

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный
исследовательский центр **ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ**
Сибирского отделения Российской академии наук»

На правах рукописи

Пахарукова Мария Юрьевна

**Структурно-функциональная организация системы метаболизма
ксенобиотиков у возбудителя описторхоза *Opisthorchis felineus*
(Rivolta, 1884)**

03.01.03 – молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Научный консультант:

д.б.н., В.А. Мордвинов

Новосибирск 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ	5
ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	12
1. Плоские черви <i>Opisthorchiidae</i>. Биология и канцерогенный потенциал <i>Opisthorchis felineus</i>	12
1.1. Жизненный цикл	14
1.2. Эпидемиология	17
1.3. Канцерогенный потенциал <i>O. felineus</i>	21
2. Взаимоотношения «паразит-хозяин».	25
2.1. Метаболизм описторхид, адаптация для жизни в желчных протоках. Питание и источники энергии	25
2.2. Секреторные белки. Воздействие гельминтов на иммунную систему	28
2.3. Потенциальные механизмы развития холангиокарциномы. Специфические оксистеролы	31
3. Система метаболизма ксенобиотиков	36
3.1. Состав и функции системы метаболизма ксенобиотиков	36
3.2. Фаза 1, ферменты, реакции. Цитохромы P450	37
3.3. Фаза 2 конъюгации, ферменты, реакции	42
3.4. Фаза экскреции. Ферменты клеточной экскреции	42
4. Система метаболизма ксенобиотиков у гельминтов	45
4.1. Состав системы и функции. Связь с устойчивостью к лекарственным препаратам	45
4.2. Цитохромы P450, как молекулярные мишени для разработки антипаразитарных препаратов	49
5. Терапия описторхоза	50
5.1. Празиквантел: механизмы действия, недостатки. Устойчивость к	

действию празиквантела. Эффективность празиквантела против <i>O. felineus</i> .	50
5.2. Другие антипаразитарные препараты, лекарственная устойчивость	53
6. Поиск новых антигельминтных препаратов	55
6.1. Методы тестирования препаратов. Экспериментальные модели.	55
6.2. Разработка таргетных препаратов. Перенаправление лекарств.	55
7. Заключение	58
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	60
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	75
1. Специфические оксистерольные метаболиты <i>O. felineus</i> и их экскреция в ткани хозяина	75
1.1. Оксистерольные метаболиты в лизатах и в яйцах <i>O. felineus</i>	76
1.2. Состав оксистеролов в лизатах разных видов трематод <i>O. felineus</i>, <i>O. viverrini</i>, <i>Fasciola hepatica</i>	80
1.3. Оксистеролы в крови, желчи, моче зараженных хомяков	82
2. Структура и функциональность системы метаболизма ксенобиотиков <i>Opisthorchis felineus</i>	88
2.1. Цитохромы P450	88
2.1.1. CYP450 в геномах и транскриптомах плоских червей. CYP450 <i>O. felineus</i> , структура предсказанного белка, экспрессия и регуляция экспрессии мРНК CYP	88
2.1.2. Функциональная значимость цитохрома P450 для <i>O. felineus</i>	99
2.1.2. Исследование регуляторных областей гена CYP. Секвенирование белков NR1 семейства ядерных рецепторов.	102
2.1.3. Экспрессия и очистка рекомбинантных цитохромов P450 <i>O. felineus</i> и <i>C. sinensis</i> в бактериальной системе. Константы связывания ингибиторов и цитохрома P450	112
2.2. Ферменты метаболизма фазы 2 конъюгации в геноме <i>O. felineus</i>	121
2.3. Клеточная выделительная система. ABC транспортеры	

в геноме <i>O. felineus</i>.	124
2.3.1. Р-гликопротеины в геноме <i>O. felineus</i> . Экспрессия Р-гликопротеинов на разных стадиях развития <i>O. felineus</i>	124
2.3.2. Исследования функциональности Р-гликопротеинов <i>O. felineus</i> . Активность и регуляция экспрессии Р-гликопротеинов. Подавление уровня мРНК Р4 с помощью РНК-интерференции.	133
3. Тестирование антигельминтных препаратов	140
3.1. Тестирование празиквантела <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> на <i>Opisthorchis felineus</i>	140
3.2. Тестирование супрамолекулярных комплексов альбендазола с арабиногалактаном на модели экспериментального описторхоза.	153
3.3. Тестирование антигельминтной активности ингибиторов СYP450	156
ОБСУЖДЕНИЕ	162
ВЫВОДЫ	169
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	171
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	189
ПЕРЕЧЕНЬ ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА	190
ПРИЛОЖЕНИЯ	195
Приложение 1. Оксистеролы с одинаковой структурой в лизатах <i>O. viverrini</i> и <i>O. felineus</i>	195
Приложение 2. Оксистеролы, представленные только у <i>O. viverrini</i>	198
Приложение 3. Вычисление констант связывания рекомбинантного белка Р450 <i>C. sinensis</i> с различными ингибиторами	199

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Возбудитель описторхоза кошачья двуустка *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884) паразитирует в желчных протоках и желчном пузыре человека и рыбоядных млекопитающих. Этот вид плоских червей входит в триаду эпидемиологически значимых видов трематод семейства Opisthorchiidae наряду с *O. viverrini* (Poirier, 1886) и *Clonorchis sinensis* (Looss, 1907). Два вида этого семейства, *O. viverrini* и *C. sinensis* признаны биологическими канцерогенами класса 1 опасности для человека (IARC, 1994; IARC, 2012) и основными факторами развития холангиокарциномы в эндемичных регионах.

Ареал *O. felineus* охватывает огромные территории Европы и Азии. Очаги описторхоза, вызванного этим гельминтом, приурочены к равнинам, расположенным в бассейнах рек. Обь-Иртышский бассейн в Западной Сибири представляет собой самый большой в мире очаг описторхоза, обусловленного инвазией *O. felineus*. Зараженность *O. felineus* населения эндемичных регионов в Западной Сибири по разным оценкам варьирует от 10% и до 45% (Ильинских и др., 2007; Зубов и др., 1989; Бражникова, Толкаева, 2002). Канцерогенный потенциал *O. felineus* изучен недостаточно хорошо, чтобы утверждать о канцерогенности этого паразита для человека. Однако на модельных животных его канцерогенные свойства близки к *O. viverrini* и *C. sinensis* (Maksimova et al., 2015).

Вероятная схема холангиокарциногенеза, ассоциированного с инвазией печеночными сосальщиками, включает: (1) механические повреждения клеток описторхами; (2) повреждающее действие реактивных форм кислорода, генерируемых клетками хозяина в очаге воспаления; (3) действие секретируемых описторхами белков и метаболитов (Chaiyadet et al., 2015; Matchimakul et al., 2015; Papatpremsiri et al., 2015). Все эти процессы приводят к повреждениям генетического материала, которые фиксируются в процессе репликации ДНК. В конечном итоге, в результате накопления мутаций может произойти злокачественная трансформация клеток и образование холангиокарцином (Sripa et al., 2012; Chaiyadet et al., 2015; Correia da Costa et al., 2014).

Канцерогенные трематоды *O. viverrini* и *S. haematobium* синтезируют специфические метаболиты оксистеролы и катехол-эстрогены (Correia da Costa et al., 2014; Vale et al., 2013), повышенная продукция которых ассоциирована с патологическими изменениями организма хозяина. Оксистеролы – это продукты метаболизма холестерина, генерируемые, вероятно, ферментативно с участием цитохрома P450, либо неэнзиматическим путем при участии активных форм кислорода. Оксистеролы генотоксичны и могут принимать участие в канцерогенезе (Cavalieri, Rogan, 2011). Обнаружение паразит-специфических оксистеролов позволяет сделать предположение о существовании у трематод функционально-активной системы биотрансформации ксенобиотиков и эндогенных соединений.

Степень разработанности. К началу нашей работы в мировой литературе было распространено устойчивое мнение, что у всех паразитических червей отсутствует система цитохромов P450 (Cvilink et al., 2009) и вся первая фаза метаболизма ксенобиотиков. Не было никакой информации, в целом, о генах и ферментах системы биотрансформации и транспорта экзогенных и эндогенных соединений у описторхид. В то же время были опубликованы сведения о наличии окислительного метаболизма антипаразитарных препаратов у трематод *F. hepatica* и свидетельства того, что у устойчивых изолятов метаболизм препаратов проходит быстрее (Devine et al., 2009). Эти факты позволили нам выдвинуть гипотезу о существовании функционально активной системы биотрансформации экзогенных и эндогенных соединений у описторхид. В поддержку нашей гипотезы говорили также данные о существовании специфических метаболитов некоторых видов трематод, которые могут быть продуктами модификации холестерина цитохромом P450 (Correia da Costa et al., 2014; Vale et al., 2013). Важно отметить, что такие генотоксические метаболиты (Cavalieri, Rogan, 2011) могут обуславливать спектр патогенных процессов и осложнений в организме хозяина и принимать участие в канцерогенезе, ассоциированном с некоторыми трематодозами.

В настоящее время накоплены большие массивы данных, полученных при выполнении проектов по секвенированию геномов и транскриптомов у трематод. Однако до сих пор нет реального представления о функционировании базисных метаболических систем, включая биотрансформацию и транспорт экзогенных и эндогенных субстратов. Знание законов функционирования этих систем необходимо для понимания адаптации биохимических процессов паразитов к существованию в организме хозяина,

формирования механизмов устойчивости к антипаразитарной терапии, а также для выбора белка – молекулярной мишени, перспективной с точки зрения разработки антигельминтных препаратов. Исследование структурно-функциональной организации системы метаболизма ксенобиотиков у описторхид направлено на решение фундаментальных вопросов организации системы взаимоотношений «паразит-хозяин». Кроме того, данное исследование призвано решить ряд практических вопросов, связанных с созданием базовой платформы для поиска новых белков мишеней для антипаразитарной терапии, основанной на сфокусированном действии на конкретные элементы метаболических систем паразита.

Цель работы: Поиск и исследование структурно-функциональной организации систем метаболизма и транспорта ксенобиотиков у возбудителя описторхоза *Opisthorchis felineus*.

Основные задачи исследования:

- Выявление генов в геномах и транскриптомах *O. felineus*, *O. viverrini*, *C. sinensis*, кодирующих белки фазы модификации (фаза 1), конъюгации (фазы 2) ксенобиотиков, а также генов АТФ-зависимого клеточного транспорта. Моделирование структуры этих белков.
- Определение функциональной активности, локализации в тканях, а также значимости системы метаболизма и транспорта ксенобиотиков для жизнедеятельности *O. felineus*.
- Поиск специфических оксистерольных метаболитов у *O. felineus*, сравнительное исследование количества форм и содержания оксистеролов у трематод.
- Выбор и тестирование белков мишеней, перспективных с точки зрения разработки новых антипаразитарных препаратов. Исследование роли экспрессии ключевых генов и активности белков метаболизма ксенобиотиков для выживаемости и поддержания фенотипа червей.
- Тестирование антигельминтных препаратов, в том числе таргетных ингибиторов отдельных клеточных метаболических систем

Научная новизна. Данная работа является первым комплексным исследованием функциональной геномики возбудителя описторхоза *Opisthorchis felineus*, в частности, структурно-функциональной организации системы биотрансформации и транспорта как экзогенных, так и эндогенных субстратов. Полученные результаты о составе системы биотрансформации у плоских паразитических червей опровергают бытующее мнение в современной научной литературе об отсутствии цитохромов P450 у паразитических видов. Показана функциональная активность цитохрома P450 и гомологов белков P-гликопротеинов у *O. felineus*. Установлено, что подавление активности и экспрессии цитохрома P450 (CYP) приводит к существенному снижению выживаемости гельминтов.

Впервые для плоских червей получены активные рекомбинантные белки CYP *O. felineus* и CYP *C. sinensis*. Продемонстрировано, что ряд веществ являются ингибиторами CYP описторхид, в частности, соединения с азольной (клотримазол, кетоконазол, миконазол) и неазольной структурой обладают константами связывания с рекомбинантным белком P450 Opisthorchiidae в микромолярном диапазоне концентраций.

Впервые показано, что ключевые белки биотрансформации и транспорта ксенобиотиков могут быть перспективными молекулярными мишенями для разработки антигельминтных препаратов.

Установлено, что кошачья двуустка *Opisthorchis felineus* синтезирует специфические генотоксические метаболиты оксистерольной структуры, которые экскретируются в ткани хозяина, где и подвергаются дальнейшей биотрансформации. Часть метаболитов описторха обнаруживается в конъюгации с основаниями ДНК.

Теоретическая и практическая значимость работы. Впервые показано, что трематода *O. felineus* обладает функционально-активной системой метаболизма и транспорта экзогенных и эндогенных соединений. Белки этой системы являются перспективными молекулярными мишенями для разработки антигельминтных препаратов как на основе монотерапии, так и в составе комбинаторного подхода. В работе выявлены наиболее активные ингибиторы цитохрома P450, обладающие сильным антигельминтным действием, превышающим действие официальных препаратов для

лечения описторхоза. Эти соединения могут стать базисными для разработки новых эффективных препаратов против трематодозов.

Предложен метод тестирования повреждений оболочки гельминтов с помощью флюоресцентного красителя, позволяющий наиболее эффективно оценить повреждения трематод после воздействия антигельминтных препаратов.

В процессе выполнения работы найден эффективный подход к исследованию специфичности монооксигеназной активности *in situ*, что позволяет тестировать микроорганизмы на способность проявлять ту или иную монооксигеназную активность. Это особенно важно при биомониторинге окружающей среды и отборе микроорганизмов, способных эффективно детоксицировать загрязнения.

Методология и методы исследования. В работе был применен комплексный подход к исследованию структурно-функциональной организации системы метаболизма и транспорта ксенобиотиков, включая методы молекулярной и клеточной биологии, молекулярного клонирования, биохимии, биоинформатики, позволяющие детально оценить систему на нескольких уровнях организации. Исследования были направлены на поиск генов, исследование механизмов их регуляции, предсказание структуры белков, оценку функциональности белков, поиск лигандов и определение активности в отношении экзогенных субстратов.

Для оценки антигельминтных свойств веществ *in vivo* и *in vitro* применяли как традиционный набор методов, так и собственные разработанные методики, включая тестирование повреждений оболочки гельминтов.

Положения, выносимые на защиту:

1. В геномах описторхид *O. felineus*, *O. viverrini*, *C. sinensis* представлены гены, кодирующие белки биотрансформации и транспорта ксенобиотиков. В отличие от свободноживущих видов плоских червей, обладающих десятками генов цитохромов P450, у паразитических плоских червей, в частности, печеночных сосальщиков (Opisthorchiidae, Fasciolidae), кровяных двуусток (Schistosomatidae), и цестод (Taeniidae) в геноме присутствует только один ген CYP.

2. Продукты генов СУР и Р-гликопротеинов *O. felineus* функционально активны, в тканях гельминта их активность ассоциирована с экскреторной системой; экспрессия гена СУР и его активность важны для поддержания фенотипа и выживаемости взрослых описторхов. Белки СУР и Р-гликопротеины *O. felineus* – перспективные молекулярные мишени для разработки антигельминтных препаратов.

3. В лизатах взрослых червей, в яйцах *O. felineus*, в крови, желчи и моче зараженных описторхами хомяков найдены специфические генотоксические оксистерольные метаболиты, их состав и количество отличается от метаболитов *O. viverrini* и *F. hepatica*.

4. Азольные соединения (клотримазол, кетоконазол, миконазол, эконазол) обладают константами связывания с рекомбинантными цитохромами P450 описторхид в микромолярном диапазоне концентраций и проявляют выраженные антигельминтные свойства.

Степень достоверности и апробация результатов. Статистическую обработку результатов и их сравнение проводили в программе Statistica 7.0; пакетах программ 'mortality' и 'drc 3.0-1' (v.2.38) R. Применяли однофакторный дисперсионный анализ, критерий Фишера, либо метод Манна-Уитни, достоверными считали отличия при уровне значимости больше 95%. Для статистической оценки смертности применяли кривые выживаемости Каплана-Мейера и лог-рэнк тест в пакете программ 'mortality' (v.2.38) R. Для вычисления концентраций полумаксимального ингибирования (IC₅₀) применяли нелинейный регрессионный анализ и ANOVA lack-of-fit тест ('drc 3.0-1' (v.2.38) R).

Основные результаты работы отражены в 12 статьях (из них 2 обзора) и 1 патенте. Результаты работы были представлены на различных российских и международных конференциях, в том числе II Конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: геномика, протеомика, биоинформатика» (2011, Новосибирск), 12-ом Международном Симпозиуме по биологии плоских червей (2012, Стокгольм); 24-ой Конференции по достижениям в ветеринарной паразитологии (WAAVP), (2013, Перт, Австралия); 5-ом Съезде Паразитологического Общества РАН (2013, Новосибирск); 38-м Конгрессе Федерации европейских биохимических обществ (FEBS), (2013, Санкт-Петербург); 9-ом Европейском Конгрессе по Тропической медицине и здоровью (ECTMIN), (2015, Базель); 8-ой и 9-ой и 10-й Конференциях по биоинформатике регуляции и структуры геномов и системной биологии (BGRS/SB),

(2012 и 2014 и 2016, Новосибирск), Азиатской Конференции по тропическим заболеваниям (NTDAsia) (2014, Кхон Каен, Таиланд); Конгрессе, посвященном изучению печеночных сосальщиков и холангиокарциномы (2015, Кхон Каен, Таиланд); на заседаниях международного Консорциума по изучению описторхоза (ТОРИС), (2014, Томск; 2015, Базель; 2016, Порто).

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов, списка литературы и приложений. Материал диссертации изложен на 207 страницах печатного текста, включая 8 таблиц и 47 рисунков. Список цитированной литературы содержит 158 работ.

ЛИТОБЗОР

Глава 1. Плоские черви *Opisthorchiidae*. Биология и канцерогенный потенциал *Opisthorchis felineus*

Семейство *Opisthorchiidae* (кл. Trematoda, тип Platyhelminthes) включает в себя паразитов почти всех классов позвоночных, главным образом млекопитающих и птиц. *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884), *O. viverrini* (Poirier, 1886) и *Clonorchis sinensis* (Loos, 1907) – три эпидемиологически значимых вида из семейства *Opisthorchiidae*, которые вызывают поражения печени и желчных протоков у людей и рыбоядных животных (King and Scholz, 2001).

Опасны для человека и такие описторхиды, как *Pseudamphistomum truncatum*, *Metorchis bilis* и *M. xanthosomus* (Беэр, 2005; Ромашов и др., 2005). Есть сообщения, что в некоторых районах Российской Федерации под маской диагноза «описторхоз» скрывается патология, вызванная заражением сразу несколькими видами описторхид (Ромашов и др., 2005; Brusentsov et al., 2013). К сожалению, особенности симптоматики и лечения таких сочетанных паразитозов пока не известны.

Описторхоз, вызванный *O. felineus*, распространен на территории бывшего СССР и Восточной Европы (Беэр, 2005; Mordvinov et al., 2012). Очаги заболевания приурочены к равнинам, расположенным в руслах рек. Наиболее показательна в этом смысле Западно-Сибирская низменность – одна из самых больших низменных равнин земного шара. Именно здесь, в Обь-Иртышском бассейне, расположен самый большой в мире очаг описторхоза, обусловленного инвазией *O. felineus* (Беэр, 2005).

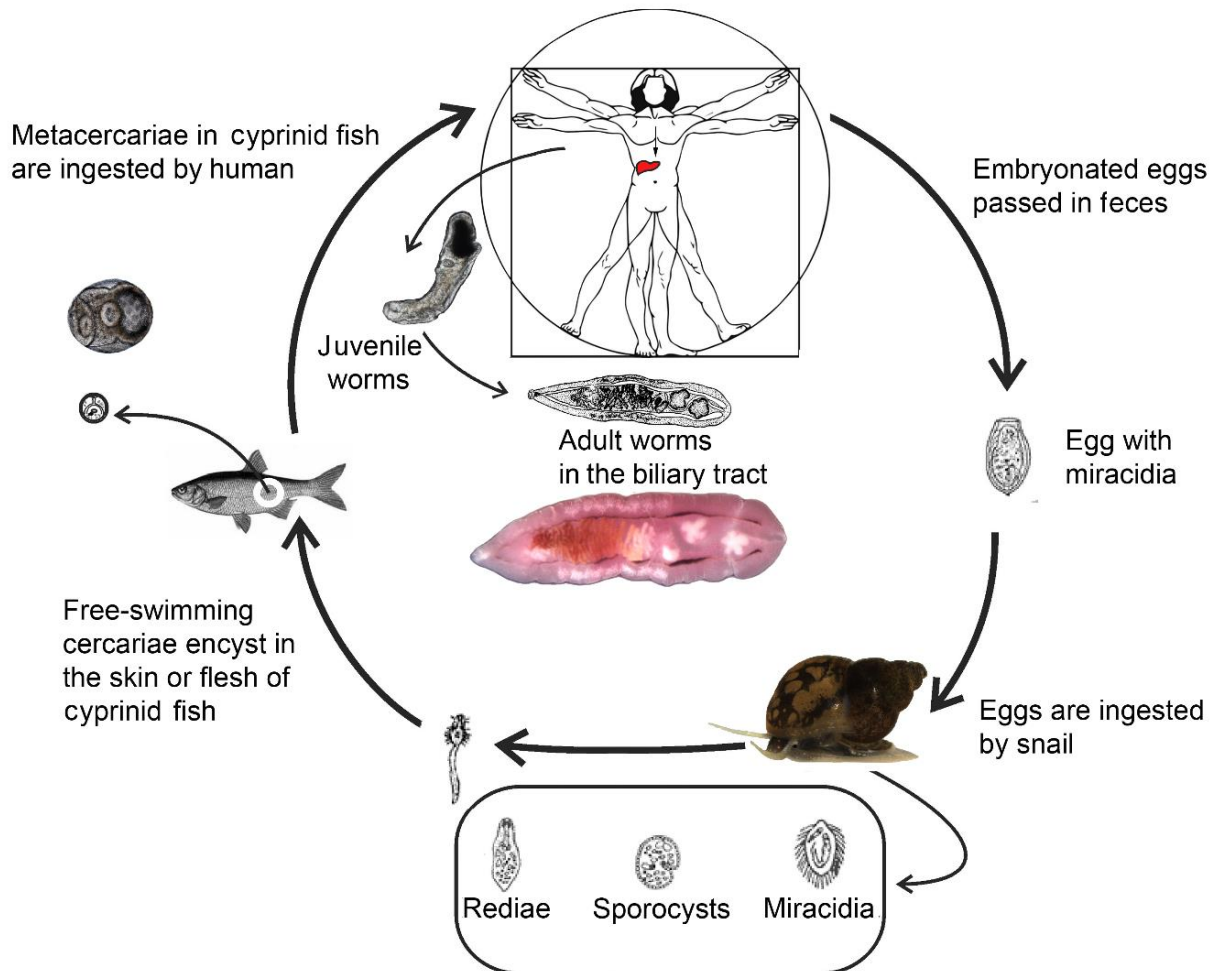


Рисунок 1. Жизненный цикл *Opisthorchis felineus*.

Ареал *O. felineus*, помимо Восточной Европы и Западной Сибири, распространяется также на Южную и Западную Европу. Этот вид гельминтов обнаружен на Пиренейском и Балканском полуострове (Petney et al., 2013), в Германии (Schuster et al., 2007) и Италии (Pozio et al., 2013). По предварительным оценкам в мире из 17 млн страдающих от инвазии описторхид, не менее 1,6 млн инфицированы *O. felineus* (Akuffo et al., 2002; Keiser and Utzinger 2010).

1.1. Жизненный цикл

Жизненный цикл *O. felineus* состоит из нескольких стадий развития, включая паразитирование в двух промежуточных хозяевах, одном окончательном хозяине, а также свободноживущую стадию.

В 1930-е годы Фогель был первым, кто описал цикл развития описторхид и экспериментально показал, что моллюск является обязательным промежуточным хозяином в жизненном цикле паразитов (Беэр, 2005). Общей характеристикой всех *Opisthorchiidae* является их высокая специфичность к первому промежуточному хозяину. Обычно только один вид улиток или несколько близкородственных видов служат первыми промежуточными хозяевами для *Opisthorchiidae*, в то время как списки вторых промежуточных и окончательных хозяев могут содержать несколько десятков видов (Беэр, 2005). До середины 20-го века, *Bithynia leachi* считался единственным первым промежуточным хозяином 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*.

В улитках мирацидий *O. felineus* проходит несколько стадий: спороцисту и редии (этапы развития с бесполом размножением), наличие которых характерно для всех *Opisthorchiidae*. Редии производят множество свободноживущих церкарий, которые покидают улитку и активно проникают во второго промежуточного хозяина.

Вторые промежуточные хозяева *O. felineus* - рыбы - принадлежат к семейству карповых (Беэр, 2005). Развитие церкарии *O. felineus* в метацеркарий в рыбе занимает от 3 недель до 2 месяцев. Показано, что в притоках реки Обь метацеркарии становятся инвазионными (способными инфицировать человека и животных) через 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 находят необычные места скопления метацеркарий, например, грудные плавники, жабры и стенки кишечника (Беэр, 2005).

Окончательные хозяева заражаются при употреблении в пищу сырой рыбы, инфицированной *O. felineus*. Общий перечень окончательных хозяев этого паразита

включает 33 вида и подвида млекопитающих, в первую очередь, из отряда хищных: домашняя кошка, собаки, волки, лисы, медведи, барсуки (Безр, 2005). После попадания в пищеварительный тракт окончательного хозяина, оболочка цисты метацеркария разрушается и эксцистированный описторх проникает в желчные протоки печени. Описторхи достигают половой зрелости (стадия мариты) через 25-30 дней (Безр, 2005). Взрослые мариты продуцируют большое количество яиц, вместе с фекалиями яйца могут попадать в пресные водоемы, где на мелководьях они оседают на дно. Находящаяся в них личинка – мирацидий может оставаться жизнеспособной в течение нескольких месяцев.

Зараженная рыба - единственный источник инфекции *O. felineus* для человека и животных. Метацеркарии *O. felineus* устойчивы к высушиванию, высокой концентрации соли, низким температурам и могут быть обезврежены высокой температурой (Пельгунов, 2005). Обычные источники инфекции *O. felineus* в России – это вяленая, слабо соленая и слабо маринованная рыба, а также рыба, не прошедшая достаточную термическую обработку.

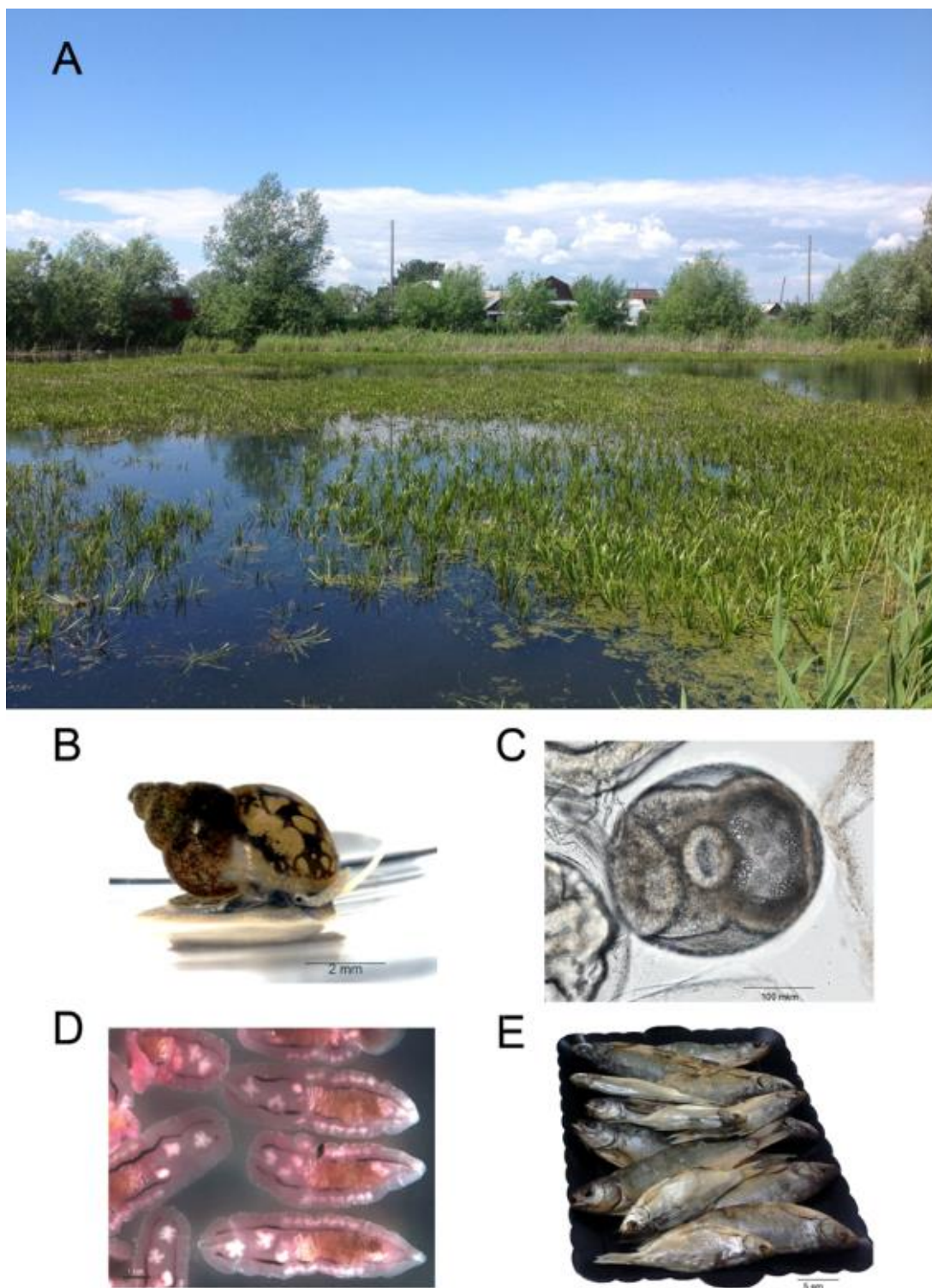


Рисунок 2. *O. felineus* и природная среда обитания (Pakharukova, Mordvinov, 2016). А. Место полевых исследований (озеро Малое, г. Новосибирск). **В.** Моллюск рода *Bithynia*. **С.** Метациркарий *O. felineus*; **Д.** Взрослые особи *O. felineus*, извлеченные из желчных протоков хомяка; **Е.** Вяленая плотва *Rutilus rutilus* на рынке.

1.2. Эпидемиология

В ряде регионов бывшего СССР, в частности, в Волго-Камском бассейне Центральной России, на Украине и в северном Казахстане (Беэр, 2005) регулярно регистрируется описторхоз, вызванный *O. felineus*. Однако, наиболее высокий уровень инфицированности населения этим паразитом отмечается в Западной Сибири (Беэр, 2005).

В Западной Сибири на территории Обь-Иртышского бассейна регулярно проводятся скрининговые исследования по выявлению рыбы, инфицированной метацеркариями *O. felineus*. 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 gibello* и серебряный карась *Carassius carassius* не были инфицированы *O. felineus* (Пельгунов, 2012).

Схожие данные по инфицированности различных видов рыб получены (Карпенко и др., 2008) на территории Новосибирской области в среднем течении Оби и ее притоках. Наиболее зараженными были язь *L. idus* (40,4%), елец *L. leuciscus*, верховка *Leucaspius delineatus* (43%). По данным нашей лаборатории, накопленным в 2012-2015 гг (27 уловов, 523 язя из Оби в районе Новосибирска), каждая особь язя была инвазирована 362 ± 177 метацеркариями *O. felineus* (Pakharukova, Mordvinov, 2016).

Важно 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 течении всей жизни.

Таким образом, на территории Западной Сибири, основным источником инфекции *O. felineus* 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 (**Рисунок 2Е**).

В 1986-1996 гг на территории Новосибирской области было проведено исследование зараженности улиток описторхидами. В 10 местах сбора материала инфицированность улиток *Vithyniidae* составила только 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, уровень зараженности улиток 1% достаточен для того, чтобы рыба в данном водоеме была заражена на 98%.

В 2013 году Росэпидемнадзор представил данные по структуре заболеваемости биогельминтозами. На долю описторхоза в России приходится 78,97%, дифиллоботриоза 18,16%, дирофиляриоз 0,48%, эхинококкоз 1,3%, альвеококкоз 0,13%, тениоз 0,11%, тениархоз 0,28%, клонорхоз 0,49%, трихинеллез 0,08% (Роспотребнадзор, 2013).

По данным официальной статистики уровень заболеваемости описторхозом в среднем по России составляет 20 случаев на 100 тыс. населения, однако в Ханты-Мансийский АО (ХМАО), административном образовании, расположенном в центре Обь-Иртышского очага описторхоза – около 1000 случаев на 100 тыс. (**Рисунок 3**). Регионы с уровнем заболеваемости выше, чем 100 случаев на 100 тыс. населения считаются эндемичными, также затрагивают область Обь-Иртышского бассейна – реки Обь, Иртыш, Тура, Томь. Наиболее высокий уровень заболеваемости описторхозом зарегистрирован в Ханты-Мансийском АО, Ямало-Ненецком АО, Тюменской, Томской, Омской, Новосибирской областях (**Рисунок 3**). 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 (Бражникова, Цхай, 2004) с выраженными болезненными проявлениями.

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 и ИФА паразитарных антигенов в образцах стула. (Ильинских и др., 2007).

Результаты кратковременных скрининговых исследований совпадают с данными длительных наблюдений в регионах с высоким уровнем инфицированности населения. Особую ценность представляют результаты проведения аутопсии, поскольку наиболее точно отражают уровень зараженности населения. Так, в период 1950-1987гг в городском морге Тобольска было обследовано 2253 трупа. Почти в половине случаев (45%) были обнаружены признаки описторхозной инвазией (Зубов и др., 1989). В Томском городском морге за период 1983-2002 зараженность населения описторхозом колебалась в пределах 10-18,3% (343 аутопсии) (Бражникова, Толкаева 2002; 2009).

В заключение этого раздела обзора следует подчеркнуть, что результаты, опубликованные отдельными группами российских ученых, демонстрируют, что зараженность описторхозом сельского населения эндемичных регионов колеблется от 10% и до 45%, что намного превышает данные официальной статистики.



Рисунок 3. Карта распространения заболеваемостью описторхозом на территории Западной Сибири согласно данным Росэпиднадзора за 2012 год (Pakharukova, Mordvinov, 2016).

1.3. Канцерогенный потенциал *O. felineus*

Международное агентство по исследованию рака классифицировало трематод *O. viverrini* и *C. sinensis* как канцерогенные факторы первой группы опасности (IARC, 2012) и как основные факторы развития холангиокарциномы в эндемичных регионах (Sithithaworn et al., 2014; Sripa et al., 2015; Sripa et al., 2010).

В связи с отсутствием в России системных эпидемиологических и клинических исследований описторхоза, роль *O. felineus* в формировании холангиокарциномы у человека не определена. Безусловно, сходство клинических проявлений и течения заболеваний, вызванных *O. felineus* и *O. viverrini* (Бражникова, 1997; Бражникова, Цхай, 2004; Онищенко и др., 2009; Thunyaharn et al., 2013), также, как и результаты исследований патогенеза этих гельминтозов, полученные на модели экспериментального описторхоза на грызунах (Lvova et al., 2012; Maksimova et al., 2015), говорят о достаточно высокой вероятности участия *O. felineus* в возникновении этих опухолей. В частности, в нашей лаборатории был проведен подробный гистопатологический анализ и комплексная оценка процессов воспаления, дисплазии желчных протоков, перидуктального фиброза, гиперплазии и пролиферации желчных протоков, образования гранулем, кист печени, холангиофиброза и холангиокарциномы на протяжении 30 недель после инвазии *O. felineus* на фоне действия диметилнитрозамина на модели золотистых хомячков. Установлено, что на этой модели *O. felineus* обладает канцерогенным потенциалом и участвует в формировании рака желчных протоков. При сочетанном действии *O. felineus* и диметилнитрозамина морфология печени на органном и клеточном уровнях менялась драматически. С раннего срока эксперимента у животных наблюдали обширный перидуктальный фиброз, активное воспаление, гиперплазии и пролиферации желчных протоков и образование гранулем, на фоне которых происходило формирование холангиофиброза и холангиокарцином.

Анализ данных, опубликованных в центральной медицинской печати России и касающиеся осложнений, связанных с описторхозом, показал, что в период 1950-1987гг в городском морге Тобольска при обследовании 2253 трупов почти в половине случаев (45%) были обнаружены признаки описторхозной инвазии (Зубов и др., 1989). Из числа

инфицированных *O. felineus* в 4,5% случаев были обнаружены гнойные осложнения, первичный рак печени - 8,7% (Зубов и др., 1989).

В Томском городском морге согласно данным 343 аутопсий, умерших с длительной инвазией *O. felineus*, в 5% случаев были обнаружены холангиокарциномы (Бражникова, Толкаева, 2002; Бражникова, Цхай, 2004). По данным Томского гепатологического центра на основании лечения 4756 больных описторхозом людей было прооперировано 141 человек по поводу рака желчных протоков и рака поджелудочной железы (Бражникова, Цхай, 2004) (без уточнения по каждому виду рака). По обобщенным данным онкологических диспансеров нескольких областей Западной Сибири за 10 лет (1962-1971 гг) было зарегистрировано 1225 больных первичным раком печени (Чаклин, Шайн, 1976; IARC, 1994), что составляет 9,4 случаев на 100 тыс населения. За этот же период в Ямало-Ненецком округе этот показатель составил 8,2; в Тобольском регионе 18,2, в ХМАО - 20,7.

На основании данных областного онкологического диспансера Томска, накопленных за период 1990-2001 гг., рак печени занимает в структуре онкологических заболеваний седьмое место (3,9%). Согласно этому исследованию заболеваемость раком печени среди мужчин в указанный период составляла 11,2 случаев на 100 тыс. населения. Этот показатель намного выше, чем данные официальной статистики России (Росэпидемнадзор), указывающие, что в России в 2012 зарегистрировано 4,6 случаев рака печени на 100,000 человек.

В результате гистологических исследований, проведенных у 315 больных раком печени в Тюменской области, в 77% случаев была выявлена холангиокарцинома, в 18,9% - гепатоклеточная карцинома, и в 4,1% случаев другие формы опухолей (Чаклин, Шайн 76). Похожие данные были получены еще в одном исследовании, проведенном в Тюменской области (Глумов и др., 1974, IARC 1994). При аутопсии 44 умерших с первичным раком печени, в 42 из 44 случаев была найдена инвазия *O. felineus*, а в 35 случаях (79,5%) определена холангиокарцинома. Таким образом, в эндемичных регионах соотношение между холангиоклеточной и гепатоклеточной опухолями составляет 4:1.

В противоположность этому, в неэндемичных регионах процент возникновения холангиокарцином составляет около 15% от всех случаев рака печени. Так, в Москве,

неэндемичном по описторхозу регионе, согласно статистике 1004 операций по поводу первичного рака печени в РОНЦ им. Блохина, доли гепатоклеточного и холангиоклеточного рака составляли 85,1% и 14,9%, соответственно (Патютко и др., 2008). Эти цифры совпадают с опубликованными данными по эпидемиологии холангиокарциномы. В США, регионе, свободном от очагов описторхоза, эта опухоль регистрируется в 19% случаев рака печени. В Таиланде, в частности, в провинции Хон Каен, районе с самым высоким уровнем заболеваемости холангиокарциномой в мире, данный вид рака является причиной 71% случаев рака печени (Sripa et al., 2015).

Помимо холангиокарциномы, при описторхозе возникают такие патологические проявления как холангиты, холециститы, холангиофиброз, кисты печени, которые считаются предраковыми состояниями. Кроме того, при описторхозе находят абсцессы печени и панкреатиты. Структура осложнений описторхоза представлена в работах, опубликованных сотрудниками Томского гепатологического центра. Так, по данным наблюдения 4756 больных, страдающих описторхозом, показано, что 1170 пациентам было необходимо хирургическое вмешательство (24,6%). Причиной этого были стриктуры желчевыводящих протоков (62,4%), панкреатит (16%), кисты печени (3,1%), склерозирующий холангит (2,3%), абсцессы печени (2,6%), цирроз печени (3,6%) (Альперович, Абушахманов, 1999; Бражникова 1997). Как отмечают авторы, большинство хирургических больных страдали хроническим описторхозом с длительностью инвазии *O. felineus* более 10 лет.

Результаты последующих исследований, проведенных в Томском гепатологическом центре, подтверждают, что наиболее частыми осложнениями описторхоза являются стриктуры и сужения желчных протоков, холециститы; описторхозные панкреатиты среди осложнений описторхоза занимают второе место. В основе развития описторхозных кист печени лежит холангиоэктазия; абсцессы печени возникают в результате нагноения кист, а также как осложнения холангита (Бражникова, Цхай, 2009).

Близкие данные о частоте хирургических осложнений при описторхозе были получены группой исследователей из ХМАО. Согласно результатам наблюдения 4327 больных описторхозом в городской клинической больнице Сургута, в 27% случаев требовалось хирургическое вмешательство (Онищенко и др., 2009).

Суммируя данные, касающиеся канцерогенного потенциала *O. felineus*, следует сказать, что между описторхозом, обусловленным инвазией этого гельминта, и раком желчевыводящих путей существует прямая связь. Именно в регионах, расположенных в Обь-Иртышском очаге описторхоза, уровень заболеваемости холангиокарциномой намного выше, чем в не эндемичных областях. Однако представленные данные получены отдельными группами исследователей и не могут дать всеобъемлющей картины ассоциации описторхоза и онкологии печени. Для этого необходимы масштабные эпидемиологические исследования, учитывающие опыт, накопленный при проведении подобных исследований в других странах, в частности в Таиланде и Лаосе, как наиболее эндемичным по описторхозу, вызванному заражением *O. viverrini* (Sripa et al., 2015).

Глава 2. Взаимоотношения «паразит-хозяин».

2.1. Метаболизм описторхид, адаптация для жизни в желчных протоках. Питание и источники энергии.

На основании исследований геномов и транскриптомов описторхид *O. viverrini* некоторые авторы делают вывод о том, что описторхиды эволюционно адаптированы к жизни в билиарной системе млекопитающих (Young et al., 2014). Описторхиды паразитируют в желчных протоках, агрессивной и неблагоприятной среде обитания. Трематоды являются факультативными анаэробами, у взрослых особей наблюдается повышенная транскрипция генов, кодирующих ферменты анаэробного (фосфоенолпируват карбоксикиназы) и аэробного (пируваткиназы) гликолиза (Mulvenna et al., 2010).

Экзистировавшие метацеркарии (ювенильные формы взрослых червей) при попадании в организм млекопитающего изначально расходуют энергию, запасенную в виде гранул гликогена и липидных капель в выделительном пузыре червя. Как только они попадают в желчный проток, их энергетические запасы быстро истощаются, и с этого момента черви должны потреблять питательные вещества и накапливать энергетические ресурсы, необходимые для роста, развития и размножения. Желчь богата мицеллами, липопротеинами высокой, средней, низкой и очень низкой плотности, которые содержат триглицериды, фосфолипиды, холестерин и амфипатические белки в различных пропорциях. Желчь также обогащена аминокислотами с разветвленной структурой и длинноцепочечными жирными кислотами (насыщенной пальмитиновой кислотой, а также ненасыщенными линолевой и арахидоновой кислотами).

Ювенильные и взрослые черви, паразитирующие в желчном протоке, активно экспрессируют ферменты, непосредственно участвующие в метаболизме компонентов желчи, в том числе деградации свободных липидов (через митохондриальное бета-окисление жирных кислот) и пептидов (через метаболизм аминокислот с разветвленной цепью). Интересно, у описторхид найден ген гомолог фосфолипазе A2 (PLA2) (Young et al., 2014). Эти липазы могут активировать деградацию стабильных мицелл и возможно

даже мембран клеток хозяина, увеличивая доступность для паразита углеводов, белков и липидов. Кроме того, описторх производит большое число ферментов, необходимых для последующего разрушения мицелл. Показано, что цистеиновые (катепсин F, B), сериновые (химотрипсин-подобные) и аспартат (пепсин-подобные и катепсин D) пептидазы выбрасываются трематодами в окружающее пространство (Robinson et al., 2009; Mulvenna et al., 2009). В целом, эти пептидазы обладают широкой субстратной специфичностью и могут разрушать различные липопротеиновые комплексы и белки.

Аминокислоты и пептиды попадают в ткани паразита, по-видимому, с помощью белков-транспортеров аминокислот, затем подвергаются дальнейшим биохимическим превращениям через формирование ацетил-кофермента А. Трематоды не способны синтезировать холестерол. Однако трематоды обладают белками, необходимыми для поглощения, накопления, транспорта и переработки экзогенного холестерола из обогащенной холестеролом среды. Один из возможных механизмов транспорта холестерола – через скэвенджер-подобный рецептор (scavenger-like receptor SR-B1), гомолог которого у млекопитающих переносит холестерол через мембрану внутрь клетки, используя в качестве источника холестерола липопротеины высокой плотности. В геноме описторха найдены гены белков, гомологов LDL рецептора и CD36-подобных рецепторов, которые участвуют в захвате липопротеинов низкой плотности и жирных кислот, соответственно. Внутри эндосом и лизосом в клетках паразита эфиры холестерола, по-видимому, гидролизуются до свободного холестерола с помощью кислой липазы (Young et al., 2014).

Желчь и желчные кислоты являются токсичными для большинства типов клеток, вызывая образование активных форм кислорода и запуская каскад реакций перекисного окисления липидов. Клетки печени млекопитающих часто подвергаются действию эндогенных и экзогенных токсинов, канцерогенов, лекарственных препаратов и их метаболитов (ксенобиотиков), которые в большом количестве накапливаются и метаболизируются в печени. Считается, что в желчных протоках описторх защищает себя, используя для этих целей белки антиоксидантной защиты, в частности, глутатион-S трансферазы (Callahan et al., 1988; Donnelly et al., 2005).

Чтобы избежать избыточного накопления холестерола в лизосомах, холестерол может быть связан с NPC2-подобным белком и транспортирован в цитозоль. В цитозоле холестерол превращается в эфир холестерола с помощью фермента лецитин:холестерол

ацетилтрансферазы, после чего этому эфиру предстоит элиминация из клетки через систему клеточных транспортеров, например АТФ-транспортеров.

В геноме описторхид найдено большое число генов, отвечающих за внутриклеточный и внеклеточный транспорт липидов (25 генов гомологов NPC2 белка человека) (Young et al., 2014). Такое число генов у описторхид свидетельствует о важности функций, которые эти белки выполняют для жизни паразита. В отличие от описторхид, человек, например, обладает всего одним представителем этого семейства белков.

Существует гипотеза, что описторхиды могут питаться клетками желчных протоков (холангиоцитами). В их геноме найдены гены ферментов галактозил церамидазы и сфингомиелин фосфодиэстеразы. Эти лизосомальные ферменты необходимы для гидролиза сфингомиелина – вещества, которым очень богаты холангиоциты.

Таким образом, в геномах описторхид представлены гены, кодирующие обширный репертуар ферментов и рецепторов, необходимых для поглощения, связывания и/или превращение питательных веществ, являющимися компонентами желчи и эпителия желчных протоков. Такие адаптации, вероятно, позволяют описторху эффективно использовать все доступные компоненты желчи и эпителия протоков, чтобы выжить в чрезвычайно жестких и агрессивных физиологических условиях в желчных путях.

2.2. Секреторные белки. Воздействие гельминтов на иммунную систему.

Одним из ключевых механизмов, регулирующих взаимоотношения «паразит-хозяин», считается выброс экскреторно-секреторного продукта (ЭСП) паразитических червей. Название продукта обусловлено тем, что часть белков и метаболитов попадают в окружающее пространство через экскреторную систему червя, часть - через пищеварительную систему; а часть компонентов ЭСП секретируется наружу через образование микровезикул (экзосом) с поверхности паразита (Chaiyadet et al., 2015). Поскольку в отношении многих компонентов ЭСП механизм, с помощью которого они попадают наружу, неизвестен, поэтому все компоненты продуктов жизнедеятельности паразита традиционно называют ЭСП.

Белки, входящие в состав ЭСП у трематод, играют ключевую роль в различных аспектах взаимоотношений «паразит-хозяин», например, способствуют проникновению паразита через ткани хозяина (Robinson et al., 2009), избеганию иммунного ответа хозяина или модулированию иммунного ответа (Loukas et al., 2001; Donnelly et al., 2005; Park et al., 2009), участвуют в морфофункциональной перестройке окружающих тканей и обеспечении питательными веществами паразита (Berasain et al., 1997; Robinson et al., 2009; Smout et al., 2009; Daouang et al., 2012). В свою очередь, все это способствует длительному паразитированию гельминтов в организме окончательного хозяина.

