путь (сигнальный путь TGF $\beta$ ) также играет значимую роль в ЕМТ, который, как уже упоминалось ранее, был наиболее представленным у всех инфицированных *O.felineus* животных.



**Рисунок 4.** Дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭГ) в печени хомячков, инфицированных *Opisthorchis felinus*, через 1 и 3 месяца после заражения. А. Анализ главных компонент выявил два отдельных кластера в данных, разделенных по первой главной компоненте (ось абсцисс). Б. Наиболее обогащенные пути KEGG в наборе ДЭГ (взаимодействие факторов: «инфекция - время»). В. Диаграмма Эйлера, иллюстрирующая перекрывание обогащенных путей KEGG среди ДЭГ, активированных у *O. felinus* - инфицированных хомячков *Mesocricetus auratus* (фактор «инфекция»). ECM: внеклеточный матрикс.

Поскольку наиболее представленным среди обогащенных MSigDB путей в ДЭГ группы «инфекция» был эпителиально-мезенхимальный переход (EMT) (значение q-value 2,2E-07), данный клеточный процесс был выбран для наиболее пристального изучения. Кроме того, из литературных данных известно, что одним из ключевых факторов, вероятно вовлеченных в развитие неоплазии эпителия желчных протоков при описторхозе, может быть активация эпителиально-мезенхимального перехода (EMT).

EMT характеризуется экспрессией специфических маркерных генов, кодирующих как: мезенхимальные (*Fnl*, *Cdh2*, *Twist1*, *Zeb1*, *Zeb2*, *Mmp2*, *Vim*, *Foxc2*, *Snai2*, *Snai1* и *Mmp9*); так и эпителиальные гены (*Tjp1*, *Ocln*, *Dsp* и *Cdh1*) (Chen et al., 2020). Данные гены были выбраны нами из всего транскриптома печени, для того, чтобы оценить процесс EMT, и вклад определённых генов из этого маркерного набора. Уровень экспрессии мРНК этих генов показан в виде тепловой карты (Рис. 4Б), где видно, что по уровню экспрессии образцы от инфицированных и интактных животных разделились на два кластера. Видно, что обе группы генов, мезенхимальные и эпителиальные гены, были активированы в инфицированной группе.

Для того, чтобы подтвердить активацию генов EMT (Рис. 5Б) в печени после инфекции и проанализировать клеточные и тканевые структуры, с которыми ассоциирована экспрессия тех или иных белков, с помощью иммуногистохимии и вестерн-блот анализа было оценено содержание белков, отвечающих как за мезенхимальный (N-кадгерин,  $\alpha$ -SMA, виментин, MMP9) так и за эпителиальный фенотип клеток (E-кадгерин) (Рис. 5А, В, Г). Специфический сигнал MMP9 был отмечен в области желчных протоков и перидуктального фиброза. Несмотря на то, что количество специфически окрашенных клеток было значительно выше в группах инфицированных животных по сравнению с интактными, существенной разницы между 1 и 3 месяцами инфекции не было.

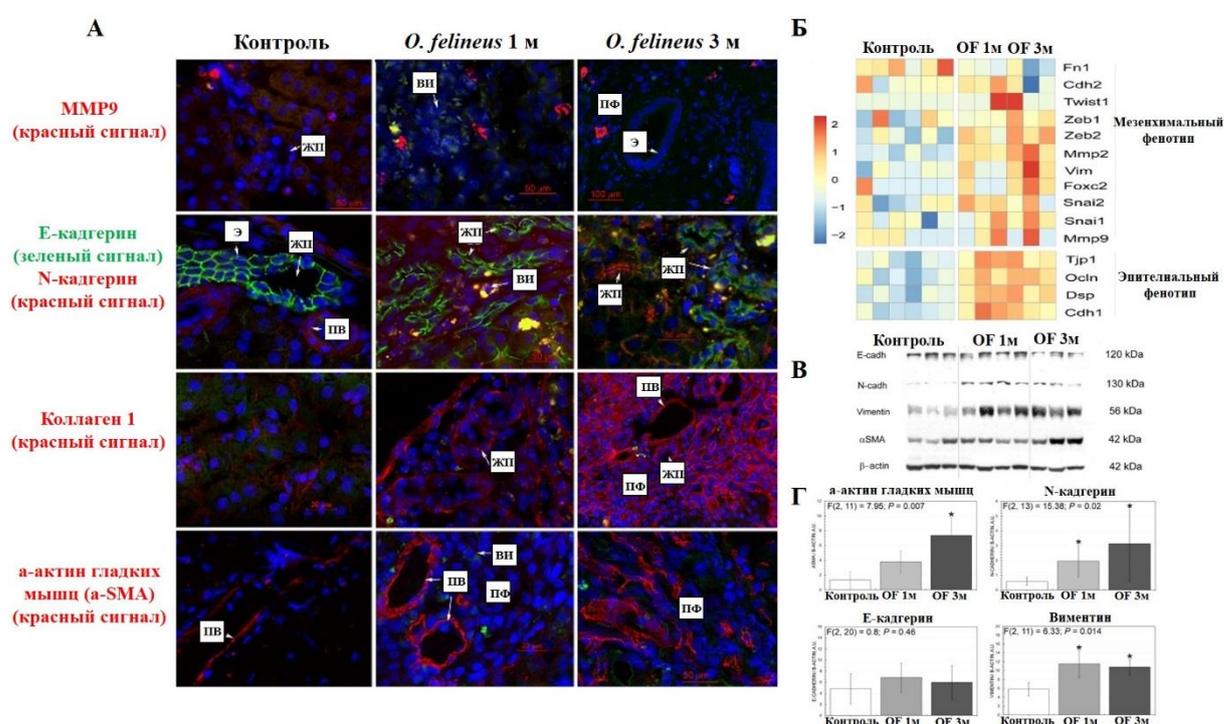
Также было показано, что содержание  $\alpha$ -гладкомышечного актина ( $\alpha$ -SMA) увеличивалось через 1 и 3 месяца инфекции. Специфический сигнал присутствовал в стенках кровеносных сосудов как в контрольной группе животных, так и в инфицированной, при этом через 3 месяца инфекции была выявлена диффузная локализация этого белка в печени. По результатам Вестерн-блот анализа, количество  $\alpha$ -SMA было значительно увеличено только через 3 месяца инфекции.

Уровень виментина был значительно повышен у инфицированных животных и оставался повышенным ( $p < 0,05$ ) через 1 и 3 месяца инфекции. По результатам Вестерн-блоттинга, содержание N-кадгерина было значительно повышено в группах инфицированных животных через 1 и 3 месяца инфекции ( $p < 0,05$ ), локализация этого белка в печени наблюдалась в основном в стенках кровеносных сосудов у

интактных животных, после заражения сигнал отмечали также в некоторых эпителиальных клетках желчных протоков (3 месяца после инфекции).

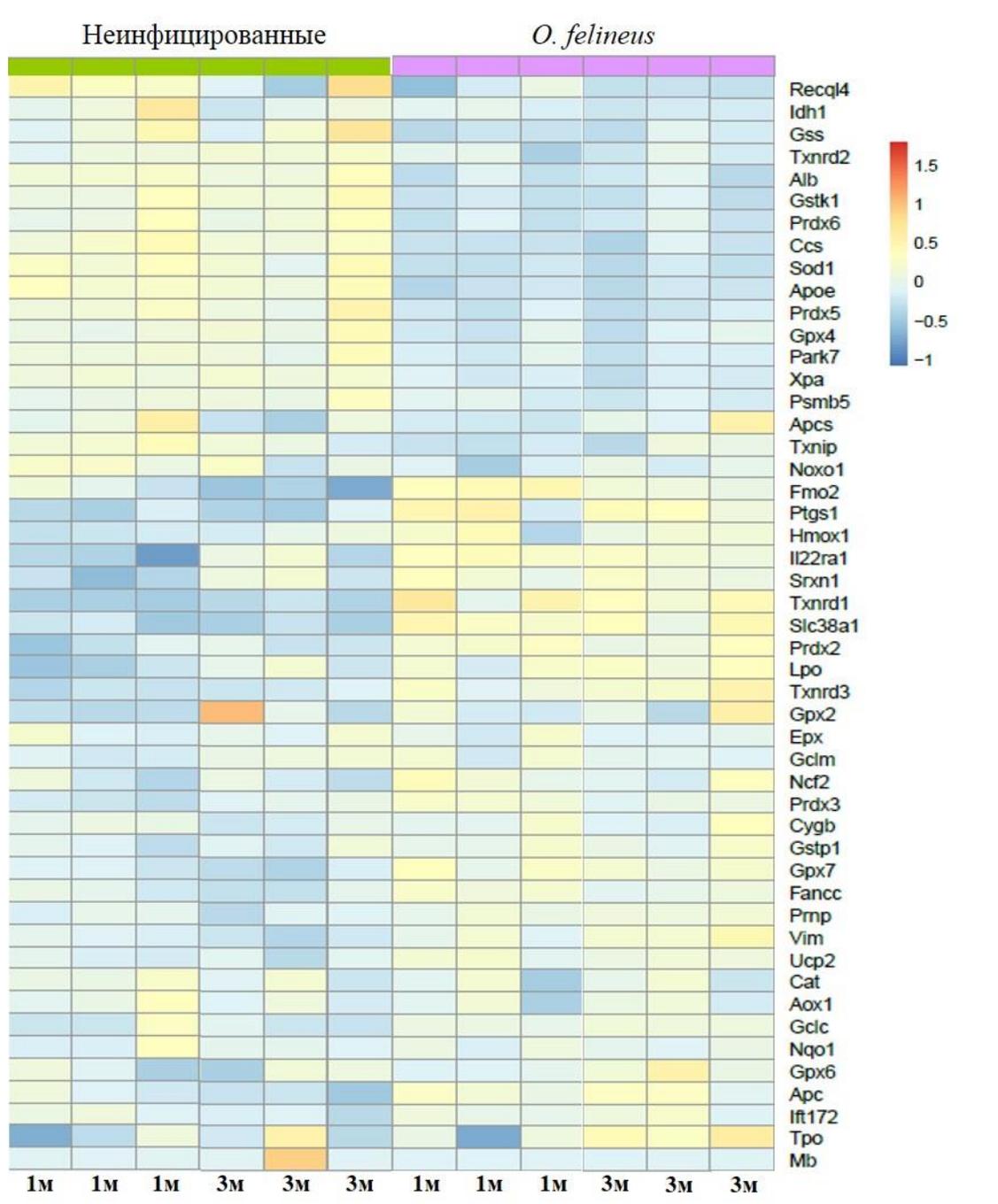
Наличие эпителиального маркера Е-кадгерина (специфический сигнал окрашен зеленым), в эпителиальных клетках желчных протоков, отражало повышение пролиферации желчных протоков в (Рис. 5А). Тем не менее, по данным вестерн-блоттинга, достоверного увеличения количества этого белка в печени выявлено не было.

Также было отмечено значительное увеличение накопления коллагена типа 1 в группах инфицированных животных через 1 и 3 месяца инфекции (Рис. 5А).



**Рисунок 5.** Экспрессия генов эпителиально-мезенхимального перехода (EMT) в печени хомячков (*Mesocricetus auratus*) через 1 и 3 месяца после заражения *Opisthorchis felineus* (OF). **А.** Иммуногистохимический анализ содержания ММР9, Е-кадгерина, N-кадгерина, коллагена типа 1 и α-гладкомышечного актина в печени *M. auratus*, инфицированных OF, через 1 и 3 месяца инфекции. ЖП- желчный проток, ПФ- перидуктальный фиброз, ПВ- кровеносный сосуд, ВИ- воспалительный инфильтрат, Э- эпителиальные клетки. **Б.** Тепловая карта, иллюстрирующая уровень экспрессии мРНК 16-ти маркерных генов EMT (R-пакета heatmap.2 (v.2.38)). **В.** Изменение уровней белков Е-кадгерина, N-кадгерина, виментина и α-актина гладких мышц (Вестерн-блот анализ). α-SMA: α-актин гладких мышц. **Г.** Результаты денситометрии иммуноблотов (Е), количественная оценка относительно β-актина. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение; \*p < 0,05. SD рассчитывали по результатам трех независимых экспериментов.

Поскольку ранее нами было показано, что накопление маркеров окислительного стресса при описторхозе увеличивается, мы оценили изменение экспрессии генов, вовлеченных в окислительный стресс, в том числе ферментов про- и антиоксидантной системы в печени неинфицированных хомячков (*Mesocricetus auratus*) через 1 и 3 месяца после заражения *O. felinus*. Данные представлены в виде тепловой карты (Рис.6). На рисунке видно, что образцы четко разделились на два отдельных кластера по фактору «инфекция».



**Рисунок 6.** Изменения генов ферментов антиоксидантной системы в печени интактных хомячков (*Mesocricetus auratus*) через 1 и 3 месяца после заражения *Opisthorchis felinus* (OF). (R-пакета heatmap.2 (v.2.38)).

Таким образом, мы обнаружили активацию определенных клеточных путей в печени экспериментальных животных при инфекции *Opisthorchis felineus*. Мы продемонстрировали, что эпителиально-мезенхимальный переход является наиболее обогащенным путем MSigDB у инфицированных животных. Кроме того, при инфекции также значимо активируются следующие KEGG-клеточные пути передачи сигнала: пути клеточной адгезии, путь передачи сигналов Hippo, взаимодействие с внеклеточным матриксом, регуляция клеточного цикла, путь передачи сигналов через TGF $\beta$  и P53 путь.

### **3.3. Влияние антиоксидантов на структурное и функциональное состояние печени при описторхозе**

#### **3.3.1. Оценка динамики влияния антиоксидантов на маркеры воспаления, степень клеточной неоплазии и структурное состояние печени**

В предыдущем разделе мы показали наличие окислительных повреждений при описторхозе. Их накопление увеличивалось в зависимости от срока инфекции и коррелировало с морфологическими изменениями в печени, в частности с развитием неоплазии холангиоцитов. Далее, используя ингибиторный анализ с антиоксидантами разного механизма действия, мы оценили структурно-функциональное состояние печени.

В результате гистологического исследования участков печени здоровых хомяков после диеты с антиоксидантами, было показано, что они не влияли на нормальную структуру печени (Рис.7, Рис.8).

В ходе изучения участков печени хомяков, инфицированных в течение 1 и 3 месяцев, с помощью полуколичественного гистологического анализа было оценено состояние желчных протоков, паренхимы печени и холангиоцитов (эпителий желчных протоков). Желчные протоки были расширены; ядра эпителия желчных протоков - увеличены. Вокруг желчных протоков наблюдалось разрастание соединительной ткани, т.е. образование перидуктального фиброза. Отмечали развитие холангиофиброза. В области портального тракта и паренхимы печени отмечали гранулематозное воспаление, инфильтрацию мононуклеарными клетками

и эозинофилами. Были отмечены гиперплазия, метаплазия и неоплазия эпителия желчных протоков. Таким образом, вышеперечисленные параметры являлись основными морфологическими изменениями в печени и желчных протоках инфицированных животных на всех сроках инфекции.

Исследование печени инфицированных хомяков, которым давали как ресвератрол, так и SkQ1, также показало наличие признаков эпителиальной гиперплазии, перидуктального фиброза и хронического воспаления (Рис.7, Рис.8). Однако, степень гистопатологических нарушений структуры печени была ниже, в частности, отмечали снижение степени воспаления (в 2 раза ( $p < 0,01$ ) через 3 месяца под действием антиоксидантов), снижение гиперплазии холангиоцитов (в 2 раза ( $p < 0,01$ ) через 3 месяца диеты с антиоксидантами), а также снижение неоплазии (в 2 раза ( $p < 0,01$ ) через 3 месяца диеты с антиоксидантами) и метаплазии эпителия холангиоцитов (Табл. 2). Для визуализации наблюдаемых процессов у разных групп животных данные были представлены в виде тепловой карты с использованием пакета `heatmap.2` (v.2.38) R (Рис.9), где в цвете закодирована степень проявления патологических изменений от светло серого до темно красного в зависимости от площади, занимаемой тем или иным параметром.

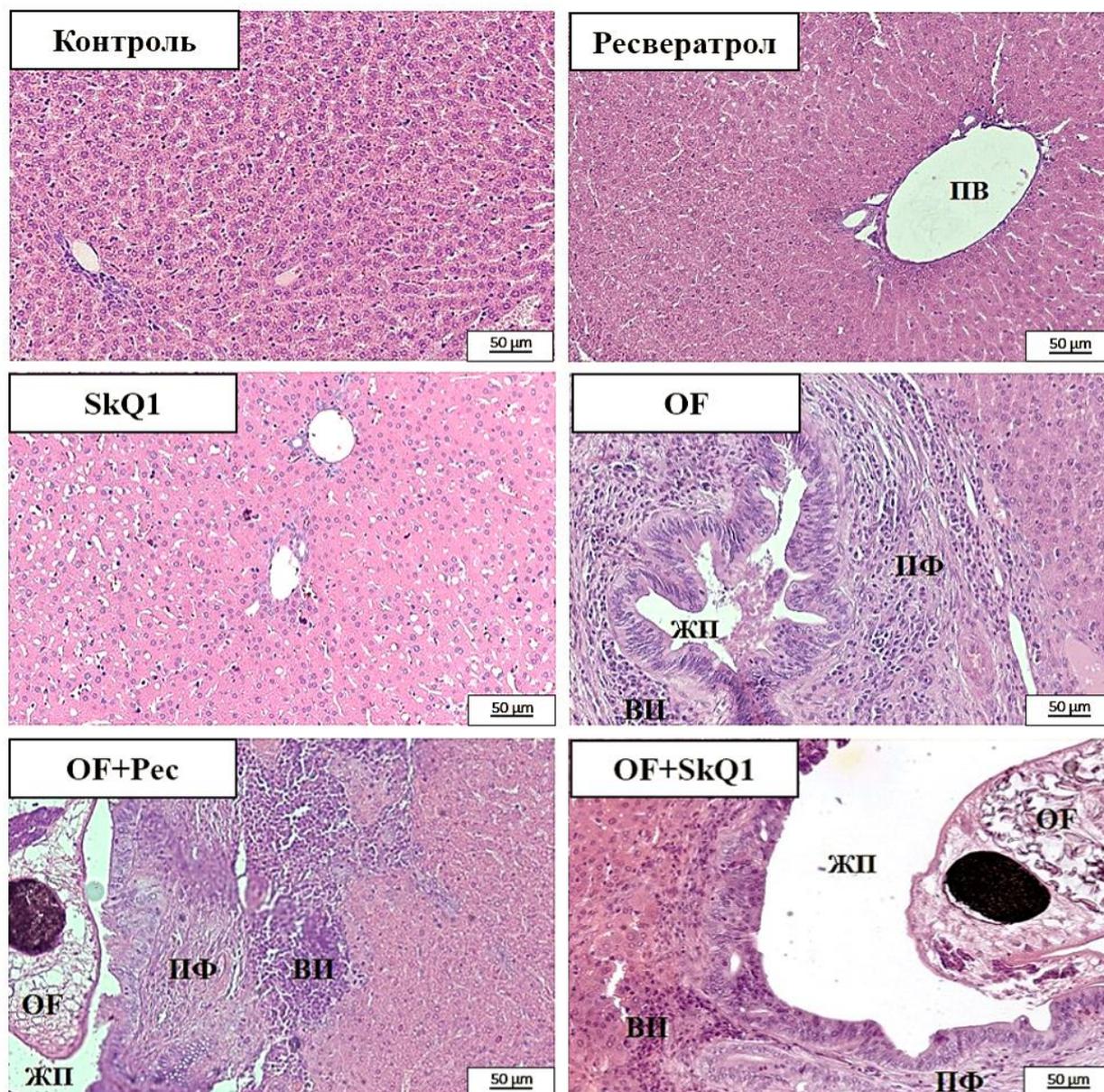


Рисунок 7. - Гистологические изменения в печени здоровых, инфицированных и получавших антиоксиданты животных через 1 месяц после инфицирования *O. felineus*.

ЖП- желчный проток, ПФ- перидуктальный фиброз, ВИ- воспалительная инфильтрация, OF- *Opisthorchis felineus*; (окрашивание гематоксилином и эозином).

