

*На правах рукописи*

ЗАПАРИНА ОКСАНА ГЕННАДЬЕВНА

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

1.5.22. - клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2023

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

**Научный руководитель:** **Пахарукова Мария Юрьевна** д.б.н., в.н.с.  
лаборатории молекулярных механизмов патологических процессов «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН», г. Новосибирск

**Официальные оппоненты:** **Кутырев Иван Александрович** д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории паразитологии и экологии гидробионтов «Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН»; профессор кафедры зоологии, факультета биологии, географии и землепользования БГУ, г. Улан-Удэ

**Дымова Майя Александровна** к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», г. Новосибирск

**Ведущее учреждение:** ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово

Защита диссертации состоится «22» марта 2023г. на утреннем заседании диссертационного совета 24.1.239.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», в конференцзале Института по адресу: пр. академика Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090, тел.: (383) 363-49-06 (1321); факс: (383) 333-12-78;

e-mail: [dissov@bionet.nsc.ru](mailto:dissov@bionet.nsc.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте института [www.icgbio.ru](http://www.icgbio.ru).

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2023г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Хлебодарова Т.М.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**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). 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 эпителия, характеризующаяся многослойностью, атипичной морфологией, нарушением связей клеток с базальной мембраной, считается преинвазивным изменением. Родственные виды семейства Opisthorchiidae *O. viverrini* (Poirier, 1886) и *C. sinensis* (Loos, 1907) признаны биологическими канцерогенами и основными факторами развития рака эпителия желчных протоков в эндемичных регионах Юго-Восточной Азии (Sripa et al., 2007). В настоящее время недостаточно данных, подтверждающих канцерогенность *O. felineus* для человека. Более того, молекулярные механизмы и клеточные пути, ведущие к развитию неоплазии эпителия желчных протоков при инфицировании печеночными сосальщиками также неизвестны.

Принято считать, что ключевую роль в генерации осложнений при трематодозах играют механическое повреждение клеток двуустками; действие активных форм кислорода, генерируемых иммунными клетками хозяина; влияние экскреторно-секреторного продукта гельминта, в состав которого входят белки и низкомолекулярные метаболиты холестерина (Gouviea et al., 2017), которые, по-видимому, обладают провоспалительными и генотоксичными свойствами. Накопление мутаций приводит к неоплазии клеток эпителия. Однако прямых доказательств наличия взаимосвязи продукции активных форм кислорода в клетках печени и неоплазии холангиоцитов не показано.

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. В работе было решено провести ингибиторный анализ с помощью двух антиоксидантов с разным механизмом действия. Митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1(-10-(6'-Plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium) способен нейтрализовать свободные радикалы в митохондриях (Skulachev et al., 2009). Природный полифенол ресвератрол обладает плеiotропной активностью, способен снижать образование оксистеролов и ДНК-аддуктов (Cavalieri and Rogan, 2010).

### **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. felineus* хомячков через 1 и 3 месяца инфекции с помощью анализа транскриптома печени.
3. Провести функциональный анализ дифференциально экспрессирующихся генов в печени инфицированных *O. felineus* 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. felineus*. Впервые показана взаимосвязь между маркерами окислительного стресса в тканях печени и выраженностью неоплазии холангиоцитов у

сирийских хомячков при инфекции *O. felineus*. 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. felineus* 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 представлены в печени инфицированных животных среди дифференциально-экспрессирующихся генов.

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

**Теоретическая и практическая значимость.** Результаты данной работы расширяют представления о механизмах взаимоотношений в системе “паразит-хозяин” при описторхозе, вызванном *O. felineus*, в том числе в области изучения молекулярных механизмов ранних событий биологического канцерогенеза при инфицировании паразитическими организмами.

В ходе исследования 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. Пономарёвым Д.В.

**Апробация результатов.** Результаты работы представлены на VI Съезде Паразитологического общества РАН (Санкт-Петербург, 2018 г.); 11-ой Международной мультikonференции «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology» BGRS/SB-2018 (Новосибирск, 2018 г.); «NTDASIA International research network» (Таиланд, г. Кхон Каен, 2019 г.); VI-ой межрегиональной научной конференции «Паразитологические исследования в Сибири и на Дальнем Востоке» (Новосибирск, 2019 г.); VII-ой Молодёжной школе-конференции по молекулярной и клеточной биологии (Санкт-Петербург, 2020 г.); 29th Annual Meeting of the German Society for Parasitology (Германия, г. Бонн, 2021 г.).