Состав мажорной фракции секретама взрослой особи *O. felineus* был определен в нашей лаборатории, он включал в себя 37 белков, которые можно разделить на следующие группы: белки цитоскелета (бета-тубулин, парамиозин), антиоксидантные (Cu/Zn супероксиддисмутаза, глутатион-S-трансферазы (GST), тиоредоксин пероксидаза, тиоредоксин), транспортные белки, протеолитические, метаболические ферменты, ингибиторы протеаз и прочие (Львова и др., 2014). Из группы антиоксидантных белков заслуживают особого внимания GST, так как в ЭСП *O. felineus* их содержится 4 изоформы: мю класса – 26 кДа; сигма класса – 28кДа и 24кДа и GST омега-1. GST – обширное семейство белков, представляет собой ферменты фазы 2 конъюгации метаболизма ксенобиотиков. Считается, что GST выполняют защитную детоксификационную функцию, связывая глутатион и эндогенные или экзогенные электрофильные компоненты, такие как лекарства или токсические метаболиты, продуцируемые при окислительном стрессе. Считается, что они обезвреживают

активные формы кислорода, продуцируемые в процессе жизнедеятельности паразитов, а также при атаке клеток иммунной системы хозяина (Callahan et al., 1988; Donnelly et al., 2005). К следующей группе белков относятся метаболические ферменты (уроканат гидратаза, глутаматдегидрогеназа, ретинол-дегидрогеназа), в том числе ферменты углеводного обмена (фруктозо-1,6-бисфосфатаза, фосфоенолпируват-карбоксилаза, фруктозо 1,6-бисфосфат альдолаза, енолаза, лактатдегидрогеназа, триозофосфатизомераза). Хотя это традиционно цитозольные ферменты, они определяются у большинства трематод в ЭСП (Knudsen et al., 2005, Mulvenna et al., 2010; Marcilla et al., 2012).

Другим важным компонентом секрета *O. felineus* являются транспортные белки: миоглобин, ферритин, белок, связывающий жирные кислоты (FABP, fatty acid binding proteins). В секрете *O. felineus* идентифицированы протеазы: катепсины F и B1, цистеиновая протеаза и лейцинаминопептидаза 2 и ингибиторы сериновых и цистеиновых протеаз. Кроме того, в состав секреторного продукта входит гранулин (гомолог гранулина млекопитающих). Гранулин человека регулирует пролиферацию эпителиальных клеток. Гранулин описторха *O. viverrini* накапливается внутри желчных протоков, попадает в холангиоциты, увеличивает их пролиферацию (Chaiyadet et al., 2015). Показано, что у человеческого и паразитарного гранулинов функции похожи, структура похожа, но действуют они через разные клеточные пути. Если гранулин человека действует через TNF рецепторы на поверхности клеток, является антагонистом TNF пути передачи сигнала, активирует воспаление и NFκB. В отличие от этого гранулин паразита не связывает TNFR. Гранулин паразита действует через систему MAPK киназ и рецептор эпидермального фактора роста EGFR (Chaiyadet et al., 2015; Smout et al., 2009). Это намного более мощный путь активации пролиферации. Гранулин гельминтов увеличивает скорость заживления ран и рост кровеносных сосудов. Наши австралийские коллеги взяли эти результаты на вооружение и создали спрей для лечения ран животных на основе белка гранулина *O. viverrini* (Michael Smout, личные сообщения).

Интересно, что как и у других трематод в составе ЭСП *O. felineus* присутствует большое количество не секретлируемых белков, т.е. белков, не имеющих сигнальных пептидов (изоформы GST, цитозольные и цитоскелетные белки). Этому есть, по крайней мере, несколько объяснений. Во-первых, в культуральную среду могут попадать участки

слущенного тегумента, цитозольные и цитоскелетные белки (Morphew et al., 2007). Кроме того, известно, что у трематод наблюдается секреция с помощью внеклеточных везикул, экзосом. Это везикулы 30 -100 нм в диаметре, с помощью которых осуществляется атипичная секреция белков (Marcilla et al., 2012). Так доказано, что *E. caproni* и *F. hepatica*, *O. viverrini* секретируют большинство определенных в их ЭСП белков в окружающие паразита ткани хозяина с помощью экзосомоподобных везикул (Marcilla et al., 2012; Chaiyadet et al., 2015).

Избегание действия иммунитета хозяина. Уклонение от иммунного ответа хозяина имеет первостепенное значение для паразита, особенно если воспаление сопровождается повреждениями клеток протоков, вызванных активностью паразита. Экспериментальные данные показывают, что экскреторно-секреторный комплекс белков способен модулировать иммунный ответ хозяина. Например, пептиды HDM (host defense molecule), способные имитировать защитные пептиды HDM хозяина (так называемые, человеческие защитные пептиды (host defence peptides - HDPs) - кателицидины) (Robinson et al., 2011). Показано, что FhHDM-1 у *F. hepatica*, массой 8 кДа, обладает иммуномодулирующими свойствами: препятствует процессингу антигенов в макрофагах хозяина, что в свою очередь нарушает презентацию антигенов на поверхности макрофага, препятствуя развитию эффективного Th1 ответа, а также развитию воспаления, индуцированного эндотоксином бактерий, связывая и нарушая взаимодействие липополисахаридов с Toll-подобными рецептами 4 на поверхности макрофагов и предотвращая секрецию медиаторов воспаления.

Другим примером может служить тиоредоксин пероксидаза, которая модулирует иммунный ответ хозяина, запуская альтернативный путь активации макрофагов, с повышенной продукцией противовоспалительных цитокинов [Donnelly et al., 2005]. Они направлены на усиление репаративных процессов. Кроме того, показано, что именно этот белок обладает также способностью снижать апоптоз холангиоцитов.

2.3. Потенциальные механизмы развития холангиокарциномы. Специфические оксистеролы

Два вида гельминтов семейства Opisthorchiidae *O. viverrini* и *C. sinensis* признаны Международным агентством по исследованию рака основной причиной развития холангиокарциномы в эндемичных регионах. Рак, как правило, возникает после 20-ти летней болезни в возрасте около 60 лет, на фоне хронического воспаления (Sripa et al., 2012). Механизм развития холангиокарциномы при инвазии описторхид исследован фрагментарно, однако факты, накопленные прежде всего при работе с *O. viverrini*, позволяют составить вероятную схему процессов холангиокарциногенеза. *O. viverrini* способен вызывать поражения эпителия желчных протоков: (i) за счет механических повреждений паразитами желчных протоков; (ii) в результате воздействия активных форм кислорода, генерируемых клетками хозяина в очаге воспаления; (iii) а также, за счет прямого воздействия секретируемых описторхами белков, индуцирующих пролиферацию и ингибирующих апоптоз клеток (Chaiyadet et al., 2015; Matchimakul et al., 2015; Paratpremsiri et al., 2015). Все эти процессы приводят к повреждениям генетического материала, мутациям, которые фиксируются в процессе репликации ДНК. В конечном итоге, в результате накопления мутаций может произойти злокачественная трансформация холангиоцитов и образование холангиокарциномы (Sripa et al., 2012; Chaiyadet et al., 2015; Correia da Costa et al., 2014).

Недавно появились сведения о том, что канцерогенные трематоды *O. viverrini* и *S. haematobium* синтезируют специфические оксистеролы и катехол-эстрогены, которые могут действовать как генотоксические соединения (Correia da Costa et al., 2014; Vale et al., 2013).

Оксистеролы – это продукты окисления холестерина. Оксистеролы обладают провоспалительными и мутагенными свойствами. Основные оксистеролы в организме – желчные кислоты (холевая и дезоксихолевая кислоты и продукты их конъюгации). Оксистеролы в организме человека модифицированы по положениям C 3, 7, 12, 17, 24 стероидных колец.

При контакте с основанием ДНК оксистеролы (**Рисунок 4**) образуют конъюгаты с основаниями ДНК и затем как бы выхватывают основание ДНК, оставляя в структуре

ДНК апуриновый сайт (**Рисунок 5**). Апуриновые (АП) сайты производятся постоянно. Системы репарации ДНК, в частности ферменты АП-гликозилазы, направлены на репарацию апуриновых сайтов. Однако в определенных условиях генерации большого числа АП-сайтов или недостатке системы репарации, АП-сайт может не репарироваться и тогда при репликации ДНК возникнет точковая мутация (Cavalieri, Rogan, 2011). Известно, на примере *E. coli*, что напротив АП-сайтов всегда встраивается Аденин («правило А»).

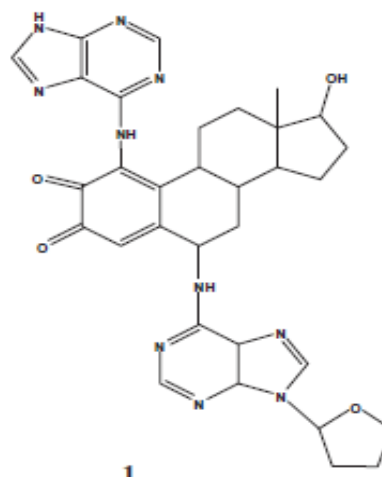
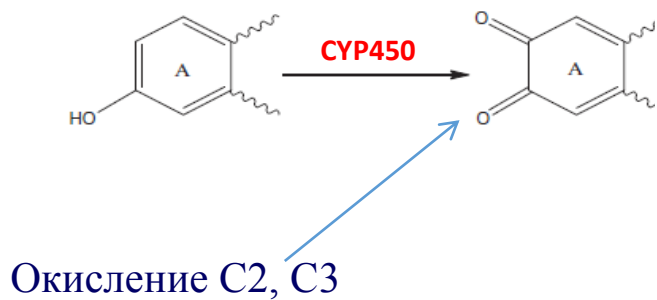
Повышенная продукция оксистеролов ассоциирована с патологическими изменениями организма. В частности, это показано на примере эстрадиола и его метаболизма у человека (Cavalieri, Rogan, 2011). Метаболизм эстрадиола протекает с помощью ферментов цитохромов P450, с образованием гидроксипроизводного, а затем кетонного производного эстрадиола. Кетонный метаболит эстрадиола является реакционноспособным сам по себе и способен реагировать с основаниями ДНК, вызывая образование АП-сайтов (**Рисунок 5**). Было показано, что у людей с повышенным риском рака груди (в группе риска и в группе больных) конъюгаты оксистеролов с основаниями ДНК находились в гораздо более высоком содержанием в моче, чем у здоровых людей (Cavalieri, Rogan, 2011).

Оказалось, что трематоды, в частности *S. haematobium* также могут генерировать оксистеролы (**Рисунок 4**). Структуры оксистеролов, найденных в лизатах шистосом, не похожи на оксистеролы и катехол эстрогены человека. Часть из них отличалась, в частности, химической модификацией одновременно по положениям 2 и 3 кольца А холестерина. Такие 2,3-катехолэстрогены обнаруживали в лизатах паразитов, в их яйцах, а также в крови и моче индивидуумов, больных шистосомозом. *S. haematobium* живет в кровеносных сосудах малого таза и признан биологическим канцерогеном для людей, заражение этим паразитом приводит к раку эпителия мочевого пузыря (IARC, 2012). Считается, что специфические генотоксические катехол-эстрогены являются существенной составляющей канцерогенного потенциала *S. haematobium* (Correia da Costa et al., 2014; Gouveia et al., 2015).

Канцерогенный потенциал *O. felineus* изучен намного слабее. Масштабных эпидемиологических исследований не было проведено в России. Есть отрывочные данные по отдельным регионам и показатели заболеваемости за отдельные короткие временные промежутки. Канцерогенный потенциал описторха изучается в нашей

лаборатории на грызунах, и показано, что в-целом, он протекает с участием тех же процессов и стадий, что и у близкородственных азиатских представителей *O. viverrini* и *C. sinensis*. При этом наблюдается сильное воспаление, образование фиброзов, пролиферация желчных протоков, холестаза (**Рисунок 6**). Вполне вероятно, что специфические генотоксические метаболиты, такие как оксистеролы являются существенной составляющей канцерогенного потенциала описторхид (Brindley et al., 2015).

В нашей лаборатории ведутся исследования биологии (Pakharukova et al., 2015; Ovchinnikov et al., 2015; Brusentsov et al., 2013), транскриптомики (Pomaznoy et al., 2013), функциональной геномики *O. felineus* (Pakharukova et al., 2014), включая механизмы метаболизма описторхид, участвующие в синтезе генотоксических соединений. С этой точки зрения важно исследовать существование специфических паразитарных метаболитов холестерина у описторхид *Opisthorchis felineus*. В случае обнаружения таких специфических оксистеролов важно исследовать структурно-функциональную организацию систем метаболизма и транспорта ксенобиотиков у описторхид, наиболее вероятно вовлеченных в процесс формирования таких метаболитов.



2,3-Катехол эстроген

Рисунок 4. Позиции окисления стероидного кольца и пример 2-3 катехолэстрогена *S. haematobium*. Катехолэстроген конъюгирован с пуриновыми основаниями ДНК.

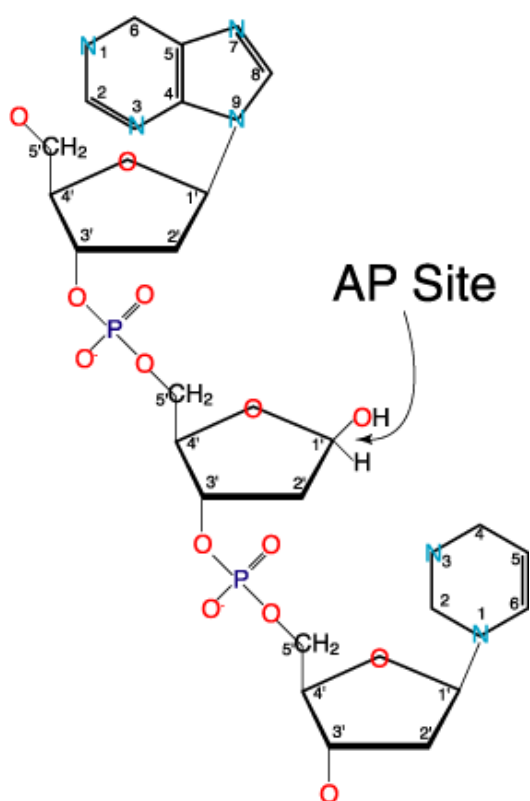


Рисунок 5. Апуриновый сайт в структуре ДНК.

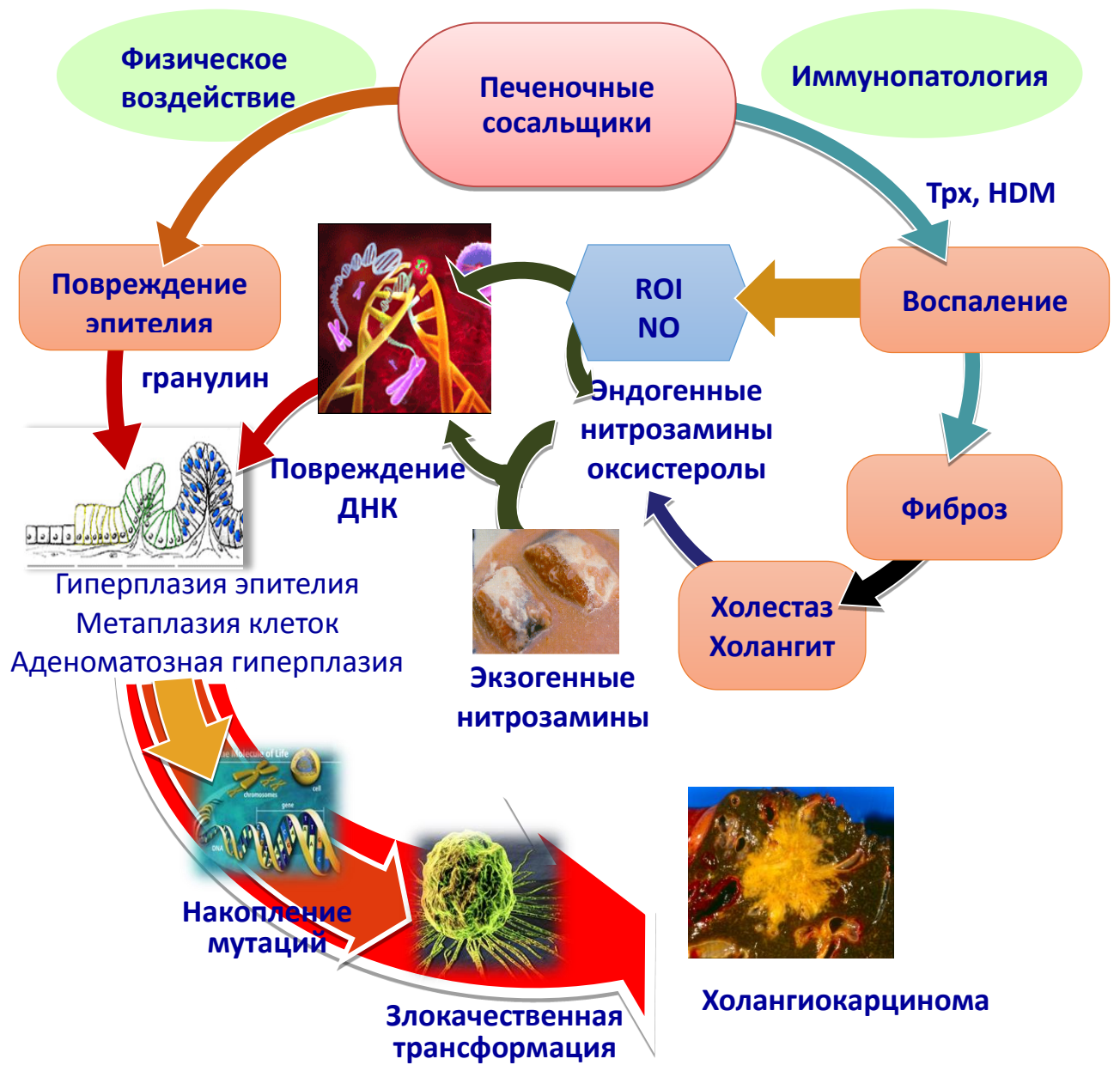


Рисунок 6. Потенциальные механизмы развития холангиокарциномы (Sripa and Pairojkul, 2008).

Глава 3. Система метаболизма ксенобиотиков

3.1. Состав и функции системы метаболизма ксенобиотиков

Способность живых организмов к метаболизму чужеродных соединений и лекарственных препаратов является естественным процессом, в который вовлечены те же самые ферментативные пути и транспортные системы, используемые для нормального метаболизма биологически активных компонентов. Живые организмы сталкиваются с десятками чужеродных химических веществ (ксенобиотиков) при взаимодействии с окружающей средой, например, при потреблении пищи. Ксенобиотики - это липофильные химические вещества, которые при отсутствии метаболизма не выводятся эффективно из организма и накапливаются внутри, что многократно усиливает их токсический эффект. У всех видов организмов есть средство для быстрого устранения ксенобиотиков из организма. Типичным примером ксенобиотиков служат токсичные вещества в ядовитых грибах, смертельных для млекопитающих, таких как аманитин, ореллантин, мускарин, иботеновая кислота, муцимол, псилоцибин и коприн. Животные должны обладать способностью усваивать и устранять такие химические вещества, поступающие к ним с пищей. Способность к метаболизму необычных химических веществ в растениях и других источниках пищи имеет решающее значение для выживания. Диетические различия между видами в ходе эволюции могут теоретически объяснить разнообразие ферментов у живых организмов и сложность устройства системы метаболизма чужеродных соединений.

Лекарственные препараты также являются ксенобиотиками. Многие препараты были получены из химических веществ, обнаруженных в растениях, некоторые применялись в народной медицине сотнями лет.

Ферменты биотрансформации ксенобиотиков и лекарственных препаратов, исторически называют ферментами метаболизма ксенобиотиков, хотя они участвуют в биотрансформации многих химических веществ, в частности, стероидных гормонов, витаминов, жирных кислот, холестерина.

За очень немногими исключениями, все ксенобиотики подвергаются одному или нескольким путям метаболизма, которые представляют собой ферментативные системы фаз 1 и 2, а также систему белков, отвечающих за выведение из клетки. Таким образом,

биотрансформация необходима для преобразования этих гидрофобных химических веществ в их гидрофильные производные, которые могут быть легко выведены с мочой или желчью.

В то время как ферменты метаболизма ксенобиотиков способствуют выведению чужеродных химических веществ из организма, как ни парадоксально, те же ферменты могут также преобразовывать определенные химические вещества в высоко реакционные токсичные и канцерогенные метаболиты. Это происходит, когда в результате реакции образуется нестабильный промежуточный продукт, который реакционно активен по отношению к другим соединениям и структурам в клетке. Необходимо отметить, что большинство злокачественных опухолей человека обусловлено воздействием химических канцерогенов. Некоторые соединения после активации ферментами метаболизма ксенобиотиков приобретают канцерогенную активность и в конечном итоге могут привести к образованию опухолей. В зависимости от структуры химического субстрата, ферменты производят электрофильные метаболиты, которые могут вступать в реакцию с нуклеофильными клеточными макромолекулами, такими как ДНК, РНК и белки. Взаимодействие электрофильных метаболитов с ДНК при дефиците работы репарационных систем приводит к мутационным изменениям в ДНК, а накопление мутаций, в свою очередь, к злокачественному перерождению клетки через образование мутаций в определенных генах, таких как онкогены или гены-супрессоры опухолей.

3.2. Фаза 1, ферменты, реакции. Цитохромы P450.

Ферменты метаболизма ксенобиотиков, осуществляющие окисление, восстановление или гидролитические реакции субстратов, сгруппированы в ферменты фазы 1. Активность этих ферментов заключается в введении в молекулу субстрата функциональных групп, что приводит к химической модификации субстрата, в частности, происходит образование новых групп: -ОН, -СООН, -SH, -О- или группы NH₂ (Montellano 2005). Добавление функциональных групп незначительно увеличивает растворимость в воде липофильного ксенобиотика, но может резко изменить его биологические свойства. Химические превращения субстрата во время фазы 1 обычно приводят к инактивации активного лекарственного средства. В некоторых случаях,

химические реакции во время фазы 1, как правило, это гидролиз сложного эфира или амидной связи, приводит к биоактивации препарата. Примером неактивного препарата, которому необходима биоактивация, для того чтобы проявить свои лекарственные свойства, может служить противоопухолевый препарат циклофосфамид, который подвергается биотрансформации и в таком состоянии электрофильного производного проявляет свою активность.

Реакции 1-й фазы окисления осуществляют ферменты цитохромы P450 (CYP), флаavin содержащие монооксигеназы (ФМО), и эпоксидгидролазы (Montellano 2005). Семейства генов CYP и ФМО состоят из надсемейств ферментов. Каждое надсемейство содержит множество генов.

Цитохромы P450 - это суперсемейство ферментов, все содержат молекулу гема, как кофактор, который нековалентно связан с полипептидной цепью (**Рисунок 7**). Гем является кислород-связывающей молекулой, которая содержит один атом железа в центре углеводородной структуры (**Рисунок 7**). Гем выполняет функцию связывания кислорода в активном сайте фермента. Ферменты CYP используют молекулу кислорода, а также атом водорода H^+ , полученного от никотинамидадениндинуклеотидфосфата (NADPH), чтобы осуществить окисление субстратов. Атом H^+ подается через фермент НАДФ-цитохром P450-оксидоредуктазу, который работает как партнер для цитохромов P450. Метаболизм субстрата с помощью CYP протекает с поглощением одной молекулы молекулярного кислорода и с образованием окисленного субстрата и молекулы воды в качестве побочного продукта. Термин P450 происходит от спектрофотометрического пика при длине волны максимума поглощения фермента (450 нм), когда он находится в восстановленном состоянии в виде комплекса с монооксидом углерода (**Рисунок 7**).

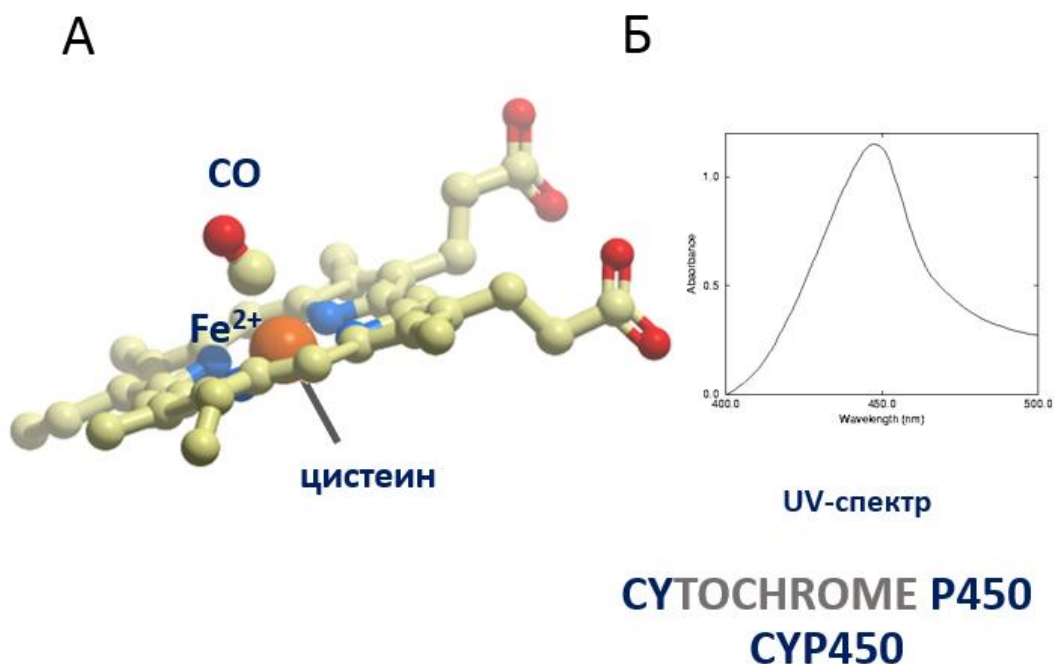


Рисунок 7. Цитохром P450. **А.** Гем в структуре цитохрома P450 с восстановленным ионом железа в комплексе с монооксидом углерода. **Б.** Спектр поглощения цитохрома P450 с гемом с восстановленным ионом железа в комплексе с монооксидом углерода.

Среди разнообразных реакций, осуществляемых цитохромами P450, наиболее известны реакции N-деалкилирования, O-деалкилирования, гидроксילирования ароматических углеводородов, N-окисление, S-окисление, дезаминирование. У человека идентифицированы более 50 белков P450. CYP участвуют в метаболизме ксенобиотиков, а также синтезе эндогенных соединений, таких как стероиды и желчные кислоты, которые являются побочными продуктами распада холестерина. В отличие от CYP, способных метаболизировать препараты, ферменты P450, которые метаболизируют стероиды и синтезируют желчные кислоты, имеют очень специфические предпочтения к субстрату. Например, CYP, который производит эстроген из тестостерона, может метаболизировать только тестостерон и не метаболизирует ксенобиотики. Специфические ингибиторы этого фермента, такие как анастрозол, были разработаны для применения в лечении эстроген-зависимых опухолей. CYP, участвующие в производстве желчных кислот имеют строгие предпочтения к субстратам и не участвуют в метаболизме ксенобиотиков или лекарственных препаратов.

CYP метаболизма ксенобиотиков имеют способность модифицировать большое количество структурно различных химических веществ. Это связано как с множественностью форм CYP, так и со способностью одного CYP модифицировать многие структурно различные химические вещества. Одно и то же соединение также может подвергаться биотрансформации различными CYP, хотя и с разной скоростью. Кроме того, CYP может модифицировать одно соединение в разных положениях на молекуле. Эти гены группируются на основе сходства аминокислотных последовательностей кодируемых ими белков, на большое количество семейств и подсемейств. Название индивидуальных цитохромов P450 состоит из корня CYP с последующей цифрой, обозначающей семейство, буквой, обозначающей подсемейство, и затем идет другая цифра, обозначающая форму CYP. Таким образом, CYP3A4 означает семейство 3, подсемейство A, и ген номер 4.

Даже если CYP имеет медленную скорость каталитического процесса, их действия являются достаточными для метаболизма препаратов, которые вводят в организм в высоких концентрациях. Эта необычная особенность широкой субстратной специфичности со стороны CYP является одной из основных причин эффекта лекарственных взаимодействий. Когда два препарата модифицируются одним CYP, они конкурируют за связывание с активным центром фермента. Это может привести к ингибированию метаболизма одного или обоих препаратов, что приводит к их повышенному уровню в плазме. CYP наиболее активно изучаются среди всех ферментов метаболизма ксенобиотиков, поскольку они несут ответственность за метаболизм подавляющего большинства терапевтических препаратов. CYP сложны и разнообразны в регуляции активности их генов и каталитической активности, которую они проявляют. В настоящее время известно 102 функционально активных генов CYP у мышей и 57 у человека.

В то время как несколько семейств цитохромов участвуют в синтезе стероидных гормонов и желчных кислот, а также метаболизме ретиноевой кислоты и жирных кислот, в том числе простагландинов и эйкозаноидов, ограниченное число CYP (15 у человека), (семейства 1-3), в основном, участвуют в метаболизме ксенобиотиков. Так как один CYP может метаболизировать большое количество структурно различных соединений, эти ферменты могут коллективно подвергать биотрансформации множество химических веществ из окружающей среды, продуктов питания,

лекарственных препаратов. У человека 12 СYP наиболее важны для метаболизма ксенобиотиков (СYP1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4 и 3A5).

Флаavin-содержащие монооксигеназы (ФМО) являются еще одним суперсемейством фазы 1 ферментов, участвующих в метаболизме лекарственных средств. Подобно СYP, ФМО экспрессируются на высоком уровне и связаны с эндоплазматической ретикулумом, местом в клетке, где происходит взаимодействие и метаболизм гидрофобных субстратов. Экспрессия ФМО не индуцируется ни одним из рецепторов ксенобиотиков.

Эпоксидгидролазы – это ферменты, катализирующие гидролиз эпоксидов, полученных в результате реакций СYP. Эпоксиды обладают высокой реакционной способностью и являются электрофильными, могут связываться с клеточными структурами, белками, РНК и ДНК, что приводит к нежелательным последствиям как для клетки, так и для организма. Эпоксидгидролазы участвуют в инактивации потенциально токсичных производных.

3.3. Фаза 2 конъюгации, ферменты, реакции

Ферменты, составляющие фазу 2, отвечают за выведение ксенобиотиков и лекарственных препаратов из организма и инактивацию электрофильных и потенциально токсичных метаболитов, продуцируемых ферментами фазы 1. В то время как многие реакции фазы 1 приводит к биологической инактивации препарата, продукты реакции фазы 2 - это метаболиты с улучшенной растворимостью в воде и повышенной молекулярной массой.

Ферменты, объединенные в фазу 2 метаболизма ксенобиотиков, включают в себя несколько надсемейств ферментов конъюгации. Наиболее важными из них являются глутатион-S-трансферазы (GST), UDP-глюкуронозилтрансферазы (УГТ), сульфотрансферазы, N-ацетилтрансферазы (NAT) и метилтрансферазы (MT). Реакции конъюгации, которые выполняют эти ферменты, происходят, когда субстрат имеет кислород-содержащую группу (гидроксильную или эпоксидную группы), аминогруппу, или атомы серы, которые служат в качестве акцептора для гидрофильного остатка молекул, такого как глутатион, глюкуроновая кислота, сульфат, или ацетильная группа, которая ковалентно конъюгируется с акцепторным сайтом на молекуле ксенобиотика. Окисление фазы 1 ферментами, либо добавляет, либо модифицирует функциональную группу, разрешая полученным продуктам реакции служить в качестве субстратов для фазы 2 конъюгирующих ферментов. В результате реакции метаболит, который является в настоящее время более растворимым в воде с более высокой молекулярной массой, выводится с мочой или желчью.

3.4. Фаза экскреции. Ферменты клеточной экскреции

Выведение из клетки токсинов и лекарственных препаратов обусловлено работой белков и компонентов экскреторной системы. Основными белками, контролирующими клеточную экскрецию ксенобиотиков и метаболитов являются АТФ-связывающие белки (ABC, ATP-binding cassette) и OATP2 белки (organic anion transporting polypeptide 2) (Xu et al., 2005). АТФ - связывающие белки найдены у всех видов животных и растений от прокариот до эукариот (Dassa, Bouige, 2001).

АВС-белков обладают консервативной структурой, имеют несколько трансмембранных доменов и обладают широкой субстратной специфичностью. У млекопитающих эти транспортеры осуществляют АТФ-зависимый транспорт токсических соединений и лекарственных препаратов из клетки во внеклеточное пространство через мембрану.

Несмотря на то, наблюдаются различия в их функции и типах распознаваемых субстратов, они имеют высокую степень структурной гомологии (Higgins, 2007). Р-гликопротеин человека (ABCB1), который кодируется геном MDR1 наиболее известный и изученный АВС-транспортер среди АВС-белков человека. ABCB1 был впервые открыт в 1976 году (Juliano, Ling, 1976) из-за его причастности к множественной лекарственной устойчивости раковых клеток к химиотерапии (Gottesman, Ling, 2006), в связи с чем и получил свое название (multidrug resistance, ген множественной лекарственной устойчивости, MDR). Белок состоит из двух частей, которые имеют высокую степень сходства. Каждая гомологичная часть содержит шесть гидрофобных трансмембранных доменов и гидрофильного внутриклеточного участка, кодирующего сайт связывания аденозинтрифосфата (АТФ) (нуклеотид - связывающий домен, NBD) (**Рисунок 8**). Из-за высокой активности этого трансмембранного канала цитотоксические препараты выбрасываются из клеток прежде, чем они оказывают свое лекарственное действие на клетку. Активность этого белка приводит к неэффективности химиотерапии против СПИДа и рака.

Повышенная экспрессия этих белков приводит к формированию фенотипа множественной лекарственной устойчивости у бактерий или у раковых клеток млекопитающих (James et al., 2009; Xu et al., 2005).

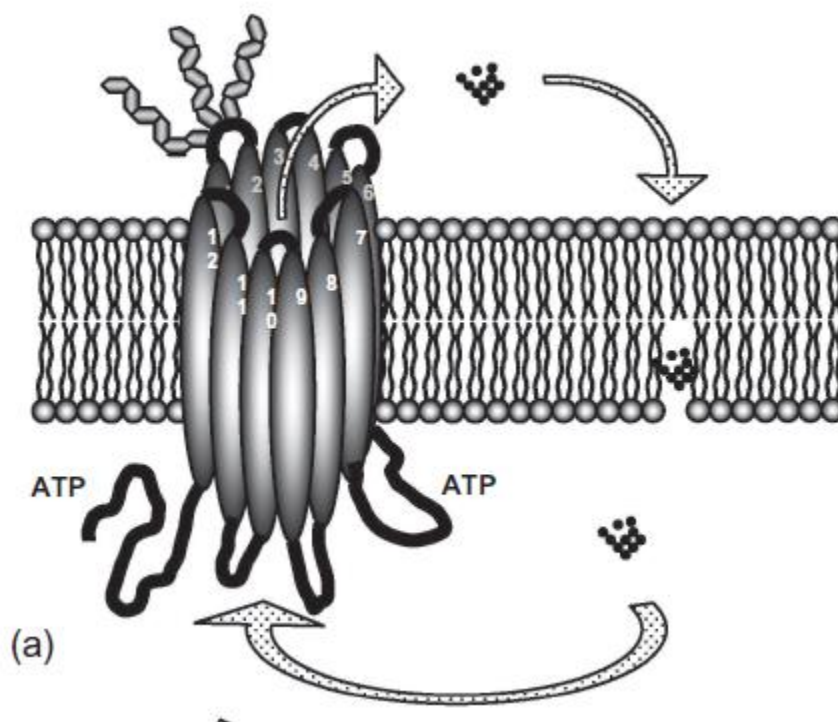


Рисунок 8. Структура АТФ-связывающего канала. На схеме представлен полный транспортер, т.е. транспортер, который содержит 12 трансмембранных каналов и два АТФ-связывающего участка. При связывании и гидролизе АТФ происходит экскреция широкого ряда субстратов в межклеточное пространство.

На сегодняшний день нет ни одного примера эукариотической АВС транспортера, выполняющего роль импорта веществ в клетку, все являются экспортерами из клетки. Тем не менее, АВС транспортеры в эукариотических клетках приспособлены для выполнения широкого спектра специализированных ролей, например, участвуют в транспорте лейкотриенов, ксенобиотиков, транспорте липидов (Dassa, Bouige, 2001). На сегодняшний день неизвестно, чем обеспечивается такая широкая субстратная специфичность при экскреции АВС транспортерами.

Глава 4. Система метаболизма ксенобиотиков у гельминтов

4.1. Состав системы и функции. Связь с устойчивостью к лекарственным препаратам.

Выведение из клетки токсинов и лекарственных препаратов обусловлено работой белков системы метаболизма ксенобиотиков и экскреторной системы. Регуляция активности этой системы является одной из важных и актуальных проблем современной фармакогенетики и фундаментальной медицины и имеет большое значение для развития представлений о механизмах множественной лекарственной устойчивости, как на уровне клетки, так и целого организма, в том числе паразитического.

Цитохромы P450. Количество генов в геномах, кодирующих СYP (CYPome), различно, начиная от единичных форм у одних видов бактерий и грибов, заканчивая десятками форм у млекопитающих и сотнями СYP генов у растений.

Цитохромы P450 играют важную роль для жизнедеятельности и выживаемости червей и простейших. В частности, определено, что СYP *Leishmania donovani* необходим для выживаемости, способности к инвазии и биосинтеза эргостерола (McCall et al., 2015). Показано, что удаление одного аллеля из генома лейшмании приводит к измененному мембранному потенциалу, нарушениям в росте, снижению инвазивности и повышенной чувствительности к лекарствам (Verma et al., 2011). При удалении двух аллелей гена СYP450 паразит не способен выжить (Verma et al., 2011). По данным, полученным на круглых червях *C. elegans*, один из цитохромов P450 участвует в синтезе стероидного гормона, необходимого для развития во взрослую особь (Rottiers et al., 2006), тогда как другой P450 участвует в поддержании гомеостаза и запасании жирных кислот (Kulas et al., 2008), т.е. также выполняют значимые функции для поддержания гомеостаза и выживаемости. Известно, что у грибов СYP участвует в синтезе клеточной стенки спор, метаболизме стеролов мембран и производстве метаболитов, обладающих антибактериальной активностью (Montellano, 2005).

Несмотря на то, что цитохромы P450 представлены во всех царствах живой природы, долгое время из-за неудачных попыток их выявления считалось, что у паразитических плоских червей отсутствуют и сами СYP и способность окислять

ксенобиотики (Cvilink et al., 2009). Однако позднее была выявлена CYP подобная активность у некоторых видов паразитических Platyhelminthes, зарегистрирован факт превращения ряда лекарств в их неактивные метаболиты (Saeed et al., 2002; Robinson et al., 2004, Solana et al., 2009), и получены свидетельства о роли такой активности в устойчивости паразитов к лекарствам (Devine et al., 2010; Cvilink et al., 2009). В частности, альбендазол может окисляться до его метаболита альбендазол сульфоксида в тканях гельминтов нематод *H. contortus* (Matouskova et al., 2016), трематод *Dicrocoelium dendriticum*, *Fascioloides vogae* и цестод *Moniezia expansa* (Matouskova et al., 2016). *F. hepatica* может метаболизировать триклабендазол до его производных триклабендазол сульфоксида и триклабендазол сульфона, при этом количество метаболитов существенно повышено у устойчивых штаммов (Devine et al., 2010). Более того, если устойчивые штаммы фасциол инкубировать с кетоконазолом (ингибитор цитохромов P450), то эти гельминты становятся чувствительны к препаратам. Все эти данные косвенно указывают на наличие CYP системы у паразитических плоских червей. Однако на момент начала наших исследований информация по структуре, составу и функциям этих белков полностью отсутствовала. Нам удалось показать, что Opisthorchiidae обладают функционально активной системой биотрансформации и транспорта ксенобиотиков (Pakharukova et al., 2012; Pakharukova et al., 2015), данные изложены в разделе 2 результаты.

Ферменты фазы конъюгации. Гены, кодирующие ферменты фазы 2 метаболизма ксенобиотиков, широко представлены в геномах плоских и круглых паразитических червей, однако роль их изучена крайне фрагментарно.

У гельминтов глутатион-S-трансферазы (GST) участвуют в детоксификации гидроперекисей липидов и карбонильных соединений, вырабатываемых в большом количестве при окислительном стрессе. Эти ферменты представлены в геномах нематод и трематод, исследована активность некоторых рекомбинантных белков. Активность этих ферментов близка к активности их гомологов у млекопитающих, в частности, показано, что они катализируют инактивацию реактивных карбонильных соединений (глутатион-S-трансфераза). Однако, метаболитов лекарственных препаратов с глутатионом у гельминтов до сих пор не показано. Кроме того, нет никаких данных в настоящее время о том, что экспрессия и активность этих ферментов GST каким бы ни было образом ассоциирована с лекарственной устойчивостью у гельминтов. Таким

образом, возможно, у гельминтов функции этих белков в метаболизме экзогенных веществ не выражены. Более того, есть сведения, что GST больше ориентированы на функции, связанные с выживаемостью в условиях недостатка влаги (для *H. concortus*), а также с устойчивостью к термальному и окислительному стрессу (для *C. elegans*) (Matouskova et al., 2016). Необходимо отметить еще одно важное свойство глутатион-S-трансфераз у паразитических трематод. В то время как гомологи этих белков у млекопитающих являются строго цитоплазматическими ферментами, несколько форм глутатион-S-трансфераз у трематод секретируются наружу в составе так называемого секреторно-эксреторного продукта паразита и обнаруживаются в тканях хозяина, в частности, в клетках эпителия желчных протоков (холангиоцитах) хомяков, зараженных описторхами (Robinson et al., 2009).

В геномах нематод найдено большое число генов UGT. В частности, у *H. concortus* найдено 34 гена, а у *C. elegans* 72 гена (Matouskova et al., 2016). Конъюгация с остатком глюкозы – это один из основных путей биотрансформации бензимидазолов, таких как альбендазол и флубендазол у *H. concortus* и *C. elegans* (Matouskova et al., 2016). У устойчивых штаммов *H. concortus* производится гораздо больше конъюгатов глюкозы с альбендазолом и глюкозы с флубендазолом. Таким образом, эти ферменты, вероятно, могут быть вовлечены в механизм устойчивости к этим препаратам. К сожалению, в целом, информации об этих ферментах у трематод крайне мало.

АТФ-связывающие транспортеры. Гены этого семейства достаточно хорошо представлены в геномах плоских и круглых паразитических червей. В частности, у плоских паразитических червей *S. mansoni* показано около 20 генов в геноме. Считается, что работа именно этого семейства белков ассоциировано с выделительной системой паразитических червей. Особенностью этой системы у паразитов является также ее ключевая роль в системе взаимоотношений «паразит-хозяин», что обуславливает многообразие плеiotропных патогенных эффектов влияния на организм хозяина. Таким образом, выделительная система с одной стороны, по-видимому, обеспечивает поддержание гомеостаза и защиту внутренней среды от токсических соединений, в том числе от различных лекарственных препаратов, а с другой стороны, вероятно отвечает за секрецию патогенных белков.

Наибольший вклад в устойчивость к антипаразитарным препаратам вносит работа именно этого семейства белков (Greenberg, 2013). В частности, устойчивые изоляты *F.*

hepatica к триклабендазолу широко распространены по всему миру. У этих штаммов наблюдали повышенную экспрессию и активность ABC-транспортеров. Кроме того, нокаут отдельных Р-гликопротеинов у свободноживущих круглых червей *C. elegans* приводит к значительному усилению чувствительности к антигельминтным препаратам (Janssen et al., 2013). Более того, если *C. elegans* обрабатывать последовательно повышающимися концентрациями ивермектина, то таким образом можно получить изоляты с повышенной экспрессией этих генов и лекарственной устойчивостью (James and Davey, 2009). Устойчивость к ивермектину обеспечивается не одним геном, это мультигенный признак, тем, не менее, применение ингибиторов ABC-транспортеров, таких, как верапамил, увеличивало чувствительность к препаратам у устойчивых штаммов *C. elegans*, *H. concortus*, *C. oncophora*, *T. circumcincta* (Kotze et al., 2014).

У шистосом *S. mansoni* найдено около 20 генов в геноме, кодирующих ABC-транспортеры. Показано, что празиквантел действует как субстрат для ABC-транспортеров. У устойчивых к празиквантелу изолятов шистосом *S. mansoni*, экспрессия гена SMDR2, кодирующего белок, гомологичный Р-гликопротеину, существенно повышена. Ингибиторы Р-гликопротеинов и нокаун отдельных генов ABC-транспортеров увеличивают антипаразитарный эффект празиквантела у шистосом (Greenberg, 2013).

Таким образом, продемонстрирована прямая связь активности белков ABC-транспортеров и чувствительности к антипаразитарным препаратам у гельминтов.

4.2. Цитохромы P450 как молекулярные мишени для разработки антипаразитарных препаратов

Некоторые белки системы биотрансформации экзогенных субстратов являются важными фармакологическими мишенями, поскольку являются критическими для собственного метаболизма и выживаемости патогенов. В частности, речь идет в первую очередь о цитохромах P450. На основе ингибитора цитохрома P450 грибов более двадцати лет назад разработаны лекарственные препараты фунгициды, обладающие эффективным фунгицидным действием и активно применяющиеся в медицине и в

настоящее время (Montellano 2005). Это такие азольные соединения, как кетоконазол, флуконазол и другие имидазольные производные.

Известно, что у трипаносомы *Trypanosoma cruzi* CYP51 является важной фармакологической мишенью, в настоящее время идут клинические испытания лекарственных соединений, разработанных на основе кристаллической структуры цитохрома P450 *T. cruzi* и направленные на лечение трипаносомоза (Gunatilleke et al., 2012). Предварительно эти соединения, как было продемонстрировано, прошли успешное тестирование при лечении трипаносомоза на модельных животных.

Отдельным направлением в мировой науке является поиск белков трематод, которые могут быть использованы в качестве новых фармацевтических мишеней (Keiser, Utzinger, 2007). Исследование роли белков системы метаболизма ксенобиотиков трематод могут дать важную платформу для разработки новых антигельминтных препаратов на основе сфокусированного воздействия на выбранные системы белков паразита. Такие препараты на основе ингибиторов выбранных белков важны как в качестве монотерапии паразитозов, так и при разработке комбинаторных подходов в лечении паразитарных заболеваний.

Глава 5. Терапия описторхоза.

Учитывая широкое распространение описторхоза и клонорхоза по всему миру, представляется весьма актуальной задача разработки адекватных методов лечения и профилактики этих патологий. Поскольку до сих пор эффективных вакцин, профилактирующих паразитозы, не создано, основная роль в лечении инвазий принадлежит лекарственной терапии (van den Enden, 2009; Keiser, Utzinger, 2010). Выбор фармакологических препаратов для химиотерапии определяется несколькими характеристиками, среди которых широкий спектр действия, высокая эффективность и избирательность действия лекарства по отношению к паразиту, низкая токсичность и минимум побочных эффектов по отношению к постоянному хозяину, в первую очередь, человеку.

5.1. Празиквантел: механизмы действия, недостатки. Устойчивость к действию празиквантела. Эффективность празиквантела против *O. felineus*.

Первым препаратом, в наибольшей степени удовлетворяющим этим требованиям, оказался празиквантел. В настоящее время он является «the drug of choice» и широко применяется с середины 80-х годов для лечения трематодозов различной этиологии, в частности, описторхоза, клонорхоза, шистоматоза (Day, Botros, 2006; Keiser, Utzinger, 2010). Во многих эндемичных по шистосомозу регионах мира его назначают для профилактики паразитарных инвазий (preventive chemotherapy) (Keiser et al., 2014).

Механизм действия празиквантела. Празиквантел (PZQ) вызывает у плоских червей спазматические сокращения и паралич, разрушения тегумента, что проявляется в его отслоении и отшелушивании с поверхности паразита, разрушении, вакуолизации. Механизм действия празиквантела до конца неизвестен, считается, что под его воздействием повышается проницаемость клеточных мембран для ионов кальция, что вызывает паралич паразита. Кроме того, одним из ключевых эффектов антигельминтного действия празиквантела является его способность разрушать структуру тегумента, что позволяет клеткам иммунной системы атаковать внутренние ткани паразита. В частности, показана абсолютная смертность всех шистосом при суммарном действии низких

концентраций празиквантела и антисыворотки, тогда как ни один из этих факторов не оказывал такого эффекта в отдельности (Day, Votros, 2006).

Тегумент трематод выполняет несколько жизненно важных функций для червей: защита от клеток иммунной системы хозяина, всасывание питательных веществ, транспорт ионов и коммуникации с нижележащей нервной системой. Тегумент контактирует напрямую с мышечными волокнами, обеспечивая мгновенную реакцию мышц на внешние стимулы, такие как механическое давление, ионный градиент или градиент питательных веществ (Day, Votros, 2006). Сокращение мышц под действием PZQ сопровождается быстрым и стабильным поглощением ионов кальция из внешней среды, вызывая деполяризацию мембран клеток паразита (Chan et al., 2012).