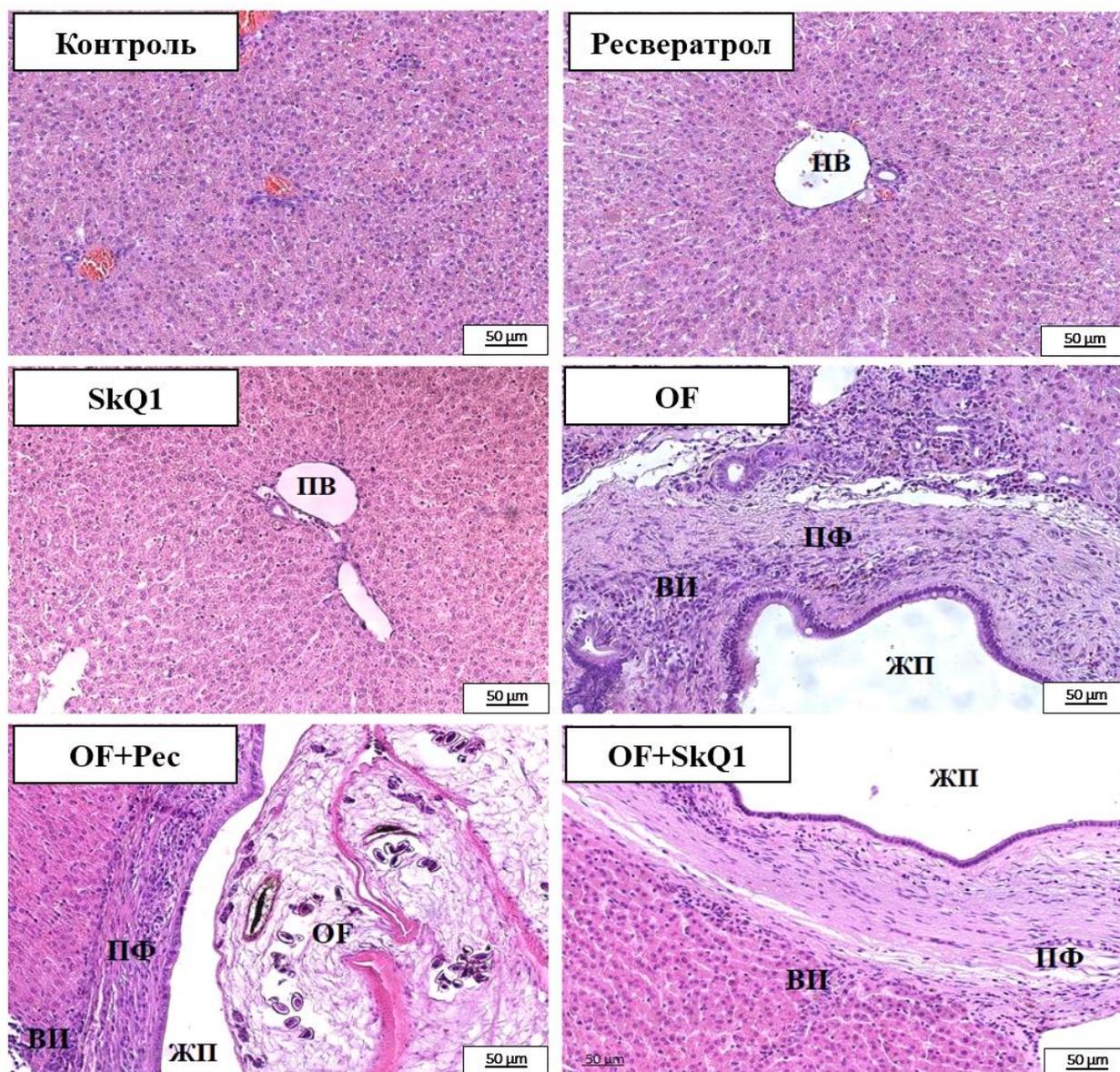


Рисунок 8. - Гистологические изменения в печени здоровых, инфицированных и получавших антиоксиданты животных через 3 месяца инфицирования *O. felinus*. ЖП- желчный проток, ПФ- перидуктальный фиброз, ВИ- воспалительная инфильтрация, OF- *Opisthorchis felinus*; (окрашивание гематоксилином и эозином).

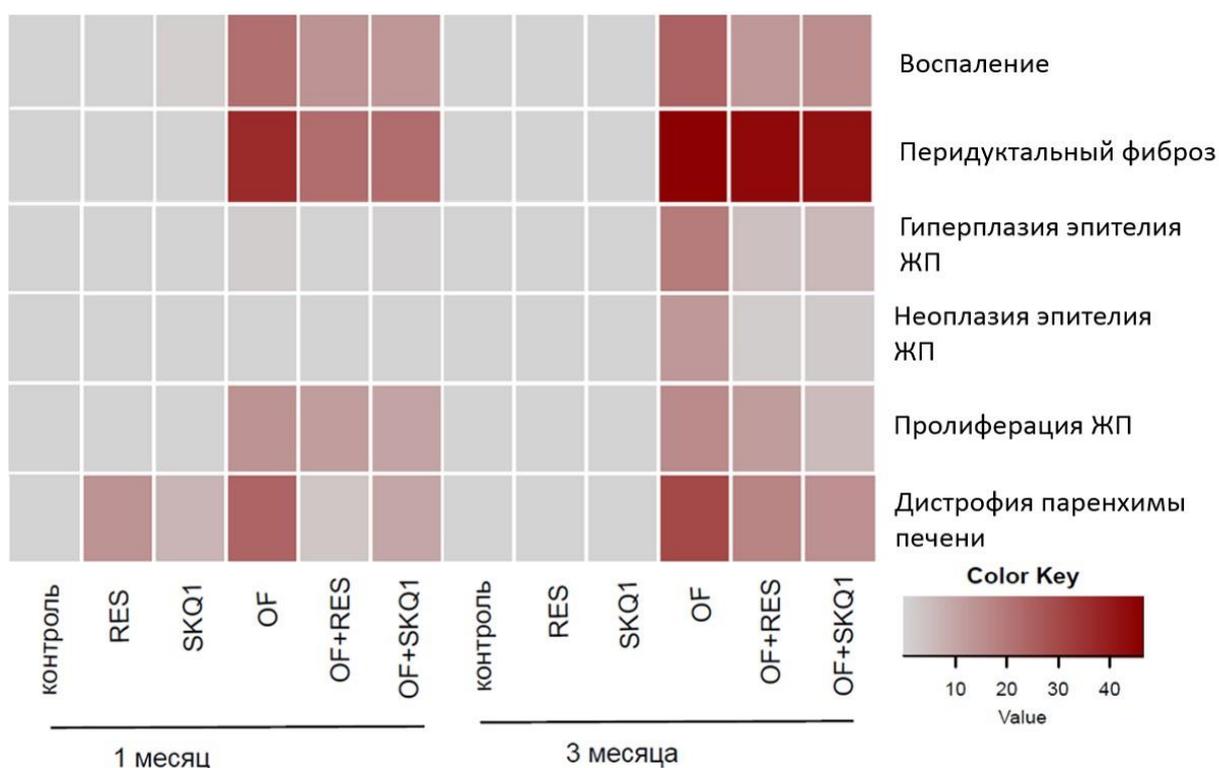
Таблица 2. Морфометрический анализ гистологических препаратов печени

	Группа	Неоплазия эпителия	Гиперплазия эпителия	Перидуктальный фиброз	Воспаление	Пролиферация желчных протоков
1 месяц	Контроль	0	0	0	0,1	0
	Resv	0	0	0	0,4	0
	SkQ1	0	0	0	1,2 ± 1,9	0
	OF	0	8,7 ± 1,8***	46,7 ± 7 ***	14,4 ± 1,3 ***	14,1 ± 0,9 ***
	OF+ Resv	0	4 ± 0,9***#	22 ± 13 ***	13,9 ± 13 *	11 ± 9,5 **
	OF+ SkQ1	0	0,6 ± 0,3** ###	22,4 ± 13,8***	13,2 ± 11*	10,2 ± 7,8**

	Группа	Неоплазия эпителия	Гиперплазия эпителия	Перидуктальный фиброз	Воспаление	Пролиферация желчных протоков
3 месяца	Контроль	0	0	0	0,1	0
	Resv	0	0	0	0,2	0
	SkQ1	0	0	0	0,1	0
	OF	3,3 ± 0,8 ***	8,3 ± 1,3 ***	46,1 ± 3,1 ***	24,8 ± 2,3 ***	15,9 ± 2,9 ***
	OF+ Resv	1,8 ± 0,8 ***##	5,5 ± 0,3 *** ##	43,8 ± 1,9 ***	12,7 ± 1,4 ***##	12,4 ± 1,7 ***##
	OF+ SkQ1	2 ± 0,3 ** ##	5 ± 0,6 *** ##	42 ± 2,7 ***	15,1 ± 1,5 *** ##	5,4 ± 0,7 *** ##

Resv – ресвератрол; OF - группа, инфицированная *O. felinus*; OF+Resv – инфицированная группа, пролеченная ресвератролом; OF+ SkQ1 - инфицированная группа, пролеченная SkQ1;

Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. Достоверность различий между группами хомячков оценивали с помощью критерия Манна-Уитни ( $P < 0,05$ ) в Statistica 6.0. \* или # $p < 0,05$ ; ## или \*\*  $p < 0,01$ ; ### или \*\*\*  $p < 0,001$  (\* - по сравнению с неинфицированными животными, # - по сравнению с группой OF).



**Рисунок 9.** Антиоксиданты снижают воспаление, гиперплазию и неоплазию эпителия желчных протоков в печени инфицированных хомячков (через 1 и 3 месяца после инфицирования *Opisthorchis felineus*). Данные представлены в виде тепловой карты с использованием пакета `heatmap.2` (v.2.38) R.

RES – ресвератрол; OF - группа, инфицированная *O. felineus*; OF+ SKQ1 - инфицированная группа, получавшая пролеченная SkQ1; OF+RES – инфицированная группа, получавшая ресвератрол.

### 3.3.2. Влияние антиоксидантов на уровни мРНК генов, участвующих в регуляции процессов воспаления и фиброгенеза

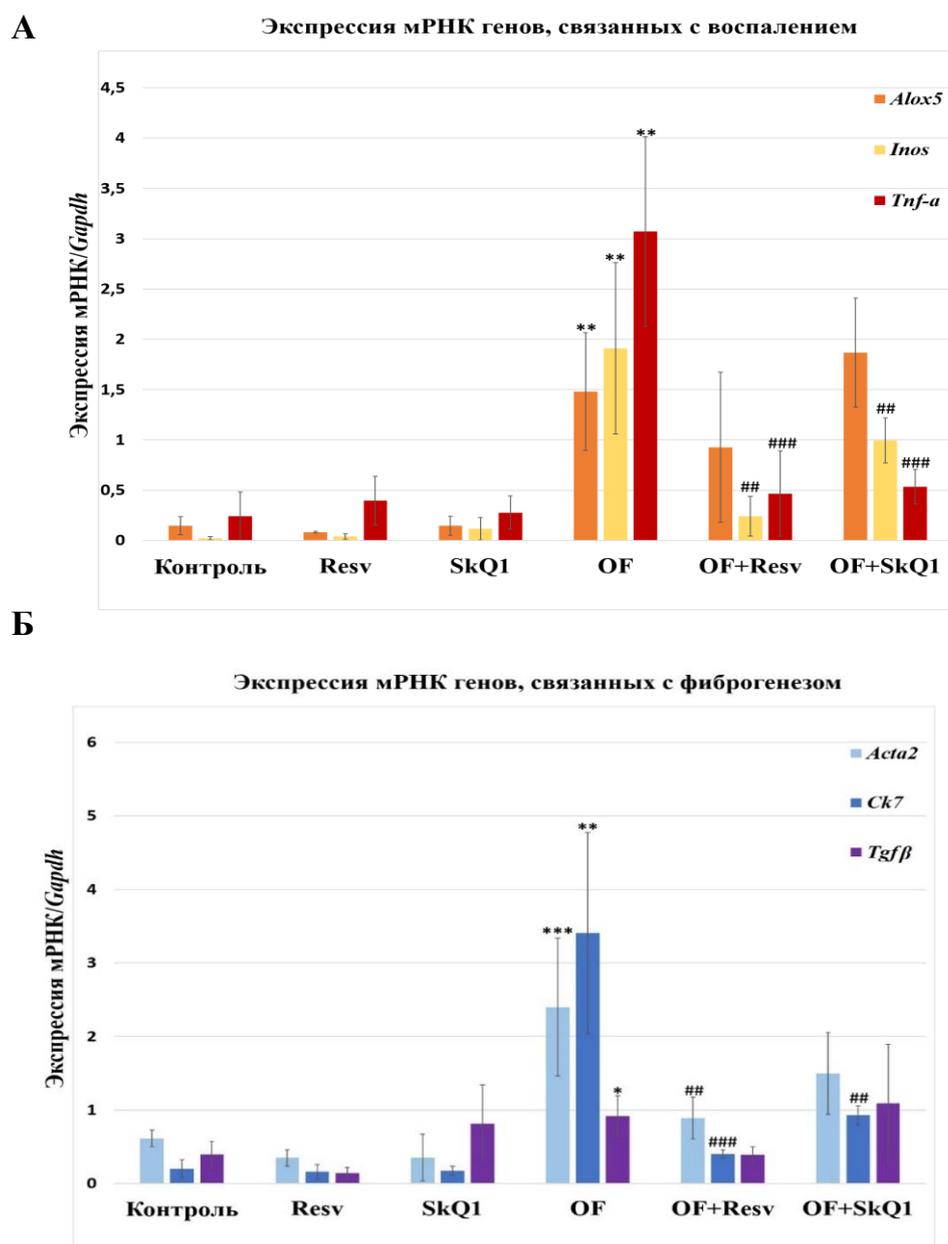
Экспрессия мРНК генов, кодирующих провоспалительные, профибротические факторы и генов антиоксидантной системы в печени хомяков, была проанализирована с помощью ПЦР с детекцией в режиме реального времени.

Арахидонат 5-липоксигеназа (*Alox5*), индуцибельная NO-синтаза (*Inos*), фактор некроза опухоли (*Tnf*) участвуют в регуляции воспаления, аллергии и других иммунных реакциях, вызывают развитие и прогрессирование острого и хронического воспаления (Roy et al., 2019). Альфа-гладкомышечный актин ( $\alpha$ -SMA, ген *Acta2*), *Ck7* (цитокератин 7 – маркер холангиоцитов) и *Tgf $\beta$*  (трансформирующий фактор роста), вовлечены в развитие фибротических процессов (Yazdani et al., 2017).

Было показано, что соотношение уровня экспрессии генов *Tnf*, *Alox5*, и *Inos* в контрольной группе и группах с антиоксидантами было одинаково низким. Тогда как в инфицированных группах (1 и 3 месяца) уровни экспрессии *Tnf*, *Alox5* и *Inos* были повышены (в 12,7 ( $p = 0,01$ ) и 18,6 ( $p = 0,001$ ) раз; 10 ( $p = 0,01$ ) и 4,8 раз ( $p = 0,04$ ); в 17 раз ( $p = 0,02$ ) соответственно). Ресвератрол снижал повышенную экспрессию мРНК *Tnf* (в 6 ( $p = 0,001$ ) и 2,5 ( $p = 0,008$ ) раза соответственно) и *Inos* (в 10 и 3 раза соответственно) через 1 и 3 месяца после инфицирования, однако не влиял на экспрессию мРНК *Alox5*. SkQ1 также снижал повышенную экспрессию мРНК *Tnf* (в 3 раза;  $p = 0,001$  через 1 месяц и в 2 раза;  $p = 0,01$ ) и *Inos* (в 2 раза;  $p = 0,02$ ) через 1 месяц после инфицирования и не влиял на экспрессию мРНК *Alox5*.

В контрольной группе и в группах с ресвератролом и SkQ1 экспрессия *Acta2* была незначительна. Наивысший уровень экспрессии *Acta2* наблюдали в группах, инфицированных *O. felineus*, через 1 и 3 месяца после инфицирования (в 6 ( $p = 0,008$ ) и 16 ( $p = 0,03$ ) раз соответственно). Ресвератрол и SkQ1 снижали повышенную экспрессию мРНК *Acta2* (в 2 раза ( $p = 0,02$ ) через 1 месяц инфекции), при этом, как и SkQ1, так и ресвератрол, проявляли свои положительные эффекты в большей степени через 3 месяца, снижая уровень *Acta2* в 16 ( $p = 0,009$ ) и 24 ( $p = 0,037$ ) раза, соответственно. Кроме того, мы оценили уровень мРНК цитокератина 7 (*Ck7*), который выступает в качестве маркера пролиферации холангиоцитов (Holtfreter, et al., 2014). *Ck7* был значительно повышен в группах инфицированных *O. felineus*

животных по сравнению с контрольными группами (в 17 и 19 раз ( $p = 0,008$ ), через 1 и 3 месяца соответственно) и группами с антиоксидантами. Ресвератрол и SkQ1 снижали повышенный уровень экспрессии мРНК *Ck7* через 1 (в 8,5 ( $p = 0,001$ ) и 3,7 ( $p = 0,008$ ) раз) и 3 месяца (в 4 и 5 раз ( $p = 0,008$ )). Экспрессия *Tgfb* была увеличена при описторхозе через 1 и 3 месяца инфекции ( $p = 0,04$ ) и не изменялась под действием антиоксидантов. Данные представлены на Рис.10. и Рис.11.

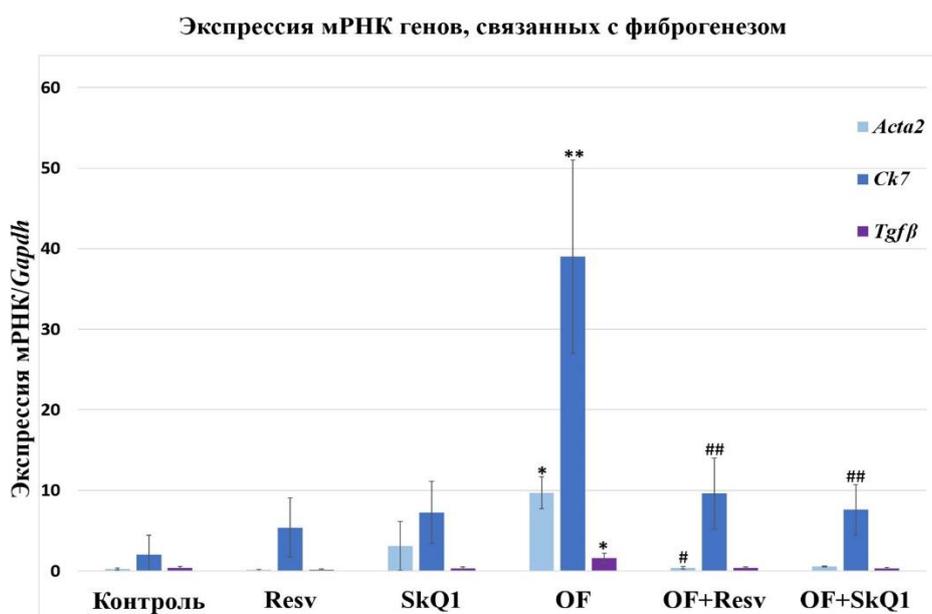


**Рисунок 10.** Экспрессия мРНК генов, участвующих в регуляции воспаления (А) и фиброгенеза (Б) через 1 месяц после инфицирования *O. felinus* и диеты с антиоксидантами. Данные представлены в виде изменения экспрессии мРНК, нормализованного на уровень экспрессии мРНК *Gapdh* (по оси Y). Resv – ресвератрол; OF - группа, инфицированная *O. felinus*; OF+ SkQ1 - инфицированная группа, получавшая SkQ1; OF+Resv – инфицированная группа, получавшая ресвератролом. ANOVA+Tukey post hoc, Mean  $\pm$  SD. \*#  $p < 0,05$ ; \*\*### $p < 0,01$ ; \*\*\*####  $p < 0,001$  \* - по сравнению с контрольной группой # - по сравнению с зараженной группой.