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Глава 1. Обзор литературы

В разделе 1.1. описана актуальность и основные проблемы описторхоза, включая сложный жизненный цикл описторхид и эпидемиологию заболевания. Раздел 1.2. посвящен структурно-функциональным изменениям в печени при описторхозе. Основное внимание уделено морфологическим изменениям, роли молекулярных механизмов и метаболитов в структурно-функциональных изменениях в печени, характерных для инфекции *O. felineus*. В разделе 1.3. рассмотрены основные понятия об окислительном стрессе, активных формах кислорода и системе антиоксидантной защиты организма, а также роли активных форм кислорода в повреждении биомолекул, неспецифическом иммунитете при воспалении. В разделе 1.4. описаны антиоксиданты природного и синтетического происхождения. В конце данной главы сделано заключение о необходимости изучения роли окислительного стресса в различных структурно-функциональных изменениях печени при описторхозе, в частности роли активных форм кислорода в развитии воспаления и неоплазии эпителия желчных протоков.

### Глава 2. Материалы и методы

Метацеркарии *Opisthorchis felineus* были выделены из подкожных мышечных тканей зараженных рыб семейства карповых (язь) из р. Обь. Сирийские хомячки (*Mesocricetus auratus*) (аутбредная линия) были получены из вивария конвенциональных животных Института Цитологии и Генетики СО РАН. Хомячки в

возрасте 6-8 недель были распределены в группы по 5 животных и перорально заражены 75-метацеркариями для всех сроков эксперимента от 1 до 18 месяцев. Протокол экспериментальных работ с животными был одобрен этической комиссией ИЦиГ СО РАН (Протокол №42 от 25.05.2018). Антиоксиданты на фоне хронического и острого описторхоза применяли в концентрации 1 мг/кг для ресвератрола и 1 микромоль /кг для SkQ1 ежедневно, в течение 1 и 3 месяцев. Через 1 месяц инфекции 4 группы животных однократно пролечили празиквантелом в дозе 400 мг/кг и вывели из эксперимента спустя неделю.

РНК из печени выделяли с помощью набора Aurum<sup>TM</sup> Total RNA Mini Kit (Bio-Rad, США). ДНК-библиотеки были подготовлены с помощью набора NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit, проанализированы с помощью Agilent Bioanalyzer, и просеквенированы (2 × 150 п.о.) на платформе Illumina HiSeq 2500 (Genewiz LLC, USA). Полученные данные (~37 миллионов прочтений на каждую ДНК-библиотеку) были выравнены на геном хомячка *M. auratus* GCF\_000349665.1\_MesAur1.0 с помощью HISAT2 2.1.0 (Kim et al., 2015; Pertea et al., 2016). Затем данные были преобразованы в таблицы количества прочтений с помощью StringTie 1.3.6. Гены с числом каунтов не менее 10 подвергали анализу дифференциальной экспрессии генов с помощью R-пакета DESeq2 (Love et al., 2014). Гены со скорректированным значением  $P_{adj} < 0,1$  (поправка Бенджамини-Хохберга) считали дифференциально-экспрессирующимися генами (ДЭГ). Функциональную аннотацию ДЭГ проводили с помощью баз данных KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) и GO (Gene Ontology) (Mi et al., 2013).

Экспрессию генов оценивали методом ОТ-ПЦР с детекцией в режиме «реального времени» (CFX96, Bio-Rad, США). кДНК получали с помощью набора RevertAid<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kits (ThermoScientific, США). Содержание белков оценивали с помощью Вестерн блот анализа лизатов печени, с последующей денситометрией (Quantity One, Bio-Rad, США) и иммуногистохимического окрашивания криосрезов. Структурные изменения в печени оценивали с помощью полуколичественного гистологического анализа срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону (Biovitrum, Россия), методом ШИК-реакции (Labiko LLC, Россия). Готовые препараты исследовали под световым микроскопом Axioskop 2 Plus (Zeiss, Германия). Полуколичественный анализ проводили с помощью программы



ImageJ. Уровень 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина в моче измеряли с использованием набора 8-OHdG ELISA (Abcam, США).