До сих пор нет четкого представления о том, с какими именно активностями празиквантела связано его антипаразитарное действие. Известно, что он может связываться со структурным белком трематод – парамиозином, а также с отдельными субъединицами каналов транспортировки ионов Ca (Cav β , Cav1A) (Pica-Mattocchia et al., 2007; Chan et al., 2012). Доступные литературные данные по исследованию механизмов действия празиквантела в основном касаются его воздействия на шистосом и лечение шистосомозов, и в гораздо меньшей степени затрагивают описторхоз, вызванный печеночными сосальщиками, трематодами, паразитирующими в гепатобилиарной системе. В этом контексте, кошачья двуустка *O. felineus* остается вне поля зрения исследователей. Несмотря на эпидемиологическую значимость этого паразита, исследований эффективности празиквантела на *Opisthorchis felineus* в современной литературе представлено очень мало. В опубликованных работах внимание исследователей, как правило, было сконцентрировано на лечебном действии препарата. В частности, есть несколько работ по эффективности терапии описторхоза у людей в различных регионах России (Бронштейн и др., 91, Завойкин и др., 91), отдельные случаи лечения собак (Schuster et al., 2007).

Устойчивость к празиквантелу. В условиях повсеместного применения празиквантела время от времени появляются сообщения об обнаружении случаев низкой чувствительности паразитов к этому препарату и возникновения устойчивых изолятов (Greenberg, 2013). В частности, опубликованы случаи низкой эффективности терапии шистосомозов празиквантелом в Африке (Day, Votros, 2006), были выделены изоляты

Schistosoma mansoni, которые действительно подтвердили сниженную чувствительность к празиквантелу *in vitro*. И хотя, в целом, конкретных охарактеризованных устойчивых изолятов выделено немного, довольно часто можно встретить информацию о низкой эффективности терапии (low cure rates), например, при лечении клонорхоза во Вьетнаме, вызванного *Clonorchis sinensis*, удалось достигнуть всего 52% эффективности терапии (Day, Botros, 2006). В целом, эффективность лечения обычно составляет 60-80%, но практически никогда 100% (Greenberg, 2013).

Известно, что устойчивость к празиквантелу можно получить искусственным путем, получая потомство от особей, которых обрабатывали невысокими дозами празиквантела несколько жизненных циклов подряд. В частности, так были получены у разных групп исследователей резистентные к празиквантелу *S. mansoni* и *S. japonicum* (Day, Botros, 2006; Doenhoff et al., 2008). После проведения 7 пассажей 93% червей *S. mansoni* оставались живыми в концентрациях празиквантела, при которых 90% чувствительных особей погибала.

Необходимо отметить, что празиквантел не является лекарственным препаратом, совершенным во всех отношениях (Wu et al., 2011; Keiser, Utzinger, 2010), поскольку (1) неэффективен в отношении яиц и ювенильных форм паразитов; (2) не свободен от побочных эффектов, (3) может формировать резистентные формы гельминтов, (4) не предотвращает реинфекции и (5) применяется в виде рацемической смеси, а не в виде чистой активной формы, что ухудшает его фармакологические характеристики.

Таким образом, поиск новых противоописторхозных лекарственных средств повышенной эффективности и безопасности, либо повышение эффективности уже выпускающихся антигельминтиков остается актуальной задачей современной медицины и фармакологии.

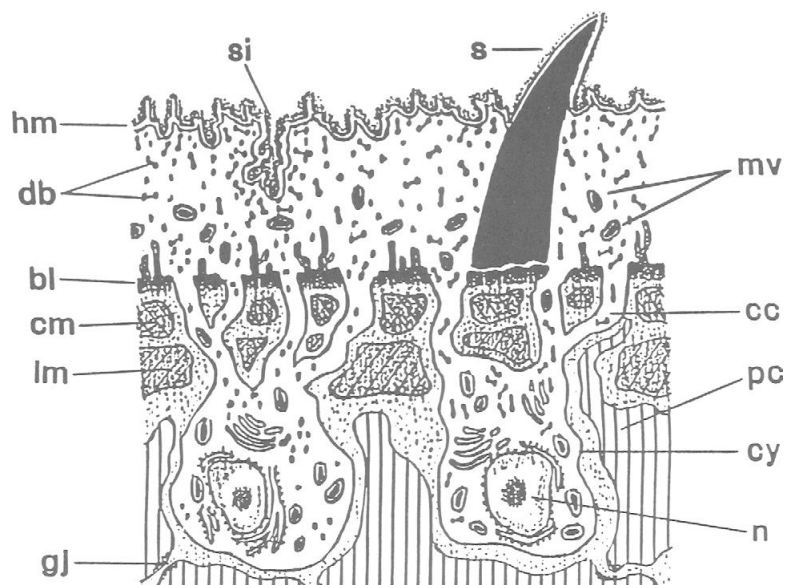


Рисунок 9. Схема строения тегумента *Schistosoma mansoni*. Сокращения: hm - гепталамитная мембрана; db- дисковидные тела; mv - многослойные везикулы, S - шип; si – инвагинации поверхности; bl - базальные пластинки; cm - круговые мышцы; lm - продольные мышцы; gj - щелевые контакты; cm - цитоплазматические канал; pc - паренхиматозные клетки; cy – цитон (тело нервной клетки), n - ядра. (Marr et al., 2003).

5.2. Другие антипаразитарные препараты, примеры лекарственной устойчивости.

Артемизинин. Артемизинин и его полусинтетические производные — это группа препаратов, которые обладают наиболее быстрым действием среди всех существующих в настоящее время лекарств против тропической малярии (Soukhathammavong et al., 2011). Использование лекарств, содержащих производные артемизинина (артемизинин-комбинированные препараты), в настоящее время является стандартом лечения тропической малярии во всем мире. Артемизинин выделяют из полыни однолетней (*Artemisia annua*), используемой в традиционной китайской медицине. Артемизинин и все его производные эффективно действует против многих видов трематод *in vitro*, в том числе *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Clonorchis sinensis*, *Fasciola hepatica* и *Opisthorchis viverrini* (Keiser, Utzinger, 2007).

Альбендазол. Устойчивость к альбендазолу. Альбендазол - антигельминтный препарат широкого спектра действия. Этот препарат активен в отношении многих видов гельминтов, однако его действие на *O. felineus* существенно уступает эффективности празиквантела. Вероятно, это происходит потому, что для альбендазола характерна слабая водорастворимость и низкая биодоступность. Тем не менее препараты на основе альбендазола традиционно применяются при лечении фасциолезов, т.к. празиквател против них неэффективен. Однако с какого-то времени в популяции фасциол появились сначала отдельные устойчивые изоляты *F. hepatica* и *F. gigantica* к альбендазолу, флубендазолу и другим производным; затем эти устойчивые изоляты получили большое распространение по миру и в настоящее время представляют собой серьезную сельскохозяйственную проблему по всему миру, включая Австралию, Индию, Ирландию, Канаду, Европейский Союз. Исследование механизмов устойчивости показали, что у резистентных штаммов наблюдается повышенный окислительный метаболизм препаратов и их повышенная экскреция. При этом, ингибирование ферментов P450 увеличивает чувствительность гельминтов. Таким образом, при формировании устойчивости к альбендазолу и его аналогам у гельминтов существенную роль играет система биотрансформации ксенобиотиков.

Трибендимидин. Трибендимидин впервые был получен в Китае, как производное амидантела, антигельминтного препарата, ранее активно использовавшегося в антигельминтной терапии широкого спектра действия (Keiser, Utzinger, 2010). В настоящее время этот препарат проходит клинические испытания в Юго-Восточной Азии. Он показал активность в отношении *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini* в исследованиях *in vitro* и *in vivo* на животных. Получены данные, свидетельствующие о его эффективности и низкой токсичности на людях, больных описторхозом *O. viverrini*. Кроме того, показана его эффективность в лечении людей, больных анкилостомозом и аскаридозом. Однако, получены также данные о его неэффективности в отношении возбудителей *Schistosoma mansoni* и *Fasciola hepatica* в исследованиях на животных (Keiser et al., 2007).

Глава 6. Поиск новых антигельминтных препаратов

6.1. Методы тестирования препаратов. Экспериментальные модели.

Традиционно первый этап тестирования препаратов проводят *in vitro* на взрослых и ювенильных стадиях развития трематод. В качестве ювенильных стадий используют стадию шистосомулы у видов Schistosomatidae или эксцистированные метацеркарии (ювенильные мариты) Opisthorchiidae (Cowan 2015; Keiser 2013). При тестировании *in vitro* определяют воздействие препаратов на подвижность гельминтов по оценке параметров полу- и эффективных концентраций препарата (IC₅₀, IC₉₅) для половинного и полного эффекта ингибирования подвижности (паралича). Кроме того, традиционно исследуют воздействие препаратов на выживаемость в течение длительного времени воздействия и фенотипические изменения (Cowan, Keiser, 2015; Keiser et al., 2013).

При тестировании препаратов *in vivo* против шистосомоза, описторхоза и клонорхоза, выбирают экспериментальную модель заболевания на грызунах: мыши, крысы, хомяки. Гельминтов Schistosomatidae культивируют, в основном, на лабораторных линиях мышей и реже на хомяках, тогда как для представителей Opisthorchiidae мыши не вполне подходят. Многие линии мышей и крыс устойчивы к описторхозу, вызываемому *O. felineus* и *O. viverrini*. Для их культивирования традиционно используют модель сирийского золотистого хомяка *Mesocricetus auratus*. И хотя хомяки – это случайный хозяин для Opisthorchiidae, показано, что взрослые особи описторхов, полученные на хомяках, достигают полового созревания в срок и фенотипически соответствуют взрослым особям описторхид, извлеченным из природных хозяев – кошек и лис.

6.2. Разработка таргетных препаратов. Перенаправление лекарств.

В настоящее время активно ведется поиск новых препаратов против трематодозов (Cowan, Keiser, 2015; Keiser et al., 2013), как с помощью скрининга библиотек химических соединений, так и исследований паразитарных белков в качестве новых молекулярных белковых мишеней для разработки таргетных препаратов.

Один из популярных подходов при поиске новых фармацевтических препаратов, который используется очень широко - это подход, основанный на перенаправлении уже известных и одобренных лекарственных средств, но использовавшихся ранее при лечении других заболеваний (Savoia, 2015). Такой подход называется *drug repurposing*, он позволяет существенно сэкономить время и стоимость работ по разработке и тестированию новых лекарственных средств. Подход заключается в том, что коммерчески доступные библиотеки соединений, сотни и тысячи препаратов, подвергаются скринингу против гельминтов *in vitro*, затем отобранные единичные соединения тестируются *in vivo* на животных моделях. Отобранные препараты анализируются на выявление функциональных групп, обуславливающих их антигельминтные свойства. Наиболее эффективные препараты отправляют на доклинические и клинические исследования. При этом подходе белковая мишень паразита, на которую действует препарат, как правило, неизвестна.

С помощью такого подхода было обнаружено, что антираковый препарат обладающий активностью ингибиторов протеинкиназ, обладает также эффективной противовирусной активностью против вируса Лихорадки Рифт-Валли, ингибируя его транскрипцию и репликацию в клетках хозяина (Benedict et al., 2015). Необходимо отметить, что такой подход наиболее эффективен в отношении раковых клеток или организмов, обладающих лекарственной устойчивостью. Например, такой подход эффективен при лечении туберкулеза, вызванного штаммом с широкой лекарственной устойчивостью (Savoia, 2015). Так было найдено несколько перспективных препаратов против шистосом, в частности, иматиниб, ранее применявшийся при лечении лейкемии (Dissous et al., 2011). Необходимо отметить, что празиквантел был открыт в 1970 году, как транквилизатор, однако первые его тестирования в качестве транквилизатора показали его меньшую эффективность при сравнении с уже известными препаратами (Andrews et al., 1983). Затем его передали для тестирования в ветеринарную область фармакологии, где он случайно продемонстрировал антишистосомную активность. С 1973 года он запатентован, как антишистосомное средство.

Имеющиеся в литературе данные об эффективности антипаразитарной терапии, а также подбору и тестированию новых лекарств при гельминтных трематодозных заболеваниях в подавляющем большинстве получены в результате исследований шистосомозов (паразитарные заболевания, вызываемые трематодами рода *Schistosoma*),

и в заметно меньшей степени – трематодозов гепато-билиарной системы, к которым относятся, в частности, описторхозы: описторхоз, вызываемый *Opisthorchis viverrini* и клонорхоз, вызываемый *Clonorchis sinensis*. По сравнению с ними молекулярные исследования описторхоза, вызываемого *O. felineus*, находятся на начальной стадии.

Классический подход при разработке антигельминтных препаратов против гельминтозов основан на поиске белков паразита, которые жизненно необходимы для его жизнедеятельности и могут быть использованы в качестве новых фармацевтических мишеней (Keiser et al., 2007) для сфокусированного воздействия на выбранные системы организма.

Ингибиторы системы P450 и системы Р-гликопротеинов являются известными лечебными препаратами. В частности, дисульфирам, средство для лечения алкоголизма, - ингибитор СYP; верапамил, антигипертензивное средство - ингибитор активности Р-гликопротеинов. Кроме того, комбинаторная терапия, основанная на одновременном использовании фармакологических препаратов, действующих на различные молекулярные мишени, становится доминирующим подходом при лечении многих заболеваний. Однако, такой вариант терапии не был до сих пор использован для лечения трематодозов и других паразитарных заболеваний. Одним из подходов для создания новых антигельминтных лекарственных средств может стать применение комбинаторных препаратов на основе празиквантела, обладающих сфокусированным действием на выбранные ферментативные или транспортные пути. С этой точки зрения наиболее перспективными клеточными путями является базовая клеточная система биотрансформации и клеточного транспорта ксенобиотиков.

Глава 7. Заключение

В настоящее время накоплено огромное количество данных, полученных в результате реализации проектов по секвенированию геномов и транскриптомов паразитических плоских червей. Интенсивно исследуются свойства различных белков гельминтов, однако, до сих пор не сформировано представление о молекулярных механизмах, обеспечивающих функционирование базисных метаболических систем у паразитических червей. Знание законов функционирования этих систем необходимо для понимания адаптации биохимических процессов паразитов к существованию в организме хозяина, механизмов устойчивости к антипаразитарной терапии, а также для выбора белка-молекулярной мишени, перспективной с точки зрения разработки антигельминтных препаратов.

К началу нашей работы в мировой литературе было распространено устойчивое мнение, что у паразитических червей отсутствует система цитохромов P450 (Cvilink et al., 2009) и вся первая фаза метаболизма ксенобиотиков. В то же время были опубликованы сведения о наличии окислительного метаболизма антипаразитарных препаратов у трематод *F. hepatica* и свидетельства того, что у устойчивых изолятов метаболизм препаратов проходит быстрее.

Эти факты противоречили мнению об отсутствии, по крайней мере, у фасциол цитохромов P450 и позволили нам выдвинуть гипотезу о существовании функционально активной системы метаболизма ксенобиотиков у печеночных сосальщиков. В поддержку нашей гипотезы говорили также данные о существовании специфических метаболитов некоторых видов трематод, которые могут быть продуктами модификации холестерина цитохромом P450. Важно отметить, что эти генотоксические метаболиты могут обуславливать спектр патогенных процессов и осложнений в организме хозяина и принимать участие в канцерогенезе, ассоциированном с некоторыми трематодозами.

Проверку нашей гипотезы можно осуществить с помощью комплекса компьютерных и экспериментальных методов исследования. Очевидно, что прежде всего необходимо идентифицировать *in silico* гены *O. felineus* и других паразитических плоских червей, кодирующие белки метаболизма ксенобиотиков и клеточной экскреции, провести моделирование структуры этих белков и оценить их функциональную

значимость. Детальная экспериментальная верификация результатов компьютерного исследования, основанная на результатах исследований с использованием технологии подавления экспрессии генов и ингибиторном анализе функциональной активности белков, будет служить базой для описания значимости системы метаболизма и транспорта ксенобиотиков в жизнедеятельности *O. felineus*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Метацеркарии *Opisthorchis felineus* были выделены из подкожных мышечных тканей зараженных рыб (язь) из р. Обь, окрестности г. Новосибирска. Выловленную рыбу анализировали на наличие метацеркарий. Затем срезы зараженной рыбы подвергали ферментативному перевариванию (HCl, пепсин) при 37°C в течение 12-24 часов. Супернатант удаляли, а осадок промывали многократно большим количеством физиологического раствора (0,9% р-р NaCl). Для непродолжительного хранения (1-2 недели) метацеркарии промывали многократно фосфатно-солевым буфером, содержащим 100 µg/мл ампициллин и 100 µg/мл канамицин, и хранили при 4°C.

Работа с животными

Для получения взрослых особей гельминтов, 6-8 недельные хомяки *Mesocricetus auratus* (аутбредная линия) подвергались заражению перорально 50-70 метацеркарий за 1-3 месяца до проведения экспериментов. Хомяков подвергали эвтаназии путем ингаляции диоксида углерода. Кровь забирали из сердца с помощью шприца. Желчь отбирали шприцом из желчного пузыря. Мочу отбирали шприцом через стенку мочевого пузыря.

Взрослых червей *O. felineus* выделяли из желчных протоков печени хомяков через 3 месяца после заражения. Червей промывали более 10 раз в физиологическом растворе (0,9% р-р NaCl) и использовали для дальнейших экспериментов. Протоколы экспериментальных работ с животными был одобрен этической комиссией ИЦиГ СО РАН (Протокол №24 и №25 от 12.12.2014).

Гистологические методы исследования печени

Для исследований патологических изменений печень фиксировали в забуференном 10% формалине (Biovitrum, Россия). После фиксации в течение 16-18 ч при 4 С образцы обезвоживали в серии возрастающего градиента этилового спирта и ксилола (Союзхимпром, Россия), затем изготавливали парафиновые блоки (Biovitrum, Россия) с использованием гистологического комплекса Microm (Microm, Великобритания). Срезы

4 мкм толщиной окрашивали гематоксилином и эозином (Biovitrum, Россия). Готовые препараты исследовали под световым микроскопом Axioskop 2 Plus (Zeiss, Германия).

Тестирование препаратов *in vitro*

Для получения ювенильных марит (эксцистированных метацеркарий) метацеркарии выдерживали в течение 30 минут в растворе трипсина (0,1% р-р трипсина в фосфатно-солевом буфере, pH 7.6) при 37⁰С, затем многократно промывали культуральной средой RPMI-1640 (Life Technologies, USA). Взрослые черви были несколько раз промыты в RPMI-1640 среде, содержащей 1% глюкозу и антибиотики (Sigma, USA) (100 мкг/мкл стрептомицин, 100 мкг/мкл пенициллин), 0,25 мкг/мл амфотерицин В (Sigma, США), и перенесены в 6-луночный планшет со свежей RPMI-1640 средой (2-3 мл, 1% глюкоза, антибиотики). Черви, выделенные из одного животного, были разделены на несколько групп из расчета 5-6 марит/лунку и 50-70 эксцистированных метацеркарий/лунку. Тестирование антигельминтной активности проводили применяя стандартные тесты на подвижность и вычисляли концентрации полумаксимального ингибирования (Cowan, Keiser, 2015).

Приготовление лизатов из взрослых червей

Для получения лизатов червей гомогенизировали в лизирующем буфере (150 mM NaCl, 25 mM ТрисHCl pH 7.6, 0,1% SDS, 0,1% Тритон X-100) при + 4⁰С и обрабатывали ультразвуком (5 секунд, 4 раза, 5% - амплитуда) (Vibra-Cell VCX130). Далее лизаты центрифугировали в течение 15 минут при 10 000 g, в супернатант добавляли протеазный ингибиторный коктейль (Amresco), делили на аликвоты и замораживали при -80⁰С. Концентрацию белков определяли по методу Брэдфорда (Bio-Rad Laboratories GmbH) согласно протоколу производителя, реагент (Bradford Dye Reagent, BioRad, USA). Для исследования содержания оксистеролов в лизаты добавляли 1мг/мл аскорбиновой кислоты перед заморозкой.

Выделение РНК, синтез кДНК, секвенирование СУР и Р-гликопротеинов

Выделение тотальной РНК из взрослых червей проводили с помощью реагента TriReagent (MRC) согласно рекомендациям производителя. Концентрацию выделенной РНК определяли с помощью NanoDrop. РНК ($A_{260}/A_{280} = 1.9-2.1$) использовали для получения кДНК с помощью набора RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kits (Fermentas). РНК, кДНК хранили при -70°C . Фрагменты генов СУР и P1-P4 были амплифицированы, используя технологию nested PCR и праймеры (Таблица 1), разработанные на эти же гены у *O. viverrini* и *C. sinensis*. Фланкирующие 5' и 3' последовательности амплифицировали технологией RACE-PCR и секвенировали на приборе ABI 3130XL (Applied Biosystems).

Цифровая капельная ПЦР

Для проведения цифровой капельной ПЦР были использованы ген-специфичные праймеры с зонды (Таблица 1). В качестве положительного контроля использовали ген митохондриального рибосомального белка L16 (MrpL16).

Полученную кДНК использовали для проведения Digital Droplet PCR. Реакционная смесь состояла из 20 мкл, содержащей 10 мкл dPCR Probe Supermix (Bio-Rad, USA), 2 мкл праймера (5 пикомоль/мкл праймера, 1,5 пикомоль/мкл зонда) и кДНК-матрицу. ПЦР-реакционную смесь сначала помещали в генератор эмульсии Bio-Rad QX-100 согласно рекомендациям производителя, переносили в 96-ти луночный планшет Eppendorf (#951020303), который запаивали термопленкой и затем помещали в амплификатор. Термопрофиль реакции: 95°C -10 мин; 40 циклов реакции амплификации: 94°C – 30 сек, 60°C – 1 мин; 98°C – 10 мин. QX-100 droplet reader (Bio Rad) был использован для проведения анализа реакции, программа QuantaSoft, Bio-Rad – для анализа полученных данных.

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 BioRad CFX.

В качестве эндогенных контролей для нормализации уровня экспрессии были выбраны 4 гена «домашнего хозяйства»: параамиозин, альфа-тубулин (TUA), митохондриальный рибосомальный белок L16 (MtpL16), рибосомальный белок S27 (RPS27) (Таблица 1). Для того, чтобы выбрать наиболее подходящий ген для нормализации уровня экспрессии мы оценивали параметр «стабильность экспрессии» на 4 различных жизненных стадиях. Стабильность экспрессии каждого гена оценивается, как M-value, вычисленный среднее стандартное отклонение логарифма уровня экспрессии во всех образцах для одного гена относительно других референсных генов, оставшихся в панели. Вычисления производили, удаляя каждый ген с наибольшим M-value пока не осталось два гена с наименьшим M-value. Предварительные данные показали, что $M < 1.5$ является подходящим критерием для RT-PCR (Strube et al 2008). В итоге для оценки уровня мРНК CYP были выбраны два гена альфа-тубулин (TUA) и митохондриальный рибосомальный белок L16. Уровень мРНК CYP оценивали, нормируя одновременно на эти 2 гена.

Полученные продукты подвергали плавлению, чтобы убедиться, что получившийся ПЦР-продукт был единственным в реакции, и его температура плавления соответствовала целевому продукту. Вычисления эффективности реакции ПЦР проводили для каждой пары праймеров, используя ряд 10-ти кратных разведений кДНК. Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения для CFX96 (BioRad, USA).

Анализ повреждений оболочки червей

Перед визуализацией повреждений оболочки в среду содержания червей добавляли пропидиум иодид до концентрации 2 мкг/мл, выдерживали 10-25 минут, затем червей промывали дважды с помощью физиологического раствора. Для визуализации под микроскопом червей помещали на предметное стекло в каплю Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen, USA) и накрывали покровным стеклом. Изображения получали под

флюоресцентным микроскопом AxioImager (Zeiss, Германия) (родаминовый и FITC фильтры). В качестве позитивного контроля использовали червей после обработки 10 мкг/мл празиквантелом в течение 4 часов. Празиквантел вызывает повреждения оболочки червей. Программа AxioVision (Zeiss, Германия) была применена для обработки полученных изображений.

Нокдаун генов P4 и CYP методом РНК-интерференции

Для проведения нокдауна генов P4 и CYP с помощью технологии dsRNA было проведено клонирование части гена P4 и CYP в вектор pET28 (Праймеры в **Таблица 1**) с применением стандартных методик по клонированию (Sambrook, Russell, 2001). Структура клонированных последовательностей была подтверждена с помощью секвенирования полученных плазмид по Сэнгеру. Для проведения РНК-интерференции был выбран участок гена (около 600 п.н. для CYP и 700 п.н. для P4), содержащий наибольшее число предсказанных микроРНК на каждый из выбранных генов для РНК-интерференции (программа SnapDragon <http://www.flyrnai.org/snapdragon>). С помощью соответствующих праймеров (**Таблица 1**), содержащих старт транскрипции для T7 РНК-полимеразы, были наработаны ПЦР-продукты. ПЦР-продукты были затем тщательно очищены с помощью фенол-хлороформной экстракции (Sambrook, Russell, 2001).

С помощью набора для транскрипции *in vitro* MEGAscript® RNAi Kit (Life Technologies, USA), с этих ПЦР-продуктов был получен двухцепочечный РНК зонд длиной 700 п.н. на центральную часть гена P4 и 600 п.н. для CYP. Для неспецифического контроля был выбран ген LUC люциферазы светлячка *Photinus pyralis*. В качестве матрицы использовали плазмиду pGL3 (Promega, USA) со встроенным геном LUC. С помощью праймеров была наработана dsRNA этого гена, как неспецифический зонд для РНК-интерференции. Целостность и концентрацию полученных зондов проверяли в агарозном геле. После проведения нокдауна гена методом электропорации (Thanasuwan et al. 2014) взрослых особей червей содержали еще 8 дней. Каждые два дня отбирали по три червя из каждой группы для анализа уровня экспрессии мРНК методом ПЦР в реальном времени (для CYP) и методом Цифровой капельной ПЦР для P4 в каждом черве индивидуально. Уровень экспрессии мРНК нормировали на уровень экспрессии гена MrpL16. Праймеры для измерения экспрессии генов выбирали на область гена, не пересекающуюся с областью зонда для

РНК-интерференции. Эксперименты по подавлению экспрессии мРНК были повторены три раза.

Вестерн-блот анализ

Белки разделяли в 10% SDS-полиакриламидном геле по методу Лэммли и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham Biosciences) с помощью прибора для полусухого переноса Bio-Rad, США. Мембрану блокировали в Трис-солевом буфере, содержащем 1% Tween-20 и 5% БСА, в течение 1 часа при комнатной температуре. Далее мембрану инкубировали с первичными антителами в разведении 1:1000 в Трис-солевом буфере с твином при + 4°C в течение 24 часов на качалке, отмывали трижды 30 мл Трис-солевым буфере с твином на качалке и далее проводили инкубацию со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Abcam, США), в разведение 1:10 000 в Трис-солевом буфере с твином в течение 40-50 минут при комнатной температуре, отмывали трижды 30 мл буфера Трис-солевым буфере с твином на качалке. Сигнал детектировали с использованием реагента для хемилюминесцентной реакции ECL (Amersham Biosciences, Великобритания). Визуализацию проводили с помощью VersaDoc 4000 (Bio Rad, США).

Индукция экспрессии СYP в бактериальной системе с помощью ИПТГ

Среда для экспрессии СYP: 1 л среды ТВ (Terrific broth), 1 mM тиамин, 50 µg/мл ампициллин, раствор редких солей (250 µl на 1л среды).

Раствор редких солей (4000X rare salts solution (на 100 мл) содержал 2,7 g FeCl₃·6H₂O, 0,2 g ZnCl₂·4H₂O, 0,2 g CoCl₂·6H₂O, 0,1 g Na₂MoO₄·2H₂O, 0,1 g CaCl₂·2H₂O, 0,186 g CuSO₄·5H₂O, 0,05 g H₃BO₃. Добавляли 90 мл воды и концентрированной соляной кислоты до полного растворения солей (примерно 5 мл).

Трансформировали компетентные клетки DH5α 2µl (1-10ng) вектора pCW-lic, содержащий встроенный ген *O. felineus* СYP или *C. sinensis* СYP, трансформированные клетки переносили на чашку с агаром и ампициллином (50 µg/мл), инкубировали 1 день при 37°C. Через 1 день 2-3 выросшие колонии помещали в пробирку с LB средой и ампициллином (50 µg/мл) и растили при 37°C на качалке при 220 rpm в течение ночи.

Полученную ночную культуру переносили в колбу с 1000 мл среды для экспрессии и растили при 37⁰С, 220 грм, в течение 6 часов. После 6 часов колбу охлаждали до комнатной температуры, добавляли ампициллин (50 µg/мл), 0.25 мл 1М ИПТГ и δ-аминолевуленовую кислоту до концентрации 1 mM (1 мл 1М стокового раствора). Растили культуру на качалке при 25⁰С, 140-180 грм, в течение 48 часов.

Индукция экспрессии СУР в бактериальной системе методом аутоиндукции

Среда для экспрессии СУР содержала: 1 л среды ТВ (Terrific broth), 1 mM тиамин, 50 µg/мл ампициллин, раствор редких солей (250µl на 1L среды), 25mM (NH₄)₂SO₄, 0,05% глюкозы, 0,2% альфа-лактозы, 2mM MgSO₄, 1mM δ-аминолевуленовой кислоты.

2-3 колонии клеток DH5α, содержащих pCW-lic со встроенным геном *O. felineus* СУР или *C. sinensis* СУР, помещали в пробирку с LB средой и ампициллином (50 µg/мл) и растили на качалке при 37⁰С 220 грм в течение ночи. Полученную ночную культуру переносили в колбу с 1000 мл среды для экспрессии и растили на качалке при 25⁰С, 140-180 грм, в течение 48-60 часов.

Получение растворимой фракции лизата бактериальных клеток для экспрессии СУР

Буфер для лизиса содержал 50 mM К-РО₄, pH 8.0; 1mM EDTA, 10% глицерин, 100 mM NaCl, 0.5 mM PMSF, 1 mM DTT (добавлять только перед использованием), 0.1% CHAPS (из 5% стока).

Бактериальную культуру осаждали центрифугированием 5000 грм 10-15 минут, 4⁰С. Клетки ресуспендировали в буфере для лизиса (из расчета 100 мл буфера для 1000 мл среды). К клеткам добавляли 25 µl раствора лизоцима (25 mg/мл), клетки замораживали при -20⁰С. Клетки медленно размораживали на льду, проводили лизис клеток с помощью прибора M-110P Microfluidizer Processor, затем центрифугировали в течение 30 мин при 4⁰С, 15000 грм, наносили супернатант на колонку Ni-NTA (Qiagen, Германия) для дальнейшей очистки рекомбинантных белков.

Очистка рекомбинантных СУР с помощью Ni-NTA смолы (Qiagen, Германия)

Все процедуры проводили при 4⁰С, все буферы и вода охлажденные до 4⁰С. Промывали Ni-NTA колонку 5 объемами (50 мл) буфера для связывания (Binding Buffer, pH 7.5) (буфер для лизиса без DTT, PMSF; 0.1% CHAPS). Наносили бактериальный лизат на колонку, затем промывали колонку 5 объемами (50 мл) буфера для связывания (Binding Buffer, pH 7.5). Смывали белок с колонки с помощью градиента двух растворов по 100 мл А (ВВ, pH 7.5; +DTT, +0.1% CHAPS) и 100 мл В (А + 500 мМ имидазол, pH 7.5). Условия для градиента: 5 min Буфер А; 40 min градиент от 0 до 100% Буфера В; 10 min Буфер В. СУР смывался с колонки при 37-45% В (200-250 мМ имидазола). Промывали колонку 5 объемами (50 мл) 0,5 М имидазола, pH 7.5 в воде, затем 5-10 объемами воды. После этого промывали Ni колонку 5 объемами буфера для связывания. Колонку можно использовать 5 раз для очистки белка без перезарядки Ni смолы. Для длительного хранения колонку заполняли 20-30% этанолом и хранили при 4⁰С.

Очистка рекомбинантных СУР с помощью гидроксиапатитной (ГАП) смолы (Sigma, USA)

Промывали колонку 5 объемами (50 мл) буфера для связывания ГАП (Binding Buffer для ГАП, pH 7.5) (буфер для лизиса без NaCl, DTT, PMSF; 0.1% CHAPS). Наносили элюат с Ni-NTA колонки (~100 мл) на ГАП колонку, промывали колонку 5 объемами (50 мл) буфера для связывания (Binding Buffer для ГАП, pH 7.5). Смывали белок с колонки с помощью градиента двух растворов 200 мл Буфера А (ВВ для ГАП pH 7.5 +DTT; +0.1% CHAPS) and 200 мл Buffer В (Буфер А + 0,8М К-РО4). 90 min градиент от 0 до 100% Буфера В; 10 min Буфер В. СУР смывался с колонки при 46% В. Белок концентрировали с помощью центрифужного концентратора EMD Millipore Centriprep™ 50kDa (Millipore, USA) до 0,6 мл конечного объема, проверяли степень очистки белка в геле с окраской Кумасси и серебром, аликвоты замораживали при -70⁰С.

Спектрофотометрический способ оценки содержания активного Р450

Содержание CYP определяли спектроскопическим методом, используя CARY Varian спектрофотометр (Palo Alto, USA) в 200 мкг белка микросомальной фракции (Omura and Sato, 1964). В основе метода оценки содержания CYP450 лежит его способность с восстановленным гемом в комплексе с CO формировать пик с максимумом на 448-450 нм. Для этого в лизат добавляли газообразный монооксид углерода в течение 2-5 сек. Затем переносили лизат в кювету для спектрофотометра и снимали спектр, который далее служил базовым уровнем. После этого добавляли несколько кристаллов дитионита натрия, перемешивали и снимали спектр еще несколько раз.

Хлорзоксазон-гидроксилирующая активность (тест на CYP2E1)

Взрослые особи описторхов содержали в буфере KRT (Kreb's Ringer Tris) (pH 7.4) с 170 мкг/мл CLZ, 1% глюкозой при 37°C в течение 24 часов кетоконазол (KZ) из стокового раствора в ДМСО добавляли до концентрации 40 мМ. Бензоксазол (BZ) был выбран в качестве внутреннего контроля и был добавлен к образцам после 24 часов инкубации. Для тестирования активности готовили лизат из взрослых особей, затем смешивали с 1V ацетонитрила.

200 мкл лизата смешивали с 1.8 мл раствора β-глюкуронидазы из *Helix pomatia* (Sigma, США) в 0.1M ацетатном буфере (pH 4.5), инкубировали ночь при 37°C. Затем проводили экстракцию образцов дважды 2 мл этилацетата и высушивали при комнатной температуре. Образцы затем растворяли в 26% ацетонитриле и анализировали с помощью ВЭЖХ с использованием C18 колонки (250 × 2 mm, 3 мкм), скорость подачи буфера 0.1 мл/мин. CLZ, 6-ОН-CLZ и BZ отслеживали спектрофотометрически при 287 nm; время выхода веществ (retention times) для 6-ОН-CLZ и CLZ было 6.4 и 9.45 мин, соответственно. Регистрировали продукт по времени удерживания вещества на колонке в соответствии с используемыми хроматографическими стандартами.

Исследование содержания специфических оксистеролов

Перед обработкой в лизаты гельминтов, а также в образцы крови, желчи и мочи животных добавляли аскорбиновую кислоту до 1 мг/мл для предотвращения дальнейшего окисления оксистеролов. Образцы подвергали ВЭЖХ и затем масс-спектрометрическому

анализу как описано в методике (Vale et al., 2013; Gouveia et al., 2015). Сначала проводили экстракцию метанолом, добавляя его к образцам до 20% (V/V). После этого, только образцы желчи центрифугировали 10 мин и наносили на колонку 25 μ l каждого образца. Анализ каждого образца проводили дважды.

Масс-спектрометрический анализ проводили на оборудовании LTQ Orbitrap XL (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany), совмещенным с UVPDA. ВЭЖХ проводили на нуклеосил C18-колонке (250 mm x 4 mm i.d.; 5 μ m), скорость потока 0.3 мл/мин. Перед нанесением следующего образца колонку промывали ацетонитрилом в течение 15 мин. Данные собирали для всех веществ с показателями m/z 50-2000. Напряжение 28 kW, температура 310 °C. Для анализа данных использовали большую базу данных стероидных веществ (Vale et al., 2013; Gouveia et al., 2015).

Визуализация CYP активности *in situ*

Взрослых особей описторхов инкубировали в среде, содержащей DMEM/F-12, 1% глюкозу, антибиотики (100 U/мл пенициллин и 100 мкг/мл стрептомицин) и 5 μ M Пентоксирезорурфин/Метоксирезорурфин/Бензоксирезорурфин (AnaSpec, USA). Алкоксирезорурфины добавляли из 100х стоковых растворов в DMSO. Кетоконазол добавляли до конечной концентрации 40 μ M в среду за 2 часа до добавления пентоксирезорурфина. Червей инкубировали при 37⁰C в течение 20 ч в атмосфере 5% CO₂. Все процедуры проводили в темноте или при непрямом освещении. Затем описторхов промывали несколько раз стерильным физ раствором (0.9% NaCl), фиксировали в 4% формальдегиде в течение 15-20 минут, затем помещали на предметное стекло в каплю ProLong Gold Antifade (Thermo Fisher Scientific, США), закрывали покровным стеклом и исследовали под флюоресцентным микроскопом (AxioImager, Zeiss, Германия). В качестве позитивного контроля для *in situ* визуализации применяли описторхов, содержавшихся 30 мин-2 часа с 0.01-0.1 μ г/мл резорурфином (AnaSpec, USA).

Выявление гомологов белков метаболизма ксенобиотиков

Для того, чтобы выявить нуклеотидные последовательности, соответствующие АТФ-связывающим белкам (АВС-транспортерам), был применен следующий подход. На первом этапе были проанализированы доступные данные геномов и транскриптомов филогенетически близких видов плоских червей. Из базы данных SchistoDB (<http://schistodb.net/schistodb20/>) была извлечена аннотированная кодирующая последовательность двух известных белков SmDR1 и SmDR2 *Schistosoma mansoni* – паразитического червя сем. Schistosomatidae. Последовательности трех генов MDR *C. sinensis* были получены из базы данных GenBank. Используя последовательности MDR представителей Trematoda, был проведен скрининг исходных данных (чтений) массового секвенирования транскриптома *O. felineus*. На основе чтений, демонстрирующих высокий уровень гомологии с ABCB1, с помощью ассемблера CAP3 были собраны контиги *O. felineus*. Для данных контигов была определена наибольшая рамка считывания (ORF Finder) и подтверждена принадлежность соответствующей аминокислотной последовательности к семейству MDR с помощью анализа консервативных функциональных доменов NCBI CDD. Кроме того был проведен скрининг всего массива чтений транскриптома *O. felineus* на предмет наличия функционального домена MDR, который показал наличие четырех представителей подсемейства белков MDR у этого паразитического вида.

Трехмерная модель MDR *O. felineus* была получена с помощью многоматричного моделирования Phyre2 <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/> (Kelley and Sternberg, 2009). Полученная модель показала 100% уровень значимости.

Клонирование гена СУР в вектор для экспрессии рСW-lic

Последовательности кодирующие районы СУР450 *O. felineus* и *C. sinensis* были оптимизированы для экспрессии в бактериальной системе. Оптимизацию и синтез генов проводили в фирме Genscript (USA), оптимизация последовательности включала замену редких кодонов, стабилизацию вторичной структуры мРНК, удаление случайных сайтов сплайсинга, удаление районов нестабильности мРНК.

Для улучшения очистки белка на 3' конец последовательности добавляли олигонуклеотид, кодирующий 6 гистидинов; 5' конец последовательности также

модифицировали – удалили участок, кодирующий трансмембранный домен на N-конце белка (MWLQSLCEYLPEAAIVVLVCYGIFLFIHHLFELRC) и вместо него поместили последовательность, кодирующую AKKTSSKGK. После получения генов CYP450 *O. felineus* и *C. sinensis* в pUC57 последовательности были переклонированы по сайтам рестрикции NdeI/ HindIII в вектор для экспрессии pCW-lic (Addgene) (**Рисунок 10**), любезно предоставленный проф. Larissa Podust, UCSD, USA. Клонирование провели, используя праймеры (**Таблица 1**) и стандартные методики по клонированию (Sambrook and Russell, 2001). Дополнительно вектор позволял применить метод отбора бактериальных клеток на способность переваривать 5% сахарозу. В вектор без вставки содержал SacB ген, в результате экспрессии которого бактериальная клетка не выживает на среде с сахарозой. Таким образом, отбор клонов со вставкой был существенно облегчен. Переклонированную конструкцию проверяли на отсутствие мутаций методом секвенирования по Сэнгеру.

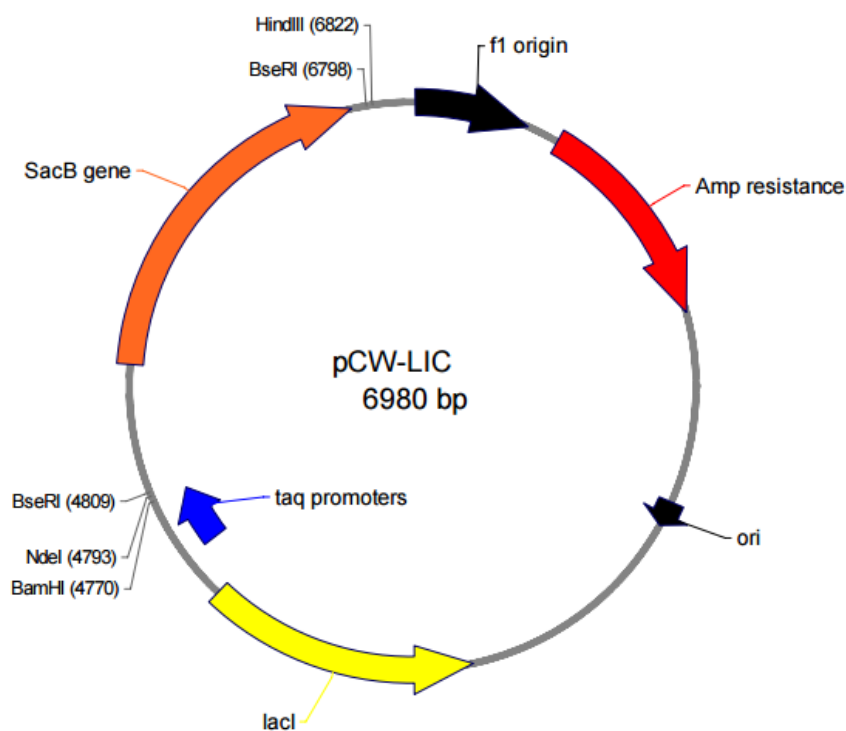


Рисунок 10. Вектор pCW-lic для экспрессии рекомбинантных CYP450.

Таблица 1. Список используемых праймеров

Название	Последовательность
Секвенирование СУР	
CYP_F1	5'TGGTT AAGTC TGGCT TGTGT TGTCG
CYP_R1	5'CCCGT TCTCC ATCTC GCACA TCG
CYP_F2	5'ACTGG AGAAT AGCAA CCAAA CGCCA
CYP_R2	5'CCGCT GGACC TCTTG TAAGC CCA
CYP_F3	5'GCCCT TCGGC TTACC CCACA
CYP_R3	5'-TGACA GCATT CACAT CATAG TCCA
Секвенирование Р-гликопротеинов	
B4F1	AGAAA TCAAC GTGTT GGCCC
B4R	TTTTG CTCGG CACTA TGCAAC
B4F2	ACATG GGAGC CAGT CTCTT
B4F3	GCGCT AACCC GGTAC ACAT
B4R3	TCCGG AGATG CTCTT CACCT
B4F4	ATCCT CGAGC AGGAA ATGGG
B4R4	CCACG TTCCT CGGAA TTCGT
B4R5	AAGCA GTGGT ATCAA CGCAG AGT
P4R_start	TGTCA GTGCC TTCGA CTTTG
B4F5	TTATA GCCGC TGCGA AGCAA
Праймеры для ПЦР в реальном времени	
RPS27_F	5'-TCCGC CACTC CGTCT TACGC
RPS27_R	5'-ACTAG CCGAT GACAT GCGGT GGA
Paramyosin_F	5'-AGAAC GTCGC CTGCG CGAGG
Paramyosin_R	5'-GGGCC CGATC GGCGG CTT
Alfa-tubulin_F	5'-CGCGT CCGAT GGTGT ACCGT CC
Alfa-tubulin_R	5'-GGTGC GAACC GGCAC TTACC GT
CYP_R2	5'CCGCT GGACC TCTTG TAAGC CCA
CYP_F3	5'GCCCT TCGGC TTACC CCACA
Количественная капельная ПЦР DD PCR	
CYP_R1	5'CCCGT TCTCC ATCTC GCACA TCG

CYP_F2	5'ACTGG AGAAT AGCAA CCAAA CGCCA
Название	Последовательность
CYP	FAM –TGCCG ATTAT TCGCC GAACT ATCTG G-RTQ1
ABCB4_F	TTGTT GGTCC AAGTG GTTCC
ABCB4_R	TGTCA GTGCC TTCGA CTTTG
PgP4	FAM –ACTGA-GATTC-TACGA-CCCAA-CATCA-GGT-RTQ1
ABCB2_F	5'AACTC ACGGG ACGTA ACAAC
ABCB2_R	5'ATCGT ATCCA TGGGG CAAAC
PgP2	FAM –AGTGA-AATAA-CCGAA-GCGGC-CTCC-RTQ1
ABCB3_F	5'CGTAA TAGCG CCCTA GCGAT
ABCB3_R	5'TAGTG GATGC GGCTA AACAA G
PgP3	FAM –TTTGT-CCGCC-AGAGA-GCTGT-GAG-RTQ1
PgP1_newF	GGGCA GTATA TTTAT GGGTT CGG
PgP1_newR	GTGAA GTTTG GCAGT CGTAA TC
PgP1 new	FAM –CCGCT CAGGA TGTGT ATGGA ACAAT CG-RTQ1
MrpL16new_F	TTCTT GCCAA TCCAG GTATC C
MrpL16new _R	TGTCG AATCT CCGTG GAAAG
MrpL16_new	R6G –CGTAA CTCCC-ATCAA-ATCCG-GTCGT-BHQ2
Клонирование	
CYPm_clonF	CGATC GAATT CATGG CGAAA AAGAC CTCCT
CYPm_clonR	AGATA CTCGA GTTAA TGATG ATGAT GGAAT
Clon_P4F	GACTG GAATT CTTGT TGGTC CAAGT GGTTC C
Clon_P4R2	CCGAG GTCGA CTCCG GAGAT GCTCT TCACC T
ClonCYP_F	TCTAA GAATT CATAA TCGGC CCAAT GTGGT TG
ClonCYP_R	AGTCT CTCGA GTGCT TCACA ATAGA AGAGC AGT
РНК-интерференция	
P4_dsF	TAATA CGACT CACTA TAGGG ACTGG TGGCA AAGAA TGGTC

Название	Последовательность
P4_dsR	ТААТА СГАСТ САСТА TAGGG CCAGG ТААГТ АААСГ СССАА
CYP_dsF	ТААТА СГАСТ САСТА TAGGG СТGGC ТСААГ ГТСАТ ГГААТ
CYP_dsR	ТААТА СГАСТ САСТА TAGGG CCAGG ТААГТ АААСГ СССАА
LUC_dsF	ТААТА СГАСТ САСТА TAGGG ТGCGC ССГCG ААСГА САТТТ А
LUC_dsR	ТААТА СГАСТ САСТА TAGGG GCAAC СГСТТ ССССГ АСТТС СТТА

Статистическая обработка результатов

Анализ результатов, полученных при выполнении экспериментов, был проведен в программе Statistica 7.0. Для проверки статистической гипотезы применяли однофакторный дисперсионный анализ, достоверность результатов которого оценивали с помощью критерия Фишера. В случае, если выборка не отвечала критериям нормальности распределения, статистические различия между выборками оценивали по методу Манна-Уитни. Для статистической оценки смертности червей были построены кривые выживаемости Каплана-Мейера. Оценка доверительного интервала при построении была вычислена с помощью лог-рэнк теста в пакете программ 'mortality' (v.2.38) R. Статистические различия между кривыми выживаемости были оценены с помощью критерия Мантеля-Хэнцеля. Значения полуэффективных концентраций при тестировании препаратов *in vitro* проводили в пакете программ ('drc 3.0-1 ' R пакет). ANOVA lack-of-fit тест был использован для вероятностной оценки гипотезы, что подходящая регрессионная модель подходила для анализа данных ('drc 3.0-1 ' R пакет). P-value был всегда выше 0.94.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Глава 1. Специфические оксистерольные метаболиты *O. felineus* и их экскреция в ткани хозяина

Ранее было показано, что паразитические черви из класса Trematoda, такие как *Schistosoma haematobium* и *Opisthorchis viverrini* могут производить специфические метаболиты, которые не синтезируются в организме незараженного хозяина (хомяка, мыши или человека) (Vale et al., 2013). Оба вида трематод признаны Международным Агентством по исследованию рака биологическими канцерогенами (IARC). Возможно, оксистеролы и катехол-эстрогены могут принимать участие в патологических процессах, сопровождающих паразитозы, вызванные этими видами трематод (Correia da Costa et al., 2014; Vale et al., 2013). Предполагается, что эти соединения генотоксичны, они повреждают ДНК хозяина и, в комбинации с другими факторами, способствуют возникновению злокачественных опухолей в тканях, поврежденных паразитами.