А



Б

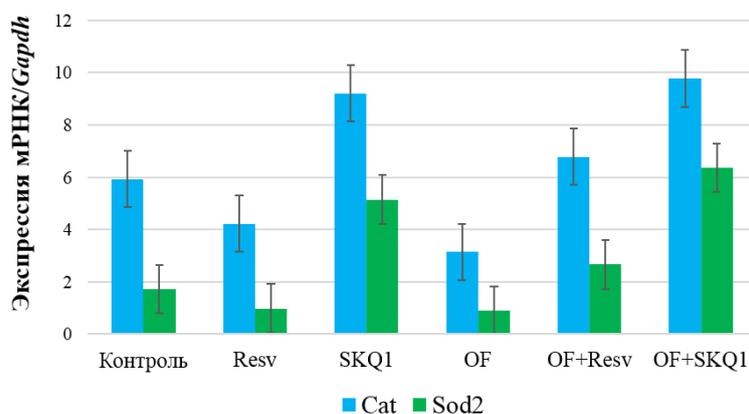


**Рисунок 11. Экспрессия мРНК генов, участвующих в регуляции воспаления (А) и фиброгенеза (Б) через 3 месяца после инфицирования *O. felineus* и диеты с антиоксидантами.** Данные представлены в виде изменения экспрессии мРНК, нормализованного на уровень экспрессии мРНК *Gapdh* (по оси Y). Resv – ресвератрол; OF - группа, инфицированная *O. felineus*; OF+ SkQ1 - инфицированная группа, получавшая SkQ1; OF+Resv – инфицированная группа, получавшая ресвератрол. ANOVA+Tukey post hoc, Mean  $\pm$  SD. ##  $p < 0,05$ ; \*\*\*## $p < 0,01$ ; \*\*\*\*### $p < 0,001$  \* - по сравнению с контрольной группой # - по сравнению с зараженной группой.

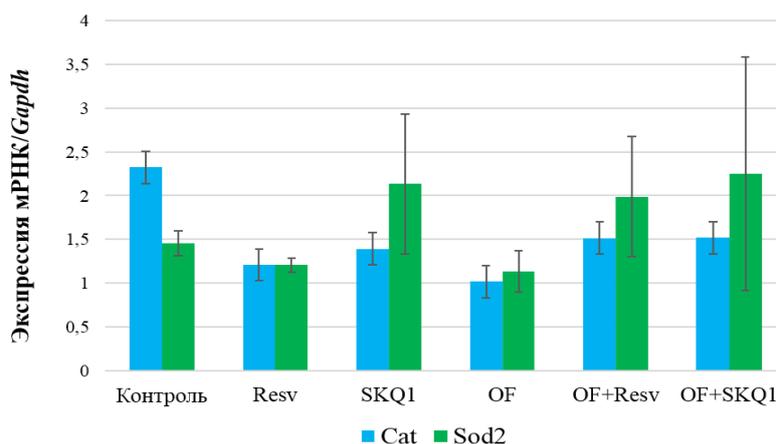
Супероксиддисмутаза и каталаза являются основными ферментами антиоксидантной системы организма (Petrou et al., 2018). Через 1 и 3 месяца инфекции наблюдали тенденцию к снижению уровней экспрессии мРНК

супероксиддисмутазы и каталазы в инфицированных группах животных. Было показано, что на всех сроках инфекции уровень экспрессии генов антиоксидантной системы под действием антиоксидантов увеличивался, однако достоверных изменений установлено не было (Рис. 12).

**А**



**Б**



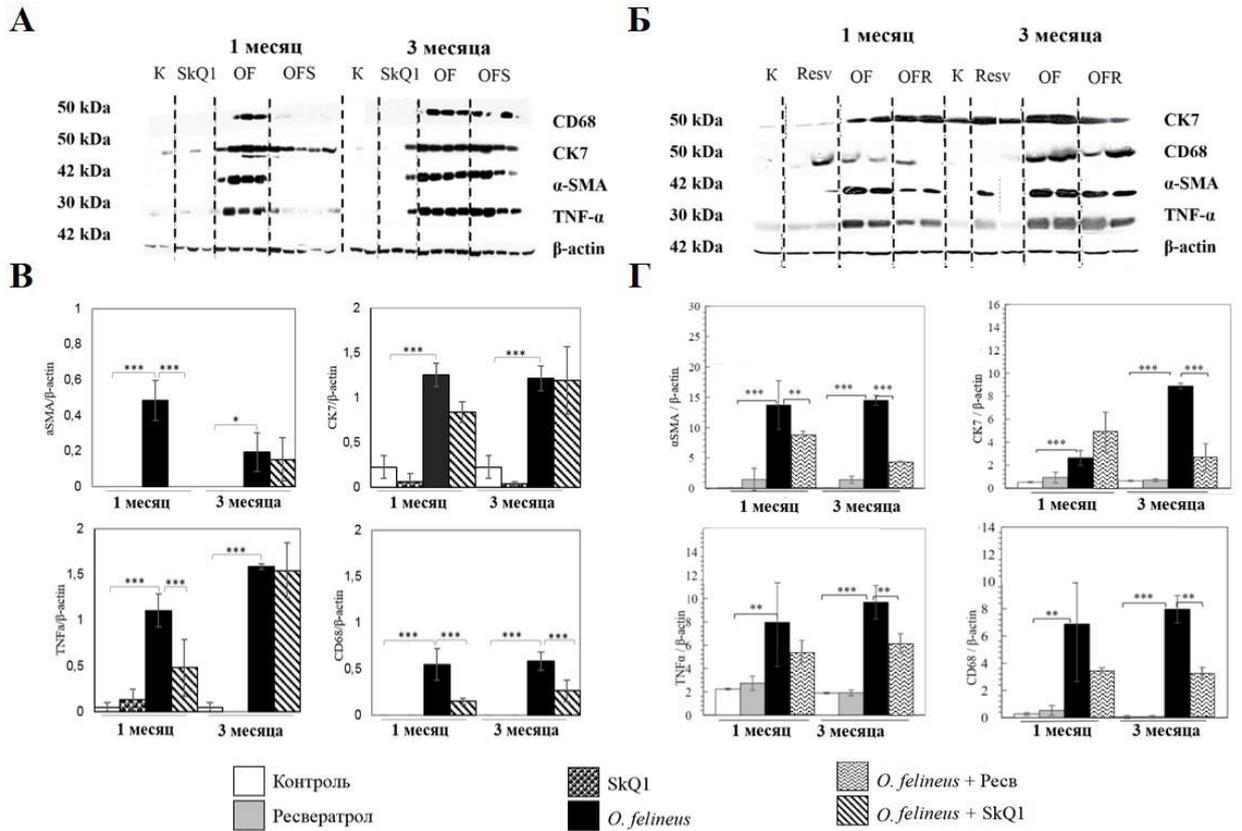
**Рисунок 12.** Экспрессия мРНК генов, кодирующих ферменты антиоксидантной системы через 1 месяц (А) и 3 месяца (Б) инфицирования *Opisthorchis felineus* через 1 и 3 месяца и диеты с антиоксидантами. Данные представлены в виде изменения экспрессии мРНК, нормализованного на уровень экспрессии мРНК *Gapdh* (по оси Y). ANOVA+Tukey post hoc.

### 3.3.3. Оценка влияния антиоксидантов на содержание белков, участвующих в процессах воспаления и фиброгенеза

С помощью метода Вестерн блот гибридизации, а затем количественной денситометрии было исследовано содержание белков, способствующих развитию воспалительного ответа, белков антиоксидантной системы и маркеров фиброгенеза в печени животных.

Значительное увеличение содержания белков, участвующих в процессах воспаления TNF-а (фактор некроза опухоли - альфа) ( $p=0,007$ ) и CD68 (маркер макрофагов) ( $p=0,001$ ) было показано в группе инфицированных животных через 3 месяца инфекции, тогда как, в контрольной группе и группах с антиоксидантами содержание этих белков было незначительным. Ресвератрол значительно снижал повышенный уровень TNF-а и CD68 через 3 месяца (в 7 раз;  $p = 0,01$ ); SkQ1 - через 1 и 3 месяца инфекции (в 2,3 и в 3,6 раз соответственно;  $p = 0,001$ ).

Также было отмечено повышенное содержание белков, участвующих в фиброгенезе через 1 и 3 месяца инфекции. Содержание цитокератина 7 было увеличено в 5,6 ( $p = 0,002$ ) и 14 ( $p = 0,003$ ) раз через 1 и 3 месяца инфекции, альфа-актина гладких мышц в группе инфицированных животных через 1 и 3 месяца (в 6 ( $p = 0,002$ ) и 16 ( $p = 0,006$ ) раз соответственно) инфекции, тогда как в контрольной группе их содержание было незначительным. Ресвератрол снижал повышенный уровень цитокератина 7 в 4,5 и 2,9 раз через 1 и 3 месяца соответственно ( $p = 0,045$ ). SkQ1 значительно снижал уровень альфа-актина гладких мышц ( $p = 0,001$ ) через 1 месяц инфекции. Данные представлены на Рис. 13.

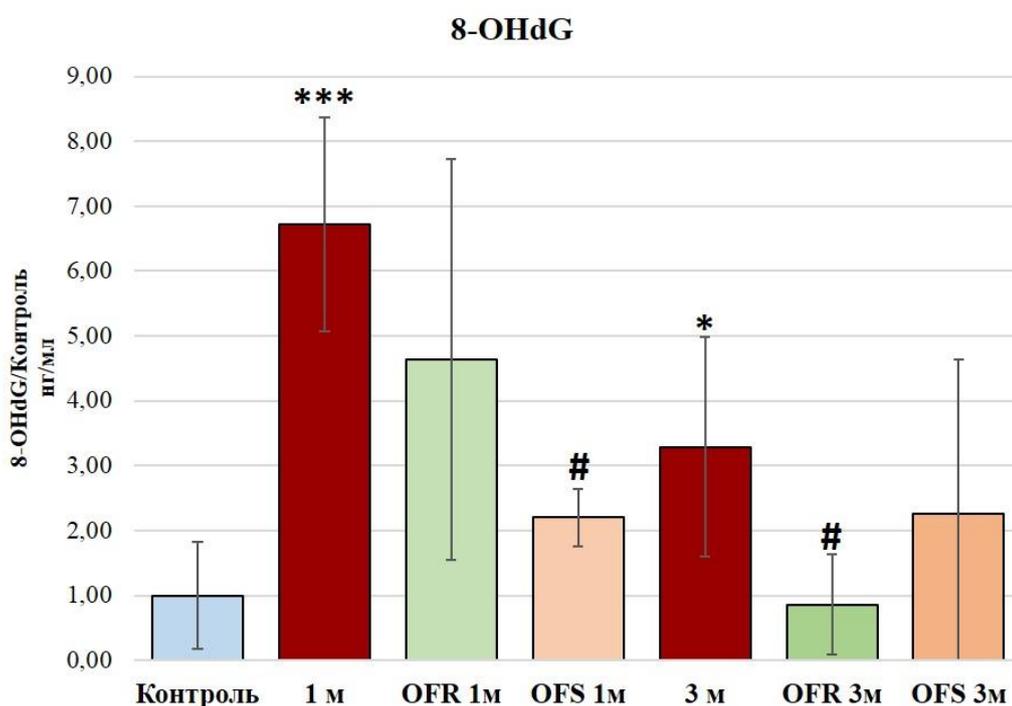


**Рисунок 13.** Изменение уровней маркеров воспаления и фиброгенеза в печени через 1 и 3 месяца после инфицирования *O. felineus* и диеты SkQ1 (А, В) и ресвератролом (Б, Г). Представлены репрезентативные иммуноблоты. К - неинфицированные; OF – инфицированные *O. felineus*; Resv- ресвератрол, OFR- инфицированные *O. felineus* и получавшие ресвератрол; OFS - инфицированные *O. felineus* и получавшие SkQ1. Иммуноблоттинг проводили трижды. Результаты денситометрии (количественная оценка интенсивности исследуемого белка относительно β-актина) белков TNF-α, CD68, α-SMA, CK7. Данные выражены как среднее ± стандартное отклонение. \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001.

К - неинфицированные; OF – инфицированные *O. felineus*; Resv- ресвератрол, OFR- инфицированные *O. felineus* и получавшие ресвератрол; OFS - инфицированные *O. felineus* и получавшие SkQ1.

### 3.3.4. Оценка влияния антиоксидантов на уровень 8-OHdG в моче и маркеры перекисного окисления липидов в печени инфицированных животных

Было показано, что уровень 8-OHdG в моче повышается у инфицированных животных начиная с 1 месяца (в 6,8 раз). Антиоксидант SkQ1 значительно снижал уровень 8-OHdG через 1 месяц инфекции (в 3 раза), а ресвератрол через 3 месяца инфекции (в 3,8 раз). Данные представлены на Рис.14.

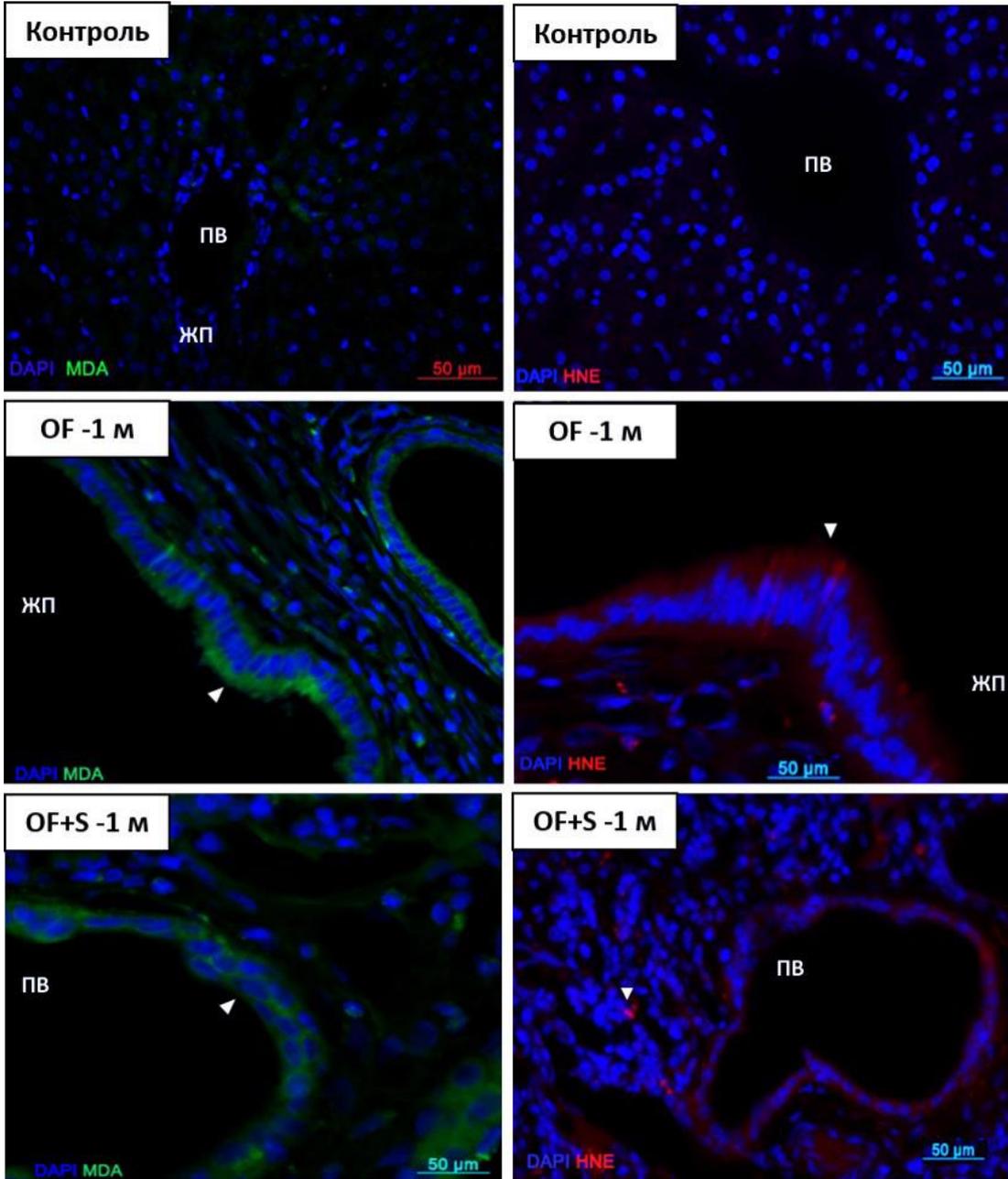


**Рисунок 14. Накопление 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина (8-OHdG) в моче хомяков при сочетанном воздействии с антиоксидантами. ИФА.**

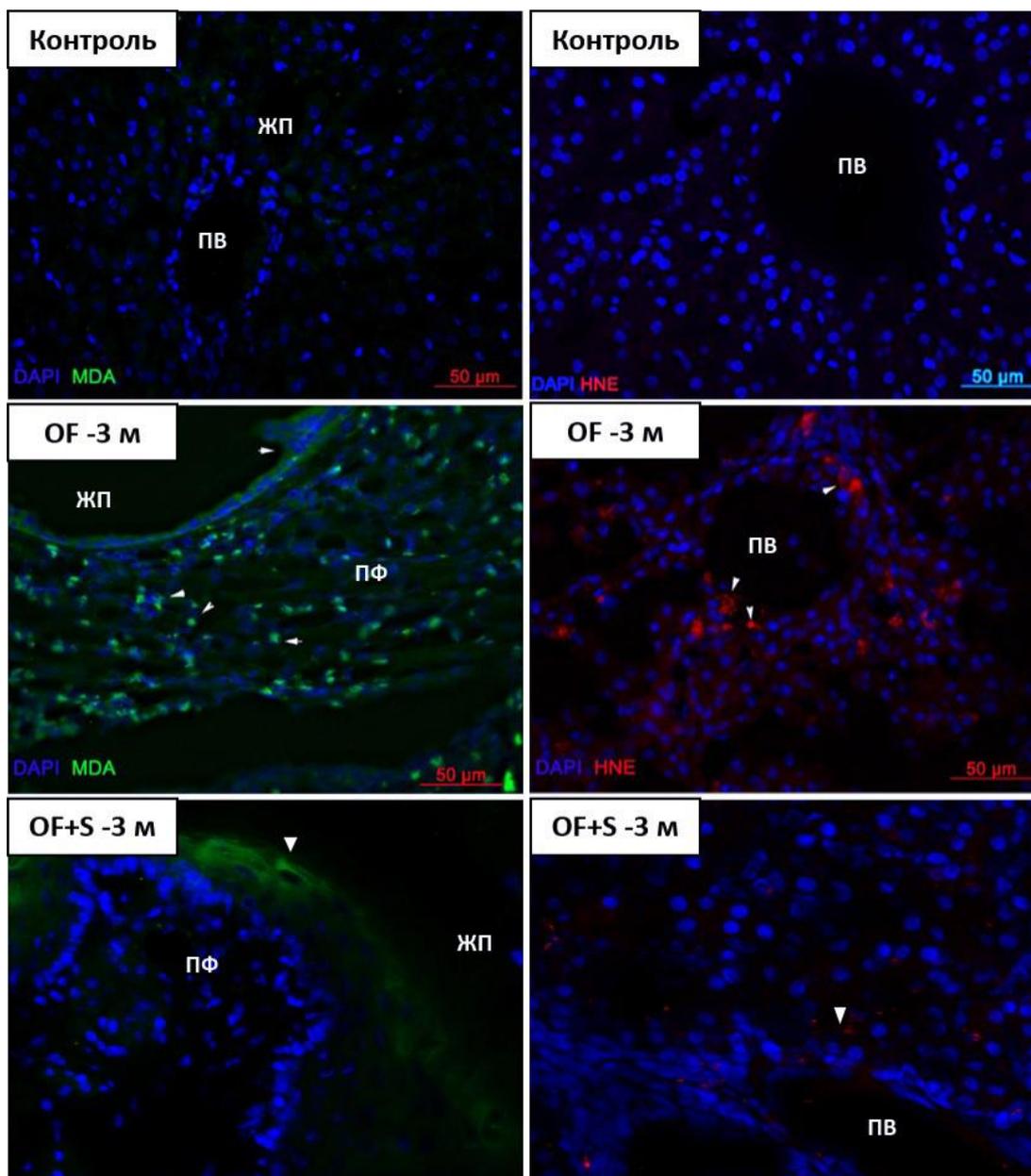
OF - группа, инфицированная *O. felinus*; OFR – инфицированная группа, пролеченная ресвератролом OFS - инфицированная группа, пролеченная SkQ1; Иммуноферментный анализ. \*- по сравнению с контролем, #- по сравнению с инфицированной группой; ANOVA+ Tukey post Hoc, Mean  $\pm$  SD. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

С помощью иммуногистохимического анализа было показано накопление маркеров перекисного окисления липидов MDA (малоновый диальдегид) и HNE (-гидрокси-2-ноненаль) уже через 1 месяц после инфицирования, с последующим увеличением прямо пропорционально срокам инфекции. После диеты с антиоксидантом SkQ1 было отмечено снижение специфического сигнала маркеров перекисного окисления липидов (MDA и HNE) в печени хомячков через 1 и 3 месяца инфекции (Рис. 15). При этом ресвератрол аналогичного действия не оказывал.