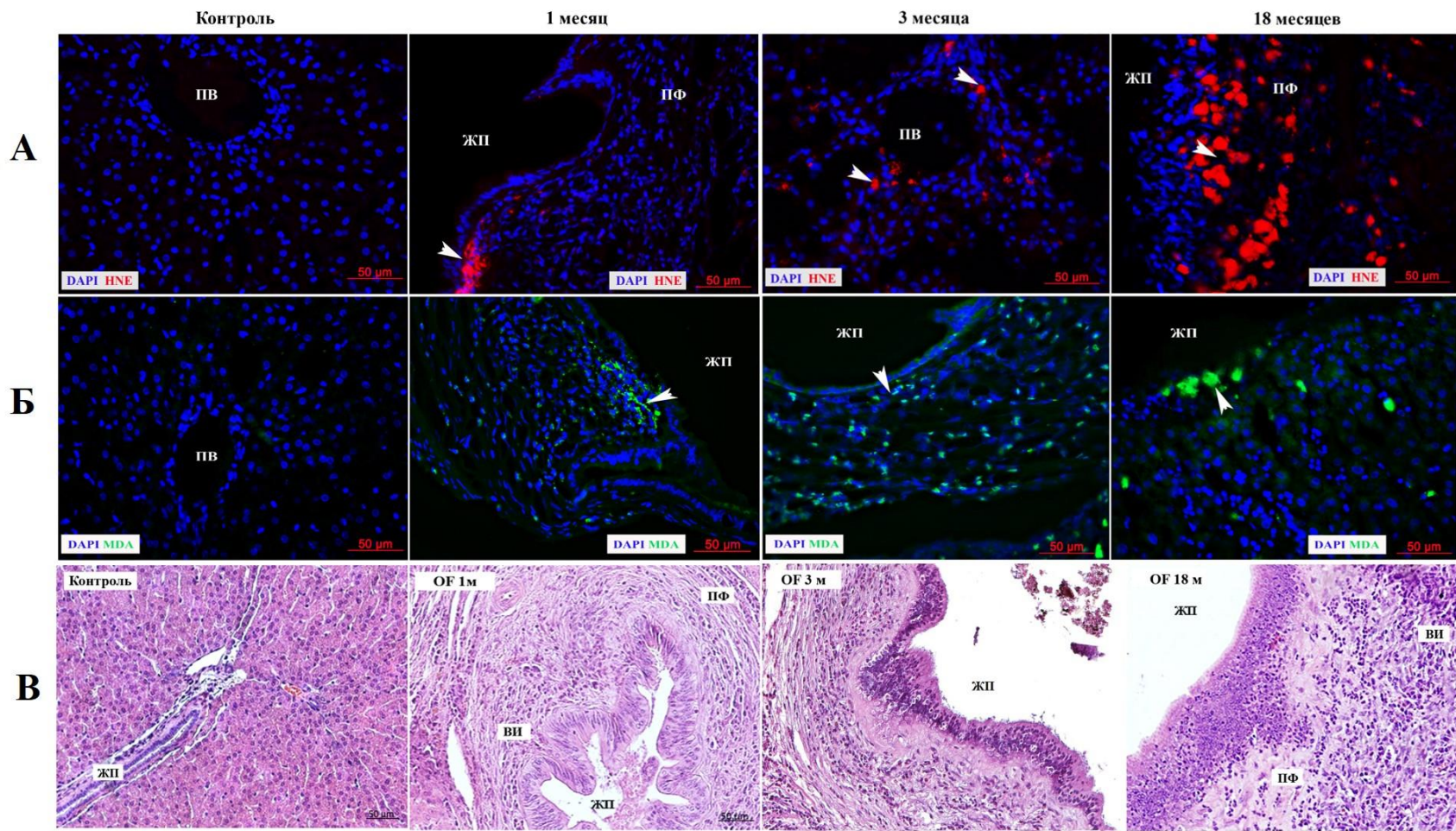
### Глава 3. Результаты

**3.1. Динамика структурных изменений в печени животных в зависимости от срока инвазии описторхоза.** Наличие маркеров перекисного окисления липидов малонового диальдегида (MDA) и 4-гидрокси-2-ноненаля (HNE) отмечали уже через 1 месяц инфекции, специфический сигнал в основном был обнаружен вблизи кровеносных сосудов и эпителия желчных протоков. Интенсивность сигнала MDA и HNE увеличивалась с продолжительностью течения инфекции. Через 18 месяцев специфический сигнал присутствовал не только в перидуктальной области, но и в паренхиме печени (**Рис. 1А и Б**).

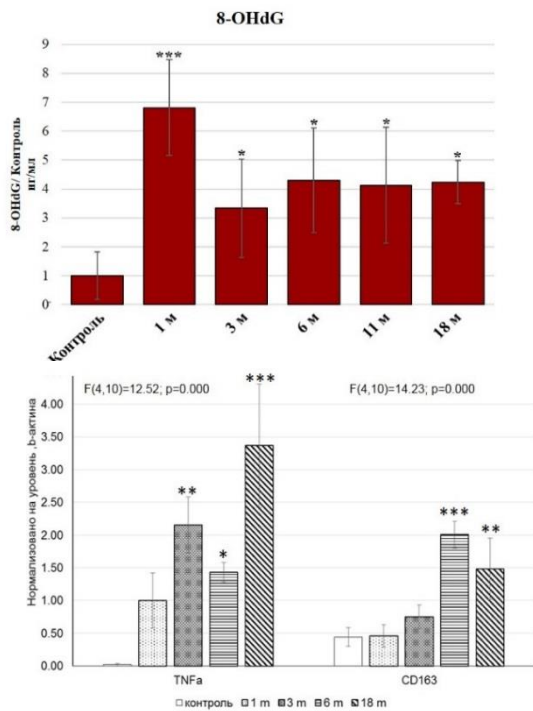
Изменения эпителия желчных протоков, характеризующиеся многослойностью, атипичной морфологией, нарушением связей клеток с базальной мембраной (неоплазия эпителия) начинались с 3-го месяца и увеличивались от сроков инфекции (**Рис. 1В**). В качестве контроля на **Рис. 1** представлены репрезентативные фотографии печени неинфицированных хомяков в возрасте 5 мес. Оценка накопления маркеров окислительного стресса у неинфицированных животных разных возрастных групп: 1, 2, 3, 10 месяцев не показала значимых изменений, поэтому они были объединены в одну контрольную группу. Аналогичные результаты были отмечены при анализе 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина в моче неинфицированных хомячков.