Оксистеролы представляют собой продукты окисления холестерина. Они могут генерироваться как ферментативным путем (с помощью P450) так и неферментативными путями (спонтанные реакции окисления при участии кислородных радикалов). Оксистеролы обладают мутагенными, прооксидативными и провоспалительными свойствами и, вероятно, способствуют канцерогенному процессу (Jukasul et al., 2011). Показана связь между повышенной продукцией оксистеролов и прогрессией рака кишечника, легких, молочной железы и желчных протоков (Jaworski et al., 2001).

Мы поставили себе цель с помощью методов жидкостной хроматографии и двойной масс-спектрометрии (LC-MS/MS) (1) исследовать лизат взрослой особи и яйца *O. felineus* на наличие специфических оксистеролов; (2) проанализировать экстракты различных трематод между собой для выявления различий в продукции оксистеролов; (3) исследовать биологические жидкости (кровь, моча, желчь) зараженных описторхами *O. felineus* животных для выявления возможности оксистеролов секретироваться в ткани хозяина; (4) выявить свидетельства повреждения ДНК у хозяина.

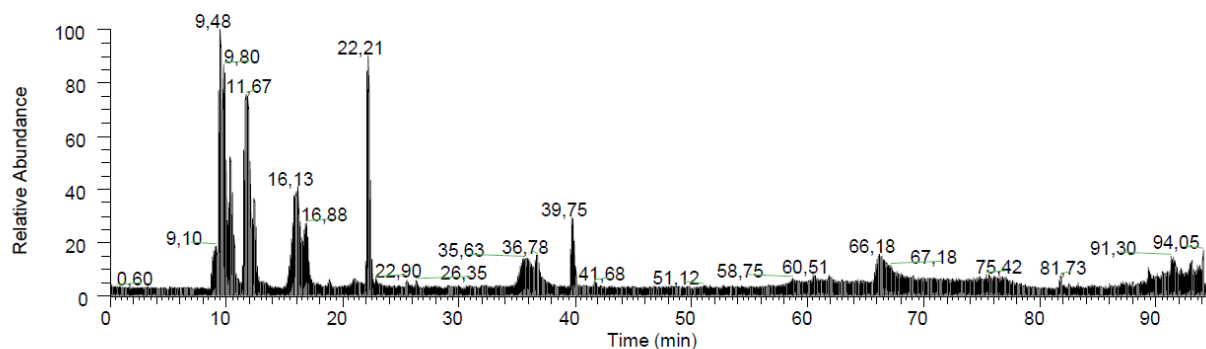
1.1. Оксистерольные метаболиты в лизатах и в яйцах *O. felineus*

Анализ растворимых экстрактов взрослых особей с помощью LC-MS/MS показал наличие оксистерольных метаболитов, со структурой, схожей с найденными у *O. viverrini* (Vale et al., 2013). Некоторые из метаболитов были идентичны *O. viverrini*, например, метаболиты с m/z (отношение массы к заряду) 385 и 438 (**Приложение 1, Рисунок 12**).

Кроме того, найдены метаболиты с гидроксированными атомами углерода стероидного кольца, по С-2 и С-3 положениям, 2,3-хиноны (m/z 326, 461, 471) (**Рисунок 12**). Представлена также группа желчных кислот, несущих дополнительную карбоксильную группу (m/z 425) (Griffiths, Sjövall, 2010). Были найдены желчные спирты, m/z 362, которые являются продуктами метаболизма желчных кислот и промежуточными продуктами их синтеза, конъюгаты альдегидов желчных кислот (m/z 340, 356), с глицином (m/z 425, 439) или с сульфатами (m/z 501, 557) (**Рисунок 12**). По-видимому, эффекты оксистеролов зависят от их структуры, времени жизни, способности конъюгировать между собой. Таким образом, при анализе мы можем наблюдать наличие в экстрактах, как активных, так и неактивных, уже метаболизированных оксистерольных метаболитов (Vale et al., 2013).

В яйцах описторхов были также найдены оксистерольные метаболиты, при этом, спектр метаболитов в яйцах был наиболее обширен. Представлены общие метаболиты между яйцами и взрослыми червями (m/z 606). Кроме того, в яйцах обнаружены новые оксистеролы (m/z 321, 677, 723, 790, 836) (**Рисунок 13**). Необходимо отметить, что ни один из упомянутых оксистерольных соединений не находился в образцах биологических жидкостей незараженного хомяка.

Взрослые особи



Экстракты яиц

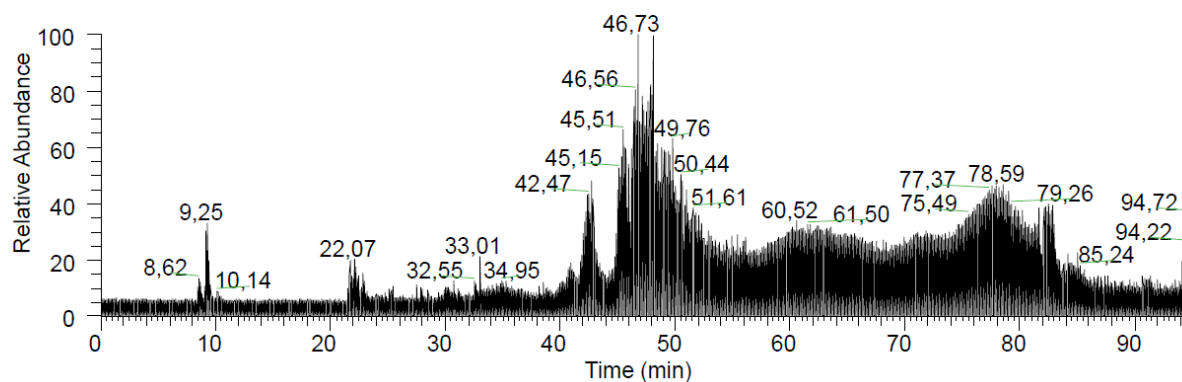


Рисунок 11. Результаты анализа растворимых фракций взрослых червей и яиц *O. felineus* с помощью жидкостной хроматографии и двойной масс-спектрометрии. Представлены хроматограммы растворимых лизатов взрослых особей и яиц описторхов, содержащих оксистеролы. По оси абсцисс откладывается время удерживания на колонке (retention time); по оси ординат – относительное количество каждого компонента. (Совместно с др. Жозе Мануель Коста и проф. Нуно Вале, Университет Порто, Португалия)

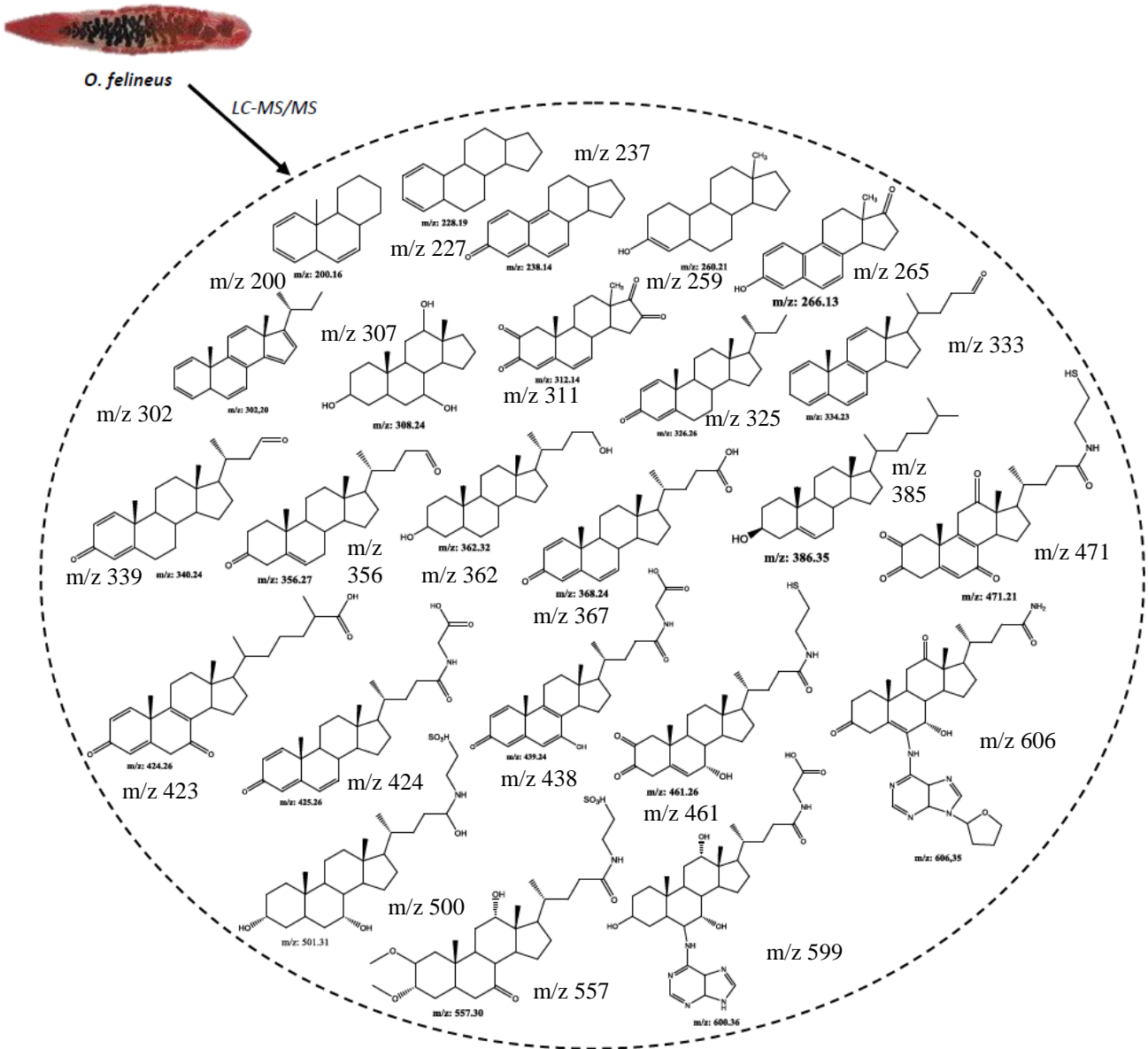


Рисунок 12. Оксистерол-подобные молекулы, найденные с помощью LC-MS/MS в экстрактах *O. felineus*. Разные формы оксистерол-подобных молекул: катехольная форма оксистеролов (m/z 471), желчные спирты (m/z 362), альдегиды желчных кислот (m/z 340), и конъюгаты желчных кислот с сульфатами (501 и 557) или глицином (439). (Совместно с др. Жозе Мануэль Коста и проф. Нуно Вале, Университет Порто, Португалия)

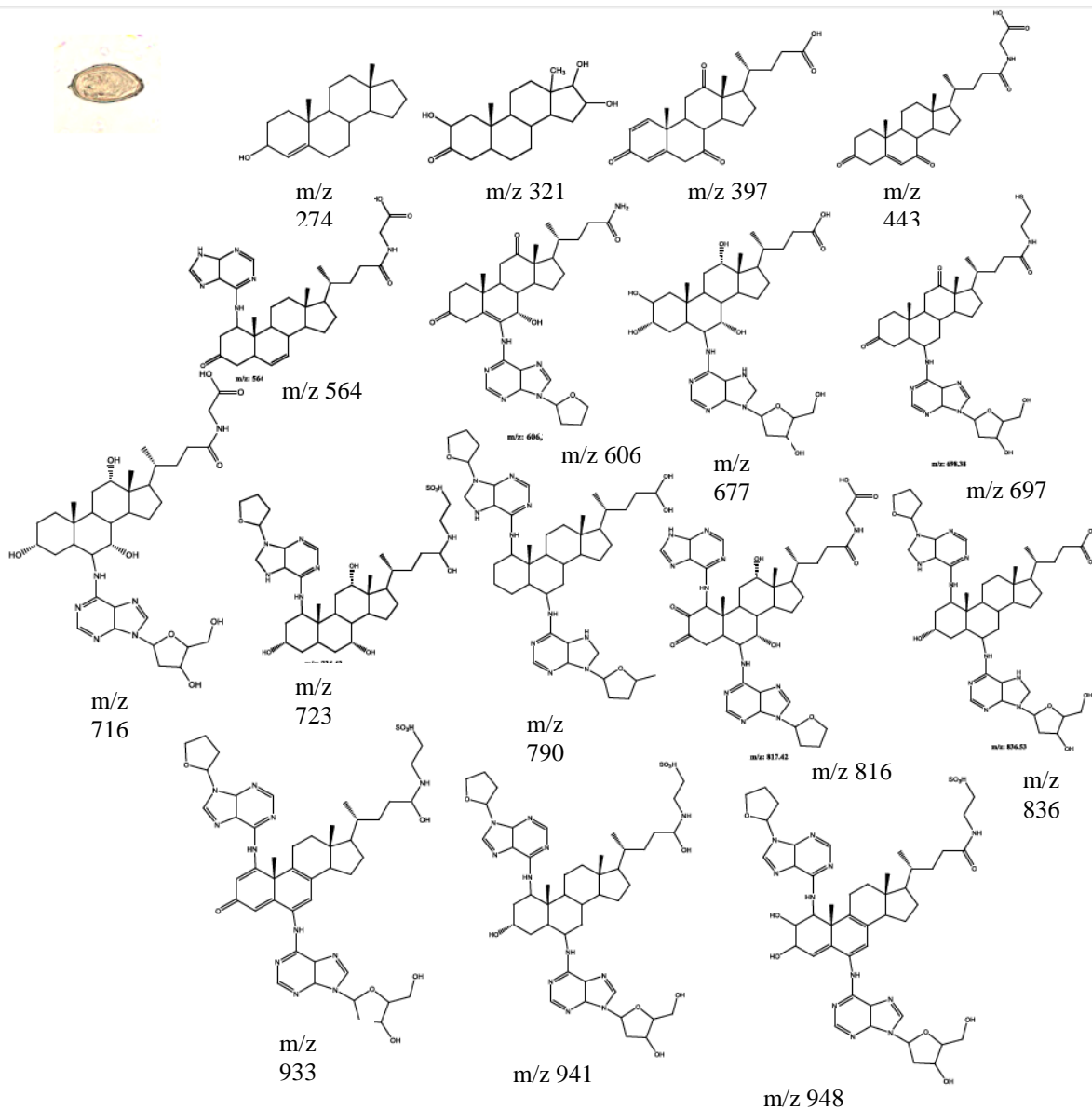


Рисунок 13. Метаболиты окистерольной структуры, найденные в экстрактах яиц *O. felineus*. (Совместно с др. Жозе Мануель Коста и проф. Нуно Вале, Университет Порто, Португалия)

1.2. Состав оксистеролов в лизатах разных видов трематод *O. felineus*, *O. viverrini*, *Fasciola hepatica*

По результатам исследований в лизатах *O. felineus* и *O. viverrini* было обнаружено много оксистеролов одной той же структуры (**Приложение 1**). Кроме этого, было показано, что в лизате *O. viverrini* оксистеролов было больше как по представленности пиков, так и по высоте и размеру пика (**Рисунок 14**). Важно отметить, что образцы лизатов червей готовили в одно и тоже время параллельно с использованием одних растворов, возраст марит был один и тот же; хомяков, на которых они были получены, заражали одновременно. Не было также различий в условиях содержания хомяков. Поэтому можно сделать вывод, что *O. viverrini* производит больше оксистеролов чем *O. felineus*. По-видимому, существуют определенные видовые различия в метаболизме червей этих двух близких видов (**Приложение 1 и 2**).

Сравнение результатов исследований растворимых фракций взрослых червей *O. felineus*, *O. viverrini*, *Fasciola hepatica* с помощью жидкостной хроматографии и двойной масс-спектрометрии показало, что в отличие от *O. felineus* и *O. viverrini*, в лизатах фасциол не было найдено специфических оксистеролов, спектр полученных пиков представлен только конъюгатами желчных кислот хозяина и аскорбиновой кислоты (**Рисунок 14**), которую добавляли как антиоксидант в процессе приготовления лизатов.

Поскольку заражение *F. hepatica* не ассоциировано ни с какими видами канцерогенеза, это еще раз подтверждает гипотезу о том, что оксистерольные метаболиты могут быть участниками патологических процессов, приводящих к развитию рака органов, заселенных паразитами.

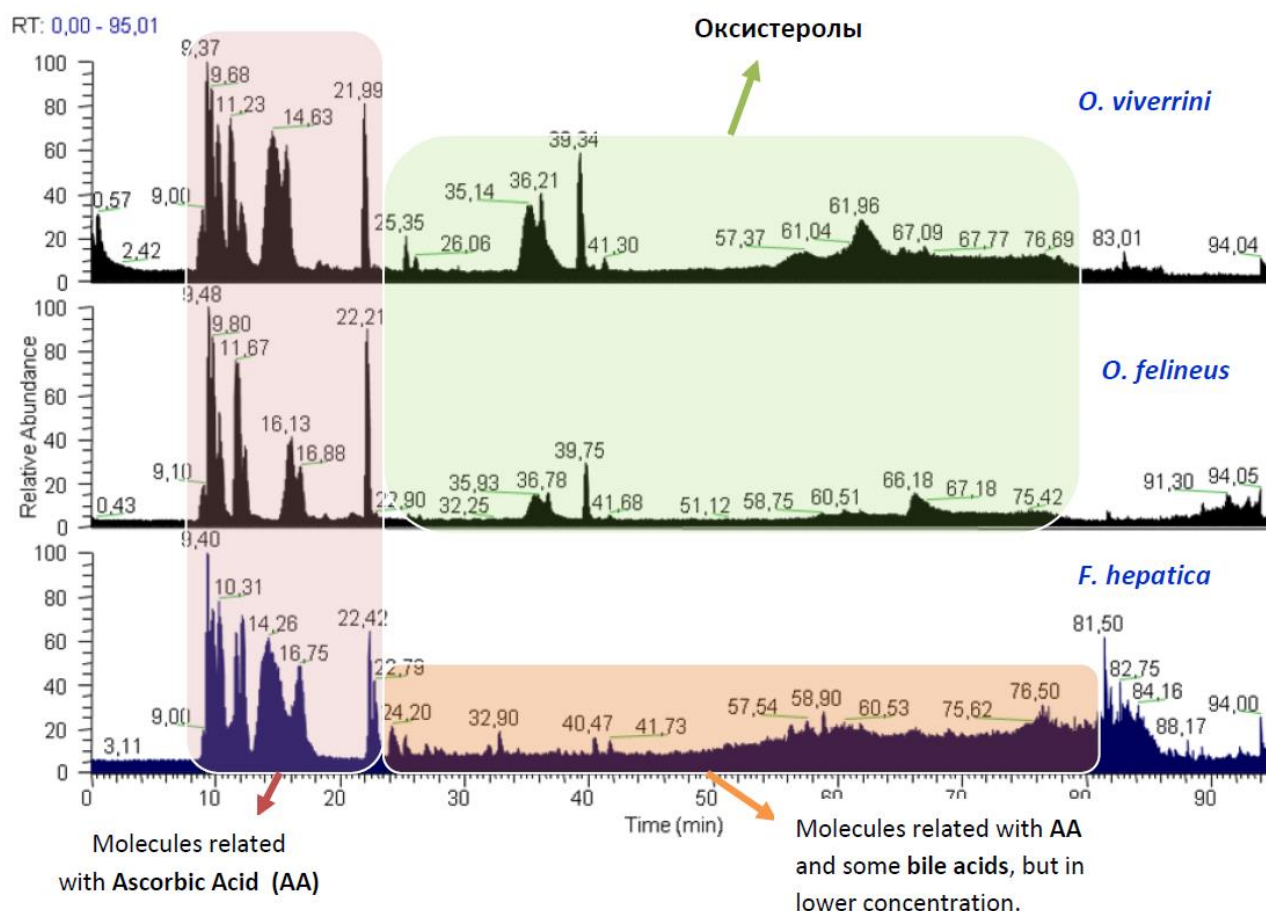


Рисунок 14. Сравнение результатов исследований растворимых фракций взрослых червей *O. felineus*, *O. viverrini*, *Fasciola hepatica* с помощью жидкостной хроматографии и двойной масс-спектрометрии. Представлены хроматограммы растворимых фракций лизатов взрослых особей трематод. По оси абсцисс отложено время удерживания на колонке (retention time); по оси ординат – относительное количество каждого компонента. Красным цветом выделена область молекул конъюгатов с аскорбиновой кислотой, добавленной в качестве антиоксидантного агента при приготовлении лизатов. Зеленым цветом выделен диапазон пиков, представленных специфическими оксистеролами; оранжевым – спектр пиков у *Fasciola hepatica*, представленных только конъюгатами желчных кислот хозяина без наличия специфических паразитарных оксистеролов. Данные получены совместно с др. Жозе Мануэль Коста и проф. Нуно Вале, Университет Порто, Португалия.

1.3. Оксистеролы в крови, желчи, моче зараженных хомяков.

В желчи, крови и моче зараженных хомяков были обнаружены специфические оксистеролы. В отличие от этого, в биологических жидкостях незараженных хомяков не было найдено ни одного из оксистеролов, о которых упоминается в этой главе. На основании этих данных можно сделать вывод, что наличие этих оксистеролов так или иначе связано с заражением описторхами.

Кроме молекул, которые идентичны по структуре оксистеролам из описторхов, были найдены также молекулы с другими m/z , которые по-видимому, являются уже результатом метаболизма оксистеролов, экскретируемых паразитом.

Один из метаболитов, найденных в желчи m/z 339, по структуре идентичен метаболиту, найденному во взрослых червях. Остальные метаболиты, найденные в желчи, по-видимому, результат метаболизма оксистеролов паразита после экскреции (m/z 249, 812 и 872. Например, метаболит m/z 494 близок по структуре к метаболиту m/z 557 (**Рисунок 15, 12**), найденному у взрослых червей, т.к. они демонстрируют примерно одинаковое время выхода ~ 54 min для m/z 494 и ~ 60 min для m/z 557. Кроме того, некоторые из метаболитов, найденных в желчи, являются, по-видимому, ДНК-аддуктами, в частности, m/z 812, 872, 908, 494, 430, 483 оксистеролы, конъюгированными с пуринами. Это является доказательством того, что оксистерольные метаболиты паразитической природы могут взаимодействовать с ДНК, вызывая образование апуриновых сайтов. Апуриновые сайты в ДНК при отсутствии или недостаточной репарации при делении клетки приводят к точковым мутациям. Похожие ДНК-аддукты были найдены также в экстрактах *O. viverrini* (**Приложение 1**).

Если сравнивать между собой сыворотку и экстракт червей, то можно обнаружить идентичные оксистеролы, в частности, m/z 259 и 325 (эти соединения имеют одно и то же время выхода (удерживания на колонке) и такую же фрагментацию. Например, m/z 599 найденный в экстракте *O. felineus* (время удерживания ~ 66 min), по-видимому, очень близок к m/z 588 в сыворотке (время удерживания ~ 67 min). Кроме того, в сыворотке также были обнаружены ДНК-аддукты m/z 588 и m/z 667, m/z 379, 479, 363. Однако, в сыворотке ДНК-аддуктов было обнаружено меньше, чем в желчи.

Анализ возможных метаболитов в моче, показал, что в моче отсутствуют метаболиты точно такой же структуры, что есть в лизатах описторха. Найденные уникальные метаболиты отличались по структуре от метаболитов описторха (m/z 415, 459, 467, 523). Вероятно, это продукты метаболизма оксистеролов в тканях хозяина. К примеру, метаболит m/z 471 (**Рисунок 12**) найденный в лизате *O. felineus* может быть источником метаболитов m/z 415 и 459 в моче; потому как они показывают близкое время удерживания: ~ 40 min для m/z 471 у червей и ~ 42 мин для m/z 415 и 459 в моче. Эти метаболиты подвергаются по-видимому многократным превращениям, проходя через желчь, кровь, мочу.

Важно, что найдены метаболиты общей структуры между яйцами и биологическими жидкостями хомяка. В частности, m/z 716, 816 были общими для желчи и яиц; m/z 564 был найден и в сыворотке и в яйцах; m/z 121, 198 и 443 были найдены и в сыворотке и в желчи зараженных хомяков и в яйцах одновременно; а метаболит m/z 339 был общим для яиц, червей и желчи (**Рисунок 15**).

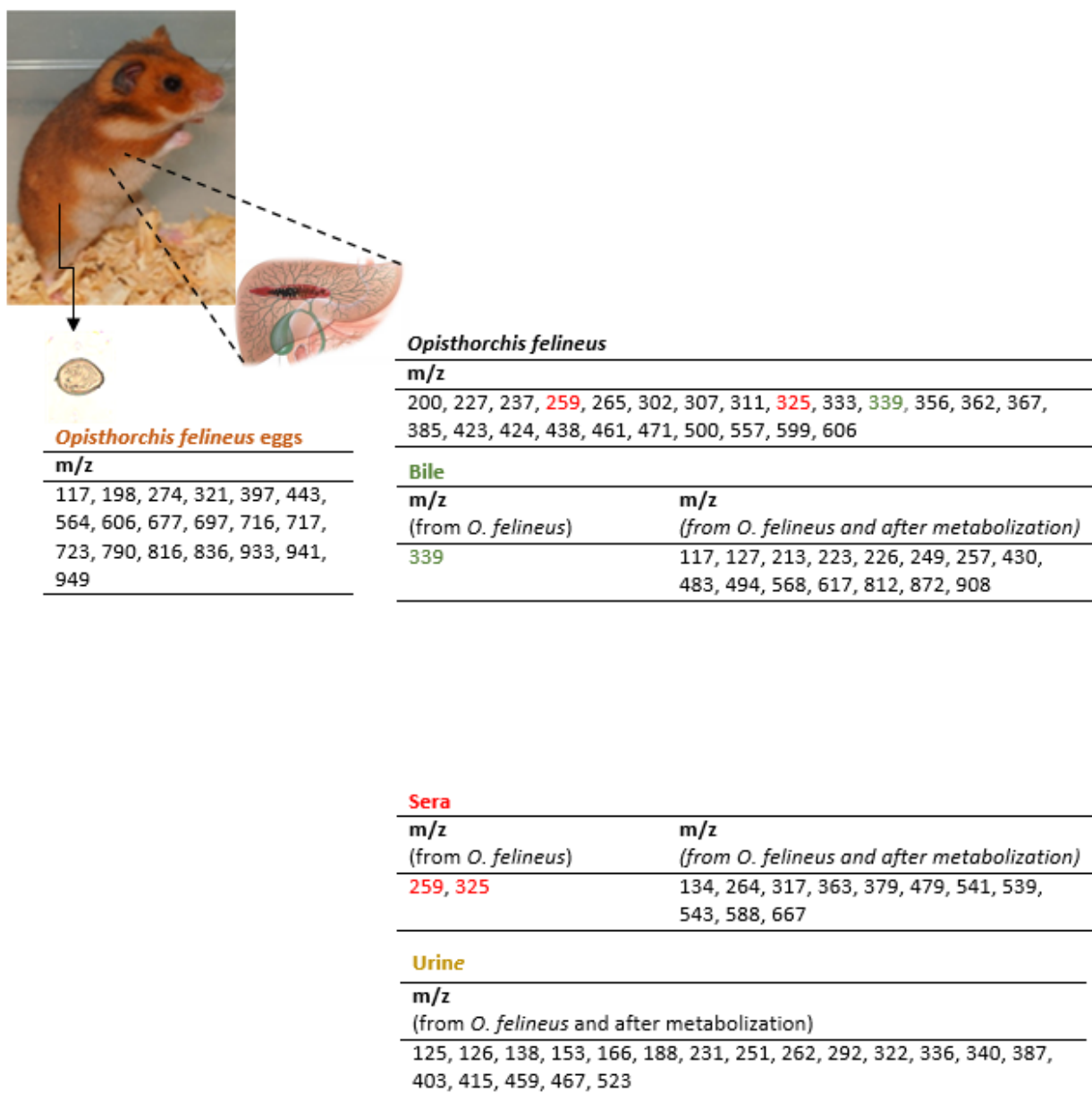


Рисунок 15. Сравнение оксистеролов в разных биологических жидкостях у зараженных хомяков. Красным цветом выделены оксистеролы одной и той же структуры, которые найдены и в лизате червя и в сыворотке хозяина. Зеленым цветом выделено соединение одной и той же структуры, которое найдено и в лизате червя и в желчи хозяина

Таким образом, *O. felineus* также как и другие виды канцерогенных трематод (Gouveia et al., 2015; Vale et al., 2013), могут производить оксистерольные метаболиты специфической структуры. Оксистеролы, как показано ранее проявляют промутагенные, генотоксические, провоспалительные свойства (Brindley et al., 2015; Cavalieri, Rogan, 2011; Jukasul et al., 2011). Показана связь между повышенной продукцией оксистеролов и развитием рака кишечника, легких, молочной железы и желчных протоков (Jaworski et al., 2001). Мы показали, что оксистеролы *O. felineus* могут попадать в окружающие описторха ткани хозяина и определяются в желчи, крови и моче зараженного животного, как в неизменном, так и в метаболизированном виде. Важно, что некоторые из оксистеролов конъюгированы с азотистыми основаниями ДНК. Это типичный продукт реакции оксистеролов при взаимодействии с ДНК, в результате которого остаются такой конъюгированный продукт и апуриновый сайт в ДНК (Cavalieri, Rogan, 2011). Апуриновый сайт в ДНК подвергается эксцизионной репарации, однако в условиях недостаточной работы системы репарации он может остаться неисправленным, и при делении клетки на этом месте появится точковая мутация. Накопление точковых мутаций в регуляторных районах генов-онкосупрессоров может привести к перерождению клетки. Таким образом, появление ДНК-конъюгатов в моче, крови и желчи косвенно подтверждают генотоксическую роль оксистеролов и происходящие процессы в окружающих описторха тканях.

Важно отметить, что яйца описторхов содержат множество оксистерольных метаболитов, как по числу форм, так и по общему количеству (**Рисунок 11, 13**). Известно, что хронический описторхоз как у хомяков, так и у людей, сопровождается гиперпластическими эффектами в тканях желчных протоках и сопровождается холангитом и холангиофиброзом, воспалительными процессами (**Рисунок 16**) и образованием гранул. На **рис 16**. можно увидеть, что хронический описторхоз (через 3 месяца после инвазии) сопровождается инфильтрацией клетками крови в ткани, расширенными желчными протоками, дисплазией клеток эпителия и образованием гранул (**Рисунок 16Е, F**). При большем увеличении видно, что вся гранулема инфильтрирована яйцами паразита (**Рисунок 16F**). Важно отметить, что гранулемы формируются вокруг скопления яиц паразита, которые в дальнейшем оказываются плотно окружены тканью гранул. Таким образом, можно предположить, что в число факторов, приводящих к образованию и прогрессированию гранул входят паразит-

специфические оксистеролы, наиболее большое количество которых представлено в яйцах паразитов. Гипотезу о гранулем-провоцирующем действии яиц поддерживает тот факт, что очаги рака мочевого пузыря содержат большое количество яиц *S. haematobium*, канцерогенного кровяного сосальщика, также генерирующего специфические оксистеролы (Gouveia et al., 2015).

В результате сравнительного исследования различных видов трематод на наличие оксистеролов нами показаны специфические различия между видами *O. felineus*, *O. viverrini*, *Fasciola hepatica* в спектре оксистеролов. Вероятно, такие видоспецифические различия обусловлены видовыми различиями в метаболизме этих червей, поскольку, если бы оксистеролы генерировались случайным образом, то спектр бы их был одинаковый. Однако, учитывая тот факт, что спектр оксистерольных метаболитов различен, более того, у *Fasciola hepatica* вообще нет оксистеролов, вероятно, существуют специфические ферментативные пути их генерации у Opisthorchiidae. Учитывая тот факт, что в качестве ферментативного пути продукции оксистеролов традиционно рассматривают монооксигеназы цитохромы P450, исследования системы P450 и системы клеточного транспорта метаболитов у паразитических червей становится наиболее актуальной задачей.

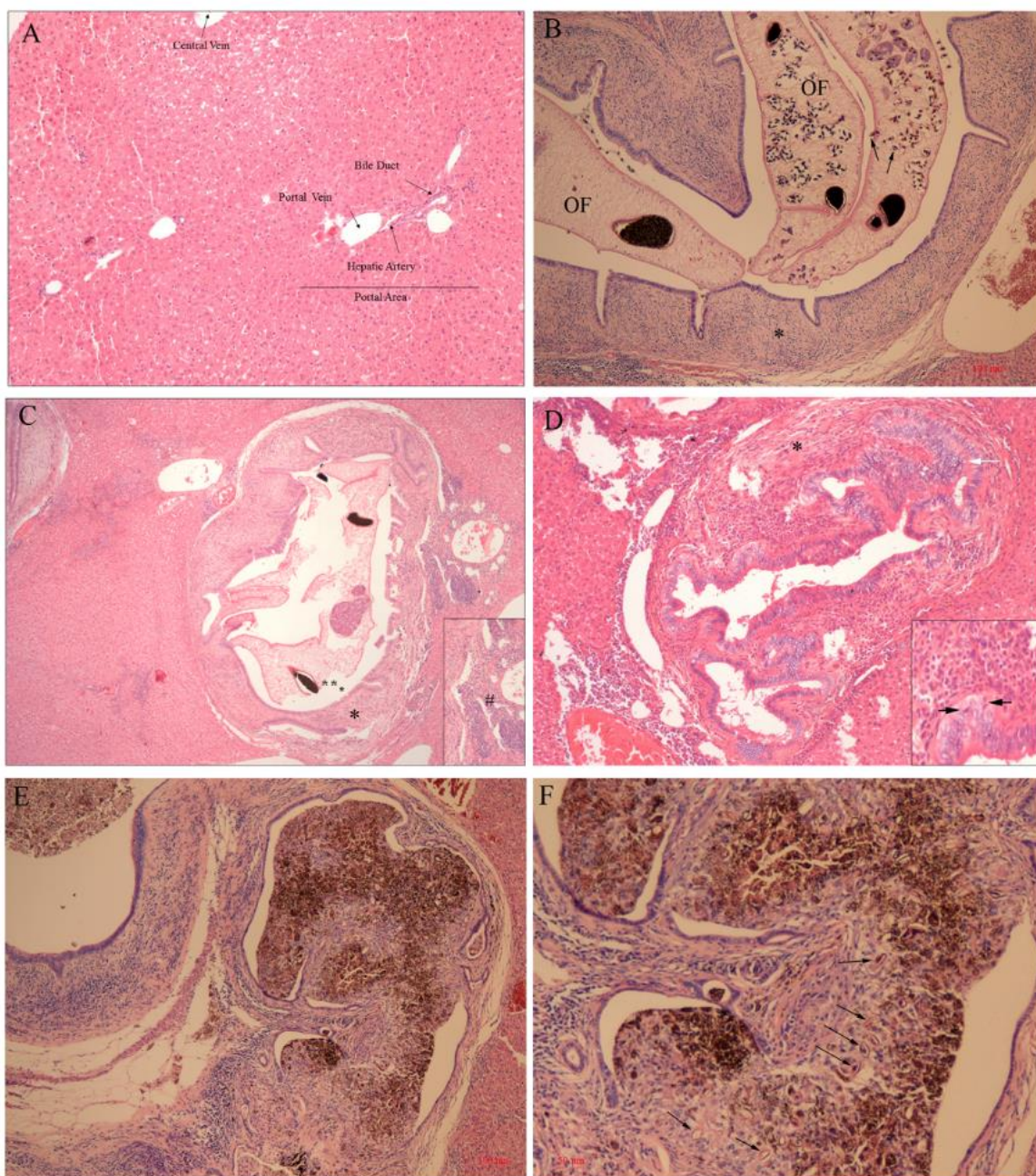


Рисунок 16. Гистопатология печени контрольных (А) и зараженных *O. felinus* хомяков (В-Ф) через 3 месяца после инвазии. Окраска гематоксилином и эозином. В, С. Видны особи паразитов в протоках печени (OF), стрелками показаны яйца внутри паразитов; D. Стрелками показана дисплазия холангиоцитов; E, F. Гранулема внутри желчного протока, состоящая из соединительной ткани, клеток воспаления, яиц паразита, темного пигмента. Стрелками обозначено положение яиц внутри гранулемы. (Результаты получены совместно с Галиной Максимовой, ИЦиГ СО РАН).

Глава 2. Структура и функциональность системы метаболизма ксенобиотиков *Opisthorchis felineus*

Глава 2.1. Цитохромы P450

Глава 2.1.1. CYP в геномах и транскриптомах плоских червей. CYP *O. felineus*, структура предсказанного белка, экспрессия и регуляция экспрессии мРНК CYP

Когда мы начинали исследование, были доступны неаннотированные транскриптомы *O. viverrini*, *C. sinensis* и *O. felineus*, геном *S. mansoni*. Геном *O. felineus* не был тогда секвенирован, он стал доступен много позднее. Для поиска CYP *O. felineus* на первом этапе работы нами были изучены опубликованные данные транскриптомов и геномов других трематод. Единственной полной последовательностью CYP у паразитических трематод оказалась мРНК этого гена у *S. mansoni* из базы данных (<http://schistodb.net/schistodb20/>). *O. viverrini* CYP и *C. sinensis* CYP были реконструированы нами используя подход поиска последовательностей и ассемблирования гомологичных последовательностей мРНК *Sm* CYP в данных сборки SRA012272 (Young et al., 2010). мРНК *S. japonicum* CYP была реконструирована из неаннотированных последовательностей генома SJC_S001070 и mRNA AY815629.1 и AY810342.1 Кроме того, было проведено предсказание интрон-экзонной структуры гена. P450 свободноживущих плоских червей *Schmidtea mediterranea* and *M. lignano* были получены из геномной базы данных *Schmidtea mediterranea* (<http://smedgd.neuro.utah.edu/index.html>) и *Macrostomum lignano* сервера (<http://www.macgenome.org/>) (Robb et al., 2007) как наиболее гомологичные последовательности для OF CYP.

Необходимо отметить, что монооксигеназной активностью в окислении чужеродных соединений у многих организмов помимо P450 обладают еще и флавиномоноксигеназы ([Pfam00743](#)). Мы проверили данные геномов и транскриптомов родственных видов (*S. mansoni*, *F. hepatica*, *O. felineus*) и не обнаружили гены, кодирующие эти ферменты.

Важным результатом было обнаружение только одного представителя семейства CYP монооксигеназ у всех исследуемых видов паразитических плоских червей (**Рисунок 17**). В целом, анализ данных известных геномов и транскриптомов паразитических и непаразитических плоских червей показал, что состав CYP кардинально отличается между этими группами. Если у свободноживущих видов имеются десятки слабо гомологичных друг другу дивергировавших форм (например, 39 CYPs у *Schmidtea mediterranea* <http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>), то у паразитических видов (*Schistosomatidae*, *Opisthorchiidae*, [Taeniidae](#), [Fasciolidae](#)) скорее всего цитохром P450 всего один.

Секвенирование OF CYP проводили, используя праймеры, подобранные на последовательности CYP *O. viverrini* и CYP *S. sinensis*. Был получен специфический продукт ПЦР, который удлинили с помощью RACE-PCR до 1613 п.н.. Наибольший ORF (программа ORFFinder) в этой последовательности был 1389 п.н., что соответствовало размеру белка OF CYP 463 а.о. Результаты секвенирования были депонированы в GenBank (JF920147). Анализ кодирующей части последовательности P450 и поиск консервативных доменов с помощью CDD (conserved domain database) NCBI показал наличие функционального домена Pfam00067 CYP (E-value=3.75e-29), характерного для CYP микросомального типа II эукариот (**Рисунок 18**). Этот тип цитохромов широко представлен у многих организмов, принимает непосредственное участие в биотрансформации экзогенных соединений – ксенобиотиков, лекарств. CYP II microsomal type расположен в мембране эндоплазматического ретикулума, работает в паре с NADPH CYP редуктазой, которая необходима для переноса электронов на цитохром P450 от NADPH. NADPH CYP редуктаза найдена у некоторых видов паразитических Platyhelminthes, например, у *Schistosomatidae* (<http://schistodb.net/schistodb20/>). В структуре OF CYP с помощью программы MEMSAT3 был обнаружен трансмембранный домен в N-концевом участке 7-30 а.к. (score 35.65) с последующим характерным кластером пролинов (**Рисунок 18**). Функционально этот кластер ограничивает жесткой конструкцией белковую глобулу от трансмембранного якоря. Домен, содержащий N-концевой сигнальный пептид митохондриальных цитохромов p450, отсутствовал.

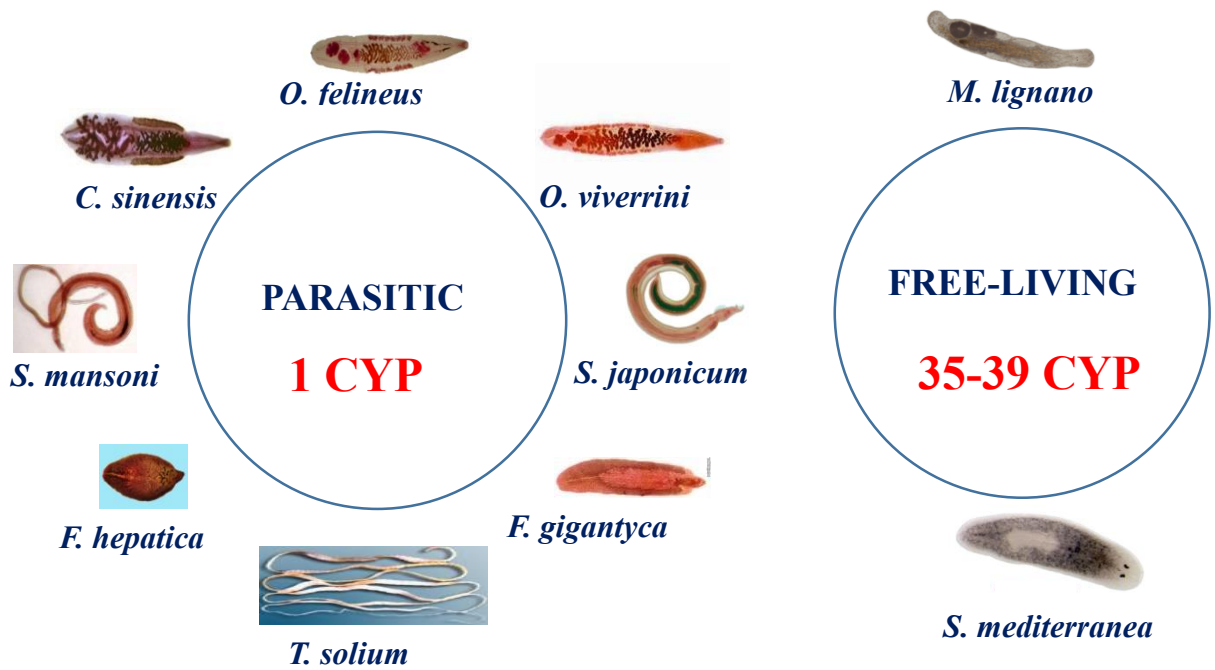


Рисунок 17. *In silico*: состав системы CYP в геномах Platyhelminthes. Найден только один ген P450 у всех известных паразитических плоских червей.

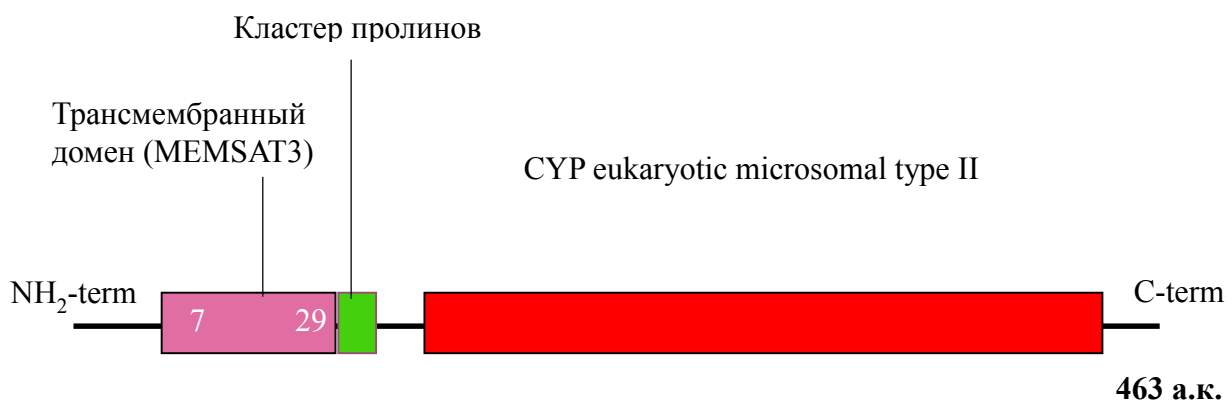


Рисунок 18. Схематическая структура и консервативные районы в последовательности белка CYP *O. felinus*.

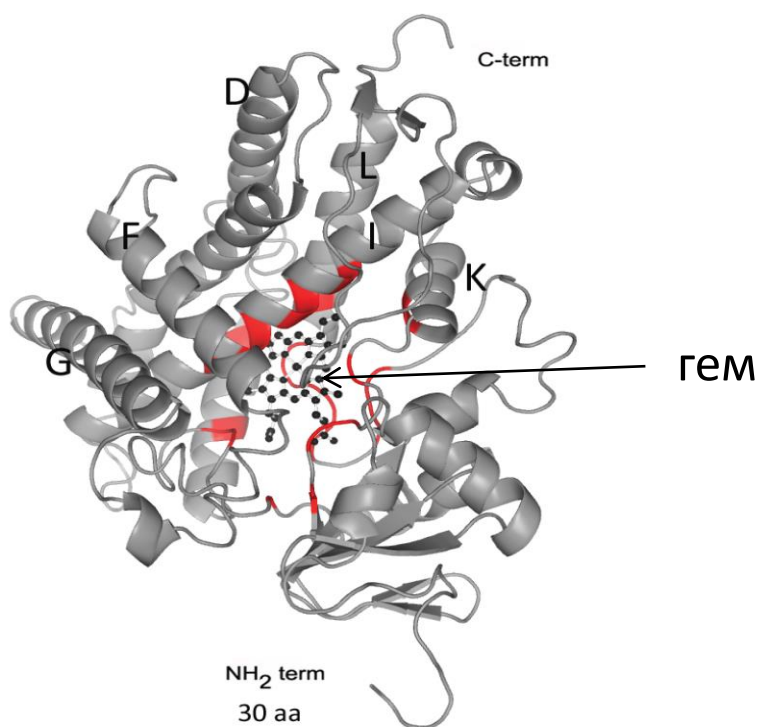


Рисунок 19. Моделирование 3D структуры OF CYP (Phyre2). Стрелкой указано положение гема внутри глобулярного участка белка. Красным цветом выделены участки белка, участвующие в позиционировании гема.

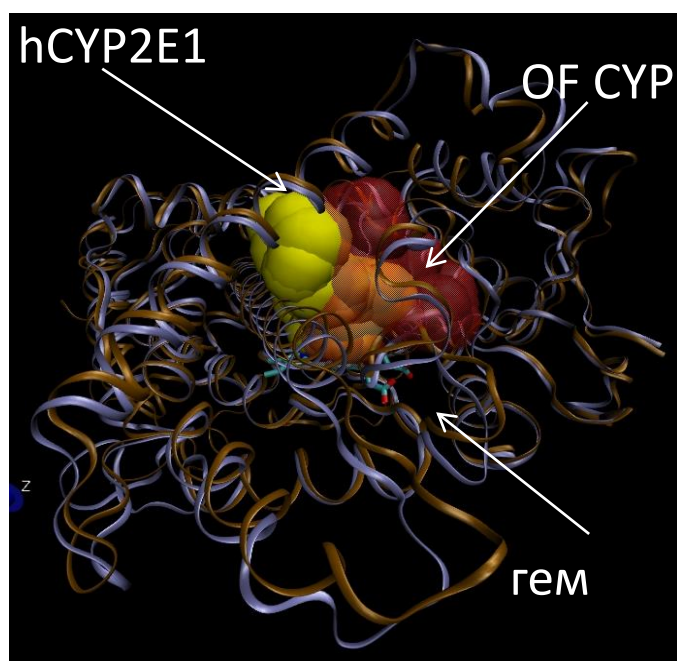


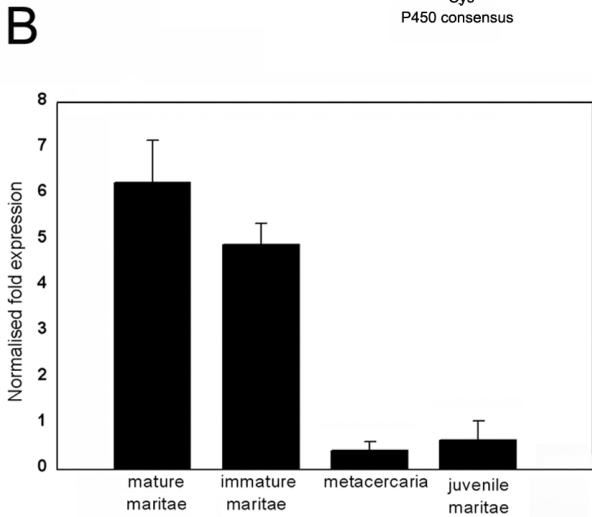
Рисунок 20. Суперпозиция OF CYP с human CYP2E1 (Phyre2). Голубым цветом продемонстрировано положение гема. Желтым цветом – лиганд связывающий карман для hCYP2E1, красным цветом – для OF CYP.