A



Б



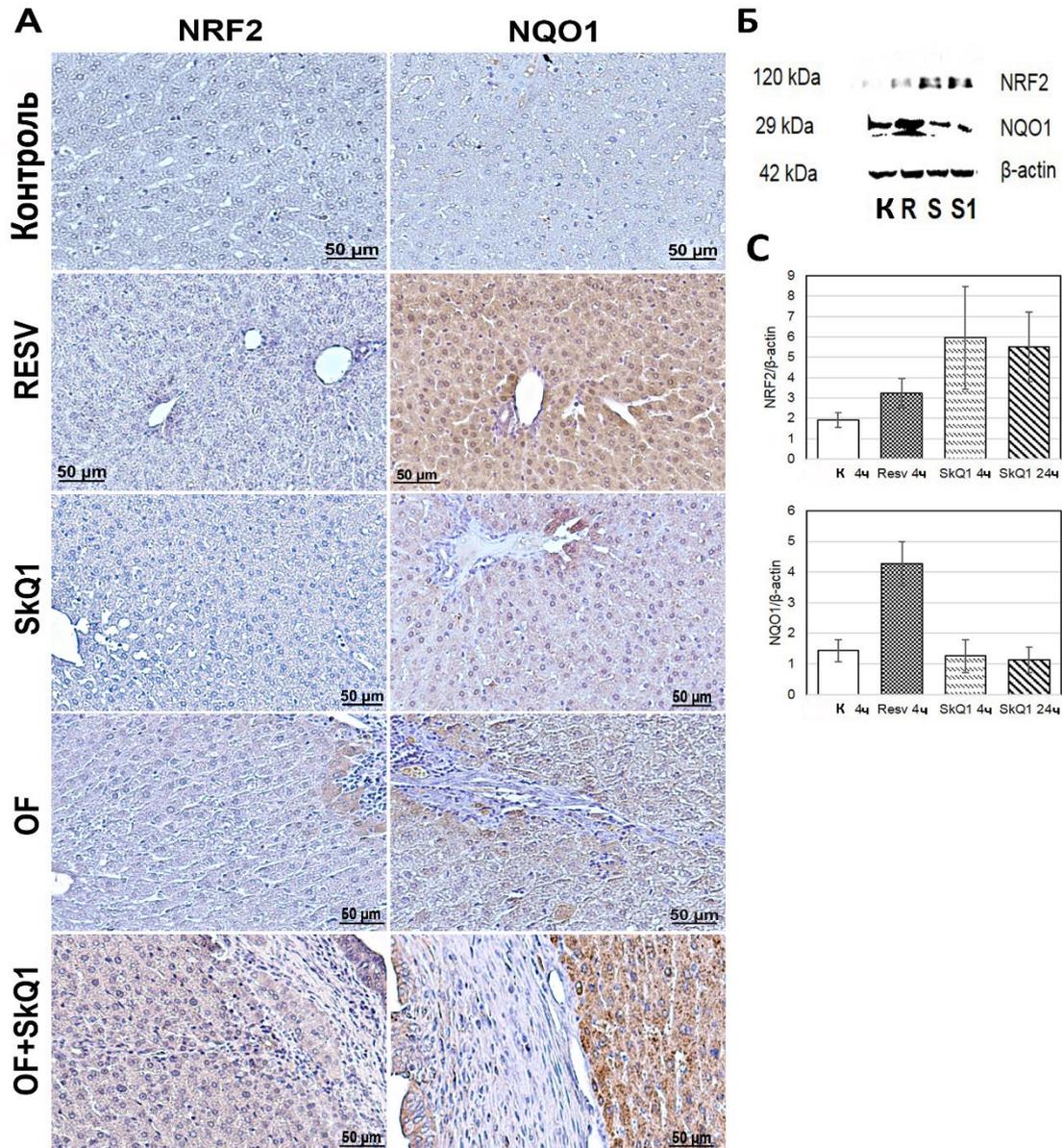
**Рисунок 15.** Снижение маркеров перекисного окисления липидов MDA (специфический сигнал зеленого цвета) и HNE (специфический сигнал красного цвета) в печени животных через 1 (А) и 3 (Б) месяца инфекции *Opisthorchis felineus*. DAPI (синий); HNE (красный) -4-гидрокси-2-ноненаль, MDA (зеленый)- малоновый диальдегид - ЖП- желчный проток, ПВ- портальная вена, ПФ- перидуктальный фиброз. Стрелкой указан специфический сигнал.

Известно, что редокс-чувствительный транскрипционный фактора NRF2 (ядерный фактор (эритроидного происхождения 2)) высвобождается в состоянии окислительного стресса и индуцирует экспрессию генов-мишеней путём связывания с ARE (антиоксидант респонсивный элемент). Ранее было показано, что ресвератрол способен увеличивать экспрессию Nrf2 (Zhang et al., 2019).

Для того, чтобы исследовать возможную активацию транскрипционного фактора NRF2 под действием SkQ1, мы исследовали содержание белка NRF2, а также содержание NQO1 (НАД(Ф)Н хинон дегидрогеназа-1), как гена мишень NRF2 в печени животных всех групп с помощью иммуногистохимии (Рис. 16 А). В качестве положительного контроля был использован ресвератрол в рамках той же диеты у хомячков в течение 1 месяца, что и SkQ1.

Было показано, что уровень NQO1 повышался в печени неинфицированных животных после диеты с ресвератролом. Специфический сигнал был отмечен, преимущественно, в цитоплазме гепатоцитов, однако встречались специфически окрашенные ядра. В отличие от ресвератрола, SkQ1, у неинфицированных животных, повышает уровень NQO1 в гепатоцитах в меньшей степени, что отражается в невысокой интенсивности специфического сигнала. В группах, инфицированных *O. felinus* было отмечено небольшое увеличение содержания как NQO1, так и NRF2. При этом специфический сигнал отмечали в цитоплазме гепатоцитов, расположенных в непосредственной близости к очагам воспаления и пролиферации желчных протоков. В группе, инфицированных *O. felinus* и пролеченных SkQ1 животных экспрессия белков NQO1 и NRF2 была повышена значительно и отмечена не только в гепатоцитах, но и в эпителии желчных протоков (Рис. 16 А).

Дополнительно, чтобы исследовать активацию этих белков, участвующих в ARE-зависимом сигнальном пути, мы исследовали содержание белков NQO1 и NRF2 на клеточной культуре HepG2 с помощью Вестерн блот анализа. В качестве положительного контроля активации ARE-зависимого сигнального пути мы использовали ресвератрол (Рис 16 Б и С). В клетках, обработанных ресвератролом в течение 4 часов было отмечено наибольшее содержание NQO1, что сочеталось с данными иммуногистохимического анализа. Наибольшее содержание NRF2 было отмечено в клетках, обработанных SkQ1 через 4 и 24 часа (Рис 16 Б и С).



**Рисунок 16.** Содержание NRF2 и NQO1 в клетках HepG2 и тканях печени после обработки антиоксидантом SkQ1. **А.** Иммуногистохимический анализ тканей печени неинфицированных и инфицированных *Opisthorchis felineus* (OF) хомячков (*Mesocricetus auratus*) через 1 месяц инфекции. SkQ1- неинфицированные, обработанные антиоксидантом SkQ1; RESV - неинфицированные, обработанные антиоксидантом ресвератролом; OF – инфицированные *O. felineus*; OF+SkQ1 - инфицированные *O. felineus* и получавшие SkQ1. **Б.** Визуализация белков NRF2 и NQO1 методом вестерн-блот анализа в клетках гепатомы HepG2. Представлены репрезентативные иммуноблоты. В качестве контроля использовали  $\beta$ -актин. **С.** - необработанные клетки HepG2; R- клетки HepG2, обработанные ресвератролом в течении 4 часов; S- клетки HepG2, обработанные SkQ1 в течении 4 часов; S1- клетки HepG2, обработанные SkQ1 в течении 24 часов. **С.** Результаты денситометрии (количественная оценка интенсивности исследуемого белка относительно  $\beta$ -актина) белков NRF2 и NQO1 в клетках HepG2. Данные выражаются как среднее  $\pm$  стандартное отклонение.

### **3.4. Биохимические показатели сыворотки крови животных, получавших антиоксиданты**

Были протестированы АСТ, АЛТ, общий билирубин и холестерин в сыворотке крови как основные показатели повреждения печени. Было обнаружено, что уровень АЛТ у инфицированных *O. felineus* животных увеличился более чем в 10 раз через 3 месяца, а уровень АСТ повысился в 2 раза, что может указывать на повреждение печени. Ресвератрол снижал активность АСТ и АЛТ через 3 месяца инфекции; SkQ1 достоверно снизил уровень АСТ через 3 месяца (в 1,5 раза), что свидетельствует об улучшении функционального состояния печени.

Билирубин, являющийся еще одним показателем нарушения работы печени, также был значительно повышен через 1 и 3 месяца инфекции. Повышенный билирубин может быть следствием гепатоцеллюлярных повреждений и холестаза (Камышников, 2016). Было установлено, что уровень билирубина у инфицированных животных снижался под действием ресвератрола в 2 раза через 1 месяц после заражения.

Как известно, нарушения функций печени также связаны с повышением уровня холестерина в сыворотке крови (Guo et al., 2019). Так, повышенный уровень холестерина наблюдался у инфицированных животных через 1 и 3 месяца. Было показано, что ресвератрол и SkQ1 снижали уровень холестерина в сыворотке инфицированных животных в 2 раза через 3 месяца инфекции. Данные представлены в таблице 3.

**Таблица 3. Влияние антиоксидантов на биохимические показатели сыворотки крови животных через 1 и 3 месяца после инфицирования.**

	Норма	Контроль, mean ± SD	Ресвератрол, mean ± SD	SkQ1, mean± SD	OF, mean ± SD	OF + Ресвератрол, mean ± SD	OF + SkQ1, mean ± SD
АЛТ, Ед/л	38,0±26,1	35,9±10,3	39,2 ± 2,8	38,7±3,3	247,8 ± 67,1*	267,4 ± 98,6	204,3±77
АСТ, Ед/л	47,0±38,3	51,5 ± 8,7	52,8±5,5	43,4±8,4	87,1 ± 30,4	72,8±19,1	53,7±12
Общий билирубин, мкмоль/л	3,4 – 1,6	6,9 ± 4,2	12,7±3,4*	11,6±2,5	24,7 ± 5,6 *	12,1±6,5\$	16,4±3,4
Холестерин, ммоль/л	2,9 - 5,4	1,6 ± 0,2	1,2±0,1*	2±0,4	2,9±0,5 *	3,3±0,6	3,9±2

	Норма	Контроль, mean ± SD	Ресвератрол mean ± SD	SkQ1, mean± SD	OF, mean ± SD	OF+ Ресвератрол, mean ± SD	OF + SkQ1, mean ± SD
АЛТ, Ед/л	38,0±26,1	35,9±10,3	70,7±16,1	45,7±16,4	356,7±150,9*	219,±66,3\$*	212,2±77
АСТ, Ед/л	47,0±38,3	51,5 ± 8,7	58,7±11,5	53±22	95,0±37,6*	59,6±6,5\$	83,4±20\$*
Общий билирубин, мкмоль/л	3,4 - 12,6	6,9 ± 4,2	5,8 ± 4,1	3,3±0,3	9,4±6,1 *	5,8±2,9	5,9±1,6
Холестерин, ммоль/л	2,9 - 5,4	1,6 ± 0,2	1,7±0,2	1,7±0,1	2,9±0,5 **	2,0±0,5\$*	2,2±0,5\$*

Достоверность различий определяли с помощью критерия Манна-Уитни U.

\* Сравнение между группами (антиоксиданты и контроль), \$ сравнение между группами (антиоксиданты и инфицированная группа), \* \$ p <0,05; \*\* SS p <0,01

Mean - среднее значение, SD - стандартное отклонение; АЛТ - аланинаминотрансфераза; АСТ - аспаргатаминотрансфераза. Значения параметров нормы взяты из Van Hoosier and Pherson, 1987, Field and Sibold, 1998.

### **3.5. Комбинаторный эффект антиоксидантов при совместном применении с празиквантелом на структурное состояние печени и уровень экспрессии мРНК генов, участвующих в регуляции процессов воспаления и фиброгенеза**

Поскольку антиоксиданты показали положительное влияние на состояние печени при описторхозе, мы решили оценить комбинаторное действие антиоксидантов и празиквантела при лечении описторхоза. Празиквантел является основным препаратом для лечения описторхоза и других трематодозов. Однако, существуют противоречивые данные о токсичности празиквантела для организма. Известно, так же, что в некоторых странах Европы празиквантел не получил одобрения к применению для людей (Hong, 2018; Zwang and Olliaro, 2017).

Для того чтобы, определить комбинаторное действие антиоксидантов и празиквантела, оценивали состояние печени по следующим параметрам: изменения в паренхиме печени (дистрофия) (при этом, под дистрофией понимали различные изменения, включая нарушение целостности мембран гепатоцитов, деформацию ядер, наличие вакуолей и неспецифических включений); наличие воспалительной инфильтрации, пролиферацию желчных протоков, перидуктальный фиброз и гиперплазию эпителия желчных протоков, а также оценивали накопление липидов и гликогена в печени.

Было показано, что в группе неинфицированных и пролеченных празиквантелом животных, были отмечены значительные дистрофические изменения в паренхиме печени. Дистрофия гепатоцитов в этой группе была оценена как  $16,3 \pm 5,6$ , что значительно превышало показатель контрольной группы животных ( $P = 0,0009$ ). Подобные структурные изменения гепатоцитов были обнаружены у инфицированных животных, в этой группе дистрофия составляла  $19,3 \pm 2,7$ ; ( $P = 0,0009$ ). В группе инфицированных *O. felinus* и пролеченных PZQ животных, дистрофия была наиболее выраженной и достигала максимального значения ( $26,1 \pm 4,6$ ) по сравнению с остальными группами. Лечение антиоксидантами привело к значительному уменьшению дистрофических изменений паренхимы печени по сравнению с группой OF + PZQ. В частности, у хомяков, получавших ресвератрол (группа OF + PZQ + Resv), структурные

изменения гепатоцитов составили  $18,1 \pm 7,2$ , а в группе OF + PZQ + SkQ1 дистрофия составила  $16,4 \pm 3,5$ . В обеих группах с антиоксидантами уровень дистрофии был достоверно снижен ( $P = 0,009$ ). Данные представлены в таблице 4 и на Рис.16.

Также была отмечена тенденция к снижению воспаления под действием антиоксидантов. Так, воспаление в группе OF + PZQ составило  $9,6 \pm 3,6$ , в группе OF + PZQ + Resv –  $8,6 \pm 2,6$ , а в группе OF + PZQ + SkQ1 –  $7,2 \pm 2,9$ . При этом не было выявлено достоверных изменений в развитии перидуктального фиброза. Однако, стоит отметить, что уровень гиперплазии эпителия желчных протоков в группе OF + PZQ снижался в 2,4 раза по сравнению с группой OF ( $P = 0,008$ ), в группах с антиоксидантами также наблюдалось достоверное снижение в 1,5 раза ( $P = 0,008$ ). Пролиферация желчных протоков снижалась в группе OF + PZQ в 2 раза, а под действием ресвератрола и SkQ1 в 1,6 раз и в 1,8 раз соответственно ( $P=0,01$ ). Данные представлены в Таблице 4.

Для того чтобы определить, связаны ли изменения гепатоцитов с нарушением липидного обмена, срезы печени хомячков были окрашены Oil Red O для выявления нейтральных липидов (Рис. 16). У неинфицированных животных (контрольная группа) в тканях печени были обнаружены единичные липидные капли. Тогда как у хомячков из всех остальных групп, включая неинфицированных животных, получавших празиквантел (группа PZQ), наблюдалось значительное накопление липидных капель. Липидные капли имели неоднородный размер и представляли собой ярко-красные или ярко-оранжевые включения. Накопление липидных капель в печени неинфицированных и пролеченных празиквантелом животных было наиболее выраженным по сравнению с другими группами. Обширные зоны с липидными каплями чаще всего располагались непосредственно возле портальной триады, в перипортальной и в промежуточной зонах. Аналогичной была локализация липидных капель в OF-группе. Распределение липидов в группе OF + PZQ было более хаотичным, по всей доле было отмечено множество отдельных капель. В группах хомячков, получавших антиоксиданты в комбинации с PZQ (группы OF + PZQ + Resv и OF + PZQ + SkQ1) отмечалось снижение накопления липидных капель в тканях печени по сравнению с группами PZQ, OF и OF + PZQ, что, вероятно, может указывать на улучшение метаболизма в печени.

Печень является основным органом, накапливающим гликоген. При этом чрезмерное или недостаточное (при условии нормального поступления пищи) накопление гликогена может свидетельствовать о нарушении углеводного метаболизма.