Уровень 8-OHdG в моче повышался у инфицированных животных начиная с 1 месяца (в 6,8 раз,  $P < 0,001$ ) инфекции и оставался повышенным на всех сроках инфекции (**Рис. 2**).

Увеличение содержания белков TNF- $\alpha$  и CD163 было отмечено в группах инфицированных животных на всех сроках инфекции (**Рис. 3**). Максимальный уровень TNF- $\alpha$  был отмечен через 18 месяцев инфекции ( $P = 0,0005$ ). Уровень белка CD163 в печени инфицированных хомячков достоверно повышался (в 4 раза) по сравнению с неинфицированными хомячками через 6 месяцев после заражения ( $P = 0,0009$ ) и оставался повышенным через 18 месяцев инфекции ( $P = 0,009$ ). Результаты линейного регрессионного анализа показали, что количество TNF- $\alpha$  ( $R = 0,79$ ;  $P < 0,001$ ) и CD163 ( $R = 0,58$ ;  $P = 0,022$ ) линейно увеличивалось от сроков инфекции.



**Рисунок. 1. Накопление HNE (4 гидрокси-2-ноненаль) (А) и MDA (малоновый диальдегид) (Б) в печени контрольных и зараженных животных через 1, 3 и 18 месяцев после инфекции. Специфический сигнал указан стрелками. HNE (красный), MDA (зеленый). Ядра клеток окрашены DAPI (синий). HNE -4-гидрокси-2-ноненаль, MDA – малоновый диальдегид, 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).**



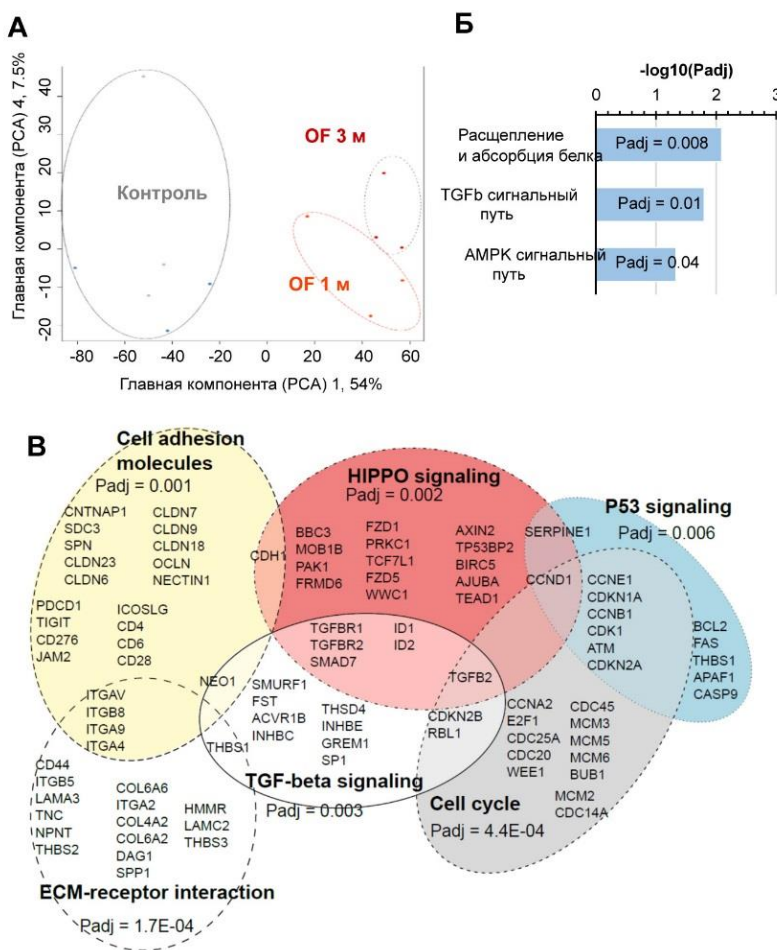
**Рисунок 2. Накопление 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина (8-OHdG) в моче хомячков на разных сроках инфицирования.** ANOVA+ Tukey. Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение. \*  $P < 0,05$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .

**Рисунок 3. Изменение уровней белков TNF- $\alpha$  и CD163 в печени хомячков, инфицированных *O. felineus* в течение 18 месяцев.** Результаты денситометрии (количественная оценка интенсивности исследуемого белка относительно  $\beta$ -актина) белков TNF- $\alpha$  (фактор некроза опухоли  $\alpha$ ), CD163 (кластер дифференцировки 163). ANOVA+ Tukey. Данные выражены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ .

**3.2. Анализ секвенирования транскриптомов печени хомячков при экспериментальном описторхозе.** В результате секвенирования транскриптома печени хомячков через 1 и 3 месяца инфекции были обнаружены различия ( $P_{adj}; 0,1 < |\log_2FC| > 1$ ) в экспрессии 2151-го ДЭГ у инфицированных хомячков (**Рис. 4А**).