A

```

C. sinensis /1-464 1 MMLQGLCDHLPEAAIVLVYCYGIFVFIIRHLVELRCLPPGGYGLPIWIGYPAFGP-SAFHOLDILHKSGFDVVCFAFGNTVVVFNSETLYEAAVVNI-RRKVGWMTLSVNDW 110
O. viverrini /1-445 1 MMLQRLCEVLEPEATIVLVYCYGIFVFIIRHLVELRCLPPGGYGLPIWIGYPAFGP-SAFHOLDILHKSGFDVVCFAFGNTVVVFNSETLYEAAVVNI-RRKVGWMTLSVNDW 110
O. felineus /1-463 1 MMLQGLCEVLEPEAAIVLVYCYGIFLFIIRHLVELRCLPPGGYGLPIWIGYPAFGP-SAFRGLDILHKSGFDVVCFAFGNTVVVFNSETLYEAAVVNI-RRKVGWMTLSVNDW 110
S. mansoni /1-414 1 MMTILLSTINILATLALMLSF-IIIYLLYIQNSTKLPPGGYGLPIWIGYTSCLGT-DAFRKIQDLNKIYDVSFQVLGKTIILVNYVDLHEAANGN-RSKVGRYMTMVNDL 109
S. japonicum /1-483 1 MMTILLSTISTTHVITLVLCF-IIIYLLYIQRSOKLPPGGYGLPIWIGYTSCLGN-DAFRKIQHNKTYGDIIVSFRYIGKTIILVYVDLHQEAANVNI-RSKVGRYMTMVNDL 109
M. lignano /1-498 1 -----MLEFLIPLTLACLAAYWYFTWNRKLPVGGYGLPIWIGYVAPLWAVKRRDHYFTELAKQYGDIFTVRVGGFYIIVLVNSXEAIKEAFARN-EHIAAGRLRAF TKF 100
S. mediterranea /1-508 1 ----MLLVVLCFITVYVYKFLRKTSSALPSHLKLPVGGYGLPIWIGYVNLNVS-SAPFYQLNDRREKYGPISYIGIQWKNIIVLVNVDVINIKSLKEGGNTFSGRWAVVFTKD 108
proline cluster
C. sinensis /1-464 111 LAQGHGISNYNTPRAVELRHAFRHLYG-HEHMIAYLSDRSNNMLAAPIRKEINGLIRELENSNOR-PIKVMPIIRRTIWKIMRVRVFGTVCMEENE-----EIEHILQ 213
O. viverrini /1-445 111 LAQGHGISNYNTPRAVELRHAFRHLYG-HEHMIAYLADRSNNMLAAPIRKEINGLIRELENSNOR-PIKVMPIIRRTIWKIMRVRVFGTVCMEENE-----EIEHILQ 213
O. felineus /1-463 111 LAQGHGISNYNTPRAVELRHAFRHLYG-HEHMIAYLADRSNNMLAAPIRKEINGLIRELEDSKOT-PIKVMPIIRRTIWKIMRVRVFGTVCMEENG-----EIEHILQ 213
S. mansoni /1-414 110 LAENSGISNYDTOKALEMRKAFVRLVHNNIKTTEEHENKLOPFISQNIINAQINELIRGLRIRGOK-PVNVLQLMRCTWRIIWNLIFGKECQLTDQ-----QISDTLD 213
S. japonicum /1-483 101 LAENSGISNYDTPKAIETRKAFLRHVHNSMKTENNEDGKHLVMPQNIITQINALIRQLRMLQOK-PVNVLQLMRCTWRIIWNLIFGKECQLTDQ-----QISDTLD 213
M. lignano /1-498 101 LSDGKGIASAEVGRHREQRRYCLRVLRDFGGRINFEG-----AIEEAGRLADSIIRANOSAXPIRIDGRLSQAIANVIGRIIVYGRFRFEYNSX-----ELRRMVSALH 198
S. mediterranea /1-508 109 LAKDSGILFKDKEFWATQRSFTRLVLRDFGKGQCAEN-----VYREIEKVMKEIKLKNOR-NIETTKLVSFATVNMISDFIMKREFENNENILVYIKSIQDIAR 209
C. sinensis /1-464 214 QISCNMENTMFOASQLLPKCI LPTFKYFPIYIQRFFNVDRLTERYKIIHCTMQOEITKSMAELNPESLLYRF TKD-----DKLKLTAKEHLRALFELMAAAGSDTSSLLTLTW 320
O. viverrini /1-445 214 QISCNMENTMFOASQLLPKCI LPTFKYFPIYIQRFFNVDRLTERYKIIHCTMQOEITKSMAELNPESLLYRF TED-----DKLKLTPTELHRLAFELMAAAGSDTSSLLTLTW 320
O. felineus /1-463 214 QISCNMENTMFOASQLLPKCI LPTFKYFPIYIQRFFNVDRLTERYKIIHCTMQOEITKSMAELNPESLLYRF TED-----DKLKLTPTELHRLAFELMAAAGSDTSSLLTLTW 320
S. mansoni /1-414 214 DSSNNLQNLQFLQIRQLLRFVFNIFKHSQFARKLFEIEEIIYKYKTVRQLIDNNVGE-----MHNSDSLLOGLIND-----LKLNLTT----- 292
S. japonicum /1-483 214 YISSNNLQNLQFLQIRQLLRFVFNIFKHIIRLARLFKIEDIAYKHVTVRQLIDSNVGE-----EKNTNSLFGQLIND-----PKLNLTKNDISRLAYEFLAAAGSDTSSLLTLTW 316
M. lignano /1-498 199 ELNSAPGGVLLNNTTSLDPLADMLGVGKKAARDGIRDLLEPIVAEHOADLDELDEQGLTDFLYAYLAEQKRRSLP-----DADIWODROMMEVLDLMAASDITRSTLW 307
S. mediterranea /1-508 210 VADVNSLVNMFVIFDMWFRISLMLIYFFHMPRIIGTIDRTTFDSIGIVEDHRRKRFEPENESQDLIDAFLEQHLNLSNLSKNSHFTDQVQVRLISELFLAKETIANTLSW 321
P450 signature
C. sinensis /1-464 321 AFTYLAAHPEQSDT-----VTTKIMCIIHRYASVVPFGLPHIAQEAMTVAGFHIIPRXSMLIFNLVAVHQKQ-----RSTAGNVT 395
O. viverrini /1-445 321 AFTYLAAHPEQSDS-----VNTKNMCIHRYASVVPFGLPHIAQEAMTVAGFHIIPRRSMLIFNLVAVHQOQ-----RSTAGNVT 395
O. felineus /1-463 321 AFTYLAAHPEQFNDT-----VNTENMCIHRYASVVPFGLPHIAQEAMTVAGFHIIPRRAMLIFNLVAVHQKQ-----LSTWVNT 395
S. mansoni /1-414 293 -----QKFIYIPKSSILINLVAVHNSQ-----IKKLIINTE 322
S. japonicum /1-483 317 ACDFYARAPPKDTFK-----LSPDIFDMWFRISVVPFGLPHIAQEAMTVAGFHIIPRSSILVNLVAVHNSQ-----LKSLLINNK 391
M. lignano /1-498 308 AINLSSGSPVQEAVRQELASVVGDAARPPSTSDLPRLPRLDVAICVLRISALVPTAVPHCCSDTELRGQCLPLGTMVMANTHCLTRDADFVNPQDFDPFGHFLTVGDEG 419
S. mediterranea /1-508 322 TFLLLAHPFEGTKIRDEISKEIGFIRWPTMDKDKSLNHYCGAVLDEIIFRYSTVPLSLIAHRVLENASINGFFVPAQSLIFNLVAVHNSQ-----YDFYEPHFL 426
Cys
C. sinensis /1-464 396 P-----PIFISLQSPGPGSRFANKLLLDIIQSVSNRNFIEVKE-----DNIPFIPVTRGLTRGPAENYFVHPKMA----- 464
O. viverrini /1-445 396 P-----PIFISLQSPGPGSRFANKLLLDIIQSVSNRNFIEVKE-----DNISP-HPATRG----- 445
O. felineus /1-463 396 P-----PIFISLQSPGPGSRFANKLLLDIIQSVSNRNFIEVKE-----DNISP-HPVPRGLTRGPAENYFVHPKMA----- 463
S. mansoni /1-414 323 QNSDEIQESDKPIFISLQSPGPGSARIANLLIEQILTAINGEFLIGNITGSPFETISPNQESLTPFGITRPHKSMYIFVTKLNGHRRTSI 414
S. japonicum /1-483 392 PQLNEMKESDKPIFISLQSPGPGSARIAAPLIERILTEVNGEFLIQSATQSSFETISSMNGESLTPFGITRPHKSMYIFIKRNTGIRRTSI 413
M. lignano /1-498 420 SGQLQVVKDKLIFISLQSPGPGSALARMEICFLSYLPRFRFELPPQ-----VTDADTVSGALFNTCRQKGFVFRPIKAL----- 498
S. mediterranea /1-508 427 NENGYQPKVLELPIFISLQSPGPGSALARMEEFIVVVSFLQKFSISLSDSEK-----LDTFQLLNSRGTFRGPAIHTLNFDELVH----- 508
    
```

B



C

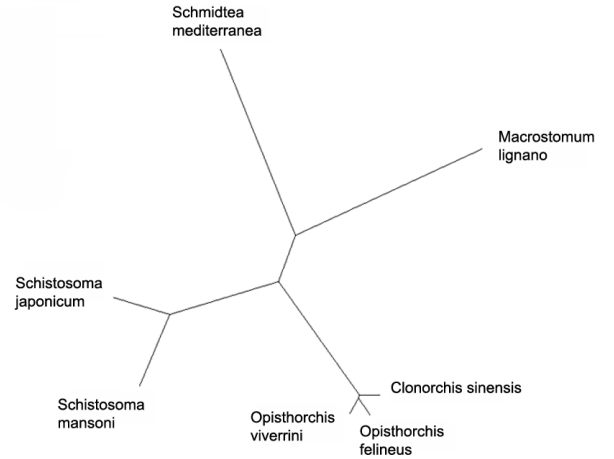


Рисунок 21. Последовательность белка *O. felineus* CYP и экспрессия мРНК этого гена на разных стадиях жизненного цикла. (А) Выравнивание последовательности белка *O. felineus* CYP с предказанными последовательностями CYP из *S. mansoni*, *S. japonicum*, *O. viverrini*, *C. sinensis*, *S. mediterranea* and *M. lignano* была выполнена используя программное обеспечение ClustalW с весовой матрицей Blosum. (Б) Экспрессия мРНК CYP *O. felineus* на различных стадиях жизненного цикла. (С) Филогенетическое дерево построено по данным CYP (ClustalW, Blosum64) и визуализировано в программе TreeView.

Трехмерная модель *O. felineus* CYP (OF CYP) (**Рисунок 20**) была сгенерирована с помощью многомерного моделирования Phyre 2 (Kelley and Sternberg, 2009). Отобранные 6 моделей демонстрировали 100% уровень значимости, хотя первые 29 а.к. остатков трансмембранного домена были смоделированы с низким уровнем достоверности. Полученная модель демонстрировала структурное сходство с CYP2 семейством цитохромов млекопитающих.

Сравнение аминокислотной последовательности с собранными CYP паразитических Trematoda обнаружило высокую 91% гомологию с P450 внутри семейства Opisthorchiidae (*C. sinensis*, *O. viverrini*), более слабую с CYP Schistosomatidae (29% - *S. mansoni* и 37% - *S. japonicum*), и низкую гомологию с CYP свободноживущих видов Platyhelminthes 23% *Schmidtea mediterranea* и 24% *Macrostomum lignano* (**Рисунок 21А**). Такая же низкая степень гомологии около 20-24% была обнаружена с известными белками CYP Eumetazoa. Среди ортологов оказался CYP 2A1 *Rattus norvegicus* (24% гомологии), P450 2E1 *Homo sapiens* (21% гомологии), P450 2R1 *Homo sapiens* (23% гомологии). Несмотря на низкую гомологию первичных последовательностей, CYP обладают консервативной укладкой небольших участков, обеспечивающей функцию монооксигеназного катализа. Консервативные участки расположены преимущественно в С-концевом районе белка и формируют четырех-спиральную глобулу (D, E, I, L), α -спирали J and K, два района β -складок, and петля, называемая “меандр”. В этом районе содержится гем-связывающая петля, с характерным P450 консенсусным мотивом Phe-X-X-Gly-X-Arg-X-Cys-X-Gly (Phe400-Ser-Leu-Gly-Ala-Arg-Ser-Cys-Pro-Gly409 в OF CYP) (**Рисунок 21А**) перед самым началом спирали L с абсолютно консервативным цистеином (Cys407 в OF CYP), участвующим в позиционировании атома железа гема (Montellano, 2005). Еще одним консервативным участком является мотив Glu-X-X-Arg в K спирали, который обычно служит для стабилизации кора (Werck-Reichhart, Feyereisen 2000). В этом мотиве у OF CYP, Glu заменен на Ala343. Другой консервативный мотив “P450-signature” Ala/Gly-Gly-X-Asp/Glu-Thr-Thr/Ser (Ala309-Gly-Ser-Asp-Thr-Ser314 in OF CYP) расположен в центральной части спирали I (**Рисунок 21А**), необходим для формирования канала передачи электрона. У двух других представителей семейства Opisthorchiidae *C. sinensis* и *O. viverrini* структуры консервативных участков CYP полностью совпадают с OF CYP (**Рис 21А**). Предсказанный CYP свободноживущих видов *M. lignano* и *S. mediterranea* обладают консервативной структурой всех функциональных доменов CYP. В отличие от

этого в структуре СУР *S. mansoni* из базы данных (<http://schistodb.net/schistodb20/>), отсутствует район I и K спиралей, содержащий высококонсервативные функциональные мотивы (**Рисунок 21А**). Это противоречит данным об активности монооксигеназной системы у *S. mansoni* (Saeed et al., 2002), поэтому представляется вероятным, что в базе представлена последовательность некоего нефункционального цитохрома, а последовательность активного цитохрома пока отсутствует.

Уровень СУР мРНК оценивали с помощью ПЦР с детекцией в режиме реального времени в нескольких различных стадиях жизненного цикла *O. felineus*. В качестве эндогенных контролей для нормализации уровня экспрессии были выбраны 4 гена «домашнего хозяйства»: парамиозин, альфа-тубулин (TUA), митохондриальный рибосомальный белок L16 (MrpL16), рибосомальный белок S27 (RPS27). Для того, чтобы выбрать наиболее подходящий ген для нормализации уровня экспрессии мы оценивали параметр «стабильность экспрессии» на 4 различных жизненных стадиях. Стабильность экспрессии каждого гена оценивается, как M-value, вычисленный среднее стандартное отклонение логарифма уровня экспрессии во всех образцах для одного гена относительно других референсных генов, оставшихся в панели. Вычисления производили, удаляя каждый ген с наибольшим M-value пока не осталось два гена с наименьшим M-value. Предварительные данные показали, что $M < 1.5$ является подходящим критерием для RT-PCR (Strube et al 2008). В итоге для оценки уровня мРНК СУР были выбраны два гена альфа-тубулин (TUA) и митохондриальный рибосомальный белок L16. Уровень мРНК СУР оценивали, нормируя одновременно на эти 2 гена. Самый высокий уровень экспрессии СУР оказался во взрослом черве – в 20 раз выше, чем в метацеркариях, и в 10 раз выше, чем в ювенильных червях (**Рисунок 21В**). Интересно, что уровень экспрессии гена СУР в марите оказался сравним с уровнем экспрессии трех из четырех белков домашнего хозяйства: RPS27, парамиозин, альфа-тубулин. Такой высокий уровень экспрессии СУР в марите свидетельствует о значительной роли продукта этого белка для взрослой стадии. Интересно, что у других паразитических трематод (Schistosomatidae) была также показана высокая активность СУР, сравнивая с микросомами печени крысы, именно на стадии взрослого червя (Saeed et al., 2002; Cvilink et al., 2009). Интересно, что до обнаружения этого факта считали, что если СУР и есть, то он важен только для стадии свободноживущей личинки, а для стадии паразита внутри хозяина СУР не нужен.

Содержание СУР определяли спектроскопическим методом используя CARY Varian спектрофотометр (Palo Alto, USA) в 200 мкг белка микросомальной фракции (Omura and Sato, 1964). В основе метода оценки содержания СУР лежит его способность с восстановленным гемом в комплексе с СО формировать пик с максимумом на 448-450 нм. В качестве положительного контроля использовали микросомы печени мыши, обработанной предварительно рифампицином, известным индуктором подсемейств 2В, 2С, 3А. В отличие от микросом мыши, гемопротеид, содержащийся микросомальный белок *O. felineus* демонстрировал пик на 420 нм и два дополнительных пика на 539 и 570 нм (Рисунок 22).

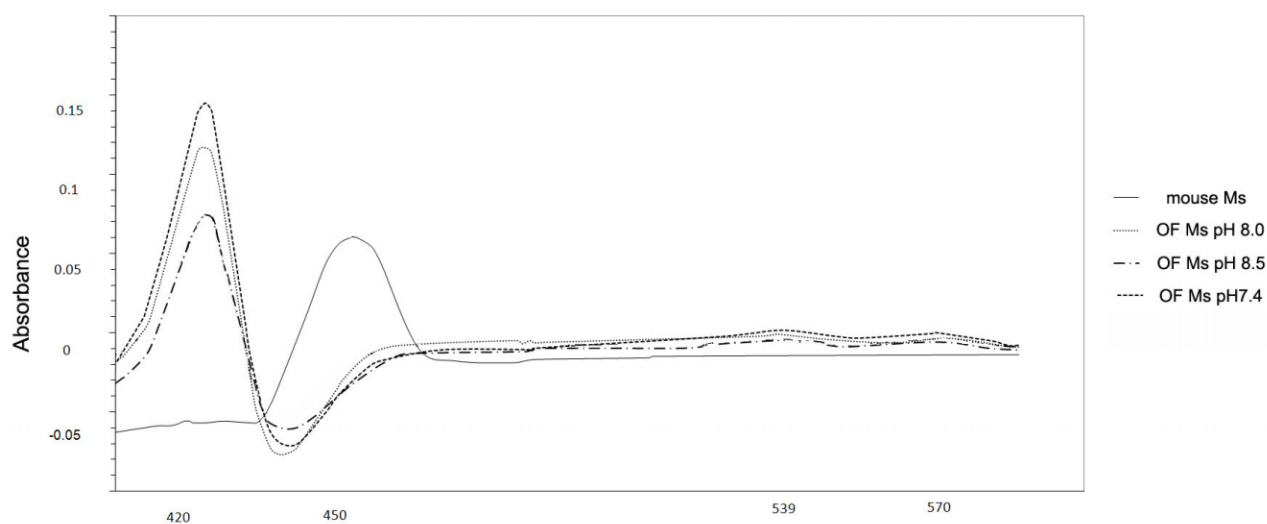


Рисунок 22. Спектроскопический анализ микросомальной фракции, выделенной из взрослой особи *O. felineus* при различных рН (7.4-8.5). В восстановленном состоянии атома железа гема в комплексе с монооксидом углерода, СУР может формировать пик на длине волны 450 нм. Такой пик был получен при тестировании положительного контроля – микросомы печени мышей. Микросомы *O. felineus* формировали пик на 420 нм и два дополнительных пика на 539 и 570 нм (α и β пики), что свидетельствовало о неактивном состоянии этого белка.

Эта картина является типичной для неактивного низкоспинового состояния СУР420 (Sabat et al., 2009; Sun et al., 2010). И действительно, измерение активностей О-гидроксилирования субстратов (этоксид-, метоксид-, бензоксид- и пентоксидрезорфуинов)

(Burke et al., 1985) в 50 мкг фракции микросом не показало наличия ферментативной активности (данные не приводятся). В отличие от *O. felineus*, в одном из источников литературы есть сведения, что микросомы from *S. mansoni* и *S. haematobium* сохраняют свою ферментативную активность при выделении (Saeed et al., 2002). Однако, больше ни в одном источнике литературы об этом не упоминается, более того, есть сведения (личные сообщения), что многим исследователям этого добиться не удавалось. Необходимо отметить, что высота пика, соответствующего P420 в образцах микросом *O. felineus* свидетельствует о большом количестве белка у паразита в стадии зрелой мариты, что согласуется с высоким содержанием мРНК (**Рисунок 22**). Известно множество случаев, когда цитохромы выделяются в низкоспиновом состоянии CYP420 (Driscoll et al., 2011; Dunford et al., 2007; Sun et al., 2010; Sabat et al., 2009). Переход из высокоспинового CYP в низкоспиновое состояние вызван изменением позиции атома железа гема в активном центре цитохрома (Sabat 2009). В позиционировании атома железа помимо гема участвует и атом серы аминокислотного остатка цистеина (Cys407 в OF CYP) (**Рисунок 7А**, **Рисунок 21А**). Протонирование цистеина до тиола может являться причиной перехода P450-P420. P420 при определенных условиях может конвертироваться обратно в P450, например, при повышении pH до 8.5 -9.0 (Driscoll et al., 2011; Dunford et al., 2007). К сожалению, выделение микросом *O. felineus* в диапазоне pH 7.4 - 8.5 не изменяло положение пика (**Рисунок 22**).

Единственный представитель CYP, по-видимому, обладает широкой субстратной специфичностью в отличие от специализированных CYPs свободноживущих видов, и участвует в различных процессах, требующих реакций монооксигеназного катализа. Анализ кодирующей части показал, что найденный цитохром P450 *O. felineus* является CYP микросомального типа II эукариот, широко представленный у высших организмов и участвующий в биотрансформации ксенобиотиков и лекарств. Учитывая наличие функциональных доменов в структуре CYP, схожесть с 3D структурами CYP высших организмов, и обнаруженную нами высокую экспрессию гена цитохрома для взрослой стадии паразита *O. felineus*, система P450 - важный участник биохимических процессов у паразитических плоских червей.

Регуляция экспрессии гена CYP *O. felineus*. Регуляцию экспрессии мРНК гена CYP исследовали по аналогии с регуляцией генов цитохромов P450 большинства организмов, в частности млекопитающих. Мы предположили, что если белок CYP участвует в

метаболизме ксенобиотиков, экспрессия его гена должна регулироваться также с помощью экзогенных субстратов. Мы проверили основные типы индукторов CYP на взрослых червях и эксцистированных метацеркариях (NEM): DMSO (dimethyl sulfoxide, диметил сульфоксид), ТХДД – тетрахлор дибензо диоксин (типичный лиганд для Арилгидрокарбонового рецептора и индуктор CYP1A); фенobarбитал (активатор конститутивного рецептора андростанов и индуктор CYP2A, 2B), дексаметазон (лиганд прегнан X рецептора и индуктор CYP3A4), этанол (индуктор CYP2E1), кетоконазол (KZ) - лиганд прегнан X рецептора. К 6 типам индукторов мы добавили также биологические индукторы – эндогенные жидкости хозяина *M. auratus* – сыворотку крови хомяка, желчь хомяка и гемоглобин.

Для оценки уровня мРНК CYP были выбраны два гена Ub and MrpL16. Уровень CYP mRNA оценивали, нормируя одновременно на эти 2 гена. В результате было показано, что вещества не влияли на уровень мРНК CYP (**Рисунок 23**), кроме незначительного увеличения экспрессии под действием гемоглобина на эксцистированных метацеркариях (**Рисунок 23В**). Этот эффект требовал дополнительного подтверждения, поэтому мы применили метод цифровой капельной ПЦР (**Рис 23С**), однако подтвердить увеличение экспрессии под действием гемоглобина не удалось. Обработка взрослых и ювенильных червей в течение 4 часов ни одним из индукторов не изменяла уровень мРНК CYP (данные не представлены). Таким образом, попытки определить тип индуктора среди экзогенных соединений ксенобиотиков и биологических индукторов не увенчалась успехом, т.е. CYP, по-видимому, обладает постоянным уровнем экспрессии мРНК.

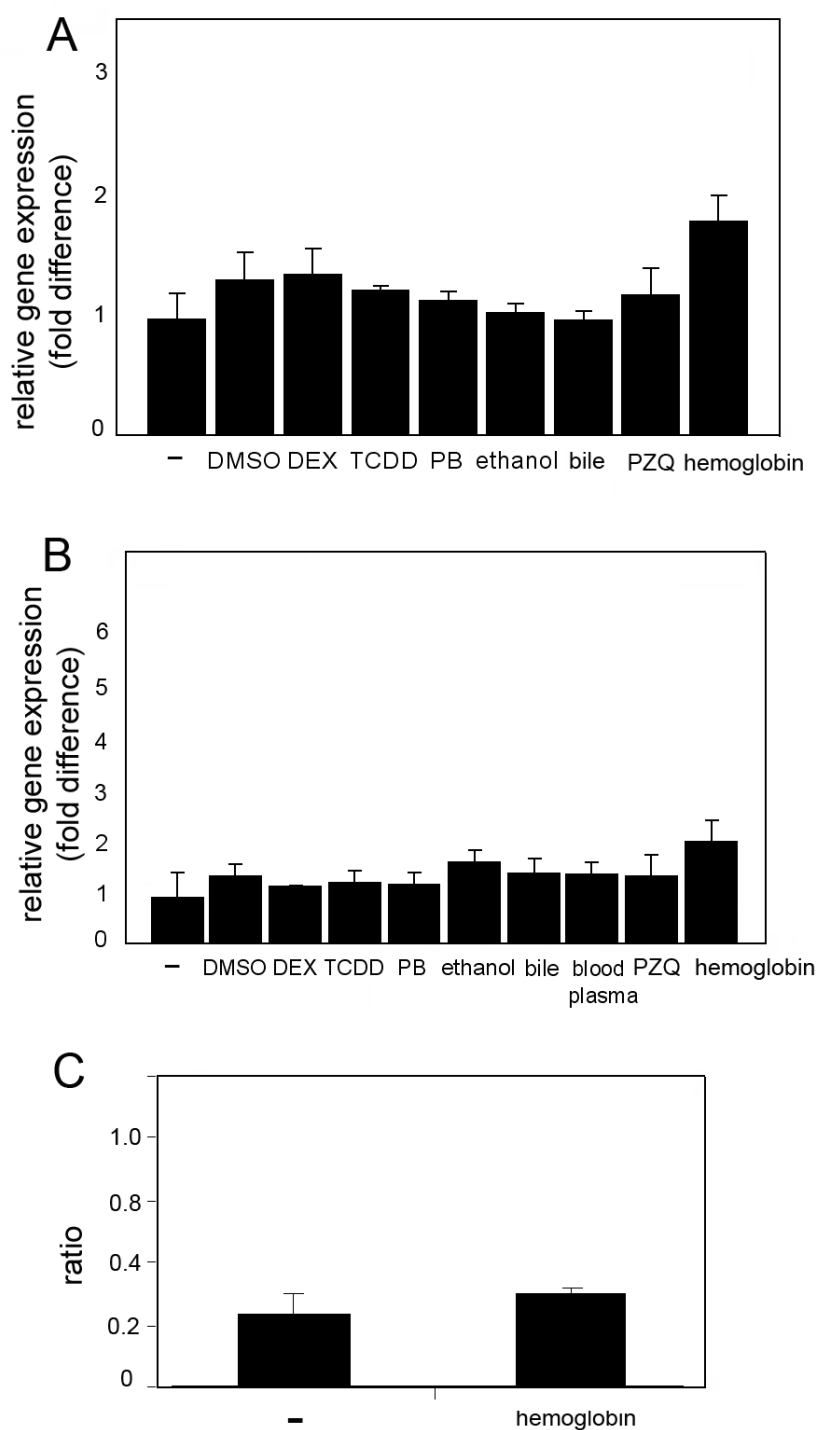


Рисунок 23. Уровень мРНК OF CYP после обработки *in vitro* *O. felineus* в течение 20 часов различными ксенобиотиками (оценка методом ПЦР в режиме реального времени (A, B) и Цифровой капельной ПЦР (C)). При нормализации результатов ПЦР в режиме реального времени оценивали параметр M, который отвечает на стабильность экспрессии (M-value). Ub и MrpL16 гены были выбраны в качестве эндогенных референсных контролей (M<1.2). **A.** Взрослые черви; **B, C.** Эксцистированные метацеркарии.

Глава 2.1.2. Исследование регуляторных областей гена CYP. Секвенирование белков NR1 семейства ядерных рецепторов.

Нами проведен анализ регуляторных районов гена CYP, в частности, района промотора, района первого экзона и первого интрона с помощью программного обеспечения Jaspar (http://jaspar.genereg.net/cgi-bin/jaspar_db.pl). Прежде всего, нас интересовало наличие сайтов связывания транскрипционных факторов ядерных рецепторов ксенобиотиков, которые могли бы реагировать на внешние стимулы и регулировать экспрессию гена цитохрома P450. Анализ показал, что в структуре этих районов обнаруживается 7 сайтов связывания транскрипционных факторов ядерных рецепторов подсемейства NR1 (**Рисунок 24А**). В состав этого подсемейства у млекопитающих входят такие рецепторы, как RAR, ROR (RAR-related receptor), VDR (рецептор витамина D), RXR (ретиноидный X рецептор, THR (thyroid hormone receptor, рецептор тиреоидного гормона). Однако нас очень заинтересовал тот факт, что при анализе последовательностей транскриптома описторхид на предмет наличия последовательностей генов, кодирующих ядерные рецепторы, были найдены несколько коротких последовательностей, содержащих консервативные домены рецептора тиреоидных гормонов. В-целом, исследования геномов плоских червей показали, что наличие предсказанных последовательностей ядерных рецепторов у плоских червей не отражает консервативность функций кодирующих их белков у плоских червей (Bertrand, Escriva, 2011).

Нашей задачей было просеквенировать последовательности этих рецепторов, для того, чтобы восстановить полную структуру их кодирующих районов. Поскольку DBD (DNA-binding domain, ДНК-связывающий домен) ядерных рецепторов консервативны, мы использовали праймеры, подобранные на эти домены у THRВ и THRA *C. sinensis*, амплифицировали районы генов *O. felineus* методом PCR и RACE-PCR, и затем секвенировали методом Сэнгера. Длина мРНК THRВ составила 2778 п.н., в которой была определена открытая рамка считывания (ORFFinder) 2163 п.н. (Genbank:JQ867457). После амплификации центральной части THRA, мы получили 2 ПЦР-продукта. После разделения продуктов в геле при денатурирующих условиях, экстракции из геля и секвенирования было обнаружено, что более длинный фрагмент содержал вставку 56 п.н. После выравнивания на геномные контиги *C. sinensis* выяснили, что в этом месте

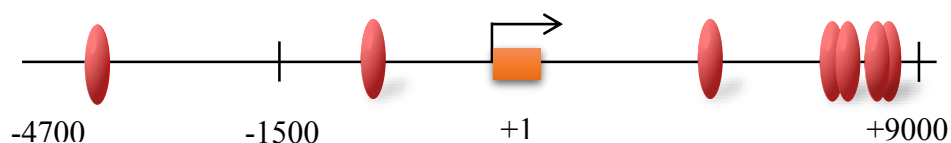
происходит соединение экзонов, и синтезируются 2 варианта мРНК. Методом RACE-PCR был определен ORF THRA1, который составил 2790 п.н. (Genbank:JQ867455). Альтернативный сплайсинг THRA2 приводит к сдвигу рамки считывания и образованию стоп-кодона TGA. ORF THRA2 (ORFFinder) составил 1992 п.н. (Genbank:JQ867456) (**Рисунок 24Б**). Таким образом, мы просеквенировали две формы THRA, образованные двумя вариантами альтернативного сплайсинга.

Поиск консервативных доменов внутри последовательностей предсказанных тиреоидных рецепторов показал, что все три формы рецептора содержат консервативный DBD, представленный в виде 2 цинковых пальцев и Р-бокса. LBD (Ligand-binding domain, лиганд-связывающий домен) является умеренно-консервативным, содержит в себе 12 альфа спиралей. THRA2 не содержал LBD (**Рисунок 24Б, 24В**). Таким образом, транскрипционные факторы THR обладают консервативным DBD доменом и слабо консервативным LBD.

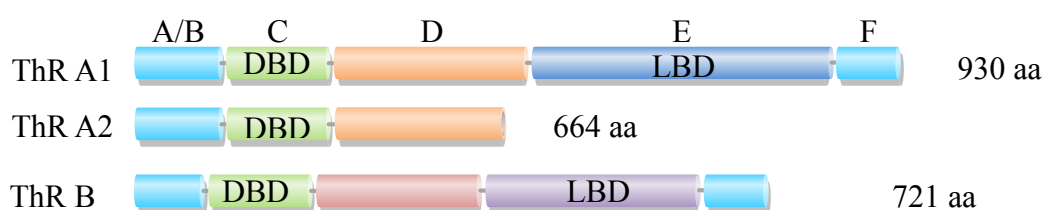
Семейство ядерных рецепторов характеризуется значительной эволюционной пластичностью в отношении как лиганд-специфичности, так и их функциональной роли (Bertrand, Escriva, 2011). В этой связи, предсказание функции этих белков, и в том числе THR, основанное только на их высокой гомологии с функционально охарактеризованными ортологами позвоночных, представляется не вполне основательным. С другой стороны, различия в базовых процессах паразитов и их хозяев объясняются паразитическим образом жизни, способствующим редукции отдельных систем в пользу максимального приспособления к условиям среды существования и использованию компонентов этой среды.

Тем не менее, мы посчитали важным исследовать воздействие экзогенно-добавленных тиреоидных гормонов на взрослых гельминтов и эксцистированных метацеркарий описторха. А также, проверить экспрессию гена CYP в ответ на обработку тиреоидными гормонами (трийодотиронином и тироксином). Изменений экспрессии гена CYP не было показано при обработке этими гормонами. Кроме того, не было показано фенотипических изменений при обработке взрослых и ювенильных гельминтов в течение продолжительного времени. Таким образом, анализ функциональности ядерных рецепторов из семейства NR1 на предмет взаимодействия и опосредования эффектов потенциальных лигандов не подтвердил изначальную гипотезу о функциональной роли этих белков, на основании только их высокой гомологии с ортологами млекопитающих.

А

O. felineus CYP

Б



В

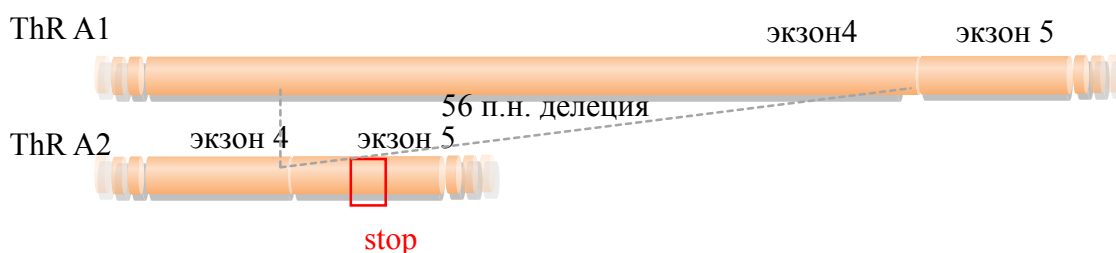


Рисунок 24. Схемы, иллюстрирующие регуляторные области гена CYP *O. felineus*; доменную структуру транскрипционного фактора NR1 *O. felineus*; схему альтернативного сплайсинга гена ThRA1. **А.** Графически представленная схема промотора (-4700 п.н.) гена *O. felineus* CYP, первый экзон и первый интрон (+9000 п.н.). Оранжевым цветом выделена область первого экзона гена. Красными овалами обозначены позиции респонсивных элементов для посадки транскрипционных факторов NR1 подсемейства, предсказанные с помощью программы распознавания сайтов транскрипции Jaspar. **Б.** Доменная структура трех предсказанных белков семейства транскрипционных факторов NR1. **В.** Схема альтернативного сплайсинга гена ThRA1.

Глава 2.1.3. Функциональная значимость цитохрома P450 для *O. felineus*.

Ранее мы показали, что у паразитических (Opisthorchiidae, Fasciolidae), кровяных двуусток (Schistosomatidae), и представителей цестод (Taeniidae) в геноме присутствует всего один ген CYP (Pakharukova et al., 2012). Кроме того, мы не обнаружили генов флавинмонооксигеназ. Очевидно, что в этом случае, основным ферментом, обладающим монооксигеназной активностью в отношении экзогенных соединений у паразитических плоских червей является цитохром P450.

Ранее мы клонировали и секвенировали кДНК CYP *O. felineus*, промоделировали структуру кодируемого белка. Предсказанный белок обладает консервативным строением, содержит функциональные домены, характерные для митохондриальных CYP млекопитающих биотрансформации ксенобиотиков, и оказался наиболее близок по структуре к CYP2 млекопитающих. Однако ничего неизвестно о функциональности этого белка.

Поэтому мы поставили себе цель исследовать функциональную организацию метаболической системы цитохромов P450 у печеночных паразитов человека и животных *Opisthorchis felineus*, в частности определить функциональную значимость монооксигеназы паразита, исследовать способность метаболизировать экзогенные ксенобиотики, определить возможный спектр субстратной специфичности CYP, а также исследовать значимость белка, кодируемого этим геном для фенотипа червя.

Исследование монооксигеназной активности CYP. При выделении митохондриальной фракции белков *O. felineus* выделяется CYP в неактивном состоянии P420 (глава 2.1.1, Рисунок 22). Поэтому определить монооксигеназную активность общепринятым способом, который применяется для исследования активности митохондриальных ферментов млекопитающих не представлялось возможным. Было решено исследовать активность CYP в тканях гельминтов, *in situ*. Это показалось оправданным, поскольку у паразитических трематод мы не обнаружили последовательностей, кодирующих другие типы монооксигеназ или других CYP. Таким образом, основным ферментом, обеспечивающим монооксигеназную активность паразита по-видимому, является именно цитохром P450.

Мы предположили, что способность паразита метаболизировать экзогенные специфические субстраты цитохромов P450 млекопитающих будет свидетельствовать о функциональной активности цитохрома P450 паразита. Кроме того, добавляя в среду инкубации различные субстраты для CYP и измеряя их количество мы хотели определить возможный спектр субстратной специфичности монооксигеназы.

Основываясь на данных литературы, хлорзоксазон (CLZ) (**Рисунок 25E**), широко применяемый миорелаксант, действующий на ЦНС, является высокоспецифичным субстратом CYP2E1 человека. Хлорзоксазон гидроксилируется этой формой цитохрома до 6-ОН-хлорзоксазон (6-ОН-CLZ) (Piccoli et al., 2010). На **Рисунок 25** представлена типичная хроматограмма разделения продуктов метаболизма CLZ. В образце среды инкубации, содержащей CLZ, мы обнаружили пик, соответствующий 6ОН-CLZ (**Рисунок 25B**). Для того, чтобы подтвердить, действительно ли образующийся метаболит может быть произведен активным CYP, в среду инкубации добавляли кетоконазол.

Кетоконазол является широко известным ингибитором микросомальных цитохромов. В концентрации 40 мкМ он способен ингибировать ферментативную активность многих форм CYP (Montellano, 2005). При совместном добавлении в среду инкубации кетоконазола и хлорзоксазона содержание 6ОН-CLZ оказалось резко сниженным и составило только около 1,9% по сравнению с количеством 6ОН-CLZ в обычных условиях содержания (**Рисунок 25C**, пик отмечен стрелкой). Кроме того, в образец среды с обработкой кетоконазолом, представленный на **Рисунок С**, мы добавили дополнительно стандарт 6ОН-CLZ, при этом видно, что увеличился именно тот пик, который соответствует времени удерживания 6ОН-CLZ (**Рисунок 25D**).

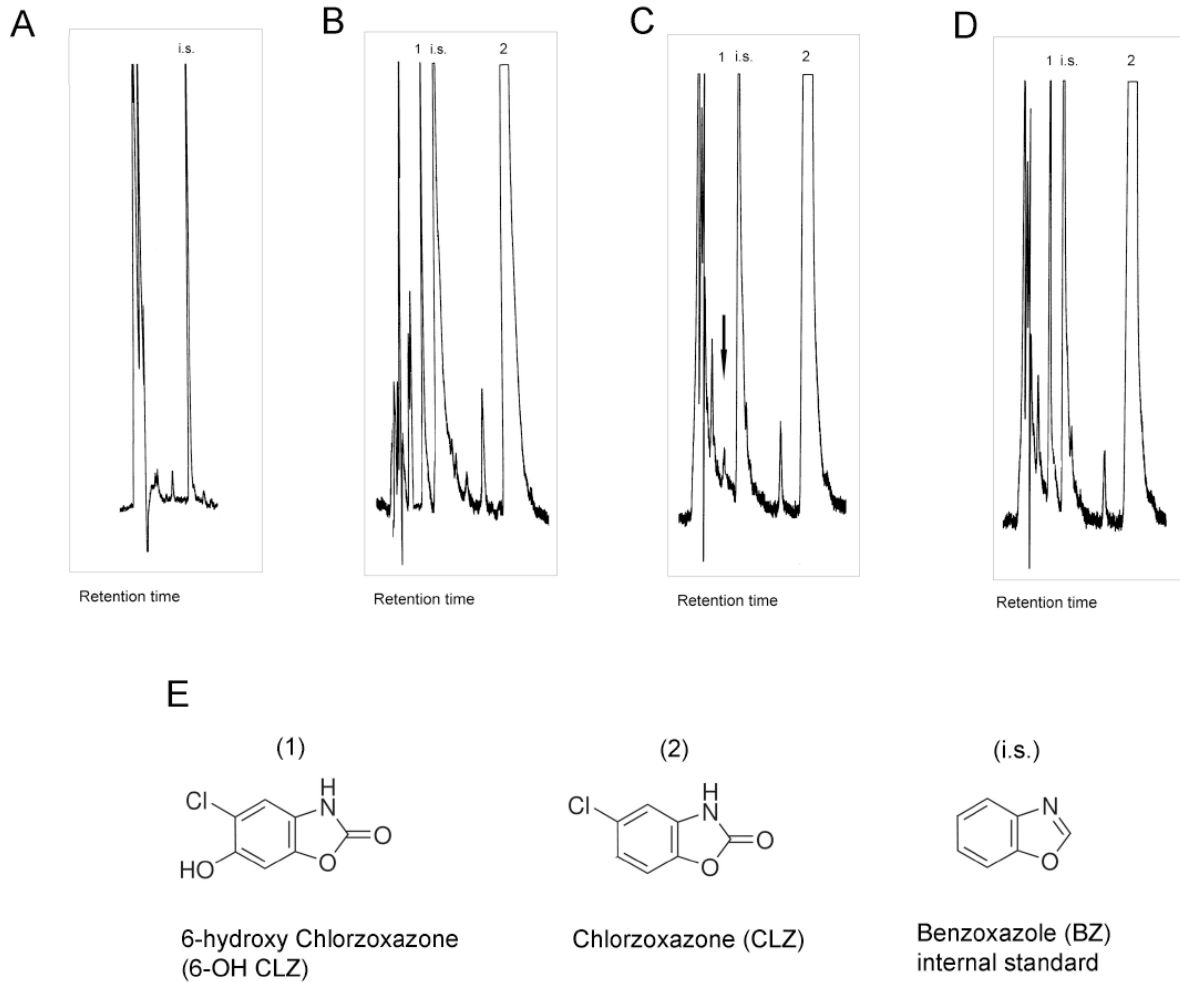


Рисунок 25. Результаты хроматографического разделения продуктов в лизате взрослых особей описторхов в контроле (A) и с хлорзоксазоном (B, C, D). B. Хлорзоксазон добавлен в среду с червями. **C.** Инкубация описторхов с хлорзоксазоном и кетоконазолом; **D.** в препарат C добавлен экзогенный 6OH-CLZ; **E.** Структуры соединений. (1) пик, соответствующий 6-OH CLZ; (i.s.) внутренний стандарт бензоксазол; (2) пик, соответствующий хлорзоксазону. (Результаты получены совместно с д.б.н. В.А. Вавилиным, Институт Молекулярной Биологии и Биофизики СО РАН).

Таким образом, мы получили результаты, свидетельствующие о том, что *O. felineus* способен метаболизировать субстрат, специфический для монооксигеназ CYP2E1 млекопитающих.

Алкоксирезорифины (пентоксирезорифин, PR), метоксирезорифин, MR), бензоксирезорифин, BR) – флюорогенные субстраты для цитохромов P450 млекопитающих, в результате ферментативной реакции образуется флюоресцентный продукт – резорифин (**Рисунок 26**). Мы предположили, что активно работающий фермент монооксигеназа в тканях описторха будет образовывать флюоресцентный продукт, который можно увидеть при исследовании под родаминовым фильтром. После 20 часов инкубации с PR видны большие скопления флюоресцентных частиц размером около 5 микрон в районе выделительных канальцев и экскреторном пузыре описторха (**Рисунок 27С, D, F, G**). Интересно, что в кишечнике и окружающих кишечник тканях паразита нет флюоресцентного окрашивания.

После инкубации с BR мы также увидели образование частиц резорифина, но значительно меньше (**Рисунок 27Е**), в то время, как после MR нет формирования частиц резорифина не наблюдали (**Рисунок 27В**). При совместной обработки PR и ингибитором микросомальных CYP кетоконазолом скоплений флюоресцентных частиц становится намного меньше (**Рисунок 27Н**). Это является дополнительным свидетельством, что образованное флюоресцентное вещество в тканях описторха является продуктом CYP.

Таким образом, *O. felineus* способен метаболизировать субстраты, специфические для монооксигеназ семейств CYP2B (PR) и CYP3A (BR) млекопитающих, и не метаболизирует субстрат для CYP1.