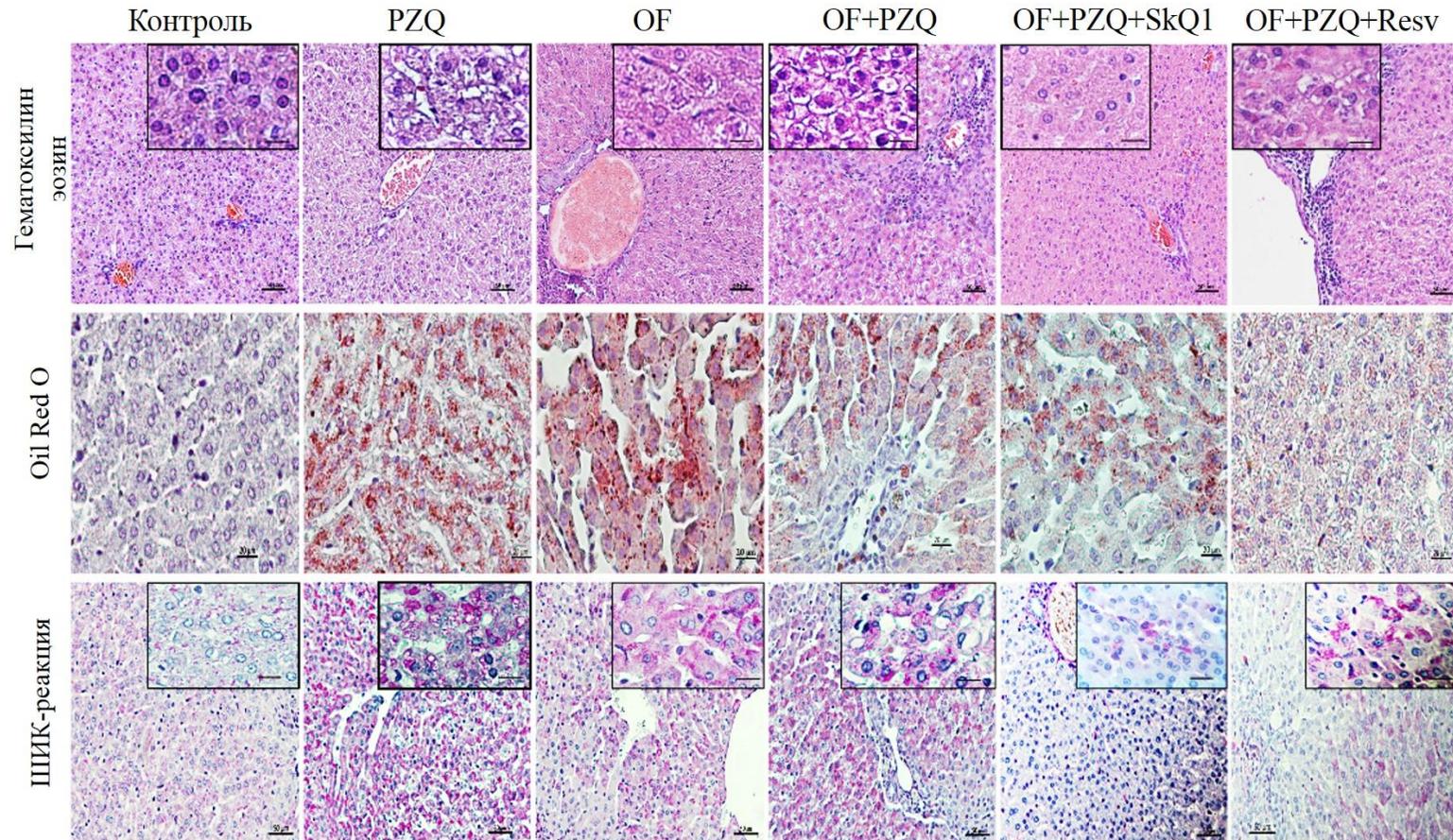
При окрашивании ШИК (ШИК-реакция (реакция Шифф-периодная кислота)) в группе неинфицированных животных отмечали нормальное накопление гликогена. Гликоген накапливался в виде неоднородных по размеру гранул ярко розового цвета на периферии самих гепатоцитов. В группе неинфицированных, но пролеченных PZQ животных, накопление гликогена значительно увеличивалось по сравнению как с контрольной группой, так и с остальными группами. Гранулы гликогена были более крупного размера, несмотря на то, что встречались и достаточно мелкие, при чем некоторые из них сливались между собой и не имели четкой локализации в гепатоците, а заполняли его полностью. Аналогичные результаты были отмечены и в других группах. Однако в группе OF, несмотря на повышенное по сравнению с контролем, накопление гликогена, его гранулы были однородные, мелкие и локализовались на периферии гепатоцитов. В группе OF+PZQ наблюдали картину, схожую с группой PZQ. После лечения антиоксидантами, накопление гликогена было снижено. При этом, в группах OF+PZQ+Resv гранулы гликогена были однородными, локализовались в основном на границах гепатоцитов, их накопление было выше, чем в группе неинфицированных животных, а также были отмечены единичные гепатоциты, полностью заполненные гранулами гликогена. В группе OF+PZQ+SkQ1 наблюдали значительное снижение гликогена. Было отмечено всего несколько гранул на периферии гепатоцитов (Рис.17).

**Таблица 4. Морфометрический анализ гистологических препаратов печени животных, пролеченных празиквантелом**

Группа	Дистрофия паренхимы	Пролиферация желчных протоков	Воспаление	Перидуктальный фиброз	Гиперплазия эпителия
Контроль	0,8±0,1	0	0,1±0,03	NA	NA
OF	19,3±2,7***	14,1±0,9***	14,4±1,3***	46,7±7***	8,7±1,8***
PZQ	16,3±5,6***	0,4±0,3	1,1±0,8	NA	NA
PZQ+OF	26,1±4,6***	7,6±3,0##***	9,6±3,6#***	28,3±5,3#***	3,6±0,4##***
PZQ+OF+Resv	18,1±7,2\$\$\$***	4,8±2,2***	8,3±2,6***	19,8±6,5##***	2,4±0,3\$\$\$***
PZQ+OF+SkQ1	16,4±3,5\$\$\$***	4,2±2,06\$\$\$***	7,2±2,9***	20,8±4,1\$***	2,3±0,3\$***

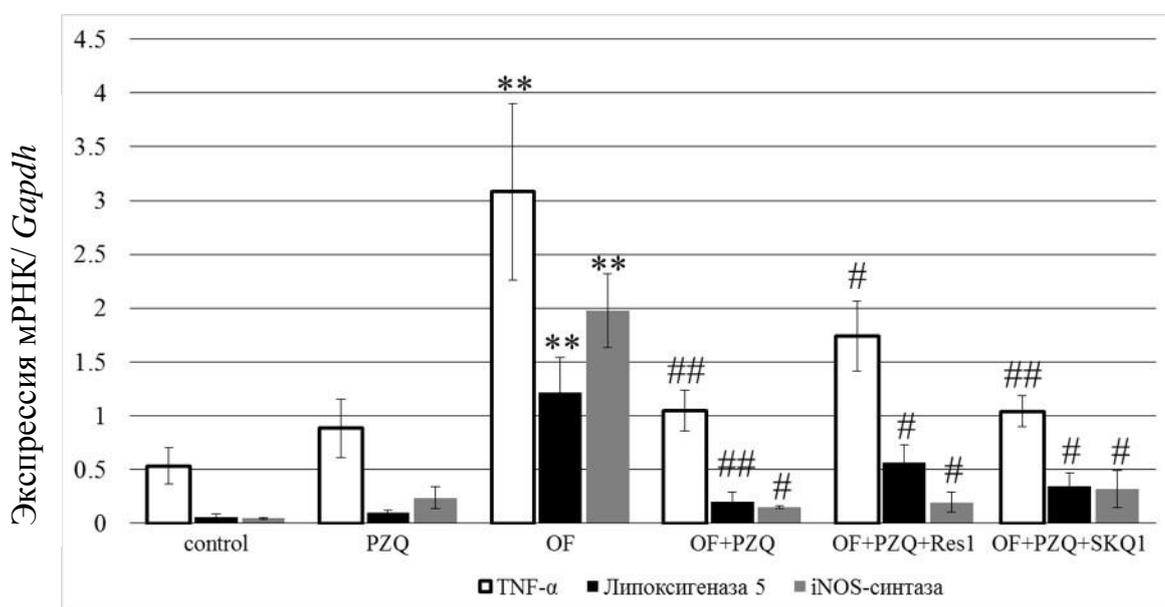
PZQ – группа, пролеченная празиквантелом; OF - группа, инфицированная *O. felineus*; PZQ+OF - инфицированная группа, пролеченная празиквантелом; PZQ+OF+Resv – инфицированная группа, пролеченная празиквантелом после диеты с ресвератролом; PZQ+OF+SkQ1 – инфицированная группа, пролеченная празиквантелом после диеты с SkQ1.

Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. Достоверность различий между группами хомяков оценивали с помощью критерия Манна-Уитни ( $P < 0,05$ ) в Statistica 6.0. \*,#,\$-p <0,05; ##,\*,\$\$ p <0,01; ###,\*\*\*,\$\$\$ p <0,001 (\* - по сравнению с неинфицированными животными, # - по сравнению с группой OF, \$ - по сравнению с группой PZQ+OF ).



**Рисунок. 17.** Гистологические изменения в паренхиме печени животных, пролеченных празиквантелом на фоне экспериментального описторхоза и диеты с антиоксидантами. **Контроль**- неинфицированная группа; **PZQ** - неинфицированная группа, после лечения празиквантелом; **OF**- группа, инфицированная *O. felineus*; **OF+PZQ**- группа, инфицированная *O. felineus* и пролеченная празиквантелом; **OF+PZQ+SkQ1**- группа, инфицированная *O. felineus* и пролеченная празиквантелом на фоне диеты с SkQ1; **OF+PZQ+Resv**- группа, инфицированная *O. felineus* и пролеченная празиквантелом на фоне диеты с ресвератролом. Н&Е- гематоксилин и эозин; ШИК-реакция -окрашивание ШИК.

Кроме того, мы также оценили экспрессию мРНК генов, участвующих в регуляции процессов воспаления и фиброгенеза. Как было показано в разделе 3.2.2. экспрессия мРНК генов, участвующих в регуляции процессов воспаления, таких как фактор некроза опухоли –альфа (*Tnf*), липоксигеназа-5 (*Alox5*) и индуцибельная синтаза оксида азота (*Inos*) увеличивалась в группе, инфицированной *O. felineus*. После лечения празиквантелом уровень экспрессии мРНК провоспалительных генов достоверно снижался по сравнению с инфицированной группой ( $p < 0,05$ ), однако достоверного снижения в группе с антиоксидантами по сравнению с группой PZQ+OF установлено не было (Рис.18).

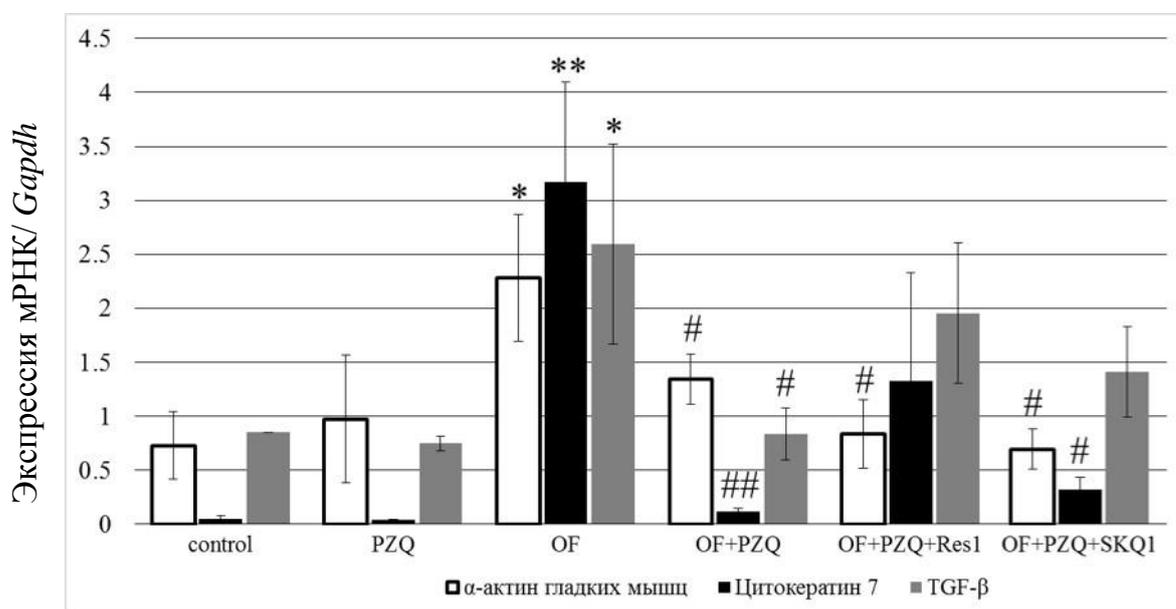


**Рисунок 18.** Экспрессия мРНК генов, участвующих в регуляции воспаления после лечения празиквантелом инфицированных *O. felineus* животных на фоне диеты с антиоксидантами. Данные представлены в виде изменения экспрессии мРНК, нормализованного на уровень экспрессии мРНК *Gapdh* (по оси Y). ANOVA+Tukey post Hoc.

\*,#- $p < 0,05$ ; ##,\*\*- $p < 0,01$ ; (\* - по сравнению с неинфицированными животными, # - по сравнению с группой OF).

Аналогичные результаты были получены и при оценке уровня экспрессии мРНК генов, связанных с фиброгенезом: уровни экспрессии *Sk7* (цитокератин-7), *Tgfb* (Трансформирующий ростовой фактор-бета) и *Acta2* ( $\alpha$ -SMA,  $\alpha$ -актин гладких мышц) увеличивались в группе инфицированных животных и снижались после лечения празиквантелом. При этом уровень *Acta2* после лечения празиквантелом снижался по сравнению с группой инфицированных животных под действием как

ресвератрола, так и SkQ1 ( $p < 0,05$ ). SkQ1, также снижал экспрессию цитокератина 7 ( $p < 0,05$ ) (рис.19)



**Рисунок 19.** Экспрессия мРНК генов, участвующих в регуляции фиброгенеза после лечения празиквантелом инфицированных *O. felineus* животных на фоне диеты с антиоксидантами. Данные представлены в виде изменения экспрессии мРНК, нормализованного на уровень экспрессии мРНК Gapdh (по оси Y). ANOVA+Tukey post Hoc.

\*,#- $p < 0,05$ ; ##,\*\*- $p < 0,01$ ; (\* - по сравнению с неинфицированными животными, # - по сравнению с группой OF).

Полученные при проведении ПЦР в режиме реального времени данные, совпадали с результатами гистологического исследования. Таким образом, под действием празиквантела (в группе PZQ+OF по сравнению с группой OF) снижался уровень воспаления, пролиферации желчных протоков, перидуктального фиброза и гиперплазии эпителия желчных протоков. Вероятнее всего, это связано именно с антигельминтными свойствами препарата. Стоит отметить, что дистрофия в группе неинфицированных, но пролеченных празиквантелом животных, превышала контрольные значения в 20 раз, а в группе PZQ+OF превышала контроль в 32 раза, значение в группе OF в 1,3 раз, что может свидетельствовать о токсичном воздействии препарата на печень. При этом отмечалось достоверное снижение дистрофии после лечения празиквантелом на фоне диеты с антиоксидантами, что

еще раз подтверждает гепатопротекторные свойства антиоксидантов, следовательно, они могут быть использованы в комплексной терапии с празиквантелом при лечении описторхоза.

Мы отметили, что все гистологические параметры, кроме дистрофии паренхимы, улучшаются после лечения празиквантелом, что связано с его антигельминтным действием. Для того, чтобы исключить возможные антигельминтные свойства антиоксидантов, мы оценили их эффективность как антигельминтных препаратов на взрослых *O. felineus in vivo* и *in vitro*.

В результате проведения тестов на подвижность, которые считаются “золотым стандартом” для оценки эффективности лекарств (Pakharukova et al., 2018; Song et al., 2016), было показано, что SkQ1 обладает антигельминтным эффектом ( $IC_{50}=1,4 \mu M$ ), близким к таковому празиквантела ( $IC_{50}=0,47 \mu M$ ). Тогда как ресвератрол не проявил никакого антигельминтного действия ( $IC_{50}=259 \mu M$ ) (Табл.5).

**Таблица 5. Концентрация полумаксимального ингибирования ( $IC_{50}$ ) антигельминтного действия антиоксидантов и празиквантела на взрослых червей *Opisthorchis felineus*.**

Вещество	Значение $IC_{50}$ ( $\mu M$ )	SE
Празиквантел (PZQ)	0,47	0,05
SkQ1	1,4	0,5
Ресвератрол	259	26

Данные представлены в виде значений  $IC_{50}$ , SE: стандартная ошибка среднего; пакет ('drc 3.0-1' R package).

После того, как был показан антигельминтный эффект SkQ1 на взрослых *O. felineus in vitro*, мы решили оценить его возможные антигельминтные свойства *in vivo*. Для этого, животным, зараженным описторхозом давали SkQ1 (1 микромоль/кг) в течение 30 дней. После этого оценили паразитарную нагрузку у животных, при сравнении с празиквантелом (Табл.6). В отличие от празиквантела, который в стандартной дозе приводил к снижению числа паразитов на 76.5%, SkQ1

не обладал антигельминтной активностью *in vivo*, т.к. не приводил к снижению числа гельминтов (Табл.6).

**Таблица 6. Оценка паразитарной нагрузки инфицированных *O. felineus* хомячков, пролеченных SkQ1 или празиквантелом.**

	<i>O. felineus</i>	<i>O. felineus</i> +SkQ1	<i>O. felineus</i> +PZQ
Количество животных	5	3	5
Среднее количество червей ± SD	56±9	55±12	8±6
WBR (%)	-	2	76.5

Данные представлены как среднее ± SD (стандартное отклонение) (Манна –Уитни); *O. felineus*- инфицированная и не пролеченная группа; *O. felineus*+SkQ1- инфицированная и пролеченная SkQ1 группа; *O. felineus*+PZQ- инфицированная и пролеченная празиквантелом группа. WBR (%) – снижение паразитарной нагрузки.

WBR рассчитывали следующим образом:  $((a - b)/a) \times 100$ , где a — среднее количество извлеченных при вскрытии червей в контрольной группе, а b — среднее количество извлеченных червей при вскрытии в пролеченных группах.

Таким образом, антиоксиданты не проявляли антигельминтного эффекта *in vivo*. Следовательно, положительные эффекты ни ресвератрола ни SkQ1 не может быть связан с антигельминтной активностью.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Описторхоз, вызываемый паразитированием кошачьей двуустки *Opisthorchis felineus*, сопровождается различными структурно-функциональными нарушениями печени. К таким нарушениям относятся формирование очагов хронического воспаления, образование перидуктального фиброза, холангиофиброза, гиперплазия, метаплазия и неоплазия эпителия желчных протоков (Альперович, Б.И., 2010; Gouviea et al., 2017). Неоплазия – это патологический процесс, который выражается в усилении процессов пролиферации и дисплазии клеток, считается предраковым изменением.

В данной работе нами впервые была выявлена прямая взаимосвязь между сроком инфекции, уровнем маркеров окислительного стресса и неоплазией эпителия желчных протоков при описторхозе. В частности, по мере увеличения времени течения инфекции, содержание токсичных продуктов перекисного окисления липидов, 4-гидрокси-2-ноненаль и малоновый диальдегид, значимо увеличивается. Эти изменения коррелировали с динамикой патоморфологических изменений в печени. Таким образом, было показано, что степень воспаления, гиперплазии, неоплазии эпителия желчных протоков, холангио- и перидуктального фиброза постепенно увеличивалась с момента инфицирования и до 1,5 лет течения инфекции. Кроме того, нами было показано, что на протяжении всего срока заражения, уровень 8-гидрокси-2'-дизоксигуанозин (8-OHdG) в моче экспериментальных животных был повышен. Поскольку этот показатель считается основным маркером окислительного стресса, то его повышенное содержание в моче отражает, во-первых, уровень окислительного стресса в тканях, а во-вторых, повышение окислительных повреждений ДНК, индуцированных свободными радикалами (Kawanishi S, Hiraku Y., 2006).

Точные механизмы развития неоплазии при описторхозе и клонорхозе неизвестны. Однако известно, что к неоплазии могут приводить накопление различных повреждений ДНК, в том числе и окислительных. Поэтому значимая роль, как агенту, способному спровоцировать развитие неоплазии, отводится секреторно-экскреторному продукту трематод, который содержит в своем составе белки и низкомолекулярные метаболиты холестерина, обладающие

прооксидативным и мутагенным эффектом. Так, было показано, что секреторно-эксекреторный продукт *Opisthorchis felinus* содержит в своем составе белки и паразит-специфичные метаболиты холестерина- оксистеролы, которые, по-видимому, обладают генотоксическими, прооксидативными и провоспалительными свойствами (Correia da Costa et al., 2014; Gouveia et al., 2017; Cavalieri and Rogan, 2010). Предполагают также, что оксистеролы могут быть задействованы в процессах возникновения и развития рака толстой кишки, легких и молочной железы (Jaworski et al., 2001; Cavalieri and Rogan, 2010; Kuver, 2012; Correia da Costa et al., 2014). Эти соединения способны приводить к повреждению генетического материала, злокачественной трансформации клеток и прогрессированию холангиокарциномы (Sripa et al., 2012, 2018; Yongvanit et al., 2012; Chaiyadet et al., 2015). Экскреторно-секреторный продукт трематод может быть вовлечен в развитие холангиокарциномы в том числе и за счет содержания в нем гранулина, поскольку, например, гранулин *O. viverrini* стимулирует пролиферацию холангиоцитов и ангиогенез, а тиоредоксинпероксидаза подавляет апоптоз (Sripa et al., 2018). В связи с этим, два близкородственных к *Opisthorchis felinus* вида - *O. viverrini* и *C. sinensis*, признаны биологическими канцерогенами 1 степени (IARC, 2012).