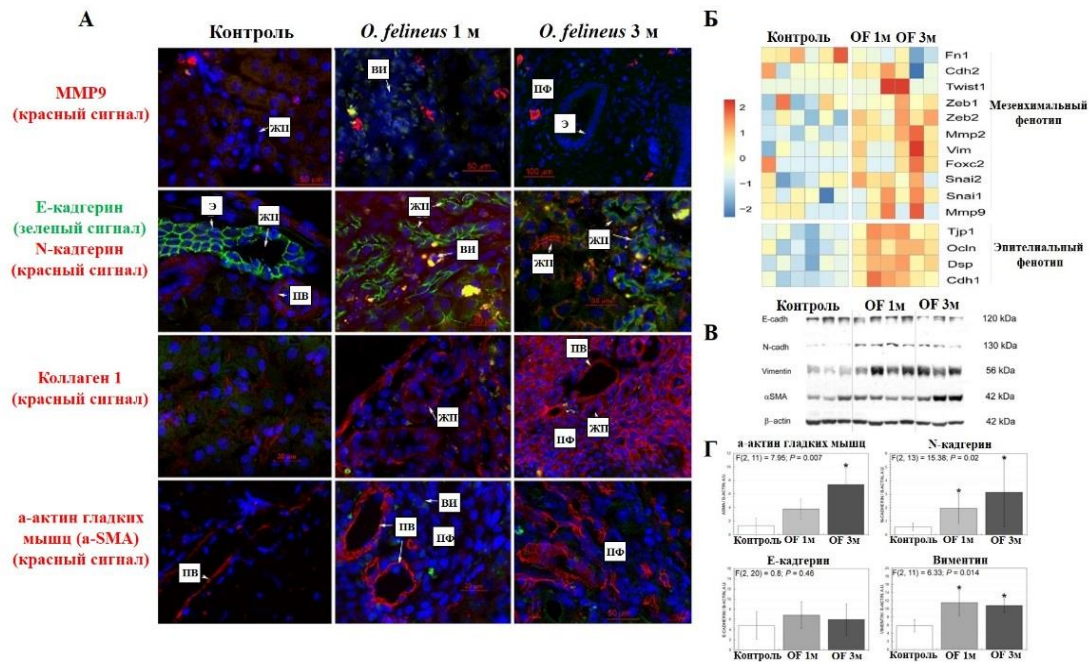
Функциональный анализ ДЭГ в печени OF-инфицированных животных показал 15 обогащенных путей KEGG ( $P_{adj} < 0,05$ ) (**Рис. 4Б и В**); 31 перепредставленных (FDR  $< 0,05$ ) биологических процессов (GO Biological Processes) и 13 обогащенных (значение  $q$ -value  $< 0,05$ ) клеточных путей из базы молекулярных маркеров (MSigDB, Molecular Signatures Database). Наиболее представленными среди обогащенных MSigDB путей в ДЭГ были эпителиально-мезенхимальный переход (EMT), апоптоз, IL6/JAK/STAT3 сигнальный путь, TNF- $\alpha$  инициированный сигнальный путь и пути, вовлеченные в развитие воспалительного ответа, регуляцию клеточного цикла и взаимодействия с внеклеточным матриксом. Эпителиально-мезенхимальный переход (EMT) ( $q$ -value  $2,2E-07$ ) был выбран для подтверждения его активации на уровне экспрессии белков, поскольку по литературным данным, наиболее вероятно вовлечен в развитие неоплазии эпителиальных клеток. Анализ уровней экспрессии маркерных генов EMT показал активацию как эпителиальных, так и мезенхимальных генов после инфекции (**Рис. 5Б**).

С помощью иммуногистохимии и Вестерн-блот анализа показано, что уровни белков виментина, N-кадгерина, коллагена типа 1,  $\alpha$ -SMA и MMP9 были повышены через 1 и 3 месяца инфекции (Рис. 5А, В и Г). В отличие от интактных животных, локализация N-кадгерина у инфицированных животных через 3 месяца инфекции была отмечена в эпителиальных клетках желчных протоков. Таким образом, в работе удалось сформировать первые представления о механизмах, которыми может быть обусловлено повреждение печени и развитие неоплазии в результате инфицирования *O. felineus*.