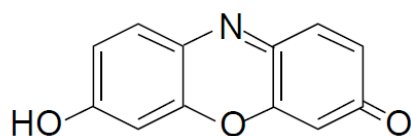
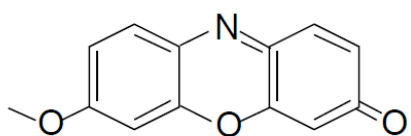
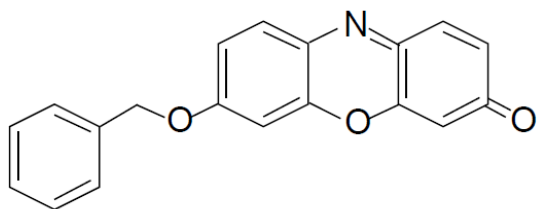
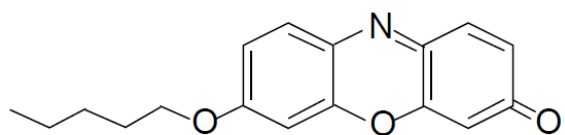


Рисунок 26. Структуры алкоксирезорифинов. А. Пентоксирезорифин; В. Бензоксирезорифин; С. Метоксирезорифин; D. Резорифин

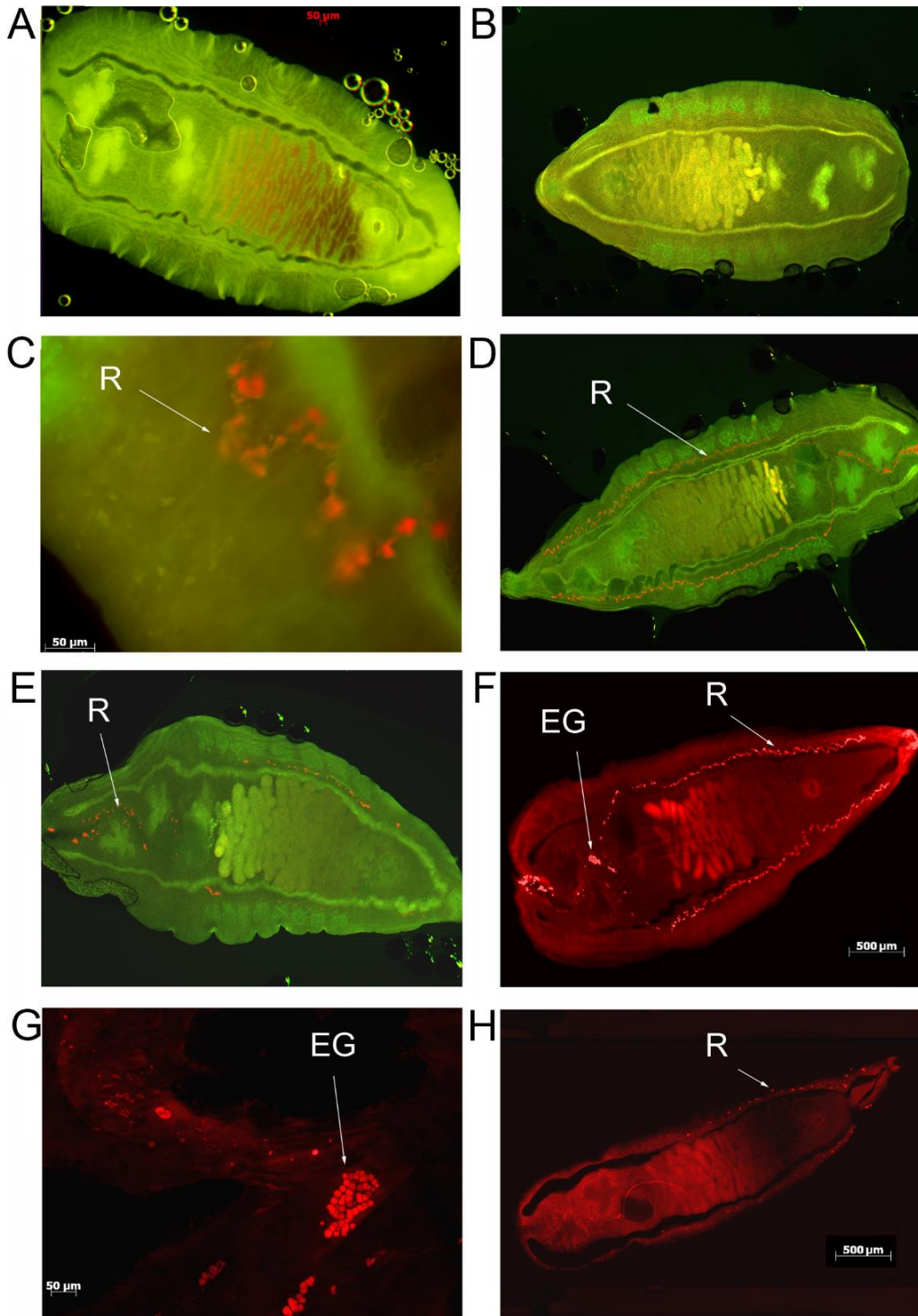


Рисунок 27. Исследование монооксигеназной активности СYP *in situ* в тканях описторхов при добавлении алкоксирезорифинов в среду. **А.** Интактная особь; **В.** Через 20 часов после добавления метоксирезорифина; **С.** Продукт реакции резорифин в тканях; **Д.** Через 20 часов после добавления пентоксирезорифина; **Е.** Через 20 часов после добавления бензоксирезорифина; **Ф.** Через 20 часов после добавления пентоксирезорифина, монохромная картинка под родаминовым фильтром; **Г.** Увеличенный фрагмент (F) гранулы резорифина в экскреторном пузыре; **Н.** Обработка пентоксирезорифином и кетоконазолом. R-резорифин; EG-экскреторные гранулы.

Подавление мРНК СУР у взрослых червей *O. felineus* методом РНК-интерференции (RNAi). Были проведены эксперименты по подавлению экспрессии гена СУР с помощью РНК-интерференции *in vitro*, а именно обработкой червей ген-специфичной dsRNA с помощью электропорации (**Рисунок 28В**). На **Рисунок 28А** представлены результаты по относительному уровню экспрессии гена СУР через 1-8 дней после проведения электропорации. Снижение уровня экспрессии происходило на 62%, 56%, 65%, 79% и 70 %, на 1, 3, 5, 6, 8 дни, соответственно. Уровень экспрессии представлен в процентах от уровня экспрессии гена СУР у контрольных червей, которых также подвергали электропорации и содержали в течение 8 дней в таких же условиях (mock control). Видно, что обработка червей с использованием неспецифического зонда LUC, разработанный на ген люциферазы светлячка *Photinus pyralis*, не приводила к изменению экспрессии целевого гена.

Особь с подавленной экспрессией СУР, демонстрировали изменения фенотипа (**Рисунок 28D, E**). Прежде всего, были изменены форма и размеры выделительной системы червей. В частности, были увеличены размеры экскреторных каналов и экскреторного пузыря. Изменения происходили, начиная с 3-4 дня после проведения нокдауна и сохранялись до 8 дней. В качестве дополнительного контроля для снижения активности белка СУР в среду с контрольными червями добавляли ингибитор активности СУР кетоконазол. Особей гельминтов содержали в течение 8 дней в аналогичных условиях со сменой среды каждый день с добавлением в среду кетоконазола (**Рисунок 28G, H**). Мы обнаружили изменения фенотипа этих червей, у них также были увеличены размеры экскреторных каналов и экскреторного пузыря (**Рисунок 28G, H**). Таким образом, черви после подавления экспрессии СУР и после действия ингибитора его активности демонстрировали одинаковые изменения фенотипа.

Кроме того, особи с подавленной экспрессией СУР демонстрировали изменения уровня выживаемости. Через 8 дней после нокдауна смертность в контрольной группе (mock control) составила 30%, а после подавления СУР – 60% (**Рисунок 29А**).

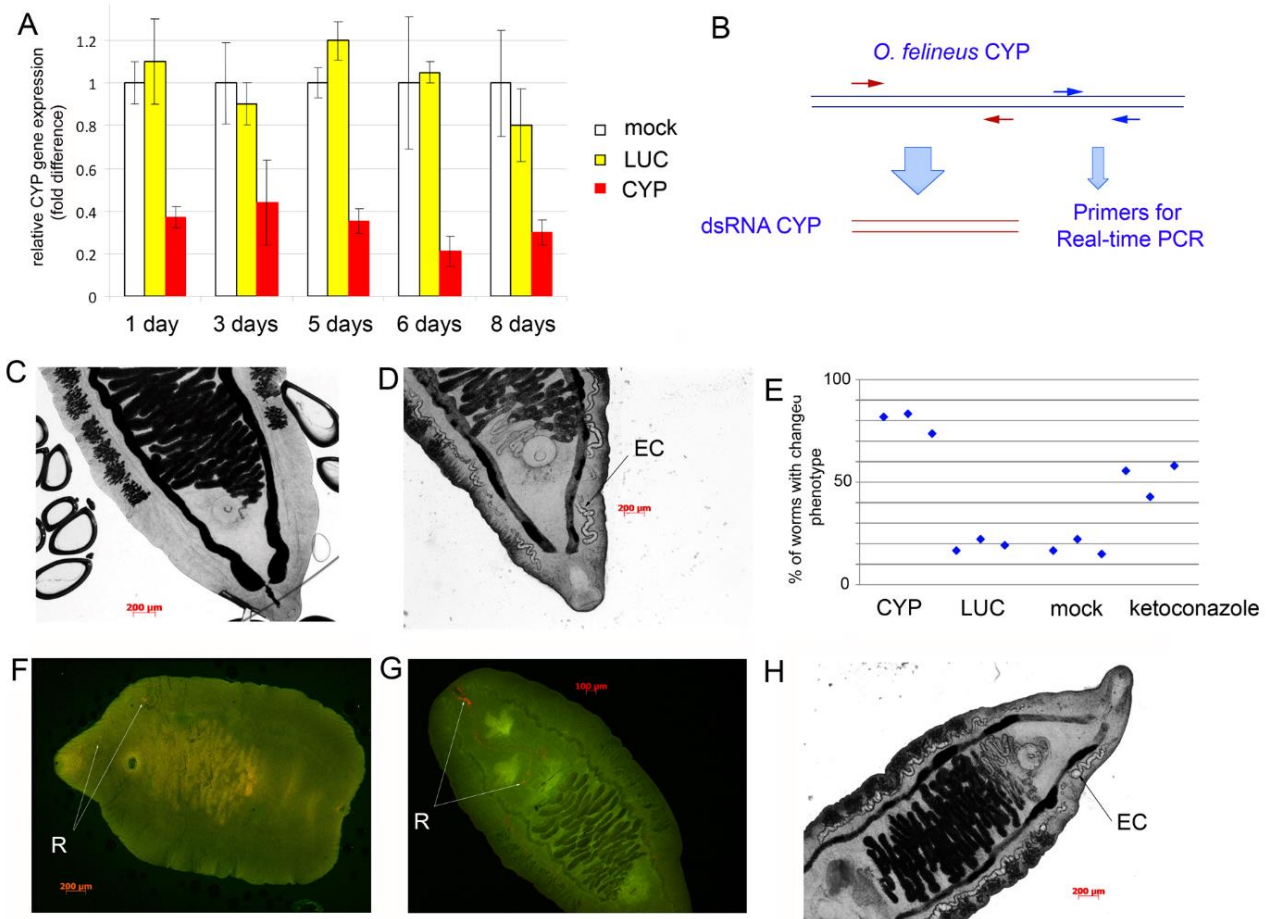


Рисунок 28. Результаты РНК-интерференции гена CYP у взрослых особей *Opisthorchis felinus*. **A.** Уровень транскриптов определяли методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени с красителем EVAgreen. Ген *MrpL16* был выбран как референсный. Данные представлены в виде среднее \pm SD. **B.** Позиции выбранных праймеров для зонда и измерения экспрессии гена CYP. **C.** Контрольная особь *O. felinus*, 8 дней после электропорации. EC: экскреторный канал, EB: экскреторный пузырь. **D.** Описторх через 8 дней после электропорации с зондом на ген CYP. **E.** Процент червей с фенотипическими изменениями (данные трех экспериментов). mock – электропорация без зонда dsRNA; LUC – *LUC* dsRNA (неспецифический контроль); CYP – CYP dsRNA; keto – описторхи, обработанные кетоконазолом в течение 3 дней. **F, G.** Описторхи через пять дней после CYP нокдауна (**F**) или LUC (**G**) были обработаны в течение 20 часов с пентоксирезоруфином (родаминовый и FITC фильтры, AxioImager, Zeiss). Резоруфин (**R**) сформированный в секреторном пузыре обозначен стрелкой. **H.** Описторх *O. felinus* через 3 дня после обработки 40 μ M кетоконазолом.

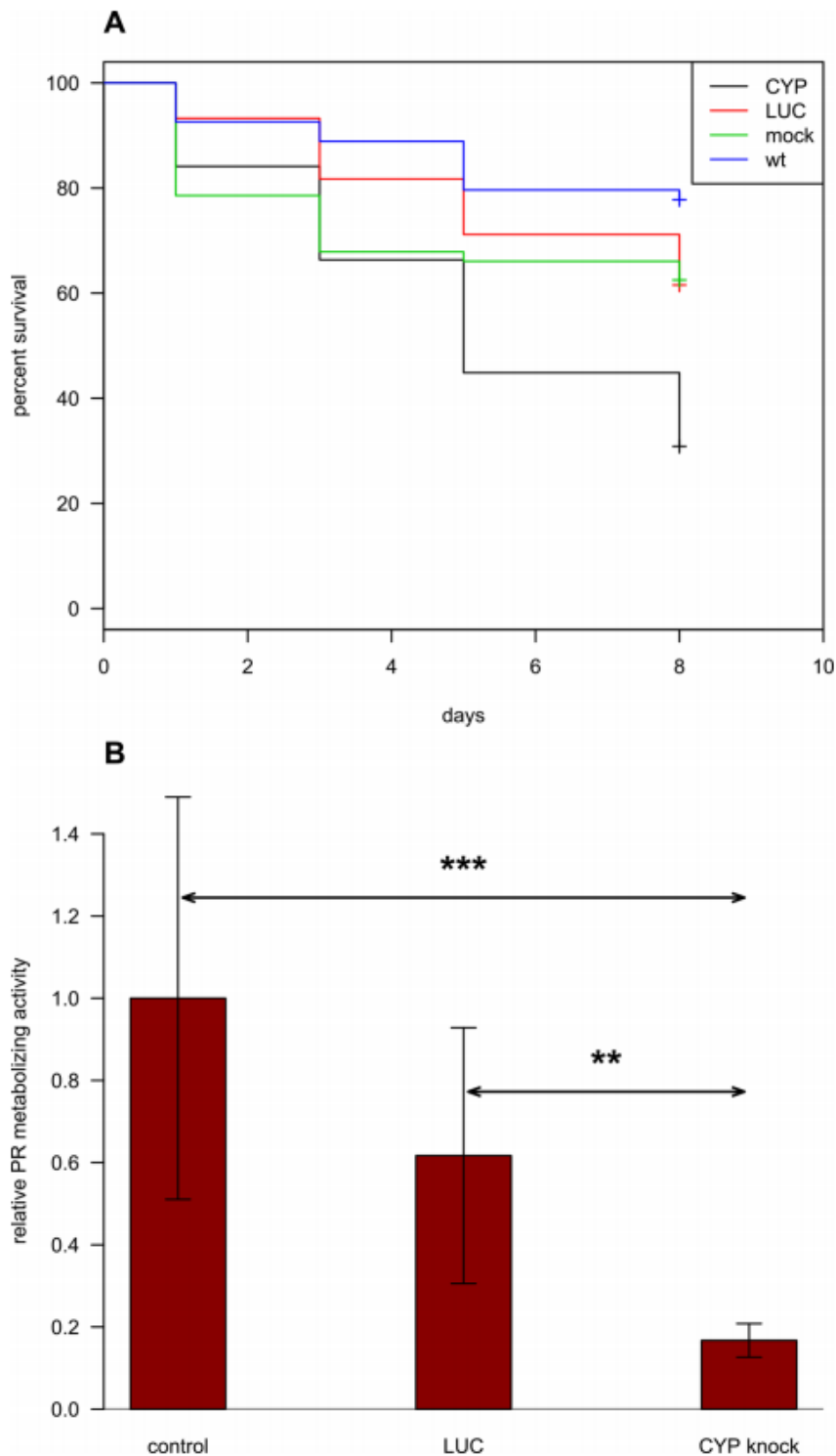


Рисунок 29. Кривые выживаемости Каплана-Мейера и пентоксирезорифин-метаболизирующая активность в тканях червей после РНК-интерференции. А. Кривые выживаемости Каплана-Мейера. Статистические различия оценивались с помощью log-rank (Mantel-Haenszel) теста между каждыми двумя парами образцов. Кривые выживаемости показывали достоверные различия когда сравнивали интактных особей (wt) ($p < 0.0001$) или LUC ($p < 0.001$) или mock ($p = 0.002$) с группой CYP и с другой стороны не было выявлено достоверных различий когда сравнивали LUC и mock группу ($p = 0.7$) ('survival'(v.2.38) R пакет). **В.** Анализ пентоксирезорифин-метаболизирующей активности. Была измерена площадь, занимаемая частицами резорифина в каждой особи. Данные представлены в единицах, нормированных на площадь частиц в контрольных особях (без dsRNA зонда). Данные представлены как среднее \pm S.D. *** $p < 0.005$; ** $p < 0.01$, (F -test).

Для проверки гипотезы о том, что при подавлении СYP может быть снижена способность червей к существованию в среде, близкой к условиям в желчных протоках, был проведен следующий тест. Через 8 дней червей после СYP dsRNA поместили в среду, в которую был добавлен гемоглобин, желчные кислоты и холестерол, и содержали 1 сутки. Однако оказалось, что изменения среды не приводили к изменениям фенотипа червей или их подвижности и жизнеспособности.

Для проверки функциональной активности СYP после 8 дней подавления СYP мРНК червей тестировали *in situ* на способность метаболизировать пентоксирезорурфин и определяли резорурфин в тканях. Оказалось, что способность метаболизировать пентоксирезорурфин с образованием резорурфина сохраняется. На Рисунок **28F** видны гранулы резорурфина в тканях экскреторного пузыря, количественный анализ пентоксирезорурфин-метаболизирующей активности показал, что сохраняется примерно 20% от активности в контрольной группе (**Рисунок 29B**).

Таким образом, мы показали, что в тканях гельминта присутствует монооксигеназная активность, характерная для цитохромов СYP2B, СYP2E СYP3A млекопитающих, что эта активность снижена под действием кетоконазола. Наиболее важным результатом оказалось, что продукт гена СYP важен для поддержания фенотипа взрослых червей, т.к. нарушение его экспрессии приводит к деформациям выделительной системы гельминта. Кроме того, активность гена СYP важна для выживаемости гельминтов. Как результат, цитохром P450 у описторха, по-видимому, перспективная молекулярная мишень при разработке фармацевтических антигельминтных препаратов.

Глава 2.1.4. Экспрессия и очистка рекомбинантных цитохромов P450 *O. felineus* и *C. sinensis* в бактериальной системе. Константы связывания ингибиторов и цитохрома P450

Экспрессию рекомбинантных белков в векторе pCW-lic (Addgene, USA) (**Рисунок 10**) проверяли в следующих штаммах *E. coli* HMS174, DH5 α , BL21(DE3)Star, BL21(DE3)Gold, Rosetta, BL21(DE3)pLysS, NCM533 с помощью классической индукции IPTG или в условиях автоиндукции. Дополнительно в некоторых случаях осуществляли ко-экспрессию белков шаперонов, закодированных в плазидах pGRO7 (GroEL-GroES), pG-KI8 (DnaK-DnaJ-GrpE-GroEL-GroES), pTf16 (tig) (Clontech), любезно предоставленный проф. Larissa Podust, UCSD, USA. Результаты тестирований различных условий экспрессии представлены в **Таблица 2**.

Результаты экспрессии белков анализировали с помощью электрофореза по Лэммли, а также с помощью метода Вестерн-блот с антителами против полигистидинового хвоста (anti His-tag), который содержали рекомбинантные белки. В качестве позитивного контроля для экспрессии рекомбинантных белков использовали вектор pCW с конструкцией CYP450 *Negleria fouleri*, любезно предоставленный проф. Larissa Podust, UCSD, USA. К сожалению, с помощью электрофореза по Лэммли и окраски Кумасси нельзя было определить экспрессию белка, т.к. на фореze после индукции не присутствовало мажорных фракций, соответствующих белку размером 50 кДа. В отличие от этого CYP450 *Negleria fouleri* экспрессировался очень хорошо. Экспрессию белков CYP450 *O. felineus* и *C. sinensis* удалось определить с помощью Вестерн-блот анализа, что свидетельствует об их низком уровне экспрессии в бактериальных системах. Для экспрессии CYP450 *O. felineus*, лучше всего подходили условия автоиндукции в штамме DH5 α без шаперонов, для CYP *C. sinensis* подходил как HMS174, так и DH5 α , при этом ни шапероны, ни аутоиндукция, ни изменение температуры инкубации существенно не сказывалось на количестве растворимого белка, полученного из лизата бактерий.

Кроме того, Вестерн-блот анализ показал, что белки СУР450 *O. felineus*, *C. sinensis* движутся в геле быстрее, чем другие белки размером 50 кДа (маркер, положительный контроль СУР450 *Negleria fowleri*) (**Рисунок 30**).

Следующим этапом была проверка полученных рекомбинантных белков на правильное свертывание и сохранение в активном состоянии. Цитохромы Р450 обладают определенными спектрофотометрическими характеристиками, в частности, способностью в восстановленном состоянии атома железа гема и в комплексе с монооксидом углерода формировать пик, примерно на 450 нм (Montellano 2005). Благодаря этой способности они и получили свое название. Нужно отметить, что часто рекомбинантные цитохромы Р450 не удается получить в активном состоянии и можно увидеть только пик на 420 нм. Это состояние атома железа гема свидетельствует о его неправильном позиционировании в активном центре цитохрома Р450, и как правило, перевести его обратно в активное состояние Р450 не удается (Sabat et al., 2009; Sun et al., 2010). Есть много примеров, когда рекомбинантные цитохромы Р450 не образуют пик на Р450 в восстановленном состоянии в комплексе с монооксидом углерода (Driscoll et al., 2011; Dunford et al., 2007; Sun et al., 2010; Sabat et al., 2009).

Наша задача была получить активный рекомбинантный Р450, для этого при культивировании бактерий и индукции белка добавляли в среду предшественник гема – аминолевуленовую кислоту, а также в среде культивирования и во всех буферах, использовавшихся для выделения белка, поддерживали постоянный рН 7.5-7.6 с помощью К-фосфатного буфера. Все полученные растворимые фракции лизатов проверяли на содержание активного состояния Р450, добавляя в среду газообразный монооксид углерода и кристаллы дитионита натрия. В результате нам удалось обнаружить, что при некоторых условиях экспрессии действительно формируется пик на 440-445 нм, что соответствовало положению активного СУР (**Рисунок 31**). Таким образом, из всех проверенных условий экспрессии рекомбинантных белков наиболее хорошие условия были при экспрессии *O. felineus* СУР в DH5 α в условиях автоиндукции, *C. sinensis* СУР в DH5 α вне зависимости от ко-экспрессии шаперонов в течение 48 часов при 25⁰С. Необходимо отметить, что нам впервые удалось получить активный рекомбинантный СУР плоских червей. До нас были попытки экспрессировать активный СУР *S. mansoni*, но они не увенчались успехом (Larissa Podust, личные сообщения). Мы также в самом начале наших исследований пытались выделить микросомальную

фракцию описторха с активным белком, однако белок выделялся в неактивном состоянии Р420 вне зависимости от рН растворов при выделении (глава 2.1.1, Рисунок 22).

Таблица 2. Выбор штамма и условий для экспрессии в *E.coli* рекомбинантных белков СYP450 *O. felineus*, *C. sinensis*.

штаммы <i>E. coli</i>	<i>O. felineus</i> СYP	<i>C. sinensis</i> СYP
HMS 174	±	+
автоиндукция	±	+
+groES/groEL	±	+
+tig	±	
DH5α	±	+
аутоиндукция	+	+
+groES/groEL	±	+
BL21 (DE3) Star	-	-
+groES/groEL	-	±
+dnaK/dnaJ/grpE/groES/groEL	-	±
+tig	-	-
BL21 (DE3) Gold	-	
Rosetta	±	
автоиндукция	-	
BL21 (DE3) pLysS	-	
NCM 533	-	

+ наблюдали хорошую индукцию белка; - не было индукции белка; ± индукция очень слабая, активности белка не наблюдали. В некоторых случаях дополнительно проводили коэкспрессию белка с шаперонами groES, groEL, dnaK, dnaJ, grpE, groES, groEL, tig.

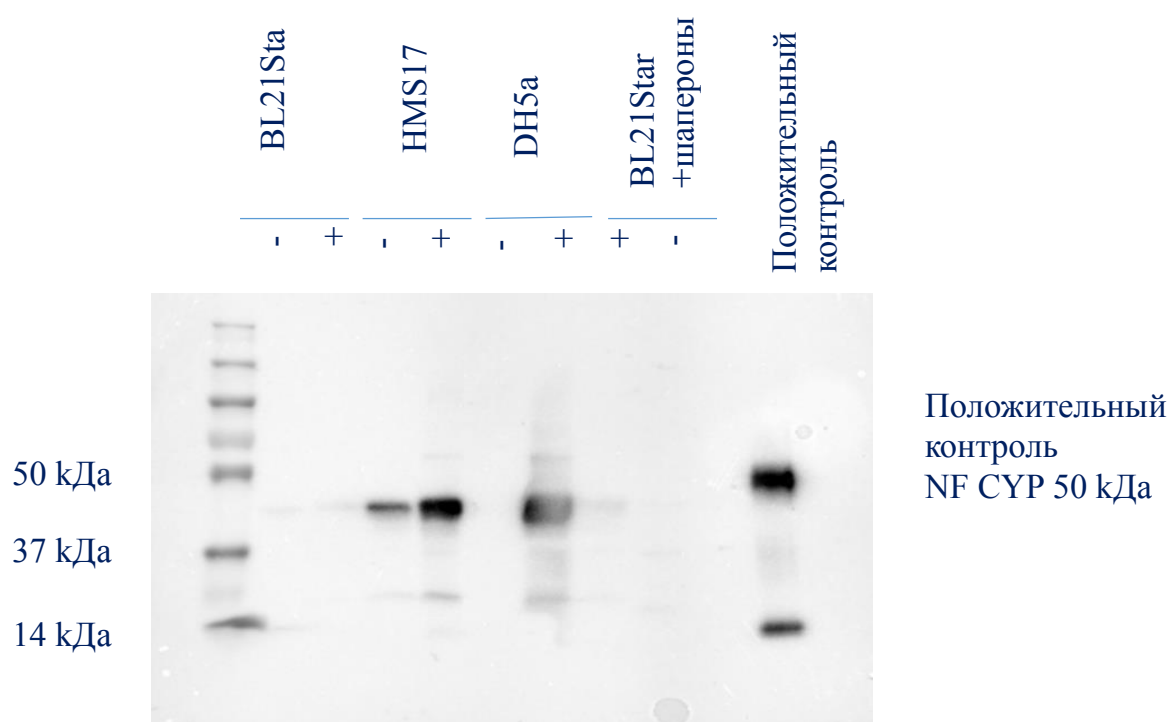


Рисунок 30. Результаты Вестерн-блот анализа с антителами против His-остатков с лизатами различных штаммов *E.coli*, используемых для экспрессии цитохрома P450 *C. sinensis* и *O. felineus*. В качестве положительного контроля использовали цитохром P450 из *Negleria fowleri*. – без индукции, + -индукция ИПТГ.

Следующим этапом было выделение рекомбинантного белка из бактериального лизата. Для этого наращивали бактериальную культуру в 6 литрах культуральной среды, получали растворимую фракцию лизата, и наносили ее на колонку с афинной Ni смолой к полигистидиновому хвосту рекомбинантного белка. Смывали в градиенте имидазола. Белок выходил примерно в концентрации 200 мМ имидазола. Поскольку была задача получить более чистый белок, элюат очищали дополнительно, наносили на смолу с гидроксиапатитной смолой и смывали затем в градиенте калий-фосфатного буфера. Полученные фракции анализировали на электрофорезе по Лэммли и определяли наличие активного белка P450 спектрофотометрическим методом. Полученный белок Cs CYP концентрировали в центрифужных белковых концентраторах Amicon 50кДа до концентрации 1.3 мкМ. При электрофорезе в геле белок был представлен мажорной полосой и двигался на уровне 45 кДа (**Рисунок 32**).

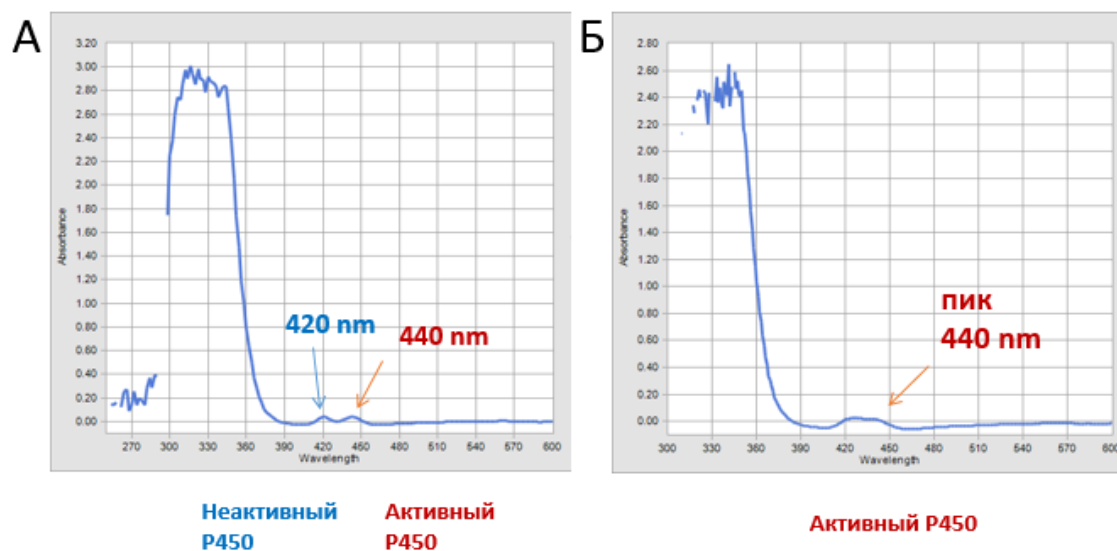


Рисунок 31. Дифференциальные спектры поглощения в области спектра 300-600 нм, полученные в растворимых бактериальных лизатах после индукции экспрессии цитохромов P450 *C.sinensis* (А) и *O. felinus* (Б) после добавления газообразного монооксида углерода и дитионата натрия. Пик на длине волны 440 нм демонстрирует образование активного цитохрома P450.

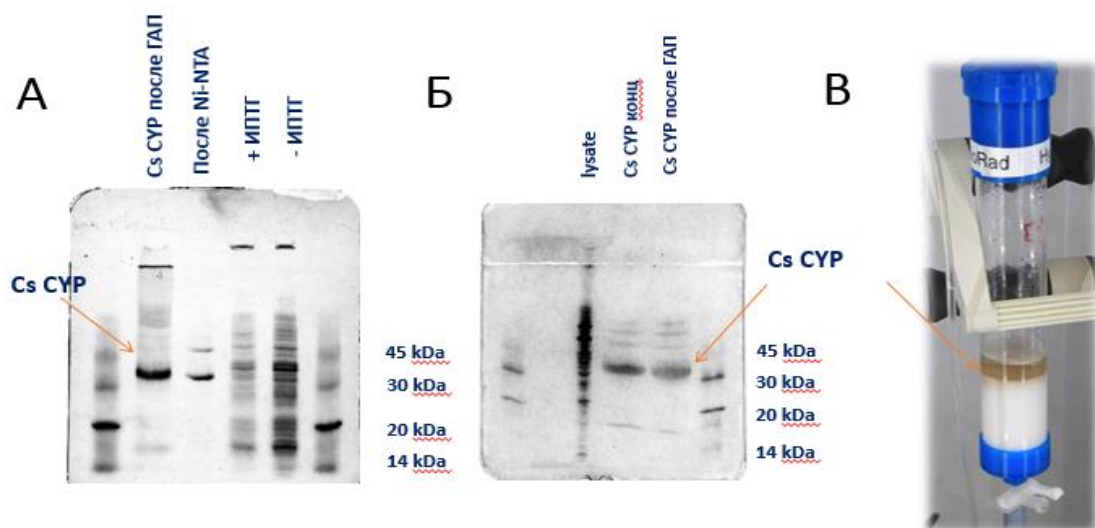


Рисунок 32. Выделение и очистка Cs CYP. А. Гель-электрофорез белков поле окраски с помощью Кумасси. Стрелкой указан очищенный белок Cs CYP. Б. Гель-электрофорез белков после окрашивания с серебром. Стрелкой указан очищенный белок Cs CYP. В. Изображение хроматографической колонки с гидроксипатитной смолой. Стрелкой указан белок цитохром P450 как красно-оранжевая полоса на смоле.

Интересной особенностью была окраска полученного белка СУР: в активном состоянии он был красно-оранжевого цвета (**Рисунок 32В**). Стрелкой указан белок цитохром P450, образующий красно-оранжевую полосу на смоле. В неактивном состоянии P420 он приобретал темно-зеленый цвет, в состоянии связанного с лигандом – желто-оранжевый. По-видимому, окраска обусловлена присутствием атома железа гема.

Константы связывания ингибиторов и цитохрома P450. Поскольку белок Cs СУР был получен в концентрированном активном состоянии, нашей следующей задачей было определение спектра возможных лигандов и ингибиторов. Для этого белок титровали 1-100 мкМ низкомолекулярными соединениями, в частности, азольными соединениями (кетоконазол, миконазол, клотримазол, эконазол, триадименол, 4фенилимидазол), а также эстриолом, пальмитиновой кислотой, холестерол сульфатом, ланостеролом, и др. Необходимо отметить, что все ферменты P450 в активном состоянии при титровании лигандами, могут изменять свои спектральные характеристики. В частности, известно два типа дифференциальных спектров, которые могут формироваться: это тип 1 – характерен для связывания субстратов СУР с появлением пика на 390 нм и снижением пика на 420 нм; и тип 2 – характерен для связывания ингибиторов СУР с появлением пика на 420 нм и снижением пика на 390 нм (**Рисунок 33В**). Из всех возможных соединений мы обнаружили формирование только одного типа дифференциальных спектров – тип 2, т.е. характерный для ингибиторов. Такой спектр формировался (**Рисунок 33Б**) при титровании следующих соединений: кетоконазол, миконазол, клотримазол, эконазол, триадименол, 4фенилимидазол, LP10 (α -((4-methylcyclohexyl)carbonyl amino)-N-4-pyridinyl-1H-indole-3-propanamide), СУР I-181, 44841(6-(2-бромофеноксигексил)имидазол). Последние три вещества – это были ингибиторы специально разработанные для СУР *Trypanosoma cruzi* на основе его кристаллической структуры (Vieira et al., 2014; Gunatilleke et al., 2012). Структуры соединений приведены на **Рисунок 34**.

Полученные данные на основе дифференциальных спектров можно было перенести в программу GraphPad, построить графики насыщения и высчитать константы связывания ингибиторов и цитохрома P450 *C. sinensis* (**Таблица 3, Приложение 3**).

Среди протестированных азольных соединений наиболее эффективным был клотримазол, константа связывания составляла 11.56 ± 3.42 мкМ, наиболее эффективным из всех ингибиторов был препарат, имеющий название 44841 (6-(2-

bromophenoxy)hexyl)imidazole) (Gunatilleke et al., 2012), константа связывания с ним составляла $1.33 \pm 0.23 \mu\text{M}$.

Кетоконазол также демонстрировал ингибирующие свойства, его константа связывания составляла $101.2 \pm 11.28 \mu\text{M}$.

Таким образом, нами получены данные о том, что цитохромы P450 являются функциональными ферментами, их структура и активность аналогична другим цитохромам P450 в животном мире. Кроме того, важным результатом было получение активных рекомбинантных белков цитохромов P450 *O. felineus*, *C. sinensis*. На P450 *C. sinensis* продемонстрировано, что ряд веществ, являющихся ингибиторами, в частности, азольные ингибиторы (клотримазол, кетоконазол, миконазол) и ингибиторы неазольной структуры (LP10, СYP I-181). Получены спектры связывания и константы связывания ингибиторов с P450. На основании полученных данных, и, учитывая то, что СYP *Opisthorchiidae* обладают 92-96% гомологией белка (**раздел 2.1.1, Рисунок 21А**), можно тестировать перечисленные вещества (**Таблица 3**) как ингибиторы СYP у представителей *Opisthorchiidae* и определять эффекты, которые эти соединения могут проявлять на организменном уровне. Кроме того, наши данные на рекомбинантных белках подтвердили полученные результаты по ингибированию кетоконазолом монооксигеназной активности СYP в тканях гельминтов (**раздел 2.1.2**).

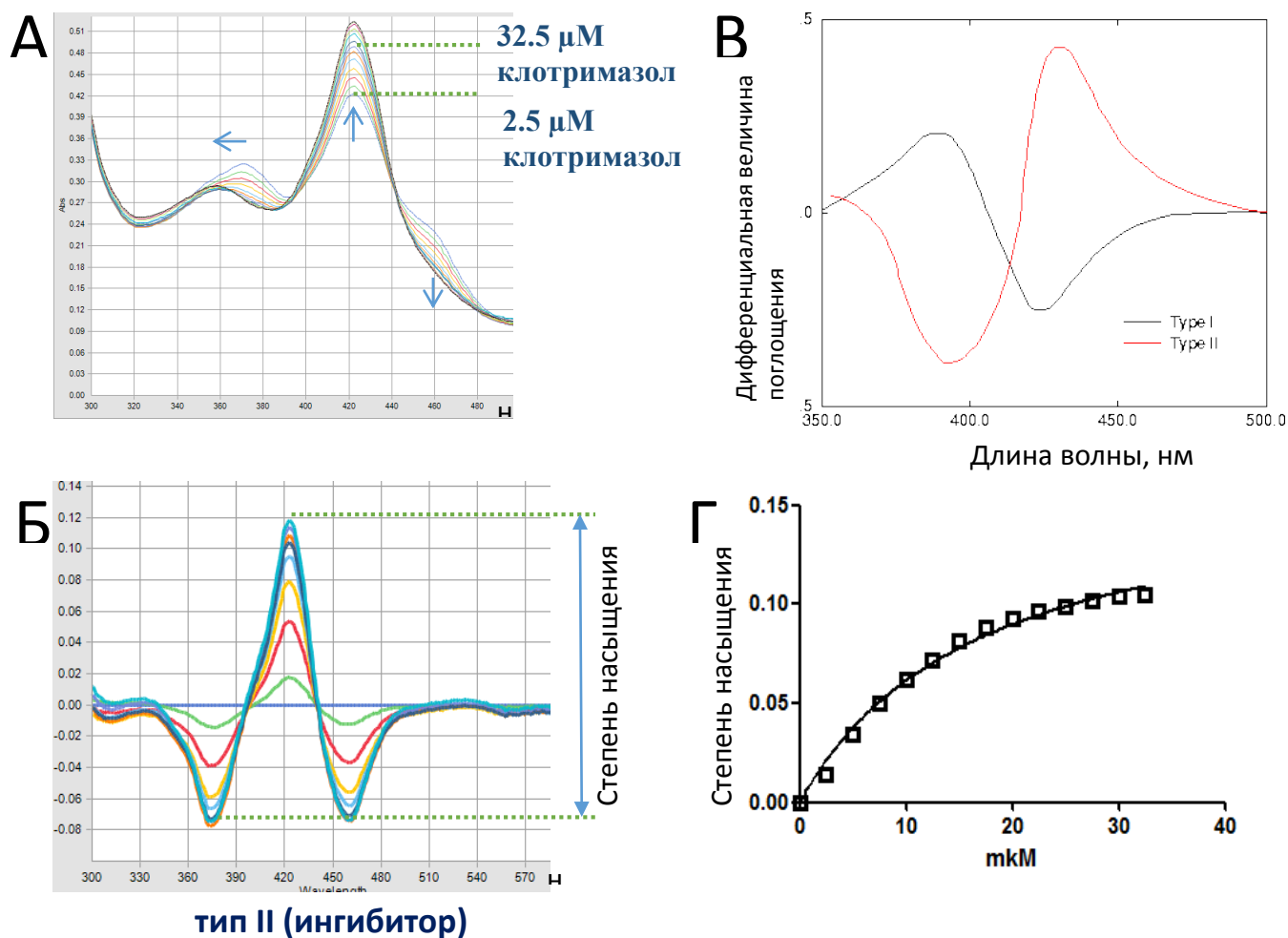


Рисунок 33. Связывание цитохрома P450 с лигандом. Примеры спектров, полученных в результате титрования цитохрома клотимазолом. А. Спектральные изменения Cs P450 при титровании клотримазолом от 2,5 μ M до 32,5 μ M; Б. Дифференциальный спектр Cs P450 при титровании клотримазолом от 2,5 μ M до 32,5 μ M; В. Примеры дифференциальных спектров для P450 при связывании лигандов типа 1 (субстрат) и типа 2 (ингибитор) лигандов; Г. График, демонстрирующий связывание клотримазола с Cs P450.

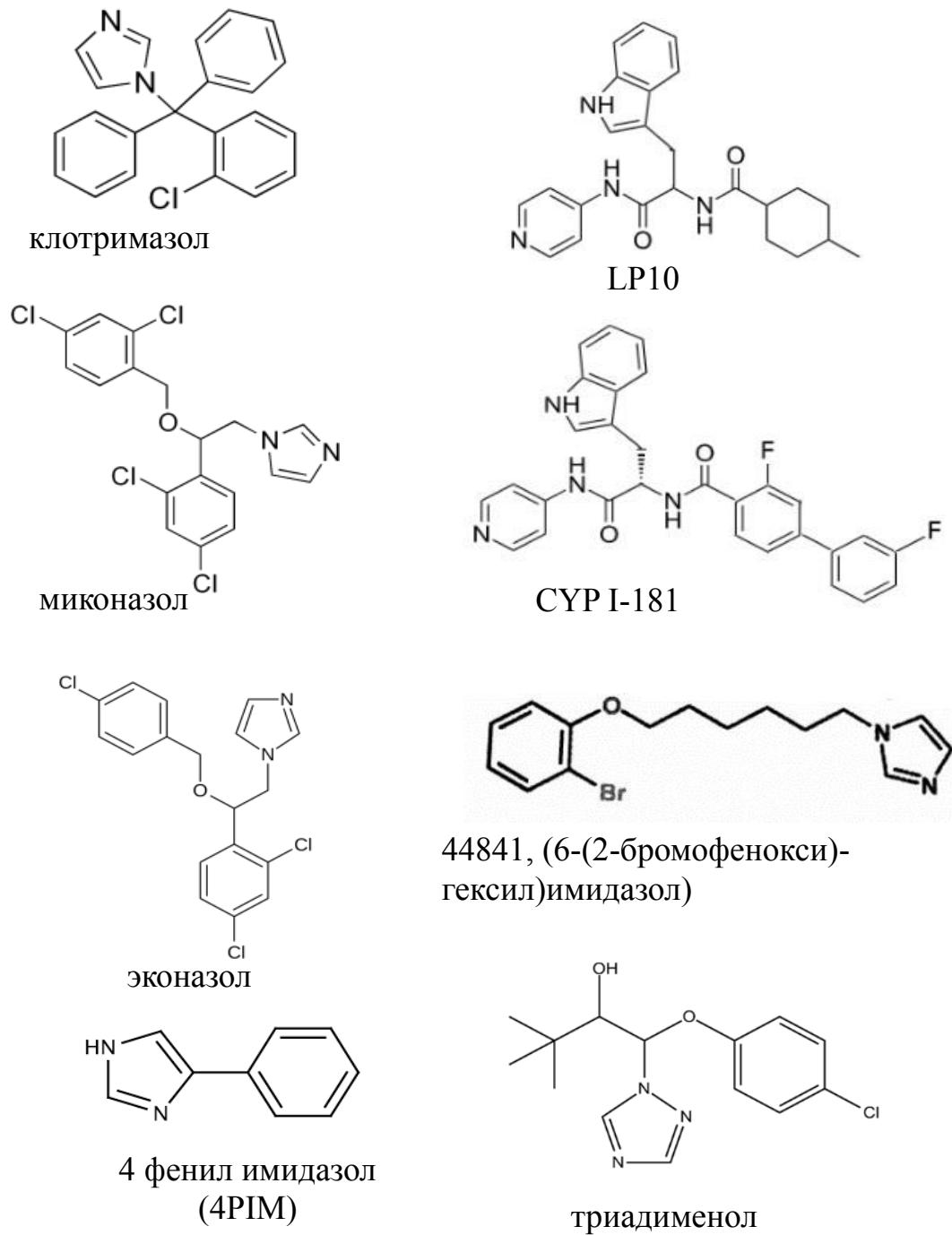


Рисунок 34. Структуры наиболее эффективных ингибиторов P450.

Таблица 3. Величины констант связывания ингибиторов и цитохрома P450 *C. sinensis*.

ингибитор	K, μM	R²
клотримазол	11.56 \pm 3.42	0.9709
миконазол	30.18 \pm 6.53	0.9860
триадеминол	101.2 \pm 11.28	0.9969
эконазол	24.01 \pm 2.31	0.9956
LP10	19.45 \pm 0.78	0.9989
СУР I-181	16.9 \pm 1.83	0.9916
44841	1.33 \pm 0.23	0.9953
кетоконазол	101.2 \pm 11.28	0.9893

Данные, полученные на основе дифференциальных спектров экспортировались в программу GraphPad 6.0, на основании этих данных были построены графики насыщения и высчитаны константы связывания ингибиторов и цитохрома P450 *C. sinensis* (Приложение 3).

2.2. Ферменты метаболизма фазы 2 конъюгации в геноме *O. felineus*

Для того, чтобы выявить нуклеотидные последовательности, соответствующие белкам фазы 2 конъюгации REACT_6959.4, был применен следующий подход. На первом этапе были проанализированы доступные данные геномов и транскриптомов плоских червей Opisthorchiidae (*C. sinensis* proteins PRJDA72781), *S. mansoni* proteins PRJEA36577, а также у круглых червей: паразитического вида *Ascaris suum* (ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/wormbase/releases/WS236/species/a_suum/a_suum.WS236.protein.fa.gz) и свободноживущего вида *Caenorhabditis elegans* (ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/wormbase/releases/WS236/species/c_elegans/c_elegans.WS236.protein.fa.gz). Данные были проанализированы с помощью алгоритма поиска консервативных доменов rpsblast CDD, были выбраны гомологи генов человека, относящиеся к REACT_6959.4 (REACTOME pathway <http://www.reactome.org/>). Кроме того, проводили также поиск генов, участвующих в катаболизме этих белков и синтезе кофакторов этих ферментов.

GST – глутатион S трансфераза, *gluthathione S-transferase*

SULT – сульфотрансфераза, *sulfotransferase*

UGT – УДФ-глюкуронозил трансфераза, *UDF-glucuronosyl transferase*

GLYAT – N-ацетил трансфераза

MT – метилтрансфераза, *methyl transferase*

Мы посчитали важным провести сравнительное исследование по составу ферментов фазы 2 конъюгации у различных представителей паразитических червей, а также свободноживущих червей. Для этого были выявлены последовательности, соответствующие белкам фазы 2 конъюгации человека REACT_6959.4, в доступных данных геномов и транскриптомов плоских червей Opisthorchiidae *S. mansoni*, а также у круглых червей: паразитического вида *A. suum* и свободноживущего *C. elegans*. Проводили поиск генов ферментов GST – глутатион S трансфераз, SULT – сульфотрансфераз, UGT – УДФ-глюкуронозил трансфераз, GLYAT – N-ацетил трансфераз, MT – метилтрансфераз. Кроме того, проводили также поиск генов, участвующих в катаболизме этих белков и синтезе кофакторов ферментов.

Нами был обнаружен очень интересный факт при сравнении состава фазы конъюгации: ферменты УДФ-глюкуронозил трансфераз, являющиеся основными ферментами фазы 2, как у паразитических, так и у свободноживущих круглых червей, полностью отсутствовали у плоских червей. Таким образом, метаболизм антипаразитарных препаратов у двух классов червей принципиально различен, что необходимо учитывать при исследовании механизмов формирования устойчивости к терапии (**Рисунок 35**).

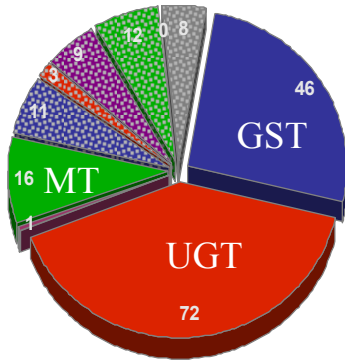
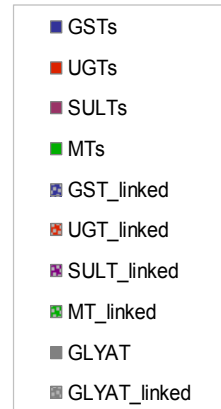
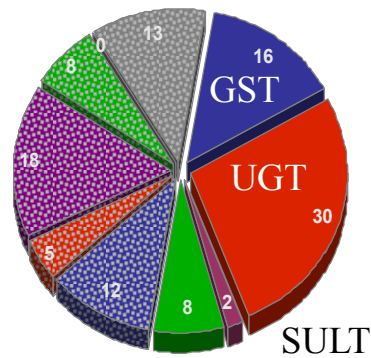
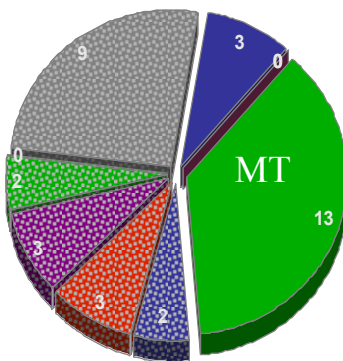
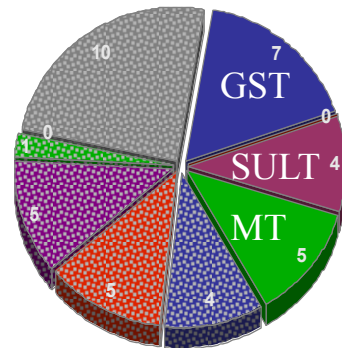
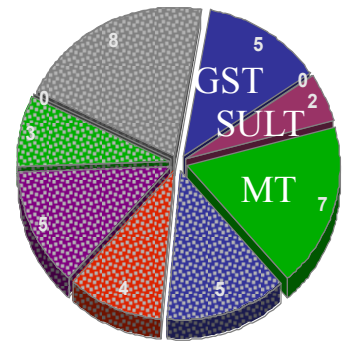
Caenorhabditis elegans*Ascaris suum**Schistosoma mansoni**Clonorchis sinensis**Opisthorchis felineus*

Рисунок 35. Спектр аннотированных генов нематод и трематод, содержащих консервативные домены белков “фазы II конъюгации” (REACT_6959.4). GST – глутатион S трансфераза, SULT – сульфотрансфераза, UGT – УДФ-глюкуронозил трансфераза, GLYAT – N-ацетил трансфераза, MT – метилтрансфераза.

2.3. Клеточная выделительная система. ABC транспортеры в геноме *O. felineus*.