Стоит отметить, что хроническое воспаление также играет значимую роль в развитии структурно-функциональных нарушений печени при описторхозе (Альперович Б.И., 2010). Формирование очагов хронического воспаления может быть обусловлено несколькими факторами. К ним относятся: механическое повреждение гельминтами клеток эпителия желчных протоков; образование активных форм кислорода клетками хозяина; белки и метаболиты, секретируемые гельминтами (Chaiyadet et al., 2015; Gouveia et al., 2017; Petrenko et al., 2017). Известно, что при хроническом воспалении иммунные клетки мигрируют в очаг повреждения, тем самым локально увеличивая высвобождение свободных радикалов. Свободные радикалы могут приводить к возникновению различных окислительных повреждений, в том числе образованию и накоплению токсичных продуктов перекисного окисления липидов - HNE и MDA (Ayala A. et al., 2014). Помимо этого, хроническое воспаление способствует активации миофибробластов и развитию перидуктального фиброза (Maksimova et al., 2017; Yazdani et al., 2017). Миофибробласты (ключевые участники ремоделирования внеклеточного матрикса)

характеризуются экспрессией  $\alpha$ -SMA и способностью секретировать широкий спектр медиаторов, в том числе TGF $\beta$ , цитокины, факторы роста, провоспалительные хемокины и другие факторы, которые способны как косвенно, так и напрямую воздействовать на клетки (Yazdani et al., 2017). Известно, что При описторхозе мы продемонстрировали увеличение пролиферации эпителиальных клеток желчных протоков (гиперплазия эпителия), что сопровождается повышенной экспрессией мРНК гена *Ck7* и повышенной продукция белка CK7. О повышении фибротических процессов свидетельствуют повышенные уровни экспрессии генов *Tgf $\beta$* , *Acta2*, *Colla* как на уровне мРНК, так и на уровне белка.

Нами было показано, что макрофаги, также участвуют в патологических изменениях в печени хомячков, инфицированных *O. felineus* (Pakharukova et al., 2019). Имеются данные о связи макрофагов разных иммунофенотипов с активацией миофибробластов при воспалении. Макрофаги M1 (CD68<sup>+</sup>, TNF $\alpha$ <sup>+</sup>) поддерживают хроническое воспаление, возможно, за счет продукции провоспалительных цитокинов, таких как TNF- $\alpha$  (Braga et al., 2015). Кроме того, в при инфекции *O. felineus* в тканях печени накапливается маркер альтернативно активированных макрофагов CD163. Вероятно, увеличение содержания этих клеток приводит к обнаруженному в наших экспериментах росту продукции TGF $\beta$ , активации миофибробластов и, соответственно, повышенной экспрессией  $\alpha$ -SMA.

В данной работе были впервые определены дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭГ) и клеточные пути в печени при остром и хроническом описторхозе, вызванном *O. felineus*. Функциональная аннотация дифференциально-экспрессирующихся генов показала, что EMT (эпителиально-мезенхимальный переход) является наиболее представленным путем из базы данных MSigDB у инфицированных животных. Сигнальный путь TGF $\beta$  также был одним из наиболее представленных путей в ДЭГ при инфекции. Активация маркерных генов EMT в печени была подтверждена с помощью Вестерн-блот анализа. Кроме того, были проанализированы клеточные структуры, с которыми ассоциирована экспрессия тех или иных белков. Так, с помощью иммуногистохимии оценено содержание белков EMT, отвечающих как за мезенхимальный (N-кадгерин,  $\alpha$ -SMA, виментин, MMP9) так и за эпителиальный фенотип клеток (E-кадгерин).

Полученные данные подтвердили результаты анализа транскриптома печени при описторхозе.

Большое количество ДЭГ, вероятно, можно объяснить тем, что РНК была выделена из большого участка печени. Печень содержит множество типов клеток, в том числе холангиоциты, гепатоциты, фибробласты, клетки воспалительной инфильтрации, иммунные клетки, эндотелиальные клетки сосудов. Это, по-видимому, объясняет различия между образцами РНК печени при анализе содержания мРНК маркерных генов ЕМТ. Судя по уровню экспрессии мРНК и экспрессии белков маркерных генов ЕМТ, была оказана активация обоих типов генов, но специфических признаков перехода от эпителиального к мезенхимальному фенотипу выявлено не было. Вероятно, если бы в анализ были включены только участки печени, содержащие эпителий желчных протоков, то переход был бы виден более отчетливо.

Сигнальные пути, связанные с воспалительными процессами, такие как сигнальный путь NIPPO, сигнальный путь NF-κB, P53, регуляция клеточного цикла и клеточной адгезии, также были высоко представлены при экспериментальном описторхозе. Воспалительный ответ на уровне дифференциальной экспрессии генов согласуется с ранее полученными данными как на лабораторных животных, так и в образцах печени от пациентов (Kovner et al., 2019; Lvova et al., 2012; Pakharukova et al., 2019a, 2019).

Кроме того, сравнивая хроническое и острое воспаление в печени при различных инфекционных и неинфекционных заболеваниях (вирус гепатита В, неалкогольная жировая болезнь печени, CCl<sub>4</sub> индуцированные нарушения), можно увидеть схожие черты в активации некоторых клеточных путей, связанных с воспалением (Campos et al., 2020). Например, известно, что активация сигнальных путей MAPK и TNF, приводит к активации экспрессии генов, соответствующих таким терминам GO, как клеточный цикл, организация внеклеточного матрикса и регуляция иммунного ответа (Campos et al., 2020). Что также согласуется с полученными данными.

Таким образом, в работе нам удалось сформировать первые представления о механизмах, которыми может быть обусловлено повреждение печени в результате инфицирования *O. felinus*.

Хроническое воспаление, связанное с *O. felineus*, увеличивает продукцию активных форм кислорода, в результате чего происходит нарушение гомеостаза антиоксидантной системы организма, и как следствие окислительный стресс, приводящий к окислительной модификации липидов, белков и нуклеиновых кислот. Фенотипическое повреждение тесно связано с биохимическими изменениями, включая накопление продуктов ПОЛ, активацию макрофагов и увеличение окислительных повреждений ДНК.

Таким образом, накоплены косвенные свидетельства в пользу участия окислительных повреждений ДНК в патогенезе описторхоза и развитии неоплазии.

Для того, чтобы подтвердить гипотезу о значимой роли хронического воспаления и окислительных повреждений в механизмах образования предраковых изменений в печени, в частности эпителиальной неоплазии, мы применили ингибиторный анализ, а именно, исследовали влияние антиоксидантов разного механизма действия (ресвератрола и SkQ1) на развитие эпителиальной неоплазии и функциональное состояние печени при остром и хроническом описторхозе. Было показано, что антиоксиданты, вне зависимости от механизма их действия, снижали степень воспаления и неоплазии эпителия желчных протоков при экспериментальном описторхозе, что сопровождалось снижением уровня окислительного стресса, в частности снижением маркеров перекисного окисления липидов в печени и уровня окислительных повреждений ДНК в моче.

SkQ1- это митохондриально - направленный антиоксидант, который, благодаря своим физико-химическим свойствам способен проникать напрямую в митохондрии и нейтрализовать активные формы кислорода непосредственно в месте их образования. Инактивация активных форм кислорода под действием SkQ1 происходит несколькими способами: за счет окисления пластохинона и за счет снижения потенциала мембраны митохондрий (Antonenko, 2008). Так, SkQ1 способен ингибировать АФК, поддерживать окислительно-восстановительный баланс в митохондриях и, за счет этого, снижать степень проявления воспаления (Chelombitko, 2016; 2017).

Ресвератрол, в свою очередь, обладает более широким спектром, оказывая противовоспалительное, противораковое, антиоксидантное действие, ингибируя определенные клеточные сигнальные пути (Fourcade et al., 2015; Xiao et al., 2016).

Так, ресвератрол является активатором белковой деацетилазы SIRT1, участвующей во многих клеточных процессах, таких как регуляция клеточного цикла и ответ на клеточный стресс (Xiao et al., 2016), путем активации или инактивации факторов транскрипции и регуляторных белков (Widlund et al., 2013; Fourcade et al., 2015). Ресвератрол может ингибировать повреждение тканей и хроническое воспаление посредством инактивации пути TGF $\beta$ ; способен снижать воспаление путем ингибирования ацетилирования NF-kB также за счет активации SIRT1 (Zhang et al., 2019). Более того, ресвератрол способен снижать образование оксистеролов и ДНК – аддуктов (Cavalieri and Rogan, 2010). Известно, также, что ресвератрол может увеличивать экспрессию гена *Nrf2* и его гена-мишени *Ho-1* и, напротив, снижает выработку АФК и экспрессию *Keap1*. При лечении ресвератролом была снижена пролиферация клеток и индуцирован апоптоз, вторичный по отношению к подавлению белка BCL-2 и увеличению продукции белка BAX (Zhang et al., 2019). Имеются данные о том, что ресвератрол способен активировать антиоксидантный путь SIRT1/Nrf2-ARE (Wang et al., 2020).

Когда данная работа была начата, то литературных данных по активации каких-либо клеточных путей под действием SkQ1 не было. Позже появились данные, косвенно указывающие на возможную активацию сигнального пути Keap1-Nrf2 под действием SkQ1. В нашей работе мы проверили эту гипотезу и, действительно, в группе, инфицированных *O. felineus* и пролеченных SkQ1 животных продукция белков NRF2 и его гена-мишени NQO1 была повышена. Повышенное содержание NRF2 было отмечено также на культуре клеток HepG2, обработанных SkQ1 через 4 и 24 часа. Таким образом, SkQ1 активирует путь Keap1-Nrf2.

Важным этапом данной работы было проверить, обладают ли антиоксиданты антигельминтным действием, поскольку снижение всех показателей воспаления, а также неоплазии холангиоцитов под действием антиоксидантов, можно было бы в таком случае объяснить снижением паразитарной нагрузки (количеством паразитов). Было показано, что SkQ1, действительно, в отличие от ресвератрола, обладает антигельминтной активностью *in vitro*. Поэтому был протестирован эффект SkQ1 в экспериментах *in vivo*, в результате антигельминтной активности у этого препарата также не было показано. Таким образом, нельзя утверждать, что снижение

предраковых изменений в печени под действием антиоксидантов обусловлено антигельминтной активностью.

Несмотря на то, что конкретные клеточные пути возникновения и развития предраковых патологических изменений при описторхозе все еще изучены недостаточно, наши исследования показали, что окислительный стресс и окислительные повреждения биомолекул играют ключевую роль в формировании таких повреждений печени, как неоплазия эпителия желчных протоков, которая считается предраковым изменением.

## ВЫВОДЫ

1. Выявлена прямая взаимосвязь между увеличением сроков инфекции, содержанием маркеров окислительного стресса в тканях печени и выраженностью неоплазии эпителия желчных протоков у сирийских хомячков, инфицированных *O. felinus*.
2. Функциональная аннотация 2151 дифференциально экспрессирующихся генов в печени инфицированных *O. felinus* хомячков показала, что наиболее представленными были элементы регуляторных путей эпителиально-мезенхимального перехода, IL6/JAK/STAT3, TNF- $\alpha$ , HIPPO, воспалительного ответа, взаимодействия с внеклеточным матриксом и регуляции клеточного цикла.
3. Активация как эпителиальных (*Cdh1*), так и мезенхимальных (*Cdh2*, *Vim*, *Acta2*, *Colla1* и *Mmp9*) маркерных генов и продукция соответствующих белков эпителиально-мезенхимального перехода в клетках печени хомячков продемонстрирована с помощью анализа транскриптома, иммуногистохимии и Вестерн-блот анализа через 1 и 3 месяца инфекции.
4. Ингибиторный анализ с помощью антиоксидантов ресвератрола и SkQ1 показал снижение степени развития неоплазии эпителия желчных протоков, а также ингибирование экспрессии мРНК и продукции белков, ассоциированных с воспалением (TNF- $\alpha$ , CD68) и с фиброгенезом (CK7,  $\alpha$ SMA), что сопровождалось улучшением структурно-функционального состояния тканей печени хомячков через 3 месяца инфекции *O. felinus*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа посвящена исследованию механизмов биологического канцерогенеза, в частности, изучению динамики предраковых изменений желчных протоков и маркеров неопластических процессов при экспериментальной инфекции печеночными трематодами семейства *Opisthorchiidae*. Ранее было показано, что описторхиды вызывают атипичную гиперплазию эпителия желчных протоков, а также формирование гранулем. С помощью ингибиторного анализа нам впервые удалось показать, что за формированием этих предраковых изменений стоит увеличение окислительных повреждений липидов и ДНК клеток хозяина. Повреждения возникают в результате действия избытка свободных радикалов, генерируемых в очаге инвазии клетками хозяина и паразитами. Маркеры повреждений липидов малоновый диальдегид и 4-гидрокси-2-ноненаль накапливаются в тканях печени в прямой зависимости от времени инфекции; повышенный уровень содержания маркера повреждений ДНК (8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин) сохраняется в течении всего времени инфекции.

В работе было выполнено секвенирование транскриптома печени и впервые выявлено 2151 дифференциально экспрессирующихся генов у инфицированных животных. Наиболее представленными среди обогащенных MSigDB путей в дифференциально экспрессирующихся генах были эпителиально-мезенхимальный переход, IL6/JAK/STAT3 сигнальный путь, TNF- $\alpha$ , HIPPO пути передачи сигнала, а также клеточные пути развития воспалительного ответа, взаимодействия с внеклеточным матриксом и регуляция клеточного цикла.

Впервые продемонстрировано, что в тканях печени *O. felineus* инфицированных животных регистрируется повышенный уровень содержания маркеров воспаления CD68, TNF- $\alpha$ . Эти данные хорошо коррелируют с результатами изучения динамики предраковых изменений желчных протоков и указывают на важную роль хронического воспаления в биологическом канцерогенезе. Кроме того, ранее было показано, что при инфекции *O. felineus* в тканях печени накапливается маркер альтернативно активированных макрофагов CD163. Вероятно, увеличение содержания этих клеток приводит к обнаруженному в наших экспериментах росту продукции TGF $\beta$ , активации миофибробластов и, соответственно, повышенной экспрессии  $\alpha$ -SMA. Суммарно это приводит к усиленному отложению коллагена 1 и фиброгенезу. Таким образом, в работе выявлены клеточные пути, вовлеченные в развитие предраковых изменений, индуцированных инфекцией *O. felineus*.

Кроме того, нами впервые было показано, что антиоксиданты ресвератрол и SkQ1 снижают степень воспаления и неоплазии эпителия желчных протоков при экспериментальном описторхозе. Полученные данные указывают, что ресвератрол и SkQ1 потенциально могут быть использованы в комплексной терапии описторхоза. Несмотря на то, что конкретные клеточные пути возникновения и развития предраковых патологических изменений при описторхозе все еще изучены недостаточно, данная работа показала, что окислительный стресс и окислительные повреждения биомолекул играют ключевую роль в формировании таких повреждений печени, как неоплазия эпителия желчных протоков, которая считается предраковым изменением.

## СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Альперович Б.И. Хирургические аспекты осложненного и сопутствующего хронического описторхоза / Б.И. Альперович, Н.А. Бражникова, В.Ф. Цхай, Н.В. Мерзликин, М.В. Толкаева, И.Ю. Клиновицкий – Федеральное агентство по здравоохранению и соц. развитию, Сибирский гос. мед. ун-т. – Томск: ТМЛ-Пресс, 2010. – 358 с.
2. Безр С. А. Биология возбудителя описторхоза. — М.: Т-во научных изданий КМК, 2005. — 336 с.
3. Бражникова Н.А. Гнойный описторхозный холангит / Бражникова Н.А., Цхай В.Ф. // *Анналы хирургической гепатологии*. – 2009. – Т. 14. – № 4. – С. 28-33.
4. Быков В.Л. Частная гистология человека (краткий обзорный курс). -2-е изд.-СПБ.: СОТИС, 1997. – 298 с.
5. Диунов А.Г. Медицинская паразитология / Диунов, А.Г., Жариков Г.П., Тихомирова С.В. // Учебное пособие. – Ярославль. – 2011. – С.50-54
6. Завойкин В.Д. Структура нозоареала описторхоза в Обь Иртышском бассейне / Завойкин В.Д., Дарченкова Н.Н., Зеля О.П. // *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. –1991. – № 6. - С. 25-28.
7. Зенков Н.К. Окислительный стресс. Биохимические и патофизиологические аспекты / Зенков Н.К., Лапкин В.З., Меньщикова Е.Б. // М.: Наука / Интерпериодика. – 2001. – С. 343.
8. Ильинских Е.Н. Инвазии *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884) и *Metorchis bilis* (Braun, 1890) у человека в различных регионах Обь-Иртышского речного бассейна / Ильинских Е. Н., Новицкий В. В., Ильинских Н. Н., Лепехин А. В. // *Паразитология*. – 2007. – Т. 41, № 1. – С. 55-64.
9. Камышнеков В.С. Клинико-лабораторная диагностика болезней печени // «Лабораторная диагностика. Восточная Европа». – 2016. –Т. 5. – № 1. –С. 150-163.
10. Карпенко С.В. Характеристика очагов описторхоза юга Западной Сибири / Карпенко С.В., Чечулин А.И., Юрлова Н.И., Сербина Е.А., Водяницкая С.Н., Кривопапов А.В., Федоров К.П. // *Сибирский экологический журнал*. – 2008. – № 5. – С. 675-680.

11. О распространении паразитов, передающихся через рыбу и рыбную продукцию в Российской Федерации 10.04.2018
12. Пельгунов А.Н. Проблемы описторхоза и дифиллоботриоза в нижнем течении Иртыша / Пельгунов А.Н. // Российский паразитологический журнал. – 2012. – № 3. – С. 68-73.
13. Пельгунов А.Н. Разработка новых методов обеззараживания рыб и рыбной продукции от метацеркарий *Opisthorchis felineus*, Rivolta, 1884 / А.Н. Пельгунов // Российский паразитологический журнал. – 2005. – № 3. – С. 80-85.
14. Сербина Е.А. Выявление очагов описторхоза в пойме реки Обь и в Новосибирском водохранилище. Сообщение 2. численность переднежаберных моллюсков и их зараженность партенитами трематод / Сербина Е.А. Бонина О.М. // Российский паразитологический журнал. – 2011. – № 4 – С. 55-59.
15. Цуканов В.В. Диагностика, клиника и лечение описторхоза / Цуканов В.В., Тонких Ю.Л., Гилюк А.В., Васютин А.В., Коленчукова О.А., Ржавичева О.С., Борисов А.Г., Савченко А.А., Масленникова Н.А. // Гастроэнтерология. – 2019. – Т. 163. – № 8. – С. 49-53.
16. Aggarwal V. Role of reactive oxygen species in cancer progression: molecular mechanisms and recent advancements / Aggarwal V., Tuli H.S., Varol A., Thakral F., Yerer M.B., Sak K., Varol M., Jain A., Khan M.A., Sethi G. // Biomolecules. – 2019. – Vol.2014. – № 9. –P. 31.
17. Aigner K. The transcription factor ZEB1 (deltaEF1) promotes tumour cell dedifferentiation by repressing master regulators of epithelial polarity / Aigner K., Dampier B., Descovich L., Mikula M., Sultan A., Schreiber M., Mikulits W., Brabletz T., Strand D., Obrist P., Sommergruber W., Schweifer N., Wernitznig A., Beug H., Foisner R., Eger A. // Oncogene. – 2007. – Vol. 26. –P. 6979–6988.
18. Antonenko Y.N. Mitochondriatargeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1.Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and in vitro studies / Antonenko Y.N., Avetisyan A.V., Bakeeva L.E., Chernyak B.V., Chertkov V.A., Domnina L.V., Ivanova O.Y., Izyumov D.S., Khailova L.S., Klishin S.S., Korshunova G.A., Lyamzaev K.G., Muntyan M.S., Nepryakhina O.K., Pashkovskaya A.A., Pletjushkina O.Y., Pustovidko A.V., Roginsky V.A., Rokitskaya T.I., Ruuge E.K., Saprunova V.B., Severina I.I., Simonyan, R.A., Skulachev, I.V., Skulachev, M.V.,

Sumbatyan, N.V., Sviryaeva I.V., Tashlitsky V.N., Vassiliev J.M., Vyssokikh M.Y., Yaguzhinsky L.S., Zamyatnin A.A., Skulachev V. P. // *Biochemistry*. – 2008. –Vol.73. – P.1273-1287.

19. Armignacco O. Cryptic and asymptomatic *Opisthorchis felinus* infections / Armignacco O., Ferri F., Gomez-Morales M.A., Caterini L., Pozio E. // *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. –2013. –Vol.88. –P.364–366.