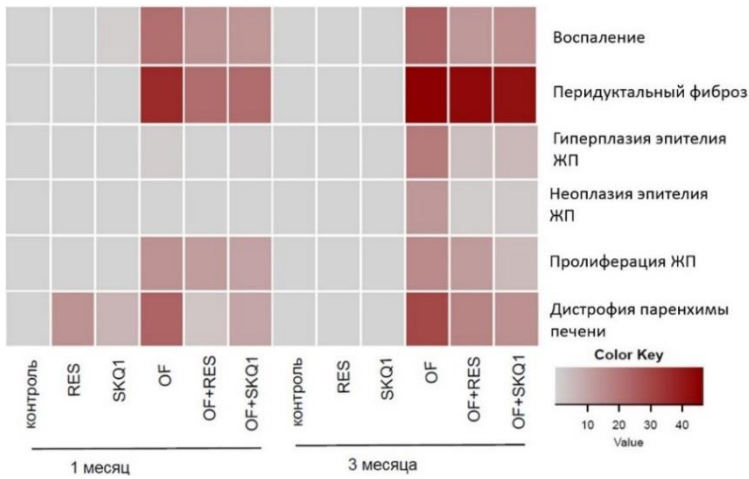
**Рисунок 4. Дифференциально экспрессирующиеся гены (ДЭГ) в печени хомячков, инфицированных *Opisthorchis felineus*, через 1 и 3 месяца после заражения.** А. Анализ главных компонент выявил два отдельных кластера в данных, разделенных по первой главной компоненте (ось абсцисс). Б. Наиболее обогащенные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

**3.3. Влияние антиоксидантов на структурное и функциональное состояние печени при описторхозе.** В результате полуколичественного гистологического анализа было показано, что под действием антиоксидантов значимо были снижены степень воспаления, гиперплазии и неоплазии холангиоцитов через 3 месяца. Данные представлены в виде тепловой карты (Рис. 6).



**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 маркеров EMT. ЖП- желчный проток, ПФ- перидуктальный фиброз, ПВ- портальная вена, ВИ- воспалительный инфильтрат, Э- эпителиальные клетки. Б. Тепловая карта, иллюстрирующая уровень экспрессии мРНК 16-ти маркерных генов EMT. В. Результаты Вестерн-блот анализа белков маркеров EMT. α-SMA: α-актин гладких мышц. Г. Результаты денситометрии иммуноблотов (В), количественная оценка относительно β-актина. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение по результатам трех независимых экспериментов; \*P < 0,05.**

Было установлено, что в инфицированных группах (1 и 3 месяца) уровни экспрессии мРНК генов *Tnf*, *Alox5*, *Inos*, *Ck7*, *Acta2*, и *Tgfb* (Рис. 7) были значительно повышены. Ресвератрол снижал повышенную экспрессию мРНК *Tnf* (в 6 и 2,5 раза соответственно) и *Inos* (в 10 и 3 раза соответственно) через 1 и 3 месяца после инфицирования. SkQ1 также снижал повышенную экспрессию мРНК *Tnf* (в 3 раза) и *Inos* (в 2 раза) через 1 месяц после инфицирования. Ресвератрол и SkQ1 снижали повышенную экспрессию мРНК *Acta2* (в 2 раза 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 и 24 раза, соответственно. Ресвератрол и SkQ1 снижали повышенный уровень экспрессии мРНК *Ck7* через 1 (в 8,5 и 3,7 раз) и 3 месяца (в 4 и 5 раз) (Рис. 7).



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

Значительное увеличение содержания TNF-α (фактор некроза опухоли- альфа) и CD68 (Кластер дифференцировки 68) было показано в группе инфицированных животных через 1 и 3 месяца инфекции (Рис. 8). Ресвератрол в 7 раз снижал уровень TNF-α и CD68 через 3 месяца; SkQ1 - через 1 месяц инфекции (в 2,3 и в 3,6 раз соответственно). Ресвератрол снижал повышенный уровень цитокератина 7 (маркер холангиоцитов) в 4,5 и 2,9 раз через 1 и 3 месяца, соответственно. SkQ1 значительно снижал уровень альфа-актина гладких мышц (P < 0,001) через 1 месяц инфекции (Рис. 8).