2.3.1. Р-гликопротеины в геноме *O. felineus*. Экспрессия Р-гликопротеинов на разных стадиях развития *O. felineus*

Актуальность исследования клеточной выделительной системы паразитов определяется ее важной ролью в адаптации к действию защитных систем хозяина, а именно, участию в экскреции препаратов и, возможно, ряда белков и метаболитов, патогенных для хозяина. Основным компонентом выделительной системы клетки являются белки ABC (ATP-binding cassette), представленные несколькими подсемействами, в числе которых наиболее важны среди них белки семейства MDR (multi drug resistance; Р-гликопротеины; Pgp), MRP белки (multidrug resistance associated protein, белки, ассоциированные с множественной лекарственной устойчивостью), и OATP2 белки (organic anion transporting polypeptide 2) (Xu et al., 2005). Все ABC-транспортеры осуществляют АТФ-зависимый транспорт токсических соединений и лекарственных препаратов из клетки во внеклеточное пространство через мембрану. Белки данного семейства имеют несколько трансмембранных доменов и обладают широкой субстратной специфичностью.

Особую роль в экскреции из клетки занимают белки семейства MDR (Р-гликопротеины). Повышенная экспрессия этих белков приводит к формированию фенотипа множественной лекарственной устойчивости у бактерий или у раковых клеток млекопитающих (James et al., 2009; Xu et al., 2005).

Нашей целью было выявление генов, кодирующих белки ABC- транспортеры (ATP-binding cassette), в составе генов, кодирующих ABC белков найти последовательности, содержащие функциональные домены MDR белков (гомологов Р-гликопротеина человека, ABCB1 подсемейство), исследовать интроно-экзонную организацию этих генов. Кроме того, нужно было собрать полные кодирующие последовательности Р-гликопротеинов, подтвердить их последовательность ресеквенированием. Важно было также оценить консервативные домены внутри

предсказанных белков и создать модель их трехмерной структуры. Кроме того, нашей задачей было также исследовать экспрессию мРНК Р-гликопротеинов на разных стадиях развития описторха.

Для того, чтобы выявить нуклеотидные последовательности, соответствующие АТФ-связывающим белкам (ABC-транспортерам), был применен следующий подход. На первом этапе были проанализированы доступные данные геномов и транскриптомов филогенетически близких видов плоских червей. Из базы данных SchistoDB (<http://schistodb.net/schistodb20/>) была извлечена аннотированная кодирующая последовательность двух известных белков SmDR1 и SmDR2 *Schistosoma mansoni* – паразитического червя сем. Schistosomatidae. Последовательности генов MDR *C. sinensis* были получены из базы данных GenBank. Используя последовательности MDR представителей Trematoda, был проведен скрининг исходных данных (чтений) массового секвенирования транскриптома *O. felineus*. На основе чтений, демонстрирующих высокий уровень гомологии с ABCB1, с помощью ассемблера CAP3 были собраны контиги *O. felineus*. Для данных контигов была определена наибольшая рамка считывания (ORF Finder) и подтверждена принадлежность соответствующей аминокислотной последовательности к семейству ABC и MDR с помощью анализа консервативных функциональных доменов NCBI CDD.

В целом, в нуклеотидных последовательностях *O. felineus* был выявлен 21 ген транспортеров семейства ABC, принадлежащих к разным подсемействам. В частности, в геноме присутствовало 4 гена А-подсемейства, 7 – В подсемейства, 4 – ABCC (multidrug resistance associated protein, белки, ассоциированные с множественной лекарственной устойчивостью), 1 - ABCD, 2 - ABCF, 3 - ABCG. Для сравнения в геноме *S. mansoni* выявлено 20 генов, кодирующих ABC-транспортеры.

Кроме того, был проведен скрининг всего массива чтений транскриптома *O. felineus* на предмет наличия функционального доменов ABC и MDR, который показал наличие четырех представителей подсемейства белков MDR (ABCB1) у этого паразитического вида. Гомологи этих белков у млекопитающих отвечают за активный выброс широкого спектра неметаболизированных препаратов, а также мелких пептидов, секрецию и т.д.

У описторха функция этих белков неизвестна. Наличие всех необходимых функциональных доменов (трансмембранные и АТФ-связывающие домены) свидетельствует о консервативности функций этих белков (**Рисунок 36**). Наиболее интересным оказалось, что в отличие от млекопитающих этот вид паразитов обладает 4 генами MDR (гомологи Р-гликопротеина). В последовательностях всех ABCB1 (MDR) были выявлены открытые рамки считывания, реконструирована полная кодирующая последовательность (**Рисунок 37**). Все четыре гена имеют гомологи у других видов *Opisthorchiidae* *C. sinensis* и *O. viverrini*. Степень гомологии составляет 94-97% между видами. Наличие однотипных транспортёров может быть связано как с защитной функцией, так и с физиологической важностью белков транспортеров для паразита (Greenberg, 2013).

Трёхмерная модель Р-гликопротеина 2 (P2) *O. felineus* была получена с помощью многоматричного моделирования в программе Phyre2 <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/> (Kelley, Sternberg, 2009). Полученная модель показала 100% уровень значимости. В результате построения этой модели было подтверждено консервативное строение белков Р-гликопротеинов (**Рисунок 38**).

Интрон-экзонная структура Р-гликопротеинов *O. felineus* была получена путем сопоставления полученного нами контига мРНК с соответствующими геномными контигами *O. felineus*. В Таблица представлены данные по собранным и ресеквенированным кодирующим районам Р-гликопротеинов. Размеры белков были все примерно одинаковы – в районе 1200 а.к, состояли из 19-20 экзонов (**Рисунок 37, Таблица 4**)

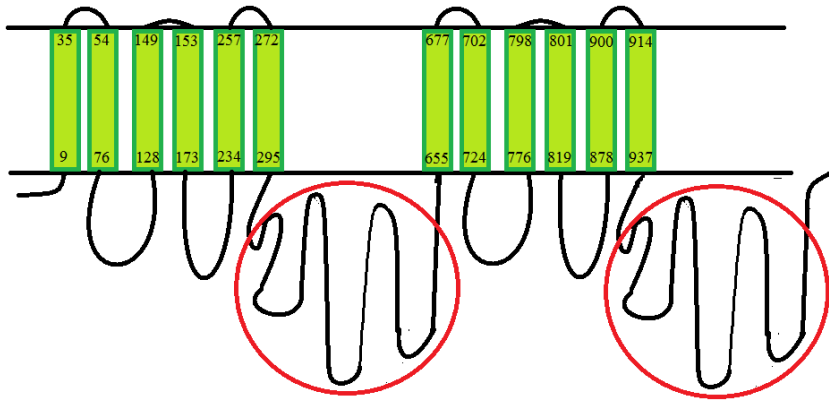


Рисунок 36. Схематичная структура консервативных доменов на примере белка P2 *O. felinus*. Видны два участка белка, каждый состоит из 6 трансмембранных доменов, выделенных зеленым цветом; и двух цитоплазматических АТФ-связывающих доменов.

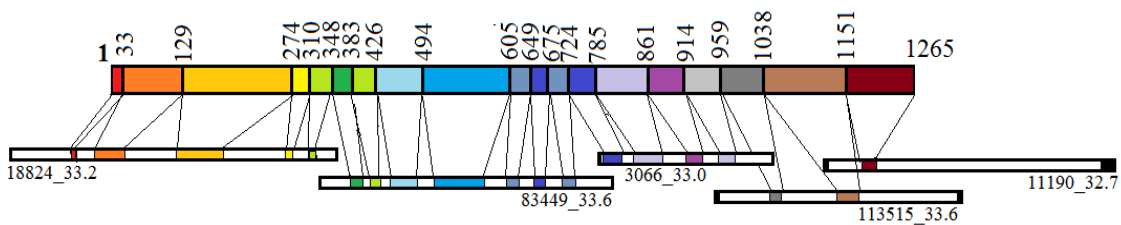


Рисунок 37. Экзон-интронная структура гена P2. Ген состоит из 19 экзонов.

Таблица 4. Гены белков ABCB1 *O. felineus* гомологичные Р-гликопротеинам человека (MDR1).

	Кол-во экзонов	Размер кодирующей области, п.н.	Размер белка, а.к.	Номер последовательности в базе GenBank
P1	20	3582	1193	GBJA01010175.1
P2	19	3816	1271	GBJA01001263.1
P3	19	3627	1208	GBJA01012280.1
P4	19	3795	1264	KJ830771.1

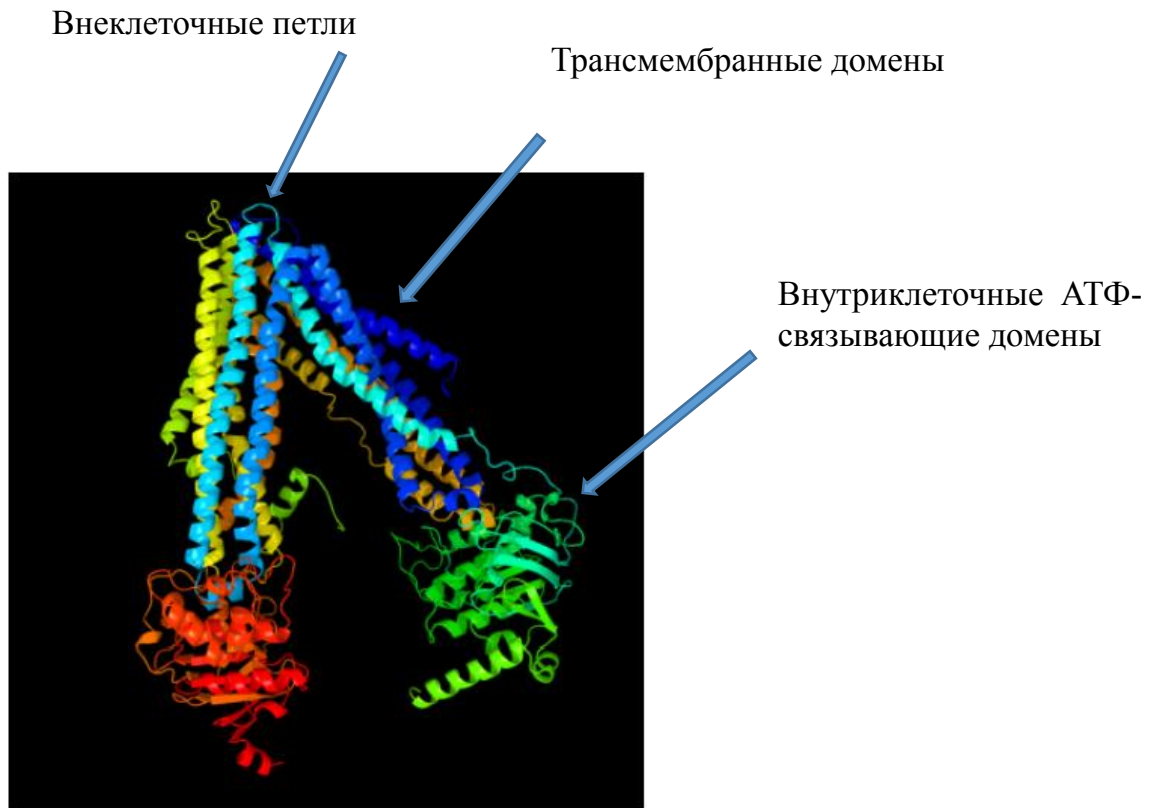


Рисунок 38. 3D модель Pgp2, (многоматричное моделирование Phyre2 при 100% уровне соответствия).

Экспрессия Р-гликопротеинов на разных стадиях развития *O. felineus*.

Исследование экспрессии мРНК генов Р-гликопротеинов проводили с помощью метода Цифровой капельной ПЦР на разных стадиях жизненного цикла (метацеркарий, эксцистированный метацеркарий, взрослая особь). В результате было показано, что два из четырех генов обладают ярко выраженной дифференциальной экспрессией на стадии жизненного цикла. Экспрессия гена Р1 увеличивалась в 20 раз по сравнению с метацеркариями и эксцистированными метацеркариями. Наиболее высокий уровень экспрессии среди всех генов Р-гликопротеинов наблюдали у мРНК гена Р4 на взрослой стадии развития, уровень экспрессии был выше чем в метацеркарии более чем в 30 раз (**Рисунок 39**). Экспрессия генов Р2 и Р3 на трех жизненных стадиях сохранялась на одном и том же уровне. Таким образом, основываясь на полученных данных, можно сделать вывод, что гены Р1 и Р4, по-видимому, наиболее значимы для взрослой стадии развития описторха, чем гены Р2 и Р3.

В настоящее время исследована связь между устойчивостью к лекарствам у паразитических червей и экспрессией отдельных Р-гликопротеинов (MDR-белков) у нематод, в частности *Cooperia oncophora*, *Brugia malayi*, *C. elegans* (Lifschitz et al., 2012). MDR белки отвечают за активный выброс неметаболизированных препаратов наружу через клеточную мембрану, снижают количество препарата внутри клетки, уменьшая его эффективность связывания с белками-мишенями. Показано, что избирательное снижение экспрессии MDR генов *C. elegans* с помощью инструмента РНК-интерференции приводило к существенному усилению чувствительности червей к ряду препаратов, в частности, ивермектину, альбендазолу и т.д. (Janssen et al., 2013; Yan et al., 2013).

Для плоских червей данных по сравнению с нематодами немного. У *S. mansoni* выявлено также около 20 генов, кодирующих белки ABC-транспортеры, однако в качестве гомологов Р-гликопротеина (MDR, белки множественной лекарственной устойчивости) было исследовано только два представителя SMDR2 и SMDR1 (Greenberg, 2013; Kasinathan et al., 2011). После проверки на наличие функциональных доменов, оказалось, что только один из них, SMDR2, является гомологом Р-гликопротеина и его экспрессия увеличивается в ответ на препараты (Kasinathan et al., 2011).

Таким образом, мы получили результаты по структуре генетического аппарата клеточной системы выделения и секреции *O. felinus* – белках семейства АТФ-связывающих транспортеров, в частности получили сведения о представленности АВС-генов в геноме, количестве генов Р-гликопротеинов в геноме, о структуре генов Р-гликопротеинов. Кроме того, в данном разделе сделан о значимости генов P1 и P4 для взрослой стадии развития паразита – марите.

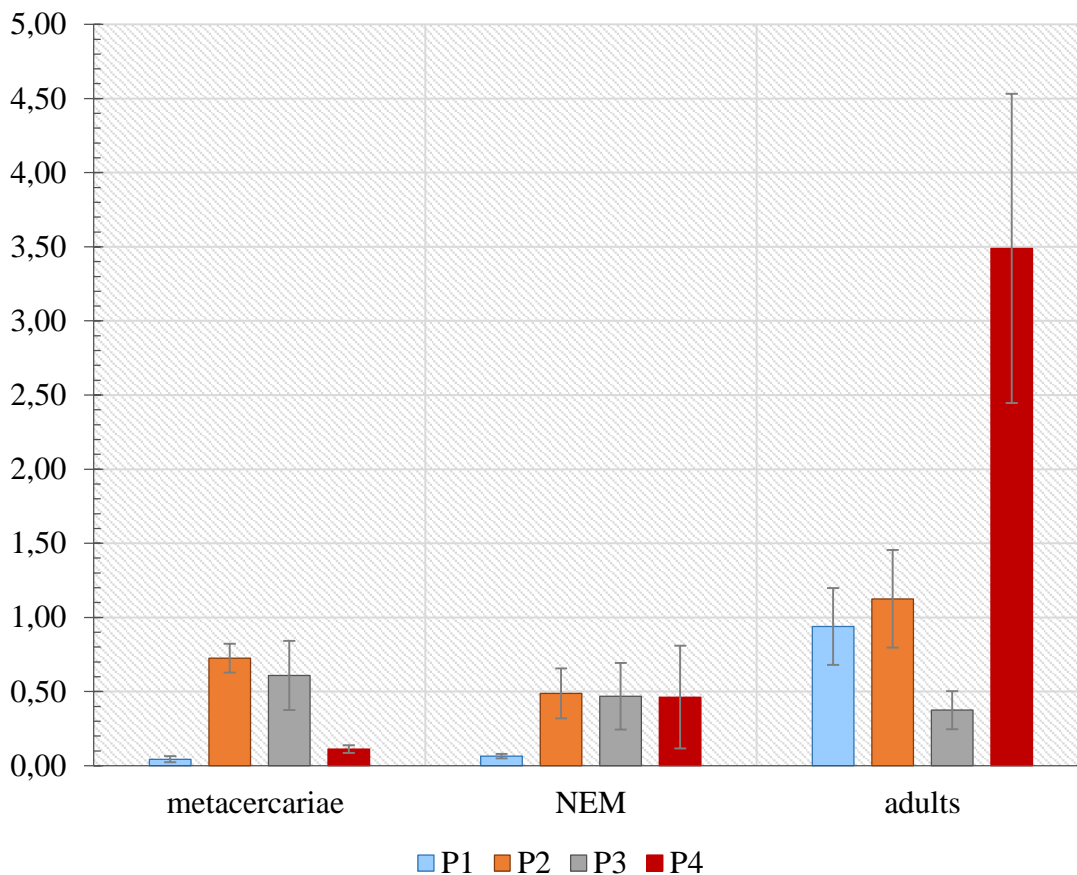


Рисунок 39. Экспрессия генов Р-гликопротеинов на трех жизненных стадиях: взрослой (adult) и эксцистированной метацеркарии (NEM) и метацеркарий (metacercariae) методом Цифровой капельной ПЦР. Экспрессию генов нормализовали на ген *MrpL16*.

2.3.2. Исследования функциональности Р-гликопротеинов *O. felineus*.

Активность и регуляция экспрессии Р-гликопротеинов. Подавление уровня мРНК Р4 с помощью РНК-интерференции.

Активность Р-гликопротеинов. Важным этапом работы было исследование функциональности системы белков Р-гликопротеинов у взрослых особей описторхов. Для исследования функциональности этих белков были поставлены следующие задачи: (1) с помощью контрастного вещества ксенобиотика продемонстрировать работу экскреторной системы; (2) исследовать активность ингибиторов Р-гликопротеинов человека против Р-гликопротеинов описторха; (3) исследовать индуцибельность генов Р-гликопротеинов с помощью различных ксенобиотиоков, а также биологических индукторов, таких, как кровь и желчь хомяков; (4) исследовать морфологические изменения у гельминтов в ответ на снижение экспрессии гена Р4 методом РНК-интерференции.

Для визуализации активности Р-гликопротеинов выбрали резорурфин – низкомолекулярное флюоресцентное вещество, которое, как было показано ранее, является субстратом для Р-гликопротеинов разных организмов, в частности шистосом (Kusel et al., 2009).

При контрастировании выделительной системы *O. felineus* с помощью резорурфина, нами была продемонстрирована динамика накопления и выведения этого препарата (**Рисунок 40**). Резорурфин – контрастное флюоресцентное низкомолекулярное вещество, видимое в красном спектре. Показано, что резорурфин проникает сквозь тегумент равномерно (**Рисунок 40**) и накапливается в выделительных канальцах (**Рисунок 40В, С, D**); затем резорурфин концентрируется в выделительном пузыре и выводится наружу через выделительную пору. Таким образом, активность белков Р-гликопротеинов локализована в районе выделительной системы *O. felineus*.

В работе мы использовали ингибиторы АВС-белков млекопитающих: тариквидар (ингибитор Р-гликопротеинов человека) и верапамил (ингибитор работы всех АВС-белков). Поскольку у Р-гликопротеинов описторха строение белков консервативное, мы предположили, что эти ингибиторы также могут работать также против Р-

гликопротеинов в тканях паразита. Применение ингибиторов тариквидара и верапамила на описторхах одновременно с резорудином показало, что ингибиторы препятствуют накоплению резорудина в выделительных канальцах, но не препятствуют попаданию красителя в червя (**Рисунок 40Е, F**). Поэтому ткани описторха окрашиваются в красный цвет равномерно.

Таким образом, резорудин попадает в ткани червя, скорее всего, диффузией через тегумент, а Р-гликопротеины участвуют в выведении этого препарата через выделительную систему. Кроме того, данные результаты демонстрируют, что функционально Р-гликопротеины по строению очень близки к белкам млекопитающих и, вероятно, можно применять эти ингибиторы или их производные с целью увеличения концентрации лекарственных препаратов внутри червя и усиления действия антигельминтных препаратов.

Регуляция экспрессии Р-гликопротеинов. Подавление уровня мРНК Р4 с помощью РНК-интерференции. Следующим важным этапом исследования функциональности Р-гликопротеинов было исследование экспрессии генов Р-гликопротеинов и поиск возможных индукторов экспрессии этих генов. Поскольку разница в базовом уровне экспрессии между взрослой особью и эксцистированным метацеркарием достигала примерно 10 раз, мы выбрали стадию эксцистированной метацеркарии, как модель для исследования действия различных индукторов экспрессии генов, добавляемых экзогенно. Мы не получили значимых изменений экспрессии генов Р-гликопротеинов в ответ на обработку ксенобиотиками, такими как ТХДД, дексаметазон, ДМСО (данные не приведены). Поэтому мы исследовали действие на индукцию биологических индукторов, таких, как гемоглобин, желчь и кровь хомяка при обработке в течение 24 часов. Мы обнаружили (**Рисунок 41**), что из всех генов Р-гликопротеинов значимо изменяется уровень экспрессии гена Р4 в ответ на гемоглобин и желчь. Относительный уровень экспрессии мРНК Р4 увеличивается в 4 раза (**Рисунок 41**). По-видимому, этот ген важен в процессах метаболизма червя, затрагивающих катаболизм и транспорт гемоглобина и желчных кислот, используемых гельминтом.

Были проведены эксперименты по подавлению экспрессии гена Р4 с помощью РНК-интерференции *in vitro*, а именно, обработкой червей ген-специфичной dsRNA с помощью электропорации (**Рисунок 42**). На Рисунок представлены результаты по относительному уровню экспрессии гена Р4 через 1-7 дней после проведения

электропорации. Снижение уровня экспрессии происходило на 30%, 50%, 59%, на 1, 3, 7 дни, соответственно. Уровень экспрессии представлен в процентах от уровня экспрессии гена P4 у червей, которых также подвергали электропорации с использованием неспецифического зонда (LUC). Видно, что обработка червей с использованием неспецифического зонда LUC не приводила к изменению экспрессии целевого гена. Эксперимент был повторен три раза, экспрессия мРНК гена P4 измеряли в каждом отдельном черве индивидуально методом цифровой капельной ПЦР. Ген *MrpL16* был выбран как референсный. Позиции праймеров для ПЦР не совпадали с районом, на который был наработан зонд для РНК-интерференции.

Мы не увидели каких-либо фенотипических изменений в ответ на снижение экспрессии гена P4 методом РНК-интерференции. К сожалению, амплитуда снижения экспрессии мРНК гена P4 была недостаточной, чтобы наблюдать фенотипические эффекты изменения экспрессии.

Таким образом, мы исследовали функциональность генов Р-гликопротеинов. Консервативность строения предсказанных белков, кодируемых этими генами позволила нам провести эксперимент, демонстрирующий их работу *in situ*. Оказалось, что активность этих белков сосредоточена в районе экскреторных каналов и, по-видимому, связана с выведением ксенобиотиков из тканей посредством экскреторных каналов. Важным результатом оказалось также, что типичные ингибиторы Р-гликопротеинов человека верапамил и тариквидар оказываются в состоянии блокировать активность белков Р-гликопротеинов, препятствуя выделению ксенобиотиков из тканей гельминта. Кроме того, оказалось, что экспрессия Р-гликопротеинов может регулироваться веществами, добавляемыми в среду экзогенно, в частности, гемоглобин и желчь оказались для гена P4 индукторами его экспрессии.

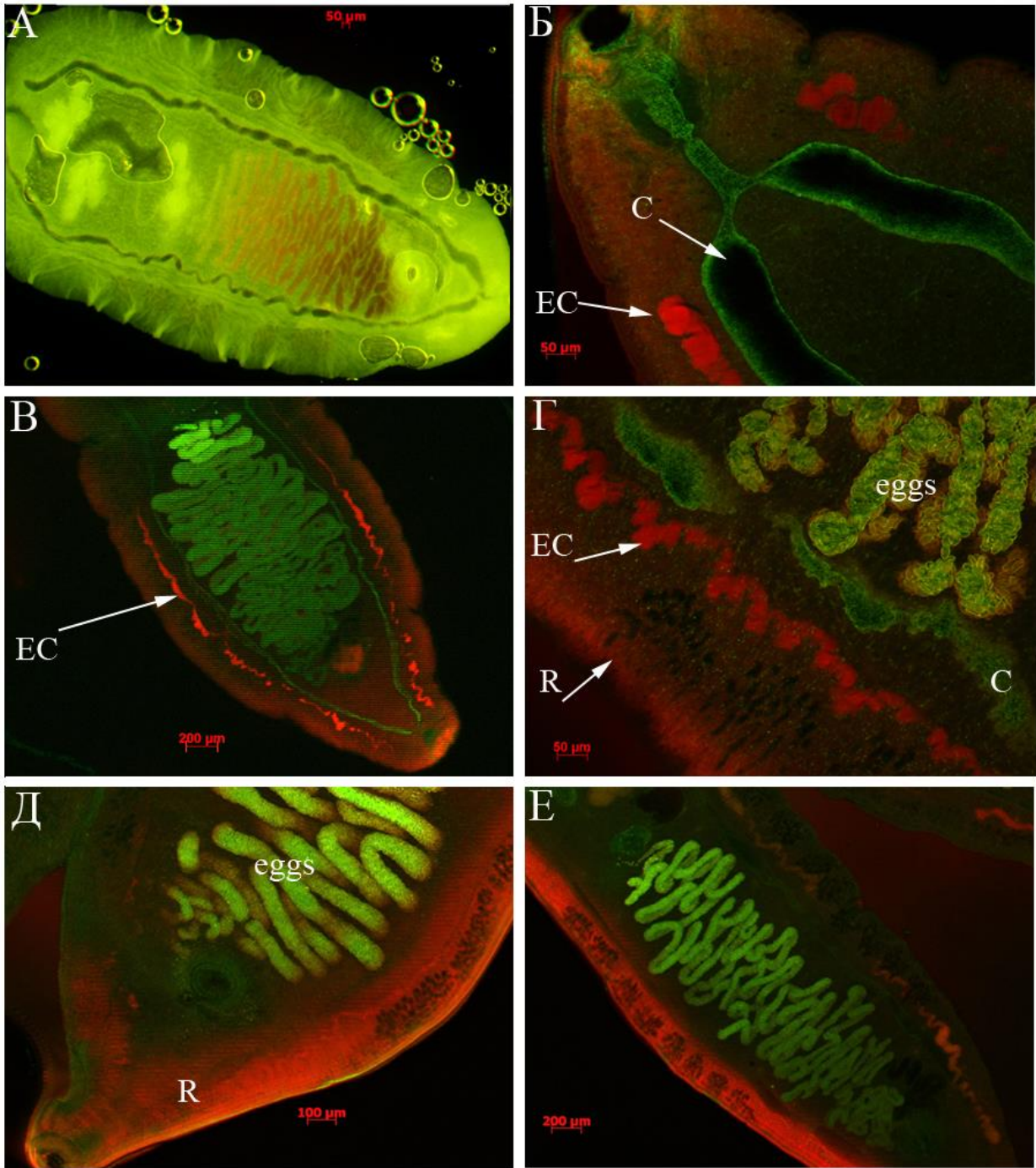


Рисунок 40. Визуализация активности Р-гликопротеинов в контроле (А) и при прокраске с субстратом (резоруфином R) (Б-Е) и ингибиторами Р-гликопротеинов тариквидаром (Д) и верапамиллом (Е). Резоруфин – флюоресцентный субстрат, на картинке продемонстрирован в виде красной субстанции, окрашивающей ткани гельминта. С – саесум, кишечник; Eggs – яйца; R– резоруфин; EC – excretory channels, экскреторные каналы.

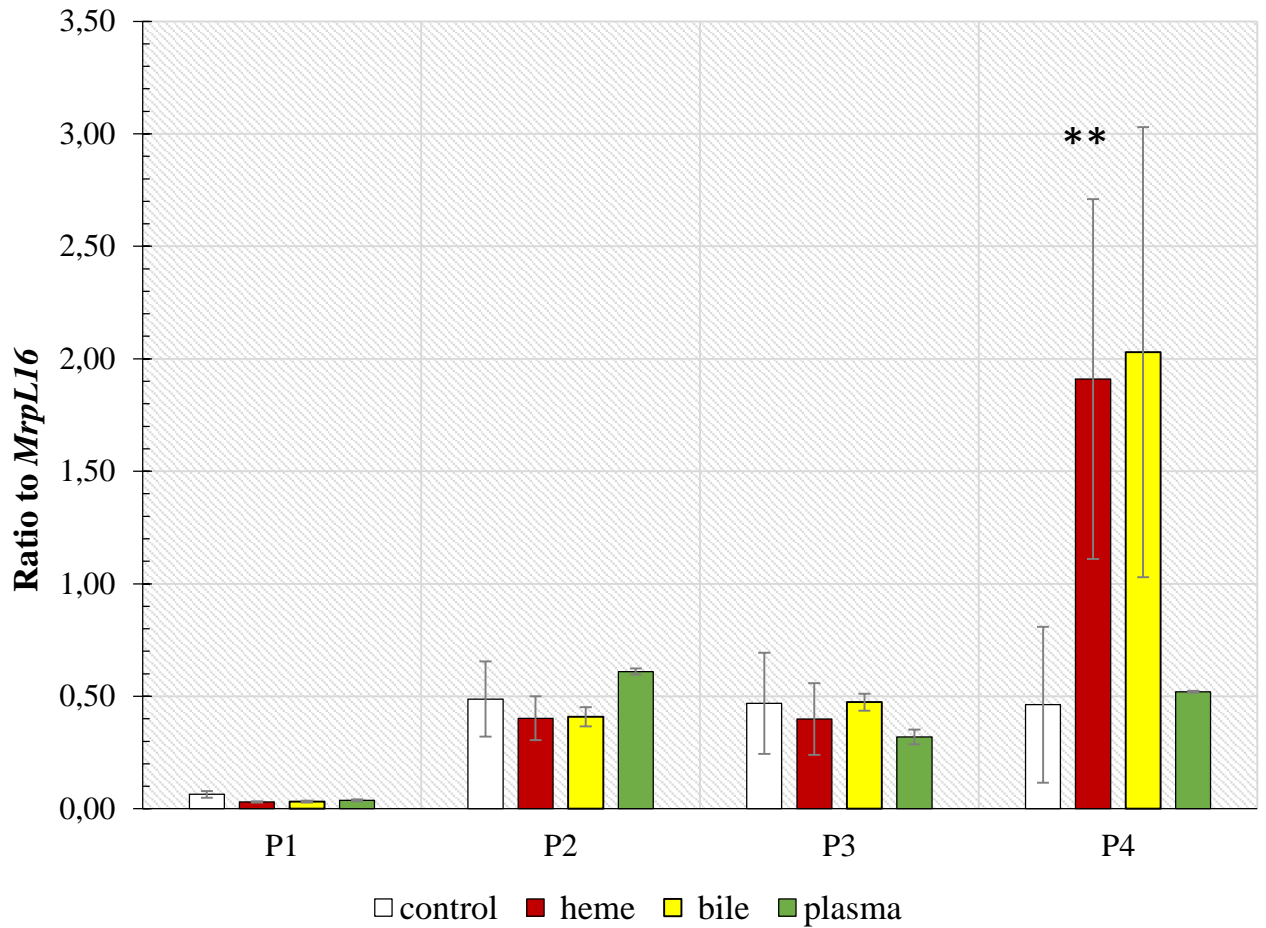


Рисунок 41. Экспрессия генов Р-гликопротеинов в контроле (с) и при обработки эксцистированных метацеркарий в течение 24 часов биологическими индукторами: гемоглобином (heme), желчью хомяка (bile) и плазмой крови (plasma). Метод Цифровой капельной ПЦР. Экспрессию генов нормализовали на экспрессию мРНК гена MrpL16.

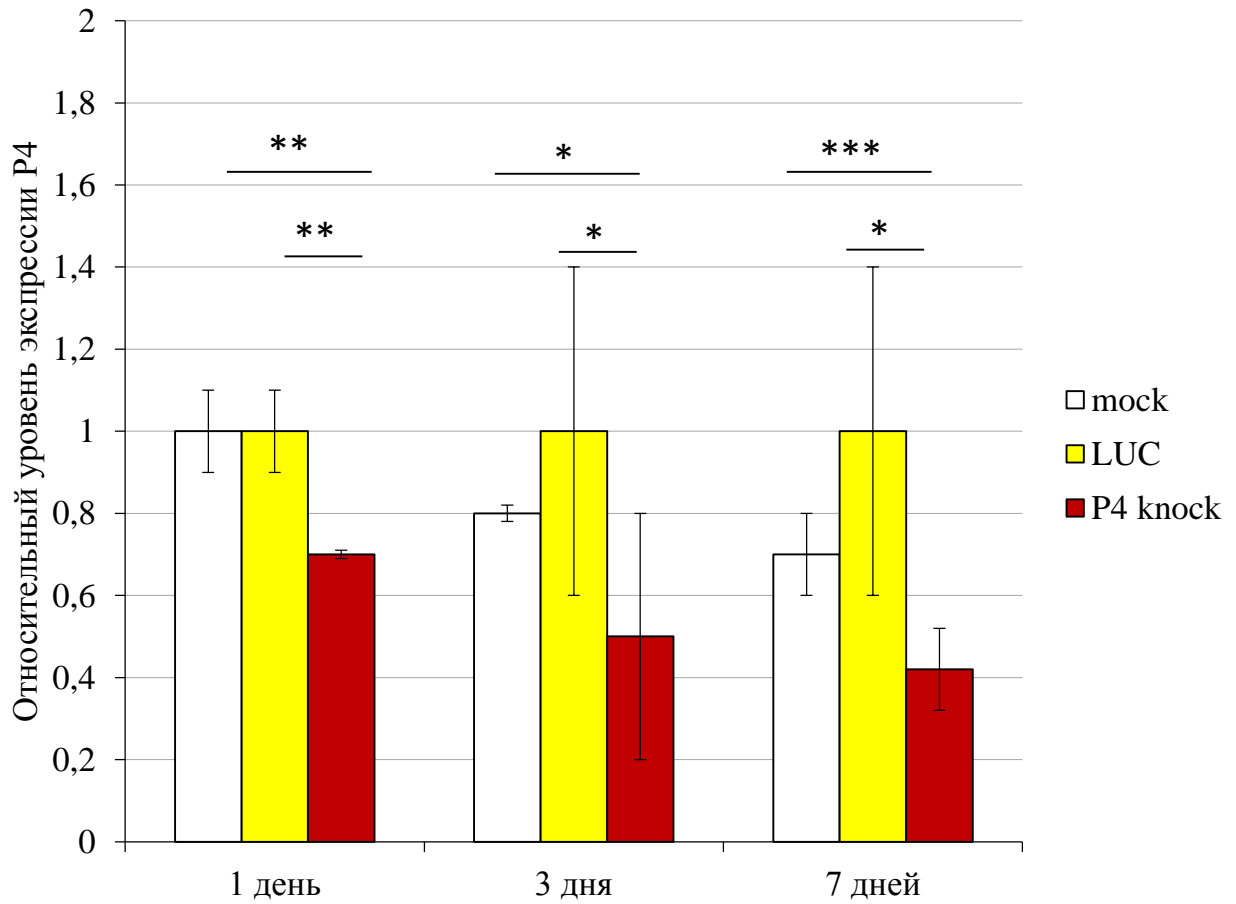


Рисунок 42. Результаты РНК-интерференции гена P4. Уровень транскриптов определяли методом цифровой капельной ПЦР. Ген *MrpL16* был выбран как референсный. Контрольную группу (без dsRNA) сравнивали с группой с зондом dsRNA на ген североамериканского светлячка *Photinus pyralis*, кодирующий фермент люциферазу (неспецифический контроль). Представлены результаты трех экспериментов по три индивидуальных особи, измерения уровня мРНК повторены дважды. Данные представлены в виде среднее \pm SD.

В-целом, можно заключить, что Р-гликопротеины описторха, вероятно, играют важную роль во взаимоотношениях «паразит-хозяин». Учитывая высокий уровень экспрессии этих генов (особенно Р4) на стадии взрослого червя и дифференциальную экспрессию на протяжении жизненного цикла, можно заключить, что потенциально Р-гликопротеины являются перспективной молекулярной мишенью для разработки терапевтических антигельминтных препаратов. Кроме того, важно отметить, что такие препараты как тариквидар и верапамил разрешены к использованию и используются в медицине для лечения заболеваний человека. Поэтому тариквидар и верапамил можно рассматривать как дополнительные в качестве комбинаторной терапии против гельминтозов, направленной на снижение дозы действующего вещества антигельминтика, т.к. механизм работы этих препаратов заключается в блокировании экскреции ксенобиотиков из тканей описторха и увеличение концентрации действующего вещества внутри.

3. Тестирование антигельминтных препаратов

3.1. Тестирование празиквантела *in vivo* и *in vitro* на *Opisthorchis felineus*

Празиквантел в настоящее время является основным антигельминтным препаратом (drug of choice), который применяется в лечении описторхоза, клонорхоза, шистосомоза и других заболеваний, вызванных трематодами. Этот препарат применяется как антигельминтик с середины 80-х годов. Во многих эндемичных регионах мира его назначают для профилактики паразитарных инвазий (Keiser et al., 2013). В условиях повсеместного применения празиквантела время от времени появляются сообщения об обнаружении низкой чувствительности паразитов к этому препарату и возникновения устойчивых изолятов (Greenberg, 2013). В частности, опубликованы случаи низкой эффективности терапии шистосомозов празиквантелом в Африке (van Lieshout et al., 1999), были выделены изоляты *Schistosoma mansoni*, которые действительно подтвердили сниженную чувствительность к празиквантелу *in vitro*. И хотя в целом конкретных охарактеризованных устойчивых изолятов выделено немного, довольно часто можно встретить информацию о низкой эффективности терапии (low cure rates), например, при лечении клонорхоза во Вьетнаме, вызванного *Clonorchis sinensis*, удалось достигнуть всего 52% эффективности терапии (Kieu et al., 1992). В целом, эффективность лечения обычно составляет 60-80%, но практически никогда 100% (Greenberg, 2013).

Празиквантел вызывает паралич червей, спазмические сокращения и обездвиживание, разрушение тегумента, что выражается в его эрозии, образовании пузырей, отшелушивании поверхностного слоя. Опубликованные данные по этим аспектам, в основном, представлены по эффектам празиквантела на шистосом и в меньшей степени по эффектам на описторхид. Несмотря на эпидемиологическую значимость *Opisthorchis felineus*, исследований эффективности празиквантела на этом представителе плоских червей в современной литературе представлено очень мало. В опубликованных работах внимание исследователей, как правило, было сконцентрировано на лечебном действии препарата. В частности, есть несколько работ по эффективности терапии описторхоза у людей в различных регионах России (Бронштейн и др., 1991; Завойкин и др., 1991), отдельные случаи лечения собак (Schuster et al., 2007). По нашим

сведениям комплексного исследования эффектов празиквантела *in vivo* и *in vitro* пока не проводилось.

В качестве общепринятой лабораторной модели паразитозов часто применяются грызуны (Keiser et al., 2013), в частности, мыши, крысы, хомяки. Показано, что трематоды полноценно развиваются и близки по фенотипу к взрослым особям, изолированным из природных хозяев. Такие модели паразитозов используются как для получения большого количества взрослых особей, так и для тестирования перапаратов. Мы исследовали действие празиквантела на модели экспериментального описторхоза у хомяков (*Mesocricetus auratus*).

Тестирование *in vivo*. Было проведено два эксперимента по исследованию действия празиквантела *in vivo*. В каждый эксперимент на точку было взято 5-22 самца хомяков, предварительно зараженных 100 метацеркариями. При этом группы выбирали с учетом разного срока заражения: 1 месяц (острый описторхоз), 3 месяца (хронический описторхоз). Степень заражения *O. felineus* между группами была примерно одинакова и составляла 35-46 червей на животное.

Доза празиквантела 75 мг/кг и способ введения 3 раза через 4-6 часов были взяты из рекомендаций в терапии описторхоза. Кроме того, применяли дозу 400 мг/кг празиквантела, как общепринятую для тестирования PZQ на грызунах (Xiao et al., 2011; Keiser et al., 2013). Спустя 21 день после начала обработки животных с хроническим описторхозом было выделено 35 ± 11 червей у контрольных животных и 11 ± 4 червей у животных, обработанных 75 мг/кг празиквантела и 8 ± 4 - у животных, обработанных 400 мг/кг PZQ. Таким образом, эффективность лечения празиквантела составила 70-81%. Черви, выделенные из животных получавших празиквантел, при исследовании под микроскопом не отличались от особей, выделенных из контрольных животных, ни по морфологии, подвижности, продукции яиц. Червей обрабатывали красителем DAPI и исследовали морфологию под микроскопом (**Рисунок 43**). На рисунке и у гельминтов из контрольных и из опытных групп можно увидеть зрелые яйца. Яйца содержат личинки, ядра клеток которых прокрашены DAPI. Таким образом, через 21 день после начала эксперимента 19-30% червей полностью восстанавливали структуру, подвижность и другие жизненно необходимые функции. Результаты тестирования празиквантела на сроке заражения 1 мес продемонстрировали аналогичный результат (**Таблица 5**).

Тестирование *in vitro*. Данных по фармакокинетике празиквантела на хомяках нет, есть сведения, полученные на кроликах, и сведения по кинетике празиквантела при терапии у людей. При лечении людей в дозах 20-40 мг/кг, C_{max} в сыворотке крови колеблется в зависимости от диеты от 250 ng/мл до 1.5 mg/мл (Lima et al., 2009; Keiser et al., 2013). Есть сведения, что в крови кроликов концентрация празиквантела может достигать 30 мкг/мл при полученной ими дозе 40 мг/кг (Wu et al., 2011).

Мы выбрали такой диапазон доз PZQ (0.1 – 50 мкг/мл) при тестировании празиквантела *in vitro*, который перекрывает биодоступные концентрации празиквантела в сыворотке крови при терапии трематодозов.

Эксперимент *in vitro* проводили на взрослых червях и ювенильных червях (эксцистированные метацеркарии) (**Таблица 6**). Культивировали червей в среде с добавлением празиквантела в течение 24 часов, затем заменяли среду на такую же без добавления лекарства и инкубировали еще 48 часов. Исследовали выживаемость червей с использованием стандартных тестов на подвижность. Подвижность червей оценивали по шкале от 0 до 3. Считалось, что червь мертвый, если в течение 2 минут наблюдения не отмечалось движений червя и червь приобретал темную окраску (Wu et al., 2011, Keiser et al., 2013). При культивировании взрослых марит мы использовали широкий диапазон концентраций празиквантела от 0.1 до 50 мкг/мл. Тесты на подвижность проводили через 1 час, 4 часа, 24 часа после действия лекарства, а также через 24-48 часов после отмены препарата. Мы обнаружили, что в дозе 0.1 мкг/мл черви были обездвижены почти полностью, наблюдали изменение фенотипа червя, нарушение перистальтики кишечника (**Таблица 6**).

Таблица 5. Результаты тестирования празиквантела *in vivo* на хомяках с острым (1 мес) и хроническим (3 мес) описторхозом.

PZQ	доза, mg/kg	Количество животных	Срок заражения, мес	Количество червей на животное, \pm SD	Гибель червей, %
-	0	22	3	35 \pm 11	0
-	0	6	1	36 \pm 6	0
+	75	17	3	11 \pm 4	70%
+	400	7	3	8 \pm 4	81%
+	400	5	1	11 \pm 5	70%

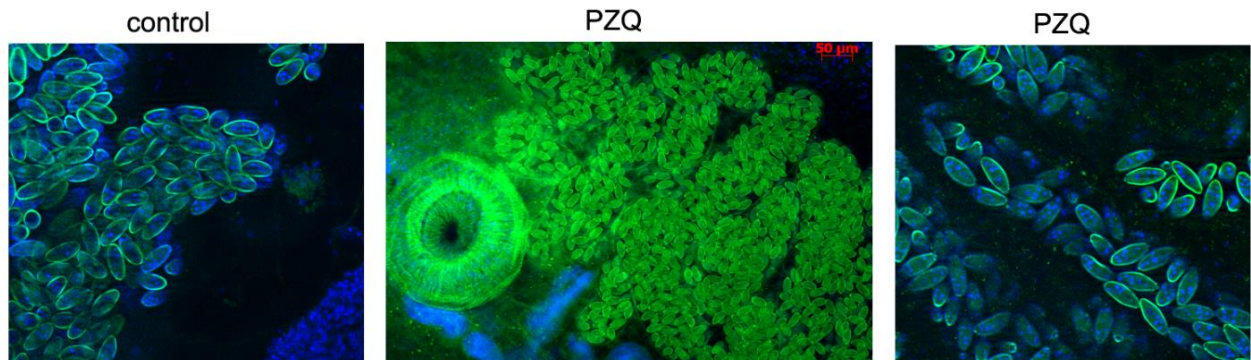


Рисунок 43. Взрослые мариты, выделенные из желчных протоков контрольных животных (А) и обработанных PZQ в дозе 75 мг/кг (В, С). Черви выделены через 21 день после обработки. Червей окрашивали красителем DAPI и анализировали под флюоресцентным микроскопом AxioImager и приставкой Apotome (Zeiss), используя FITC и DAPI фильтры.

Таблица 6. Результаты тестирования празиквантела *in vitro* на взрослых майритах и эксцистированных метацеркариях *O. felineus*.

Время действия	Взрослые черви				
	Концентрация PZQ				
	0	0.1 µg/мл	1 µg/мл	10 µg/мл	50 µg/мл
1ч	40 (+++)	18 (+) 20 (-) живые	6 (+) 24 (-) живые	30 (-) живые	15 (-) живые
24ч	40 (+++)	18 (+) 20 (-) живые	30 (-) живые	30 (-) живые	15 (-) живые
48ч после отмывки от PZQ	40 (+++)	18 (++) 20 (-) живые	6 (+) 19 (-) живые 5 (-) мертвые	2 (+) 19 (-) живые 9 (-) мертвые	2 (+) 13 (-) мертвые
	Эксцистированные метацеркарии				
	0 µg/мл	0.1 µg/мл	1 µg/мл	10 µg/мл	50 µg/мл
1х	80 (+++)	55 (-) живые 25 (+)	80 (-) живые	70 (-) живые	80 (-) живые
4х	80 (+++)	65 (-) живые 15 (+)	80 (-) живые	7 живые	80 (-) живые
24х	80 (+++)	60 (+) фенотип слегка отличается 20 (++)	50 (++) фенотип слегка отличается 30 (+) эксреторный пузырь слегка раздут	19 (+) эксреторный пузырь сильно раздут 51(+)	60 (-) живые 20 (+) эксреторный пузырь сильно раздут
24ч после отмывки от PZQ	80 (++)	80 (++)	80 (+) фенотип слегка отличается	70 (+) эксреторный пузырь сильно раздут	80 (+) эксреторный пузырь сильно раздут

Подвижность червей оценивали по шкале от 0 до 3: 3 (+++) – очень активный (такая же подвижность как у контрольных червей); (++) - активный (сниженная подвижность, движения всем телом); (+)-слабо активный (подвижность только ротовой присоски); (-) - неподвижный.

После отмывки в течение 48 часов черви полностью восстанавливали свой фенотип и подвижность. В дозе 1 мкг/мл было отмечено более значительное изменение фенотипа в течение действия препарата, черви были обездвижены, скручены, часть червей приобретала темную окраску. В этой дозе обработки наиболее ярко проявилась гетерогенность особей по способности к восстановлению после празиквантела. После отмены препарата и 2 суток отмывки наблюдали частичное восстановление фенотипа и подвижности одной трети от общего количества червей, часть червей оставалась неподвижной, но не изменяла окраску, и часть червей восстанавливала фенотип и подвижность в ограниченной степени. В дозе 10 мкг/мл все черви были вытянуты, скручены и не шевелились. После отмывки в течение 2 суток часть червей восстанавливали частично свою подвижность в ограниченной степени, в том числе сохранялась подвижность ротовой присоски, часть червей приобретала темноватый оттенок (**Таблица 6**). Важно отметить, что в концентрациях празиквантела 1-10 большая часть червей хотя и были обездвижены полностью, но они не приобретали темную окраску и характерную мутность. По-видимому, эти дозы празиквантела не были смертельными для большинства червей, хотя черви и приобретали некоторые необратимые фенотипические изменения. После 2 суток отмывки от празиквантела, используемого в дозе 50 мкг/мл, все черви приобрели необратимые фенотипические изменения и окраску, и были обездвижены полностью, за исключением 2 особей, которые сохраняли очень незначительную подвижность.