20. Assi M. The differential role of reactive oxygen species in early and late stages of cancer // *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. – 2017. – Vol. 6. – № 313. – P.646–653.

21. Ayala A. Lipid Peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal / Ayala A., Muñoz M. F., Argüelles S. // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2014. – ID 360438, P.31.

22. Bakshtanovskaia I.B. Analysis of a complex of biochemical parameters of hepatic functions in opisthorchiasis / Bakshtanovskaia I.B., Stepanova T.F. // *Medical Parasitology*. –2005. –Vol.4. – P.18–21.

23. Baur J.A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence / Baur J.A., Sinclair D.A. // *Natural Reviews Drug Discovery*. – 2006. –Vol.5. – P.493–506.

24. Bility M.T. Chronic *Opisthorchis viverrini* infection and associated hepatobiliary disease is associated with iron loaded M2-like macrophages / Bility M.T., Sripa B. // *Korean Journal of Parasitology*. – 2014. – Vol. 6. – № 52 – P.695-699.

25. Birben E. Oxidative Stress and Antioxidant Defense / Birben E., Sahiner M.U., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. // *WAO Journal*. – 2012. – № 5. – P.9–19.

26. Bolger A.M. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data / Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. // *Bioinformatics*. – 2014. – Vol. 30 – P. 2114–2120.

27. Borthwick L.A. Cytokine mediated tissue fibrosis / Borthwick L.A., Wynn T.A., Fisher A.J. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* // 2013. – Vol. 1832. – I. 7. – P. 1049-1060.

28. Braga T.T. Macrophages during the fibrotic process: M2 as friend and foe / Braga T.T., Agudelo J.S., Camara N.O. // *Front Immunology*. – 2015. – Vol.6. – P.602.

29. Brindley P.J. Why does infection with some helminths cause cancer? / Brindley P.J., Correia da Costa J. M., Sripa B. // *Trends Cancer*. – 2015. –Vol.1. – № 3. – P.174–182.

30. Byles V. SIRT1 induces EMT by cooperating with EMT transcription factors and enhances prostate cancer cell migration and metastasis / Byles V., Zhu L., Lovaas J.D., Chmielewski L.K., Wang J., Faller D.V., Dai Y. // *Oncogene*. – 2012. – Vol. 31. – № 43. – P. 4619-4629.
31. Cadamuro M. The deleterious interplay between tumor epithelia and stroma in cholangiocarcinoma / Cadamuro M., Stecca T., Brivio S., Mariotti V., Fiorotto R., Spirli C., Strazzabosco M., Fabris L. // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2018. – Vol. 1864. – P. 1435–1443.
32. Campos G. Inflammation-associated suppression of metabolic gene networks in acute and chronic liver disease / Campos G., Schmidt-Heck W., De Smedt J., Widera A., Ghallab A., Pütter L. // *Archives of Toxicology*. – 2020. – Vol. 94. – P. 205–217.
33. Cavalieri E.L. Depurinating estrogen-DNA adducts in the etiology and prevention of breast and other human cancers / Cavalieri E.L., Rogan E.G. // *Future Oncology*. – 2010. – Vol. 6. – P. 75–91.
34. Chaiyadet S. Carcinogenic liver fluke secretes extracellular vesicles that promote cholangiocytes to adopt a tumorigenic phenotype / 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. // *Journal of Infection Diseases*. – 2015. – Vol. 212. – P. 1636–1645.
35. Chai J. Praziquantel Treatment in Trematode and Cestode Infections: An Update / J. Chai – 2013. – Vol. 45 – № 1 – P. 32–43.
36. Chao S-C. Induction of sirtuin-1 signaling by resveratrol induces human chondrosarcoma cell apoptosis and exhibits / Chao S-C., Chen Y-J., Huang K-H., Kuo K-L., Yang T-H., Huang K-Y., Wang C-C., Tang C-H., Yang R-S., Liu S-H. // *Scientific reports*. – 2017. – Vol. 7. – P. 3180
37. Chelombitko M. A. Comparative effects of mitochondria-targeted antioxidant *10-(6'-plastoquinonyl) dodecyltriphenylphosphonium bromide* and a fragment of its molecule dodecyltriphenylphosphonium on the carrageenan-induced acute inflammation using an air pouch model in mice / Chelombitko M. A., Averina O. A., Vasilieva T. V., Dvorianinova E. E., Egorov M. V., Pletjushkina O. Yu., Popova E. N., Fedorov A. V., Romashchenko V. P., Ilyinskaya O. P. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2017. – Vol. 162. – P. 730-733.

38. Chelombitko M.A. The role of reactive oxygen in mast cell degranulation / Chelombitko M.A., Fedorov, A.V., Ilyinskaya O.P., Zinovkin R.A., Chernyak B.V. // *Biochemistry*. –2016. – Vol.81. – P.1564-1577.
39. Chen J.S. Nrf-2 mediated heme oxygenase-1 expression, an antioxidant independent mechanism, contributes to anti-atherogenesis and vascular protective effects of Ginkgo biloba extract / Chen J.S., Huang P.H., Wang C.H., Lin F.Y., Tsai H.Y., Wu T.C., Lin S.J. Chen J.W. // *Atherosclerosis*.- 2011. – Vol. 214. –P. 301–309.
40. Cichoż-Lach H. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases / Cichoż-Lach H. Michalak A. // *World Journal of Gastroenterology*. – 2014. – Vol. 20. – P.8082–8091.
41. Correia da Costa J.M. Schistosome and liver fluke derived catechol-estrogens and helminth associated cancer / Correia da Costa J.M., Vale N., Gouveia M.J., Botelho M.C., Sripa B., Santos L.L., Santos J.H., Rinaldi G., Brindley P.J. // *Front Genetics*. – 2014. –Vol.5. –P.444–447.
42. Coussens L.M. Inflammation and cancer / Coussens L.M., Werb Z. // *Nature*. – 2002. – Vol. 420. – P.860–867.
43. Dannenmann B. High glutathione and glutathione peroxidase-2 levels mediate cell-type-specific DNA damage protection in human induced pluripotent stem cells / Dannenmann B. Lehle S, Hildebrand DG, Kübler A, Grondona P, Schmid V, Holzer K, Fröschl M, Essmann F, Rothfuss O, Schulze-Osthoff K. // *Stem Cell Reports*. – 2015. – Vol. 4. – № 5. – P.886-898.
44. Derkacz A. Molecular mechanisms of neoplasia / Derkacz A., Komosińska-Vassev K // *Annales Academiae Medicae Silesiensis*. - 2017. – Vol. 71. – eISSN 1734-025. –P. 225–245.
45. Dizdaroglu M. Mechanisms of free radicalinduced damage to DNA / Dizdaroglu M., Jaruga P. // *Free Radical Research*. – 2012. – Vol.46. –№ 4. – P.382–419.
46. Dongre A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer / Dongre A., Weinberg R.A. // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2019. –Vol. 2. – № 20. – P. 69-84.
47. Federico A. Chronic inflammation and oxidative stress in human carcinogenesis / Federico A., Morgillo F., Tuccillo C., Ciardiello F. Loguercio C. // *International Journal of Cancer*. – 2007. – № 121. – P. 2381–2386.

48. Fedorova O. S. *Opisthorchis felineus* infection, risks, and morbidity in rural Western Siberia, Russian Federation / Fedorova O.S., Fedotova M.M., Zvonareva O.I., Mazeina S.V., Kovshirina Y.V., Sokolova T. S., Golovach E.A., Kovshirina A.E., Konovalova U.V., Kolomeets I. L., Gutor S. S., Petrov V. A., Hattendorf J., Ogorodova L. M., Odermatt P. // PLoS Neglected Tropical Diseases. – 2020. – Vol.6. – № 14. – e0008421.
49. Field K.J., Sibold A.L. The Laboratory Hamster and Gerbil. - CRC Press, New York, 1998. – 168 p.
50. Fourcade S. Oxidative stress, mitochondrial and proteostasis malfunction in adrenoleukodystrophy: a paradigm for axonal degeneration / Fourcade S., Ferrer I., Pujol A. // Free Radical Biology and Medicine. – 2015. –Vol.88. – P.18–29.
51. Giannakou M.E. The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival / Giannakou M.E., Partridge L. // Trends of Cell Biology. – 2004. –Vol.8. – № 14. –P. 408-412.
52. Gibson-Corley K.N. Principles for valid histopathologic scoring in research / Gibson-Corley K.N., Olivier A.K., Meyerholz D.K. // Veterinary Pathology. – 2013. – № 50. – P.1007–1015.
53. Giorgi C. Redox control of protein kinase C: cell-and disease-specific aspects / Giorgi, C. Agnoletto C., Baldini C., Agnoletto C., Bononi A., Bonora M., Marchi S., Missirooli S., Patergnani S., Poletti F., Rimessi A., Zavan B., Pinton P. // Antioxidants and Redox Signaling. – 2010. – Vol.13. –№ 7. – P.1051–1085.
54. Gil L. Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes / Gil L., Siems W., Mazurek B., Gross J., Schroeder P, Voss P. Grune T. // Free Radical Research.-2006. – Vol.5. – № 40. – P. 495-505.
55. Guo S. Endogenous cholesterol ester hydroperoxides modulate cholesterol levels and inhibit cholesterol uptake in hepatocytes and macrophages / Guo S, Lu J, Zhuo Y, Xiao M, Xue X, Zhong S, Shen X, Yin C, Li L, Chen Q, Zhu M, Chen B, Zhao M, Zheng L, Tao Y, Yin H. // Redox Biology. – 2019. –Vol.21. – 101069.
56. Gouveia M.J. Infection with *Opisthorchis felineus* induces intraepithelial neoplasia of the biliary tract in a rodent model / Gouveia M.J., Pakharukova M.Y., Laha T., Sripa B., Maksimova G.A., Rinaldi G., Brindley P.J., Mordvinov V.A., Amaro T.,

Santos L.L., Correia da Costa J.M., Vale N. - Carcinogenesis. – 2017. – №.38. – P. 929-937.

57. Green S.L. Analysis of the canine Cu / Zn Superoxide Dismutase (SOD1) gene / Green S.L., Tolwani R.J., Varma S., Quignon P., Galibert F., Cork L.C., Zn C. // Journal of Heredity. – 2002. – P.119–124.

58. Guido M. Hepatic stellate cell immunodetection and cirrhotic evolution of viral hepatitis in liver allografts / Guido M., Rugge M., Leandro G., Fiel IM., Thung SN. // Hepatology. – 1997. – Vol.26. – P.310–314.

59. Halliwell B. The antioxidant paradox // Lancet. – 2000. – Vol. 355. – № 9210. – P. 1179-80.

60. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease // Annual Review of Nutrition. 1996. – Vol. 16. –P.33-50.

61. Harris N.L. Recent advances in type-2-cell-mediated immunity: Insights from helminth infection / Harris N.L., Loke P. // Immunity. - 2017.-Vol.47.-P.1024–1036.

62. Holtfreter M.C. *Schistosoma haematobium* infections acquired in Corsica, France, August // Euro Surveill. – 2014. – Vol.19. –№ 22. – P. 208-221.

63. Hong S.T. Albendazole and praziquantel: review and safety monitoring in Korea // Infection and Chemotherapy. – 2018. – Vol. 50. – P.1–10.

64. IARC, IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Biological agents. A review of human carcinogens. In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. – 2012. –100. –P.1–441.

65. Ighodaro O.M. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid / Ighodaro, O.M. Akinloye, O.A. // Alexandria Journal of Medicine. – 2018. – №54. – P. 287-293.

66. Jan J. Antioxidant mechanism of mitochondria-targeted plastoquinone SkQ1 is suppressed in aglycemic HepG2 cells dependent on oxidative phosphorylation / Jan J., Engstová H., Ježek P. // BBA – Bioenergetics. – 2017. – Vol.750. – P.751-762.

67. Jang M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes / Jang M., Cai L., Udeani G.O., Slowing K.V., Thomas C.F., Beecher C.W., Fong H.H., Farnsworth N.R., Kinghorn A.D., Mehta R.G. // Science. – 1997. – № 275. – P.218–220.

68. Ji Q. Resveratrol suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer through TGF- $\beta$ 1/Smads signaling pathway mediated Snail/E-cadherin expression / Ji Q., Liu X., Han Z., Zhou L., Sui H., Yan L., Jiang H., Ren J., Cai J., Li Q. // *BMC Cancer*. – 2015. – Vol.97. – № 15. – P.133-142.
69. Ji Q. Resveratrol inhibits invasion and metastasis of colorectal cancer cells via MALAT1 mediated Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway / Ji Q., Liu X., Fu X., Zhang L., Sui H., Zhou L., Sun J., Cai J., Qin J., Ren J., Li Q. // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol.8. – №.11.- e78700.
70. Jukaul A. Mechanisms of oxysterol-induced carcinogenesis / Jukaul A., Yongvanit P., Loilome W., Namwat N., Kuver R. // *Lipids in Health and Disease*. – 2011. – Vol. 10. – P. 44-48.
71. Jukaul A. Liver fluke-induced hepatic oxysterols stimulate DNA damage and apoptosis in cultured human cholangiocytes / Jusakul A., Loilome W., Namwat N., Haigh W.G., Kuver R., Dechakhamphu S. // *Mutation Research*. – 2012. – Vol.731. – P.48–57.
72. Kagan V.E. Mitochondrial targeting of electron scavenging antioxidants: Regulation of selective oxidation vs random chain reactions / Kagan V.E., Wipf P., Stoyanovsky D., Greenberger J.S., Borisenko G., Belikova N.A., Yanamala N., Samhan Arias A. K., Tungekar M. A., Jiang J., Tyurina Y.Y., Ji J., Klein-Seetharaman J., Pitt B.R., Shvedova A.A., Bayır H // *Adv Drug Deliv Rev*. – 2009. – Vol.61. – № 14. – P.1375–1385.
73. Kalluri R. The basics of epithelial–mesenchymal transition / Kalluri R., Weinberg R.A. // *Journal of Clinical Investigation*. – 2009. – Vol. 119. – P.1420–1428.
74. Kaneko T. Formation of 8-oxo-2'-deoxyguanosine in the DNA of human diploid fibroblasts by treatment with linoleic acid hydroperoxide and ferric ion / Kaneko T., Tahara S. // *Lipids*. – 2000. – Vol.35. – P.961–965.
75. Kawanishi S. Oxidative and nitrate DNA damage as biomarker for carcinogenesis with special reference to inflammation / Kawanishi S., Hiraku Y. // *Antioxidant and Redox Signaling*. – 2006. – Vol.8. – P.1047–1058.
76. Keiser J. Food-borne trematodiasis / Keiser J., Utzinger J. // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2009. – Vol.22. – № 3. – P.466-483.

77. Kim D. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements / Kim D., Landmead B., Salzberg S.L. // *Nature Methods*. – 2015. – Vol. 12. –357–U121.
78. Kim H.-S. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3- gallate / Kim H.-S., Quon M. J., Kim J.-A. // *Redox Biology*. – 2014. – Vol. 2. – № 1. –P. 187–195.
79. King S. Trematodes of the family Opisthorchiidae: a minireview / King S., Scholz T. // *Korean journal of parasitology*. – 2001. – Vol. 39. – № 3. – P. 209–221.
80. Ko J.H. The Role of Resveratrol in Cancer Therapy / Ko JH., Sethi G., Um JY., Shanmugam MK., Arfuso F., Kumar AP., Bishayee A., Ahn KS. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – Vol.18. – № 12. – P. 25-89.
81. Kovner A.V. Characteristics of liver fibrosis associated with chronic *Opisthorchis felineus* infection in Syrian hamsters and humans / Kovner A.V., Pakharukova M.Y., Maksimova G.A., Mordvinov V.A. // *Experimental and Molecular Pathology*. – 2019. – Vol. 110. - № 104274.
82. Kuleshov M.V. / Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update / Kuleshov M.V., Jones M.R., Rouillard A.D., Fernandez N.F., Duan Q., Wang Z. // *Nucleic Acids Research*. – 2016. – Vol. 44. – P. 90–97.
83. Kume S. Silent information regulator 2 (SIRT1) attenuates oxidative stress-induced mesangial cell apoptosis via p53 deacetylation / Kume S., Haneda M., Kanasaki K., Sugimoto T., Araki S., Isono M., Isshiki K., Uzu T., Kashiwagi A., Koya D. // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2006. –Vol. 12. – № 40. –P. 2175 - 2182.
84. Kuver R. Mechanisms of oxysterol-induced disease: insight from the biliary system // *Clinical Lipidology*. – 2012. – Vol.7. – P.537–548.
85. Li S. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases / Li S., Tan HY., Wang N., Zhang ZJ., Lao L., Wong CW., Feng Y. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2015. –Vol. 16. – № 11. – P.260-287.
86. Li S. Insights into the Role and Interdependence of Oxidative Stress and Inflammation in Liver Diseases / Li S., Ming H., Hor-Yue T., NingW., Yibin F. // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2016. – Article ID 4234061. – P. 21.
87. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. – Anthelmintic Agents. 2021.

88. Love M.I. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 / Love M.I., Huber W., Anders S. // *Genome Biology*. – 2014. – № 15. – P.550-571.
89. Low I. C. C. Bcl-2: a prime regulator of mitochondrial redox metabolism in cancer cells / Low I. C. C., Kang J., Pervaiz S. // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2011. Vol. 15. – № 12. P. 2975–2987.
90. Lvova M.N. Comparative histopathology of *Opisthorchis felineus* and *Opisthorchis viverrini* in a hamster model: an implication of high pathogenicity of the European liver fluke / Lvova M.N., Tangkawattana S., Balthaisong S., Katokhin A.V., Mordvinov V.A., Sripa B. // *Parasitology International*. – 2012. – Vol. 61. – P.167–172.
91. Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity // *Annual Review Pharmacology Toxicology*. – 2013. – № 53. – P. 401-426.
92. Maeng S. Oxidative stress-mediated mouse liver lesions caused by *Clonorchis sinensis* infection / Maeng S., Lee H.W., Bashir Q., Kim T.I., Hong S.J., Lee T.J. // *International Journal for Parasitology*. – 2016. –Vol.46. – P.195–204.
93. Mahmood S. Immunohistochemical evaluation of oxidative stress markers in chronic hepatitis C / Mahmood S., Kawanaka M., Kamei A., Izumi A., Nakata K., Niiyama G. // *Antioxidant Redox Signaling*. – 2004. –Vol.6. – P.19–24.
94. Maksimova G.A. Effect of *Opisthorchis felineus* infection and dimethylnitrosamine administration on the induction of cholangiocarcinoma in Syrian hamsters / 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. // *Parasitology International*. – 2017. – Vol. 66. –№ 4. – P. 458-463.
95. Margis R. Glutathione peroxidase family – an evolutionary overview / Margis R., Dunand C., Teixeira F.K., Margis-Pinheiro M. // *FEBS Journal*. – 2008. – P. 3959–3970.
96. McMachon M. Keap1-Dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant responsw element-driven / McMachon M., Itoh K., Yamamoto M., Hayes J.D. // *Gene Expression – Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – № 278. – P. 21592-21600.