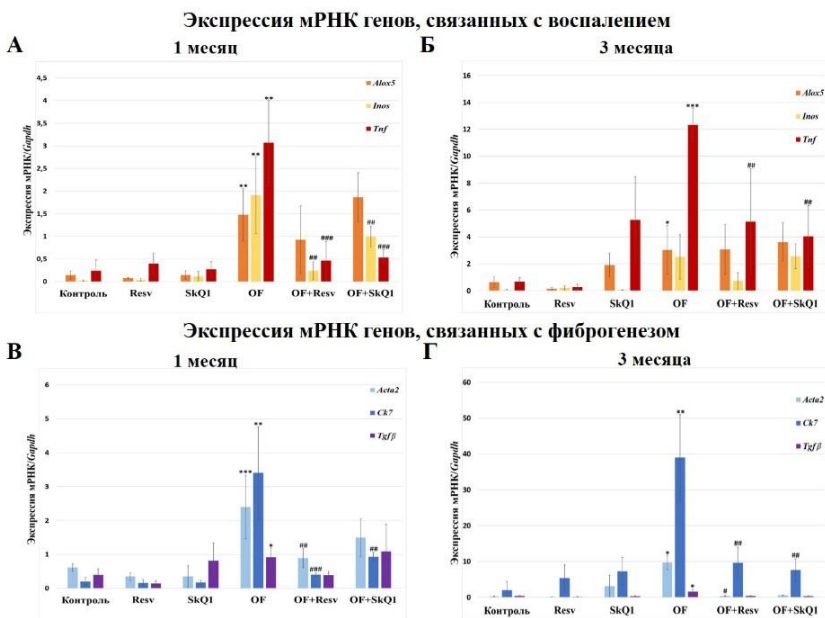
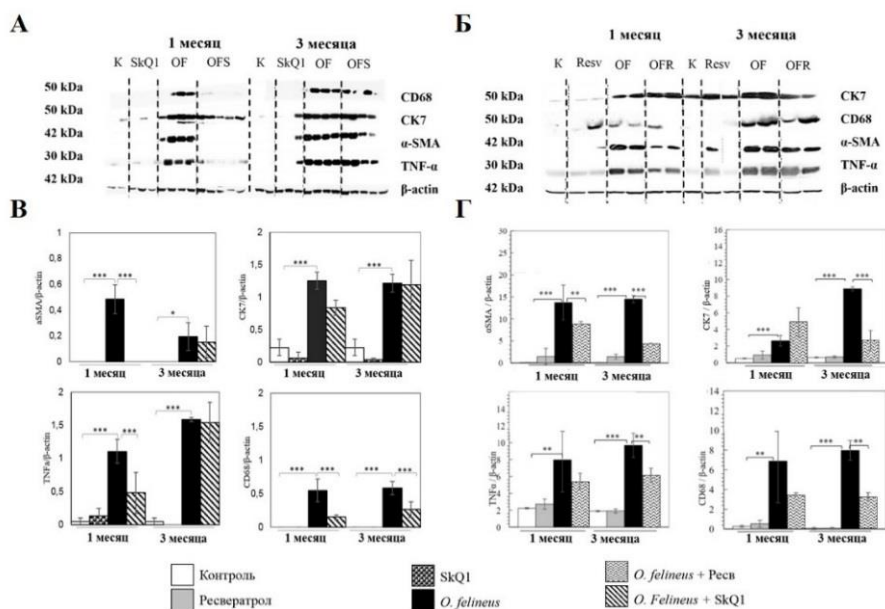


Рисунок 7. Экспрессия мРНК генов, участвующих в регуляции воспаления (А, Б) и фиброгенеза (В, Г) через 1 и 3 месяца после инфицирования *O. felinus* и диеты с антиоксидантами. Данные мРНК нормализованы на уровень экспрессии мРНК *Gapdh*. Resv – ресвератрол; OF - *O. felinus*. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение. \*# P < 0,05; \*\*### P<0,01; \*\*\*\*### P < 0,001 (ANOVA+Tukey. \* - по сравнению с контрольной группой # - по сравнению с зараженной группой.



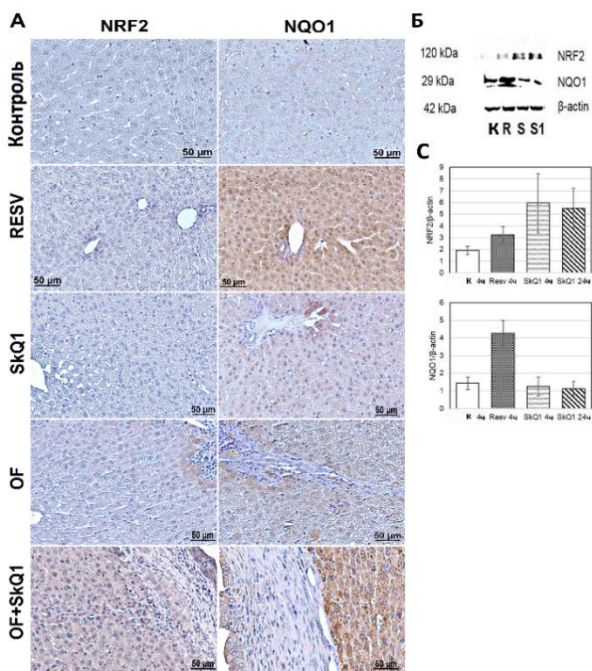
**Рисунок 8. Изменение уровней белков воспаления и фиброгенеза в печени через 1 и 3 месяца после инфицирования *O. felineus* и диеты SkQ1 (А, В) и ресвератролом (Б, Г). К – неинфицированные; OF – *O. felineus*; Resv-ресвератрол, OFR-инфицированные и получавшие ресвератрол; OFS - инфицированные и получавшие SkQ1.**

Представлены репрезентативные иммуноблоты (проводили трижды). Результаты денситометрии (нормализованы на уровень β-актина) выражены как среднее ± стандартное отклонение. \* P <0,05, \*\* P <0,01, \*\*\* P <0,001 (ANOVA+Tukey).

Уровень 8-OHdG в моче повышался у инфицированных животных начиная с 1 месяца (в 6,8 раз). Антиоксидант SkQ1 снижал уровень 8-OHdG через 1 месяц инфекции (в 3 раза), а ресвератрол через 3 месяца инфекции (в 3,8 раз).

Для того, чтобы продемонстрировать вовлеченность ARE-зависимого сигнального пути под действием SkQ1, мы исследовали содержание белка NRF2, а также содержание NQO1 (НАД(Ф)Н-хинондегидрогеназа 1), как гена мишени NRF2 в печени с помощью иммуногистохимии и Вестерн блот анализа (**Рис. 9А**). В качестве положительного контроля был использован ресвератрол. Видно (**Рис. 9**), что SkQ1, у неинфицированных животных повышал уровень NQO1 в гепатоцитах в меньшей степени, чем ресвератрол, что отражалось в невысокой интенсивности специфического сигнала. В группах, инфицированных *O. felineus*, наблюдали увеличение содержания как NQO1, так и NRF2. В группе, инфицированных *O. felineus* и пролеченных SkQ1 животных экспрессия белков NQO1 и NRF2 также была повышена (**Рис. 9А**).

Дополнительно, мы исследовали содержание белков NQO1 и NRF2 на клеточной культуре HepG2 с помощью Вестерн блот анализа. Увеличение содержания NRF2 было отмечено в клетках, обработанных SkQ1 через 4 и 24 часа (**Рис. 9Б и С**), что может свидетельствовать об активации пути Keap1-Nrf2.



**Рисунок 9. Содержание NRF2 и NQO1 в клетках HepG2 и тканях печени после обработки антиоксидантом SkQ1. А. Иммуногистохимический анализ печени неинфицированных и инфицированных *Opisthorchis felinus* (OF) хомячков (*Mesocricetus auratus*) через 1 месяц инфекции. RESV - ресвератрол; OF – *O. felinus*. Б. Содержание NRF2 и NQO1 в клетках HepG2. Представлены репрезентативные иммуноблоты. С- необработанные клетки HepG2; R- обработка ресвератролом в течении 4 часов; S- обработка SkQ1 в течении 4 часов; S1- обработка SkQ1 в течении 24 часов. С. Результаты денситометрии NRF2 и NQO1 относительно β-актина). Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение.**

## 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 гранул. 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 печени. Маркеры повреждений липидов, малоновый диальдегид и 4-гидрокси-2-ноненаль, накапливаются в тканях печени в прямой зависимости от времени инфекции; повышенный уровень 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-α, HIPPO пути передачи сигнала, а



также клеточные пути развития воспалительного ответа, взаимодействия с внеклеточным матриксом и регуляции 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, 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, 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 значимую роль в формировании таких предраковых повреждений печени, в частности, неоплазии эпителия желчных протоков.

## 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. felineus*.
2. Функциональная аннотация 2151 дифференциально экспрессирующихся генов в печени инфицированных *O. felineus* хомячков показала, что наиболее представленными были элементы регуляторных путей эпителиально-

мезенхимального перехода, IL6/JAK/STAT3, TNF- $\alpha$ , NIPPO, 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 (СК7,  $\alpha$ SMA), что сопровождалось улучшением структурно-функционального состояния тканей печени хомячков через 3 месяца инфекции *O. felineus*.

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Zaparina O.G.**, Rakhmetova A.S., Kolosova N.G., Cheng G., Mordvinov V.A., Pakharukova M.Y. Antioxidants resveratrol and SkQ1 attenuate praziquantel adverse effects on liver damage in *Opisthorchis felineus* infected hamsters // Acta Tropica – 2021.- Vol.220. doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.105954. (IF 3.1)\_Q1
2. Pakharukova M.Y., **Zaparina O.G.**, Kovner A.V., Mordvinov V.A. Inhibition of *Opisthorchis felineus* glutathione-dependent prostaglandin synthase by resveratrol correlates with attenuation of cholangiocyte neoplasia in a hamster model of opisthorchiasis // International Journal of Parasitology.- 2019.- Vol.49 N12 P. 963-973. (IF-3.4)\_Q1.
3. Pakharukova M.Y., **Zaparina O.G.**, Kapushchak Y.K., Baginskaya N.V., Mordvinov V.A. *Opisthorchis felineus* infection provokes time-dependent accumulation of oxidative hepatobiliary lesions in the injured hamster liver // PLoS ONE.- 2019.-Vol.5 N14 P.1-14. (IF 2.8)\_Q1.
4. Mordvinov V.A., Ershov N.I., **Zaparina O.G.**, Pakharukova M.Y. Genomics and proteomics of the liver fluke *Opisthorchis felineus*. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2020. DOI 10.18699/VJ2044-o. (IF-0.1)
5. Pakharukova M.Y., **Zaparina O.**, Baginskaya N.V., Mordvinov V.A. Global changes in gene expression related to *Opisthorchis felineus* liver fluke infection reveal temporal heterogeneity of a mammalian host response. Food Waterborne Parasitol. 2022 Apr 27;27:e00159. doi: 10.1016/j.fawpar.2022.e00159. IF 4) \_Q1.