97. Mi H. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system / Mi H., Muruganujan A., Casagrande J.T., Thomas P.D. // Nat Protoc. – 2013 – Vol. 8. – P. 1551–1566.
98. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance // Trends Plant Sciences. – 2002. – № 7. – P.405–410.
99. Mordvinov V.A. Anthelmintic activity of cytochrome P450 inhibitors miconazole and clotrimazole: in-vitro effect on the liver fluke *Opisthorchis felineus* / Mordvinov V.A., Shilov A.G., Pakharukova M.Y. // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2017. – № 50. – P. 97–100.
100. Mordvinov V.A. Anthelmintic Activity of Antioxidants: In Vitro Effects on the Liver Fluke *Opisthorchis felineus* / Mordvinov V.A., Ponomarev D.V., Pakharukov Y.V., Pakharukova M.Y. // Pathogens. – 2021. – Vol.10. – № 3. – P. 284- 294.
101. Motorna O.O. Analysis of lacI mutations in Big Blue transgenic mice subjected to parasite-induced inflammation / Motorna O.O., Martin H., Gentile G.J., Gentile J.M. // Mutation Research. - 2001. – Vol.484. – P.69–76.
102. Murata M. Inflammation and cancer // Environmental Health and Preventive Medicine. – 2018. – Vol.23. – № 1. – P.50.
103. Murray P.J. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets / Murray P.J., Wynn N.A. // Nature Reviews Immunology. – 2011. – № 11. – P.723-737.
104. Nadif R. Association of CAT polymorphisms with catalase activity and exposure to environmental oxidative stimuli / Nadif R., Mintz M., Jedlicka A., Bertrand J.P., Kleeberger S.R., Kauffmann F. // Free Radical Research. – 2005. – № 39. – P. 1345–1350.
105. Nazarov P. A. Mitochondria-targeted antioxidants as highly effective antibiotics / Nazarov P.A., Osterman I.A., Tokarchuk A.V., Karakozova M.V., Korshunova Galina A., Lyamzaev K.G., Skulachev M.V., Kotova E.A., Skulachev V.P., Antonenko Y.N. // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – № 1. - P.1394.
106. Nichelle C. The anticancer effects of resveratrol – Modulation of transcription factors / Nichelle C., Whitlock J.B., Seung J.B. // Nutrition and Cancer. - 2012. – Vol.4. – № 64. – P. 493–502.
107. Nicholls P. Classical catalase: ancient and modern // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2012. –Vol.252. – № 2. – P.95-101.

108. Ninlawan K. *Opisthorchis viverrini* excretory/secretory products induce toll-like receptor 4 upregulation and production of interleukin 6 and 8 in cholangiocyte / Ninlawan K., O'Hara SP., Splinter PL., Yongvanit P., Kaewkes S., Surapaitoon A., LaRusso NF., Sripa B. // *Parasitology International*. – 2010. – Vol. 4. – № 59. – P.616-621.
109. Ohnishi S. DNA damage in inflammation-related carcinogenesis and cancer stem cells / Ohnishi S., Ma N., Thanan R., Pinlaor S., Hammam O., Murata M., Kawanishi S. // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2013. – article ID 387014.
110. Pakharukova M.Y. *Opisthorchis felineus* infection provokes time-dependent accumulation of oxidative hepatobiliary lesions in the injured hamster liver Pakharukova M.Y., Zaparina O.G., Kapushchak Y.K., Baginskaya N.V., Mordvinov // *PLOS One*. – 2019. – Vol.5. – № 14. – P.1-14.
111. Pakharukova M.Y. The liver fluke *Opisthorchis felineus* as a group III or group I Carcinogen / Pakharukova M.Y. Correia da Costa J.M., Mordvinov V.A. // *4OPEN*. 2019c. – 2:23. doi:10.1051/fopen/2019016 (a)
112. Pakharukova M.Y. Mechanisms of trematodiasis pathogenicity: The presence of the secretory proteins from the liver fluke *Opisthorchis felineus* in the gallbladder tissues of the patients with chronic opisthorchiasis / Pakharukova M.Y., Kovner A.V., Trigolubov A.N., Fedin E.N., Mikhailova E.S., Shtofin S.G. // *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii*. – 2017. – Vol.21. – P.312–316.
113. Pakharukova M.Y. The liver fluke *Opisthorchis felineus*: biology, epidemiology and carcinogenic potential / Pakharukova, M.Y., Mordvinov, V.A. // *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. – 2016. – № 110. – P. 28–36.
114. Pakharukova M.Y. The first comprehensive study of praziquantel effects in vivo and in vitro on European liver fluke *Opisthorchis felineus* (Trematoda) / Pakharukova M.Y., Shilov A.G., Pirozhkova D.S., Katokhin A.V., Mordvinov V.A. // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2015. – Vol.1. – № 46. – P. 94–100.
115. Pakharukova M.Y. Similarities and differences among the Opisthorchiidae liver flukes: insights from *Opisthorchis felineus* / Pakharukova MY., Mordvinov VA. // *Parasitology*. – 2022. –P.1–13.
116. Pakharukova M.Y., Inhibition of *Opisthorchis felineus* glutathione-dependent prostaglandin synthase by resveratrol correlates with attenuation of

cholangiocyte neoplasia in a hamster model of opisthorchiasis Pakharukova M.Y., Zaparina O.G., Kovner A.V., Mordvinov V.A. // International Journal of Parasitology.- 2019a. – Vol.49 – № 12. – P. 963-973.

117. Pakharukova M.Y., Zaparina O.G., Kapushchak Y.K., Baginskaya N.V., Mordvinov V.A. *Opisthorchis felinus* infection provokes time-dependent accumulation of oxidative hepatobiliary lesions in the injured hamster liver // PLoS ONE. – 2019. –Vol.5 – № 14 – P.1-14

118. Pakharukova MY, Correia da Costa JM and Mordvinov VA. The liver fluke *Opisthorchis felinus* as a group III or group I Carcinogen. 4OPEN. 2019b; 2:23. doi:10.1051/fopen/2019016

119. Pakharukova M.Y. Effects of miconazole / clotrimazole and praziquantel combinations against the liver fluke *Opisthorchis felinus* in vivo and in vitro / M. Y. Pakharukova – 2018. – P.2327–2331.

120. Papoutsoglou P. Transforming Growth Factor-Beta (TGFβ) Signaling Pathway in Cholangiocarcinoma // Papoutsoglou P., Louis C., Coulouarn C. // Cells. – 2019. – Vol. 8 – № 9. – P. 960-977.

121. Pastushenko I. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis / Pastushenko I., Blanpain C. // Trends in Cell Biology. – 2019. – Vol. 29. – I. 3. – P.212-226.

122. Peter V. U. Redox regulation of 4-hydroxy-2-nonenal-mediated endothelial barrier dysfunction by focal adhesion, adherens, and tight junction proteins / Peter V.U., Narasimham P.L., Natarajan V. // Journal of biological chemistry. – 2006. – Vol.281. –№ 46. – P.556-566.

123. Petney T.N. The zoonotic, fish-borne liver flukes *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis felinus* and *Opisthorchis viverrini* / Petney T.N., Andrews R.H., Saijuntha W., Wenz-Mücke A., Sithithaworn P. // International Journal of Parasitology. – 2013. – Vol.43. – P.1031–1046.

124. Petrenko V.A. Secretion of thioredoxin peroxidase protein of cat liver fluke *Opisthorchis felinus* during modeling of experimental opisthorchiasis / Petrenko V.A., Pakharukova M.Y., Kovner A.V., Lvova M.N., Lyakhovich V.V., Mordvinov, V.A. // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2017. – № 162. – P.773–776.

125. Pertea M. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown / Pertea M., Kim D., Pertea G., Leek J.T., Salzberg S.L. // Nature Protocols. – 2016. – Vol.11. – P. 1650–1667.
126. Petrou A. L. A Possible Role for Singlet Oxygen in the Degradation of Various Antioxidants. A Meta-Analysis and Review of Literature Data / Petrou A. L., Petrou P.L., Ntanos T., Liapis A. A. // Antioxidants 2018. – № 7. – P.35.
127. Pinlaor S. Oxidative and Nitrative Stress in *Opisthorchis viverrini*-Infected Hamsters: An Indirect Effect after Praziquantel Treatment / Pinlaor S., Prakobwong S., Hiraku Y., Kaewsamut B., Dechakhamphu S., Boonmars T., Sithithaworn P., Pinlaor P., Ma N., Yongvanit P., Kawanishi S. // American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. – 2008. – №78. –Vol.4. – P.564–573.
128. Pozio E. *Opisthorchis felinus*, an emerging infection in Italy and its implication for the European Union / Pozio E., Armignacco O., Ferri F., Gomez Morales M.A. // Acta Tropica. – 2013. – Vol.1. – № 126. – P.54-62.
129. Qiao Y. Hepatocellular iNOS protects liver from NASH through Nrf2-dependent activation of HO-1 / Qiao Y., Li X., Zhang X., Xiao F., Zhu Y., Fang Z., Sun J. // Biochemical and Biophysical Research Communication. – 2019. –Vol. 2. – № 514. – P.372-378.
130. Robinson M.W. A helminth cathelicidin-like protein suppresses antigen processing and presentation in macrophages via inhibition of lysosomal vATPase / Robinson M.W., Alvarado R.T.J., Hutchinson A.T., Dowdell S.N., Lund M., Turnbull L., Whitchurch C.B., O'Brien B.A., Dalton J.P., Donnelly S. // FASEB Journal. – 2012. – Vol.26. – №.11. – P.4614-4627.
131. Rosa A.C. Superoxide Dismutase Administration: A Review of Proposed Human Uses / Rosa A.C., Corsi D., Cavi N., Bruni N., Dosio F. // Molecules. – 2021. - Vol.7. – № 26. –P. 1844-1884.
132. Roy S. Inflammation and Progression of Cholangiocarcinoma: Role of Angiogenic and Lymphangiogenic Mechanisms / Roy S., Glaser S., Chakraborty S. // Front Med (Lausanne). – 2019. –Vol. 6. – No 293.
133. Ryan S. *Fasciola hepatica*-Derived Molecules as Regulators of the Host Immune Response. Ryan S., Shiels J., Taggart C.C., Dalton J.P., Weldon S. // Frontiers in Immunology. – 2020. – Vol.11. –2182.

134. Sanchez-Valle V. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: A review / Sanchez-Valle V., Chavez-Tapia N.C., Uribe M., Mendez-Sanchez N. // *Current Medicinal Chemistry*. – 2012. – № 19. – P.4850–4860.
135. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants // *Experimental Physiology*. – 1997. – Vol. 2. – № 82. – P. 291-295.
136. Singal A.K. Antioxidants as therapeutic agents for liver disease / Singal A.K., Jampana S.C., Weinman S.A. // *Liver International*. – 2011. – № 3. – P. 1432–1448.
137. Skulachev M.V. Mitochondrial-targeted plastoquinone derivatives. Effect on senescence and acute age-related pathologies / Skulachev M.V., Antonenko Y.N., Anisimov V.N., Chernyak B.V., Cherepanov D.A., Chistyakov V.A., Egorov M.V., Kolosova N.G., Korshunova G.A., Lyamzaev K.G., Plotnikov E.Y., Roginsky V.A., Savchenko A.Y., Severina I.I., Severin F.F., Shkurat T.P., Tashlitsky V.N., Shidlovsky K.M., Vyssokikh M.Y., Zamyatnin Jr. A.A., Zorov D.B., Skulachev V.P. // *Current Drug Targets*. – 2011. – № 12. – P.26.
138. Skulachev V.P. An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach / Skulachev V.P., Anisimov V.N., Antonenko Y.N., Bakeeva L.E., Chernyak B.V., Elichev V.P., Filenko O.F., Kalinina N.I., Kapelko V.I., Kolosova N.G., Kopnin B.P., Korshunova G.A., Lichinitser M.R., Obukhova L.A., Pasyukova E.G., Pisarenko O.I., Roginsky V.A., Ruuge E.K., Senin I.I., Severina I.I., Skulachev M.V., Spivak I.M., Tashlitsky V.N., Tkachuk V.A., Vyssokikh M.Y., Yaguzhinsky L.S., Zorov D.B. // *Biochimica Biophysica Acta*. – 2009. – Vol. 5. – I.1787. – P.437-461.
139. Smout M.J. Carcinogenic parasite secretes growth factor that accelerates wound healing and potentially promotes neoplasia / Smout M.J., Sotillo J., Laha T., Papatpremsiri A., Rinaldi G., Pimenta R.N. // *PLoS Pathogens*. –2015. –Vol. 11. – e1005209.
140. Song L.J. Oxadiazole-2-oxides may have other functional targets, in addition to SjtGR, through which they cause mortality in *Schistosoma japonicum* / Song L.J., Luo H., Fan W.H., Wang G.P., Yin X.R., Shen S., Wang J., Jin Y., Zhang W., Gao H. // *Parasites and Vectors*. – 2016. –Vol.9. – № 26. – P.1-12.
141. Sripa B. Food-borne trematodiasis in Southeast Asia epidemiology, pathology, clinical manifestation and control / Sripa B., Kaewkes S., Intapan P.M., Maleewong W., Brindley P.J.// *Advanced Parasitology*. – 2010. – Vol. 72. – P. 305-350.

142. Sripa B. Liver Fluke Induces Cholangiocarcinoma / Sripa B., Kaewkes S., Sithithaworn P., Mairiang E., Laha T., Smout M., Loukas A. // PLoS Med. – 2007. – I. 4. – P.201.
143. Sripa B. Update on pathogenesis of opisthorchiasis and cholangiocarcinoma / Sripa B., Tangkawattana S., Brindley P.J. // Advanced Parasitology. – 2018a. –V.102. – P.97–113.
144. Sripa B. Immune Response to *Opisthorchis viverrini* Infection and Its Role in Pathology / Sripa B., Jumnainsong A., Tangkawattana S., Haswell MR. // Advances in Parasitology. –2018. – Vol. 102. –P. 73-95.
145. Sripa B. The tumorigenic liver fluke *Opisthorchis viverrini*--multiple pathways to cancer / Sripa B., Brindley P.J., Mulvenna J., Laha T., Smout M.J., Mairiang E., Bethony J.M., Loukas A. // Trends in Parasitology. – 2012. –Vol. 10. – № 28. – P. 395-407.
146. Valavanidis A. 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis / Valavanidis A., Vlachogianni T., Fiotakis C. // Journal Environmental Science Health C Environmental Carcinogenesis Ecotoxicology Reviews. – 2009. – Vol.27. –I.2. – P.120-139.
147. Vale N. Carcinogenic liver fluke *Opisthorchis viverrini* oxysterols detected by LC-MS/MS survey of soluble fraction parasite extract / Vale N., Gouveia M.J., Botelho M., Sripa B., Suttiprapa S., Rinaldi G., Gomes P., Brindley P.J.,Correia da Costa J.M. Parasitology international. – 2013. –Vol.6. – № 62. – P. 535–542.
148. Vale N. Oxysterols of helminth parasites and pathogenesis of foodborne hepatic trematodiasis caused by *Opisthorchis* and *Fasciola* species / Vale N., Gouveia M.J., Gärtner F., Brindley P.J. // Parasitology Research. – 2020. –Vol. 5. – № 119. – P.1443-1453.
149. Valko M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer / Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. // Chemico-Biological Interactions. – 2006. – Vol. 160. – I. 1. –P. 1-40.
150. Van Hoosier, G.L. Academic Press McPherson / Van Hoosier G.L., Orlando C.W. // Laboratory Hamsters/ - 1987.- 400p.
151. Vnukov V.V. Influence of SkQ1 on Expression of Nrf2 Gene, ARE-Controlled Genes of Antioxidant Enzymes and Their Activity in Rat Blood Leukocytes under Oxidative Stress / Vnukov V.V., Gutsenko O.I., Milutina N.P., Kornienko I.V.,

Ananyan A.A., Danilenko A.O., Panina S.B., Plotnikov A.A., Makarenko M.S. // *Biochemistry*. – 2015. – Vol. 12. – № 80. – P. 1598-1605.

152. Wang N. The dynamics of select cellular responses and cytokine expression profiles in mice infected with juvenile *Clonorchis sinensis* // Wang N., Bai X., Jin X., Tang B., Yang Y., Sun Q., Li S., Wang C., Chang Q., Liu M., Liu X. // *Acta Tropica*. – 2021. – Vol. 217. – 105852.

153. Wang G. Resveratrol ameliorates rheumatoid arthritis via activation of SIRT1-Nrf2 signaling pathway / Wang G., Xie X., Yuan L., Qiu J., Duan W., Xu B., Chen X. // *Biofactors*. – 2020. – Vol. 3. – № 46. – P. 441-453.

154. Wei Y. The Role of SkQ1 (Visomitin) in Inflammation and Wound Healing of the Ocular Surface / Wei Y., Troger A., Spahiu V., Perekhvatova N., Skulachev M., Petrov A., Chernyak B., Asbell P. // *Ophthalmol Ther*. – 2019. – Vol. 8. – P. 63-73.

155. Wonkchalee O. *Opisthorchis viverrini* infection causes liver and biliary cirrhosis in gerbils / Wonkchalee O., Boonmars T., Kaewkes S., Chamgramol Y., Pairojkul C., Wu Z., Juasook A., Sudsarn P., Boonjaraspinyo S. // *Parasitology Research*. – 2011. – Vol. 109. – P. 545–551.

156. World Health Organization, 1995. Control of Foodborne Trematode Infections: Report of a WHO Study Group. World Health Organization.

157. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis // *Journal of Pathology*. – 2008. – Vol. 214. – P. 199–210.

158. Xiao Z. Resveratrol attenuates renal injury and fibrosis by inhibiting transforming growth factor- $\beta$  pathway on matrix metalloproteinase 7 / Xiao Z., Chen C., Meng T., Zhang W., Zhou Q. // *Experimental Biology and Medicine*. – 2016. – Vol. 241. – P. 140–146.

159. Yazdani S. Drug targeting to myofibroblasts: Implications for fibrosis and cancer / Yazdani S., Bansal R., Prakash J. // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2017. – Vol. 121. – P. 101–116.

160. Yongvanit P. Oxidative and nitrative DNA damage: key events in opisthorchiasis-induced carcinogenesis / Yongvanit P., Pinlaor S., Bartsch H. // *Parasitology International*. – 2012. – Vol. 61. – P. 130–135.

161. Zakhid M. Prevention of estrogen-DNA adduct formation in MCF-10F cells by resveratrol / Zahid M., Gaikwad N.W., Ali M.F., Lu F., Saeed M., Yang L, Rogan E.G., Cavalieri E.L. // *Free Radical Boilogy and Medicine*. – 2008. –Vol.45. – P.136–145.

162. Zen Y. Biliary intraepithelial neoplasia: an international interobserver agreement study and proposal for diagnostic criteria / Zen Y., Adsay N.V., Bardadin K., Colombari R., Ferrell L., Haga H., Hong S.M., Hytiroglou P., Klöppel G., Lauwers G.Y., van Leeuwen D.J., Notohara K., Oshima K., Quaglia A., Sasaki M., Sessa F., Suriawinata A., Tsui W., Atomi Y., Nakanuma Y. // *Modern Pathology*. –2007. –Vol.20. – P.701–709.

163. Zhang J. ROS and ROS-Mediated cellular signaling / Zhang J., Wang X., Vikash V., Ye Q., Wu D., Liu Y., Dong W. // *Oxidative Medicine Cell Longevity*. – 2016. – eID.4350965.

164. Zhang Y. Nrf2-Keap1 pathway-mediated effects of resveratrol on oxidative stress and apoptosis in hydrogen peroxide-treated rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes / Zhang Y., Wang G., Wang T., Cao W., Zhang L., Chen X. // *Annals of New York Academy of Sciences*. – 2019. –I.1457. – P. 166–178.

165. Zhang Y. Resveratrol improves hepatic steatosis by inducing autophagy through the cAMP signaling pathway / Zhang Y., Chen M.L., Zhou Y., Yi L., Gao Y.X., Ran L., Chen S., Zhang T., Zhou X., Zou D., Wu B., Wu Y., Chang H., Zhu J., Zhang Q-y., Mi M. // *Molecular Nutrition Food Research*. – 2015. –Vol. 8. – № 59. –P. 1443-1457.

166. Zheng Y. The Hippo Signaling Pathway in Development and Disease / Zheng Y., Pan D. // *Development Cell*. – 2019. – Vol. 3. – № 50. – P. 264-282.

167. Ziech D. Reactive oxygen species (ROS)-induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis / Ziech D., Franco R., Pappa A., Panayiotidis M.I. *Mutation Research*. – 2011. –Vol.711. – I.1–2. – P.167–173.

168. Zwang J. Efficacy and safety of praziquantel 40mg/kg in preschoolaged and school-aged children: a meta-analysis / Zwang J., Olliaro P. // *Parasites and Vectors*. – 2017. –10, 47.

169. Zuo L. Inflammaging and Oxidative Stress in Human Diseases: From Molecular Mechanisms to Novel Treatments / Zuo L., Prather E.R., Stetskiv M., Garrison D.E., Meade J.R., Peace T.I., Zhou T. // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2019. –Vol. 18. – № 20. P.4472 - 4511.