Были вычислены параметры полуэффективных концентраций через 1 день после обработки PZQ *in vitro* с помощью метода (Keiser et al., 2013), которые составили для эксцистированных метацеркарий $IC_{50}=0.33$ мкг/мл (1.06 μ M); для взрослых червей $IC_{50}=0.14$ мкг/мл (0.45 μ M), эти параметры оказались близки к эффектам празиквантела для *O. viverrini*: $IC_{50}=0.16$ μ g/мл, $IC_{95}=0.99$ μ g/мл (Keiser et al., 2013) и были выше, чем для *S. mansoni*: $IC_{50}=0.024$ μ g/мл (Keiser et al., 2011).

В-целом, нужно отметить, что все наблюдаемые эффекты действия празиквантела на взрослых маритах *O. felineus* были те же, что и наблюдаемые на других трематодах, в частности *S. mansoni*, *S. japonicum*, *C. sinensis*, *O. viverrini*, однако эти признаки проявлялись в концентрациях празиквантела больше, чем необходимые для тех же эффектов на других трематодах (Staudt et al., 1992, Xu et al., 2011).

Следующим этапом работы было исследование эффектов празиквантела на ювенильных маритах *O. felineus* (**Таблица 6**). Тестировали празиквантел в концентрациях 0.1 - 100 мкг/мл. Празиквантел добавляли в среду, инкубировали особей в течение 24 часов, затем меняли среду и продолжали инкубацию еще 24 часа после отмены препарата. Проводили стандартные тесты на подвижность и микроскопически исследовали изменения фенотипа. Известно, что на ювенильных маритах (эксцистированных метацеркариях) трематод празиквантел действует слабее, чем на взрослых (Wu et al., 2011).

Мы наблюдали изменения фенотипа, обездвиживание червей в течение первых часов обработки на всех концентрациях празиквантела примерно одинаково. При концентрации 0.1 полного обездвиживания не было совсем, форма червей напоминала шарик, сохранялась активная подвижность присоски. После отмывки фенотип не был слегка изменен, движения восстанавливались почти полностью (**Таблица 6**). В дозе 1-50 мкг/мл особи были неподвижны в течение первых нескольких часов, затем через 1 сутки происходило частичное подвижности червей (**Таблица 6, Рисунок 44**), но не фенотипа. Фенотип восстанавливался после отмывки от празиквантела в концентрации 1 мкг/мл, при этом у части червей фенотип оставался раздутым, напоминающим шарик, вторая половина червей восстанавливала фенотип (**Рисунок 44**). В дозе 10 мкг/мл проявилась выраженная гетерогенность червей, часть червей не восстановила фенотип и движения, оставались раздутыми и изменили цвет, а половина червей восстановили фенотип, как и в дозе 1 мкг/мл. В дозе 50 мкг/мл фенотип червей оставался сильно изменен после отмывки, хотя наблюдались слабые движения червей. Также, при этой концентрации была отмечена вакуолизация тегумента, выразилась в формировании вздутий на поверхности червей (**Рисунок 44**). В дозах 100 мкг/мл было четкое потемнение цвета червей и приобретение характерной мутности окраски. Что свидетельствовало о токсичности этих доз для ювенильных марит *O. felineus*.

В-целом, особи эксцистированных метацеркарий оказались менее чувствительны к празиквантелу и могли частично восстанавливать фенотип и подвижность в дозе празиквантела 1 мкг/мл и редко в 10 мкг/мл, тогда как взрослая марита в дозе 1-10 мкг/мл после отмывки в течение 48 часов оставались с сильно измененным фенотипом и ограниченной подвижностью. Эти данные согласуются с литературными сведениями о различиях токсичных доз для этих стадий шистосом в 30 раз (Day, Botros, 2006).



Рисунок 44. Фенотипические изменения эксцистированных метацеркарий, обработанных празиквантелом *in vitro*.

Исследование поверхности описторхов под действием празиквантела.

Известно, что празиквантел вызывает повреждения тегумента, его локальные разрушения, вакуолизацию, эрозию (Keiser et al., 2013; Staudt et al., 1992; Day, Botros, 2006; Apinhasmit, Sobhon, 1996). В организме хозяина это приводит к тому, что клетки иммунной системы лучше атакуют ткани и органы червя, что в конечном итоге приводит к его гибели.

Поскольку при концентрациях празиквантела 1-10 мкг/мл у взрослой мариты мы не обнаружили характерного помутнения червей и изменения цвета при полном обездвиживании, которое бы свидетельствовало о гибели особей, было решено подобрать подходящий краситель.

Пропидиум иодид (PI) используется как флюоресцентный краситель поврежденных клеток, он может проникать через мембраны только разрушенных клеток и окрашивать ДНК. Этот краситель применяли для окраски погибших шистосомул при тестировании различных антигельминтных препаратов (Peak et al., 2010). Мы использовали окраску с помощью пропидиум иодида, чтобы визуализировать повреждения оболочки червей. В качестве контроля использовали живых особей (**Рисунок 45А**) и марит убитых нагреванием до 65⁰С (**Рисунок 45Н**). Марит окрашивали пропидиум иодидом в течение 15-20 минут и снимали под родаминовым и FITC фильтрами. PI не проникал через оболочку контрольных марит (**Рисунок 45А, В, D**), наблюдали только аутофлюоресценцию особей в зеленом и частично в красном спектре. В отличие от живых, мертвые мариты были полностью окрашены PI (**Рисунок 45Н**). Интересно, что после обработки празиквантелом в течение 1 суток в дозе 10 мкг/мл (**Рисунок 45С**) мы не обнаружили окраски марит PI, выражена только аутофлюоресценция. Включение красителя PI наблюдали в дозе 100 мкг/мл (**Рисунок 45I**), что свидетельствовало о повреждении оболочки и гибели особей.

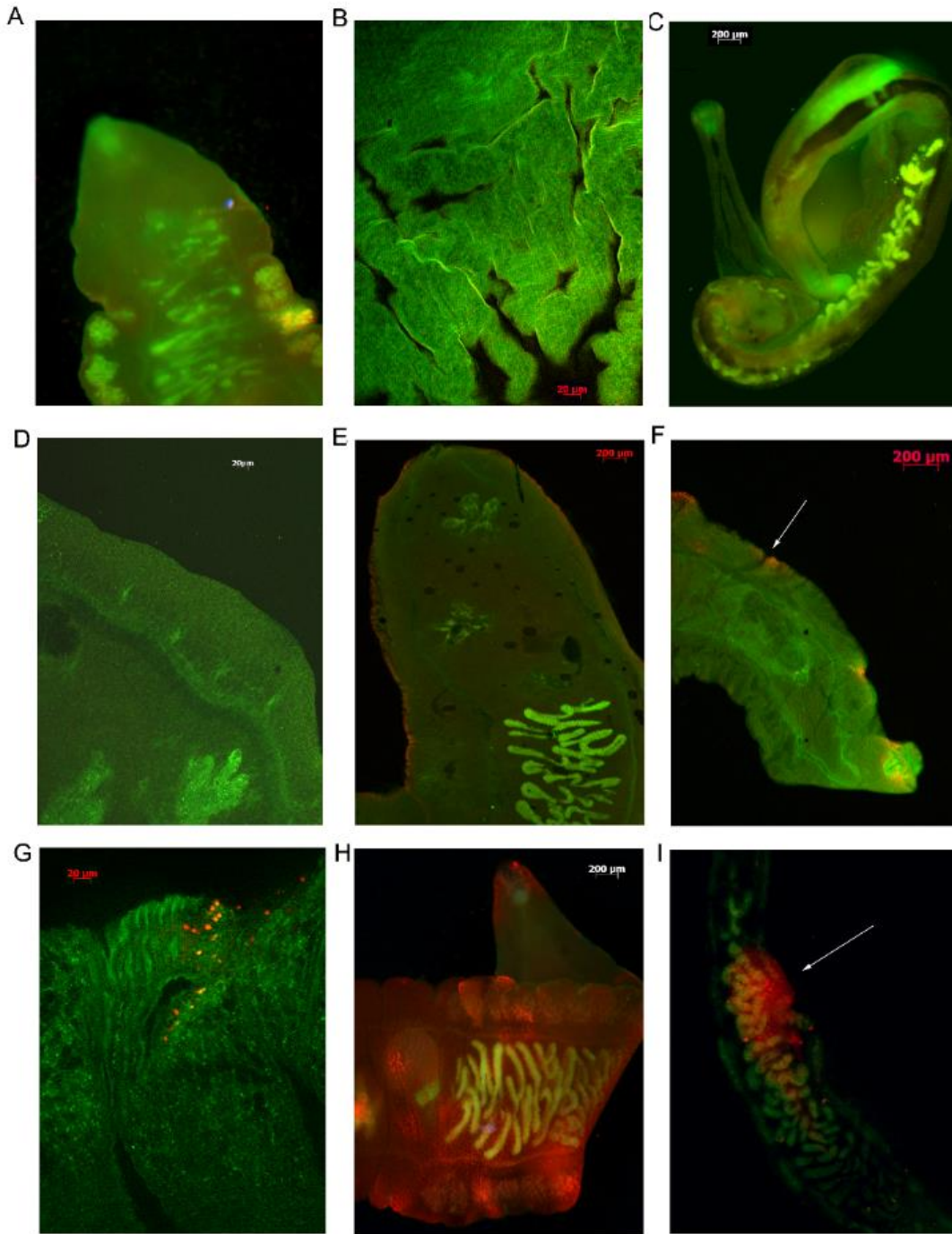


Рисунок 45. Оценка повреждений поверхности взрослых марит *O. felinus* с помощью окрашивания пропидиум иодидом. (А) интактная особь. (В) поверхность интактной особи (С) Марита после обработки 10 $\mu\text{g}/\text{мл}$ PZQ через 1 день. (D) Оболочка контрольной особи после окраски PI (E) Марита после обработки 10 $\mu\text{g}/\text{мл}$ PZQ в течение 30 мин. (F, G) Марита после обработки 10 $\mu\text{g}/\text{мл}$ PZQ в течение 3 часов (H) мертвая особь. (I) Марита после обработки 100 $\mu\text{g}/\text{мл}$ PZQ в течение 1 дня.

Мы предположили, что тегумент червей после повреждений может восстанавливаться через 24 часа и провели исследования временной динамики окраски PI после обработки празиквантелом *in vitro* в течение первых нескольких часов. Мы обнаружили (**Рисунок 45E**), что через 30 мин обработки празиквантелом глубоких повреждений поверхности нет, хотя заметна тонкая полоса красителя с внешней стороны оболочки. Поверхность *O. felineus* представляет собой извитую складчатую поверхность (**Рисунок 45B**). Через 3 часа обработки празиквантелом мы показали, что краситель начинает локально проникать внутрь в поверхностные слои описторха (**Рисунок 45G**) и окрашивать поврежденные клетки, однако повреждения выглядят очень локально и по-видимому *in vitro* не влияют на жизнеспособность взрослых марит *O. felineus*.

Исследуя эффекты празиквантела *in vitro* на взрослых особях и эксцистированных маритах *O. felineus* мы обнаружили несколько интересных фактов. Во-первых, мариты *O. felineus* обладали способностью к восстановлению фенотипа в ответ на достаточно высокую дозу празиквантела, токсичную для других видов трематод. В частности, показано, что в дозе 1 мг/мл празиквантел *in vitro* убивает шистосом и *Clonorchis sinensis* (Xu et al., 2011; Staudt et al., 1992).

Во-вторых, мы обнаружили интересный факт относительно тегумента. Полное обездвиживание червя и неспособность восстановить свой фенотип в течение 48 часов после отмены празиквантела не свидетельствуют о необратимом повреждении оболочки и смерти паразита. В дозе празиквантела 10 мкг/мл тегумент обладал способностью восстанавливаться и через 1 сутки становился опять непроницаемым для пропидиум иодида. Хотя при этом особи оставались обездвижены и у них было необратимо нарушено фенотип. Для сравнения, вакуолизация тегумента и его разрушение были наглядно продемонстрированы у *S. mansoni* в дозе уже 0,5-1 мкг/мл (Day, Botros, 2006; Staudt et al., 1992).

Тегумент трематод представляет собой многоядерный синцитий около 4 микрон толщиной. Тегумент выполняет несколько жизненно важных функций для червей: защита от клеток иммунной системы хозяина, всасывание питательных веществ, транспорт ионов и коммуникации с нижележащей нервной системой. Тегумент контактирует напрямую с мышечными волокнами, обеспечивая мгновенную реакцию мышц на внешние стимулы, такие как механическое давление, ионный градиент или градиент питательных веществ (Беэр, 2005; Day, Botros, 2006). Внешняя поверхность

тегумента представляет собой совокупность множественных складок, что обуславливает увеличение поверхности червя более чем в 10 раз. Поскольку тегумент выполняет такие важные функции для жизнеобеспечения червя, должны существовать механизмы его регенерации. Предшественники тегумента - дискоидные и гепталамитные тела, находятся в толще синцития. Например, тегумент шистосомулы принципиально отличается от тегумента взрослой особи. Однако компоненты тегумента шистосомулы позволяют приобрести такой же тегумент по составу фосфолипидов, как и у взрослой особи всего через 3 часа после инвазии хозяина (Day, Botros, 2006). Данные по структуре и функциям тегумента *O. felineus* крайне ограничены, поэтому основываясь на литературных данных по структуре других трематод, можно предполагать, что тегумент *O. felineus* также обладает всеми ресурсами, которые создают возможность его быстрой регенерации.

Одним из ключевых эффектов антигельминтного действия празиквантела является его способность разрушать структуру тегумента, что позволяет клеткам иммунной системы атаковать ткани и органы. В частности, было показано абсолютная смертность всех шистосом при суммарном действии низких концентраций празиквантела и антисыворотки, тогда как ни один из этих факторов не оказывал такого эффекта в отдельности (Day, Botros, 2006).

Кроме того, очень важным наблюдением во время проведения тестирования празиквантела было много раз отмеченная гетерогенность особей *O. felineus*. Этот факт, вероятно, обусловил высокую статистическую ошибку эксперимента *in vivo*. И в результате часть особей (19-30%) полностью восстановили свою морфологию, подвижность, репродуктивные функции. Эта же гетерогенность проявилась наглядно в экспериментах *in vitro*. Часть особей *O. felineus* демонстрировали тенденцию к восстановлению фенотипа после отмывки от высоких концентраций празиквантела, тогда как большинство особей погибало. Таким образом, в популяции *O. felineus*, представленных в районе Новосибирска, были найдены особи, отличающиеся по чувствительности в реакции на празиквантел.

Известно, что устойчивость к празиквантелу можно получить искусственным путем, получая потомство от особей, которых обрабатывали невысокими дозами празиквантела несколько жизненных циклов подряд. В частности, так были получены у разных групп исследователей резистентные к празиквантелу *S.mansoni* и *S.japonicum* (Fallon, Doenhoff, 1994). В частности, после проведения 7 пассажей 93% червей *S.mansoni*

оставались живыми в концентрациях празиквантела, при которых 90% чувствительных особей погибала. Поскольку описторхоз широко распространен на территории России и близлежащих странах Средней Азии и Восточной Европы, он является важной эпидемиологической проблемой. Это заболевание в хронической форме может протекать скрыто. Можно предполагать, что применение несистематического лечения антигельминтными препаратами может приводить к получению потомства червей, менее чувствительных к празиквантелу.

Таким образом, по нашим данным в популяции описторхов Западной Сибири есть определенная доля гельминтов, которые менее подвержены действию празиквантела, и обладают способностью быстрее восстанавливаться после его парализующего действия. Таким образом, поиск новых антигельминтных препаратов для терапии описторхоза становится актуальной задачей.

3.2. Тестирование супрамолекулярных комплексов альбендазола с арабиногалактаном на модели экспериментального описторхоза

Альбендазол – антигельминтный препарат широкого спектра действия. Этот препарат активен в отношении многих видов гельминтов, однако его действие на *O. felineus* существенно уступает эффективности празиквантела.

Недостатком альбендазола является его крайне низкая водорастворимость и связанная с этим низкая абсорбция и биодоступность (<5%) (Чистяченко и др., 2014). Ранее было показано, что включение альбендазола в комплексы с арабиногалактаном (АГ) позволяет многократно увеличить его водорастворимость (Халиков и др., 2011), в частности, в комплексах в соотношении 1:10 растворимость в воде альбендазола увеличивается примерно в 70 раз. Морфологически субстанция АГ состоит из частиц сферической формы размером 2-20 мкм; субстанция альбендазола - из частиц неправильной формы размером 5-30 мкм. Полученные дисперсии имеют аморфное строение и состоят преимущественно из агрегатов частиц общим размером 5-20 мкм (Chistyachenko et al., 2015). Анализы ВЭЖХ и ГПХ указывают, что при механохимической обработке не происходит химических взаимодействий компонентов, молекулярный вес макромолекул АГ также не изменяется. Комплексы альбендазола и арабиногалактана были получены и описаны д.б.н. Душкиным А.В. (Институт Химии Твердого Тела СО РАН).

Нашей задачей было исследовать противоописторхозную активность предоставленных комплексов альбендазола с АГ, выделяемым из древесины лиственниц *Larix sibirica* и *Larix gmelinii*. Тестирование препаратов *in vivo* проводили на модели хронического экспериментального описторхоза на золотистых хомяках *Mesocricetus auratus*. В качестве положительного контроля была выбрана высокая трехкратная доза АБЗ (500 мг/кг веса), чтобы достигнуть максимальной эффективности действия этого препарата (суммарно 1500 мг/кг) (Таблица 7). Однако этой однократной дозы было недостаточно, чтобы уничтожить 100% описторхов. Выживаемость гельминтов была около 25%.

Показано, что увеличение кратности введения сказывается на эффективности лекарства значительно существеннее, чем величина однократной дозы. Наиболее

выраженные различия между АБЗ и его композициями АБЗ-АГ были получены при исследовании суммарной дозы препарата 300 мг/кг, вводимые животным 6 дней подряд, при ежедневном введении по 50 мг/кг (**Таблица 7**), а также суммарной дозы препарата 75 мг/кг, вводимые животным 3 дня подряд, при ежедневном введении по 25 мг/кг (**Таблица 7**). Выживаемость паразитов при приеме заявляемых композиций АБЗ-АГ в дозах 6x50 мг/кг составила 4-10%. При этом многие животные оказались полностью излечены от описторхозной инвазии, тогда как использование исходного АБЗ приводило к уничтожению только 70% паразитов. Выживаемость паразитов при приеме заявляемых композиций в дозе 3x25 мг/кг составила 60-35%, тогда как исходный АБЗ в этой дозе был неэффективен.

Таким образом, при равных дозировках антигельминтная активность комплексов АБЗ-АГ существенно выше, чем активность официального альбендазола (Dushkin et al., 2012).

Более того, при сравнении результатов с тестированием празиквантела *in vivo* (глава 3.1.) было обнаружено, что эффективность действия комплексов АБЗ-АГ на модели экспериментального описторхоза с использованием золотистых хомячков близка к терапевтической эффективности празиквантела. Таким образом, результаты данной работы подтверждают возможность создания лекарственных средств для лечения описторхоза на основе межмолекулярных комплексов альбендазола с арабиногалактаном. Кроме того, поскольку празиквантел и альбендазол обладают различными механизмами действия на гельминтов, можно предположить, что комбинаторное действие празиквантела и комплексов альбендазола с арабиногалактаном на *O. felineus* окажется более эффективным, чем индивидуальное действие этих препаратов.

Таблица 7. Исследование антигельминтного действия альбендазола (АБЗ) и его композиции с АГ в массовых соотношениях 1:5, 1:10 и 1:20 *in vivo* на модели экспериментального описторхоза.

№ П.п.	Состав композиции	Доза ЛВ на 1 живот ное мг/кг	Кратность приема	Суммарная доза ЛВ, мг/г	Выживаемость паразитов, % *
1		0	6	0	100
2	АГ	0	6	0	100
3	АБЗ	500	3	1500	25
4	АБЗ	50	6	300	30
5	АБЗ:АГ (1:5)	50	6	300	10
6	АБЗ:АГ (1:10)	50	6	300	6
7	АБЗ:АГ (1:20)	50	6	300	4
8	АБЗ	25	6	150	45
9	АБЗ:АГ (1:5)	25	6	150	50
10	АБЗ:АГ (1:10)	25	6	150	36
11	АБЗ:АГ (1:20)	25	6	150	25
12	АБЗ	25	3	75	100
13	АБЗ:АГ (1:5)	25	3	75	65
14	АБЗ:АГ (1:10)	25	3	75	51
15	АБЗ:АГ (1:20)	25	3	75	40

* (количество выживших червей в опыте / количество червей в контроле)

Глава. 3.3. Тестирование антигельминтной активности ингибиторов P450

В настоящее время активно ведется поиск новых препаратов против трематодозов (Keiser et al., 2013; Cowan, Keiser, 2015;), как с помощью скрининга библиотек химических соединений, так и исследований паразитарных белков в качестве новых молекулярных белковых мишеней для разработки таргетных препаратов.

С этой точки зрения, цитохром P450 может быть перспективной белковой мишенью для разработки препаратов против трематодозов. Принимая во внимание наши предыдущие данные по снижению выживаемости червей при нокдауне гена CYP, можно заключить, что этот ген важен для выживаемости паразитов. Поскольку все паразитические плоские черви, включая печеночных сосальщиков (Opisthorchiidae, Fasciolidae), кровяных двуусток (Schistosomatidae), и цестод (Taeniidae) обладают только одним геном CYP (Pakharukova et al., 2012), можно подавлять монооксигеназную активность CYP с помощью селективных ингибиторов.

Для тестирования антигельминтной активности были выбраны универсальные азольные ингибиторы CYP – кетоконазол, миконазол, триадименол, клотримазол, 4-фенил имидазол (4PIM). Как было продемонстрировано в **Главе 2.1.4 (Таблица 3)**, все эти вещества являются лигандами CYP и формируют спектр, соответствующий спектрам типа 2 лигандов (ингибиторов) фермента CYP. Таким образом, мы использовали эти вещества для того, чтобы ингибировать активность CYP450 у описторхов и определить, будут ли эффекты ингибирования монооксигеназной активности CYP приводить к изменениям фенотипа и выживаемости паразитов на разных стадиях развития.

Кроме того, были также протестированы другие ингибиторы гем-содержащих ферментов, обладающие отличной от азольных ингибиторов структурой: дисульфирам, метирапон, бензил изотиоцианат (BITC), тиклопидин (**Таблица 8**). Тестирование препаратов с помощью стандартных тестов на подвижность на эксцистированных метацеркариях показало, что часть препаратов вызывало обездвиживание гельминтов. На основании результатов, полученных через 24 часа обработки была оценена подвижность червей и вычислены параметры полу-эффективных концентраций препаратов. Наиболее эффективным препаратом оказался миконазол (IC₅₀ 0.79 μM) (**Таблица 8, Рисунок 46**), и клотримазол (IC₅₀ 1,25 μM) (**Таблица 8, Рисунок 46**).

Таблица 8. Значения IC₅₀ тестируемых соединений ингибиторов гем-содержащих ферментов человека против взрослой и ювенильной (эксцистированные метацеркарии) форм *Opisthorchis felineus*.

Соединение	Эксцист. метацеркарии IC ₅₀ ± SE (µM)	Взрослые IC ₅₀ ± SE (µM)	Ингибирование гем-содержащих ферментов человека
празиквантел	0.98±0.18	0.47±0.05	Нет данных
миконазол	0.79±0.18	20.05±0.09	2B6, 2C9, 2C19, 3A4, 2A6, 2D6 (Zhang, 2002)
клотримазол	1.25±0.33	18.03±0.35	2B6, 2C9, 2C19 3A4, 2A6 (Zhang, 2002)
кетоконазол	16±1.25	13.77±0.48	2C9, 3A4 (Zhang, 2002)
ВИТС	16±0.08	27.2±0.06	2B1, 2B6, 1A1, 2E1 (Montellano, 2005)
4PIМ	368±29	1050±48	Индоламин-пиррол-2,3-диоксигеназа
триадименоол	220±17.5	208±45	Ароматаза и CYP51 (Warrilow et al., 2013)
тиклопидин	40±4.2	147±36	2C19, 2B6 (Montellano, 2005)
метирапон	199±13.3	99±0.51	3A4, 11-р-гидроксилаза (Montellano, 2005)
дисульфирам	764±104	364±62	CYP2E1, Алкоголь дегидрогеназа

Данные представлены в виде IC₅₀ ± стандартная ошибка ('drc 3.0-1' R package). ANOVA lack-of-fit тест был использован для вероятностной оценки гипотезы, что подходящая регрессионная модель подходила для анализа данных ('drc 3.0-1' R package). P-value был всегда выше 0.94.

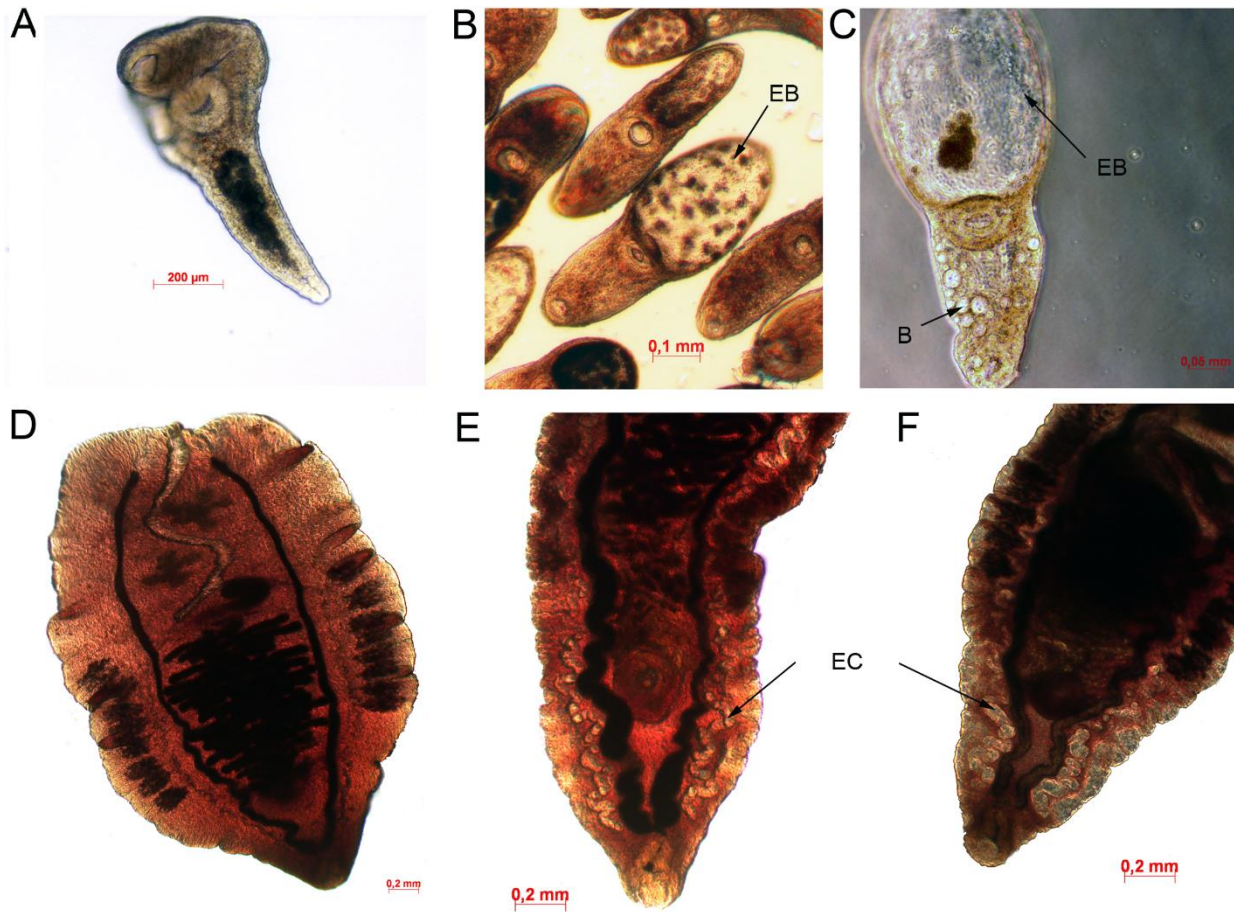


Рисунок 46. Общий вид взрослых червей (D-F) и эксцистированных метацеркарий (A-C) *O. felineus* через 1 день после обработки миконазолом и клотримазолом *in vitro*. А. 1% ДМСО; В. 10 μМ клотримазол; С. 5 μМ миконазол. D. 1% ДМСО; Е. 10 μМ клотримазол; F. 10 μМ миконазол. EB—экскреторный пузырь; EC—экскреторные каналы; B—образование пузырей.

Важно отметить, что миконазол, таким образом, проявил также эффективно против ювенильных червей (эксцистированных метацеркарий), как и стандартное лекарство празиквантел PZQ (IC_{50} 0,98 μ M). При этом, другие азольные ингибиторы 4-фенил имидазол, триадеминол практически не влияли на подвижность червей (IC_{50} >100 μ M) (Таблица 8). Среди ингибиторов неазольной структуры наиболее сильной антигельминтной активностью обладал ВТС (IC_{50} 16 μ M). Дисульфирам и метирапон не влияли на подвижность эксцистированных метацеркарий, т.е. не обладали антигельминтной активностью. Наиболее эффективными препаратами против взрослых червей также оказались ингибиторы азольной структуры CZ и MZ (Таблица 9), однако их активность была немного слабее против взрослых червей, чем против эксцистированных метацеркарий.

После обработки клотримазолом, миконазолом и кетоконазолом наблюдали выраженные фенотипические изменения в форме и размерах выделительных канальцев червя. В частности, у всех взрослых червей, обработанных 10 μ M клотримазолом и 10 μ M миконазолом наблюдали увеличение размеров выделительных канальцев взрослых червей через 1 и 3 суток (Рисунок 46), в ответ на 40 μ M кетоконазол изменения наблюдались только у 70% взрослых особей. У эксцистированных метацеркарий наблюдали обездвиживание, увеличение размеров экскреторного пузыря и появление пузырей на поверхности тела в ответ на обработку 10 μ M клотримазолом и 5 μ M миконазолом (Рисунок 46). Похожие изменения фенотипа, такие как образование пузырей, наблюдаются при действии празиквантела (Pakharukova et al., 2015; Day, Botros, 2006), свидетельствующие о повреждении тегумента. Кроме того, подобную деформацию выделительной системы мы ранее также наблюдали при нокдауне гена CYP. Таким образом, наиболее эффективными антигельминтными свойствами обладали ингибиторы азольной структуры, которые вызывали тот же самый фенотипический эффект, нарушая форму и размеры выделительной системы, что и ранее нокдаун гена CYP у *Opisthorchis felineus* (Pakharukova et al., 2015).

Предварительные данные показали, что нокдаун гена CYP влияет на выживаемость взрослых червей (Pakharukova et al., 2015). Для исследования ингибиторов CYP на выживаемость, взрослых и ювенильных (эксцистированных метацеркарий) червей обрабатывали различными ингибиторами CYP и содержали длительное время (до 18 дней) без смены среды. Была показана 100% смертность эксцистированных метацеркарий

через 1 день после обработки 10 μM миконазолом, через 3 дня после 10 μM клотримазола, и через 7 дней после 40 μM кетоконазола (**Рисунок 47**). В то время, как 10 μM ВІТС, 10 μM дисульфирам, 10 μM 4-фенил имидазол, 1% ДМСО в течение длительного воздействия не оказывали эффекта на выживаемость эксцистированных метацеркарий (**Рисунок 47**). Выживаемость червей после 18 дней обработки составляла около 75-80% в группах ВІТС, 4РІМ, 1% ДМСО; и 60% после дисульфирама (**Рисунок 47**).

Мы показали, что ингибиторы гем-содержащих ферментов, в частности азольные ингибиторы СУР, и повсеместно применяемые антигрибковые препараты, обладают разной антигельминтной активностью. Наиболее эффективной антигельминтной активностью обладали миконазол и клотримазол на ювенильных и взрослых червях, что продемонстрировано нами, как с помощью тестов на подвижность, так и с помощью оценки выживаемости при инкубации в течение длительного времени. При этом миконазол (IC_{50} 0.79 μM) был так же эффективен против эксцистированных метацеркарий, как и PZQ (IC_{50} 0.98 μM) и вызывал смертность 100% червей через 1 сутки в дозе 10 μM . Необходимо принять во внимание, что миконазол в настоящее время используется как препарат для лечения людей. Концентрация миконазола Стмах в крови человека при назначении орально, составляет 94 μM (Cardot, 2004). Эти цифры более чем в 9 раз превышают концентрацию миконазола смертельную для эксцистированных метацеркарий *in vitro*, и в 100 раз выше, чем IC_{50} для эксцистированных метацеркарий. Миконазол и клотримазол обладают самым широким спектром ингибиторной активности из тестируемых соединений против цитохромов P450 (**Таблица 8**) (Zhang et al., 2002), в отличие от них 4РІМ and триадименол являются слабыми ингибиторами СУР, но сильными ингибиторами индоламин-пиррол 2,3-диоксигеназы и ароматазы человека, соответственно (Warrilow et al., 2013). То же можно сказать и об ингибиторах неазольной структуры, наиболее эффективным среди них был ВІТС, который обладает самым широким спектром активности против цитохромов P450. В то время, как метирапон, дисульфирам, тиклопидин – ингибиторы специфические к отдельным СУР (**Таблица 8**) обладали либо низкой антигельминтной активностью, либо не проявляли ее совсем.

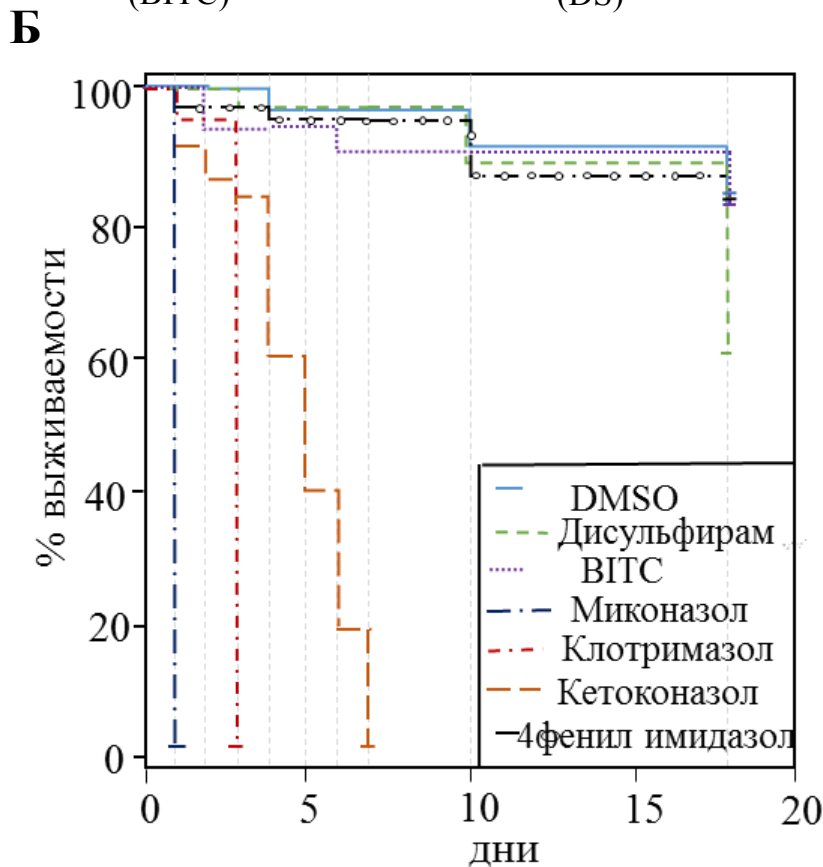
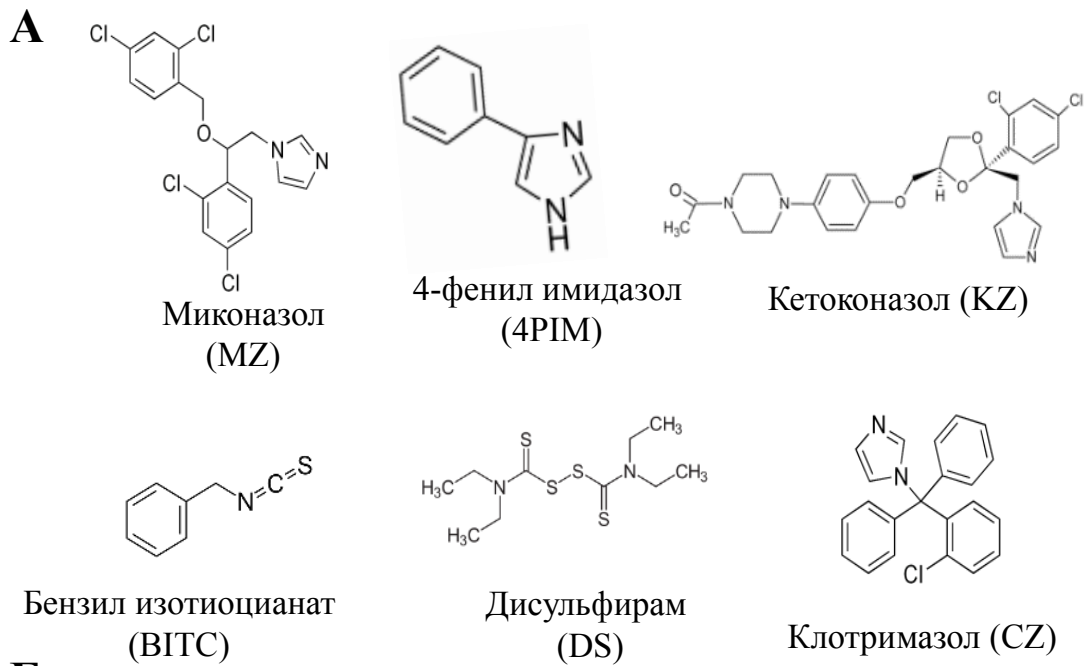


Рисунок 47. Структуры тестируемых ингибиторов (А) и кривые выживаемости Каплана-Мейера (Б) А. MZ – миконазол; KZ – кетоконазол; BITC – бензил изотиоцианат; DS – дисульфирам; CZ – клотримазол. Б. Эксцистированные метациркаррии обработаны: 10 μ M BITC, 10 μ M дисульфирам, 10 μ M миконазол, 10 μ M клотримазол, 10 μ M 4PIM, 40 μ M кетоконазол, 1% ДМСО. Статистические различия оценивались с помощью лог-рэнк теста (Мантеля Хенцеля) между каждыми двумя кривыми. Статистические различия наблюдали при сравнении группы ДМСО ($p < 0.0001$) или BITC ($p < 0.0001$) или дисульфирама ($p < 0.0001$) с какой либо из групп (миконазол, клотримазол, кетоконазол) и не наблюдали различий при сравнении группы 4PIM и ДМСО ($p = 0.77$) (пакет 'survival'(v.2.38) R).

ОБСУЖДЕНИЕ

Данная работа посвящена фундаментальной проблеме молекулярной паразитологии и биохимии – комплексному исследованию функционирования метаболических систем, связанных с биотрансформацией и транспортом, как экзогенных, так и эндогенных субстратов у печеночных паразитов человека и животных *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884). Знание закономерностей функционирования этих систем необходимо для понимания адаптации биохимических процессов паразитов к существованию в организме хозяина, а также формирования механизмов устойчивости к антипаразитарной терапии.

Необходимость приспособливаться к условиям существования, повышая вероятность выживания и самовоспроизведения, является у паразитических организмов двигателем регрессии одних органов и систем, и высокой специализации других. Яркими примерами биохимических адаптаций к паразитизму в форме симплификации базисных метаболических систем может служить редукция пути синтеза холестерина и жирных кислот, в частности, это показано на примере шистосом (Young et al., 2014), а так же монооксигеназной системы цитохромов P450 (CYPome). Реализуемая цитохромами P450 реакция монооксигеназного катализа является необходимым звеном в обеспечении жизнедеятельности организмов, начиная с простейших и заканчивая многоклеточными эукариотами (Montellano, 2005). Белки этой системы присутствуют у всех живых организмов и участвуют в процессах обмена стероидов, желчных кислот, метаболизме холестерина, ненасыщенных жирных кислот, фенольных метаболитов, в синтезе простагландинов, а также в нейтрализации ксенобиотиков и лекарств.

Количество генов в геномах, кодирующих СУР (CYPome), различно, начиная от единичных форм у ряда видов бактерий и грибов, заканчивая десятками форм у млекопитающих и сотнями СУР генов у растений. Мы показали, что у свободноживущих червей CYPome представлен десятками дивергированных форм (Pakharukova et al., 2012), тогда как все известные на сегодня геномы паразитических плоских червей обладают только одним геном цитохрома P450, вне зависимости от сложности жизненного цикла и среды обитания этих видов. В частности, печеночные сосальщики (Opisthorchiidae, Fasciolidae), кровяные двуустки (Schistosomatidae), и представители цестод (Taeniidae),

паразитирующие в кишечнике, обладают только одним CYP450 (Pakharukova et al., 2012). Недавние геномные исследования группы цестод также подтвердили полученные нами данные (Tsai et al., 2013).

В отношении половозрелой стадии жизненного цикла печеночных сосальщиков можно допускать, что мариты, колонизирующие желчные протоки, где компоненты их среды обитания уже прошли «барьер» ферментативной системы CYP450 и других типов оксигеназ печени хозяина, практически не нуждаются в наличии многокомпонентной монооксигеназной системы. В контексте вышесказанного наиболее вероятными представляются два сценария функциональной и каталитической активности CYP450. С одной стороны, этот фермент может обладать достаточно широкой субстратной специфичностью и участвовать в метаболизме значительного спектра экзогенных соединений, в том числе лекарственных препаратов. В этом случае биологическая роль CYP450 может быть ориентирована на механизмы защиты и адаптации паразитов. Альтернативно, эволюционная сохранность этого фермента может быть связана и с его узкой специализацией в рамках какого-либо критически важного эндогенного процесса, например, биотрансформации ключевого эндогенного субстрата. По нашим данным, CYP описторхид может участвовать в метаболизме экзогенных соединений, при этом способен метаболизировать субстраты, характерные для CYP2E1, CYP2B, CYP3A, но не CYP1A млекопитающих. Интересно, что были обнаружены большие скопления флюоресцентных частиц размером около 5 микрон в районе выделительных канальцев описторха. Это свидетельствует об образовании продукта реакции монооксигеназ – резорурфина в районе выделительной системы и активном участии CYP в системе экскреции, но не в кишечнике и окружающих кишечник тканях. По-видимому, роль CYP ассоциирована с выделительной системой описторха, возможно с метаболизмом и детоксикацией. На связь белка CYP с выделительной системой также указывают морфологические изменения червей в результате подавления экспрессии гена CYP с помощью РНК-интерференции и воздействия специфических азольных ингибиторов активности CYP. У гельминтов со сниженной экспрессией гена P450 или сниженной активности белка CYP были заметны деформации экскреторных канальцев и экскреторного пузыря. Кроме того, эти особи обладали сниженной жизнеспособностью.

Взрослые особи *O. felineus* могут находиться в печени человека более 30 лет (Беэр, 2005), и все это время паразиты сталкиваются с теми же ксенобиотиками, лекарствами и токсинами, что и человек. Однако, в отличие от человека, единственной формы цитохрома паразиту оказывается достаточно, чтобы выполнять общую функцию детоксикации, поддержания гомеостаза. По-видимому, структура этого фермента такова, что он способен модифицировать не один, а много типов субстратов. Это явление интересно с эволюционной точки зрения, как дивергенция функций белков, приобретение белками новых функций. Более того, чрезвычайно интересным вопросом является эволюция вышестоящего регуляторного аппарата, обеспечивающего восприятие сигнала от разнообразных соединений, - процесса, в котором у млекопитающих участвуют различные и непохожие по структуре транскрипционные факторы – рецепторы ксенобиотиков (Montellano, 2005; Xu et al., 2005).

Важным результатом работы было определение специфических оксистерольных метаболитов в лизатах описторха и их секреция в окружающие ткани хозяина. На сегодняшний день актуальность исследования специфических оксистеролов подчеркивается строгим фактом соответствия продукции таких оксистеролов и канцерогенностью гельминтов. В частности, *O. viverrini* и *S. haematobium* – биологические канцерогены для человека 1-го класса опасности производят специфические генотоксические оксистеролы. В отличие от них, *S. mansoni* (Dr. Jose Correia da Costa, персональные сообщения) и *F. hepatica* (наши результаты) не производят специфические оксистерольные метаболиты.

Поскольку некоторые из этих метаболитов подвергались дальнейшей биотрансформации при попадании в ткани хозяина, многие из метаболитов были представлены уже не в начальной, а метаболитизированной форме. Оксистерольные соединения могут быть реакционноспособны и генотоксичны. В нашем исследовании мы подтвердили генотоксичность оксистеролов, т.к. многие из найденных метаболитов были конъюгированы с пуриновыми основаниями ДНК. Косвенно это может служить дополнительным доказательством роли оксистеролов в патогенезе описторхоза и сопутствующих заболеваний.

Известно, что на модели экспериментального описторхоза на золотистых хомяках при образовании холангиокарциномы *O. felineus* является митогеном, т.е. способствует

пролиферации инициированных клеток, тем самым выступая в роли промотора опухоли (Maksimova et al., 2015). Для опухолевого роста необходимы определенные условия, способствующие митозу инициированных клеток. Такие условия, судя по всему, возникают при описторхозе. Действительно, печень больных описторхозом значительно увеличивается в размерах, клетки протоков активно пролиферируют и формируют кисты. Очень близкая картина патологических изменений печени регистрируется и при экспериментальном описторхозе золотистых хомячков. Описторхоз сопровождается хроническим воспалительными процессами, фиброзом, пролиферацией желчных протоков, инфильтрацией клетками воспаления, формированием гранулем. Механизм развития холангиокарциномы под действием печеночных сосальщиков до конца не исследован. Есть основания предполагать, что специфические генотоксические метаболиты, такие как оксистеролы являются существенной составляющей канцерогенного потенциала описторхид (Brindley et al., 2015).

Механизм, с помощью которого продуцируются специфические оксистеролы, неизвестен. Можно предполагать, как энзиматические, так и неэнзиматические пути синтеза этих соединений. Возможно, что оксистеролы генерируются с помощью монооксигеназы гельминта P450, вероятен также неэнзиматический путь – через конъюгирование желчных кислот и большого числа кислородных радикалов. К сожалению, на данный момент наше исследование не дает ответа на этот вопрос. В дальнейшем, если удастся добиться устойчивого подавления экспрессии гена P450, лизаты таких гельминтов следует протестировать на предмет наличия специфических оксистеролов. Возможно также, что рентгеноструктурный анализ кристаллической формы P450 описторхид позволит ответить на вопрос, подходит ли субстратный карман для оксистерольных молекул.

В продукции оксистеролов нельзя исключать вовлеченность других ферментативных систем, таких как глутатион-S-трансфераз или тиоредоксинпероксидаз или другие ферментов, участвующих в окислительно-восстановительных реакциях в клетках гельминтов. Белки, вовлеченные в ферментативный путь генерации специфических генотоксических оксистеролов, по-видимому, будут наиболее важны при поиске молекулярной терапевтической белковой мишени для лечения паразитозов.

Важным этапом в работе стало выявление особенностей фазы конъюгации у плоских червей. Дело в том, что многие тест-системы для оценки эффективности противопаразитарных препаратов ориентированы преимущественно на свободноживущих гельминтов, в частности, очень популярной моделью для тестирования является нематода *C. elegans*. Учитывая выявленные нами особенности организации системы метаболизма ксенобиотиков у паразитических плоских червей, фармакокинетика антигельминтных препаратов у *C. elegans* может отличаться кардинально, т.к. у этого организма присутствует огромное количество UGT-трансфераз, ферментов, образующих глюкуронозильные производные препаратов. В этом плане метаболизм *C. elegans* похож на метаболизм млекопитающих. У млекопитающих до 90% метаболитов лекарств в моче – это глюкуронозильные производные. Однако мы показали, что у плоских червей такие ферменты в принципе отсутствуют, таким образом при тестировании препаратов на нематодах такие существенные различия в метаболизме у круглых и плоских червей должны быть учтены.

Важным результатом работы было также обнаружение четырех генов гомологов Р-гликопротеина человека и их функциональной активности в районе экскреторной системы. При этом два гена (P1 и P4) имели ярко выраженный дифференциальный характер экспрессии. Более того, очень важно, что один из генов P4 регулировался с помощью гемоглобина и желчи хомяка, что, по-видимому, свидетельствует о роли именно этого гомолога Р-гликопротеина в транспорте желчных кислот и, возможно, оксистеролов. Необходимо отметить, что именно Р-гликопротеины, в свете их широко известной роли в формировании лекарственной устойчивости и выраженной индуцибельности, некоторые исследователи связывают с резистентностью к празиквантелу (Dr. Charles Cunningham, персональные сообщения). При выполнении экспериментов по экспрессии и индуцибельности Р-гликопротеинов, результаты цифровой ПЦР время от времени заводили нас в тупик, т.к. экспрессия Р-гликопротеинов – как базовая, так и индуцированная – могла варьировать от особи к особи в несколько раз (5-10 раз). В ходе обсуждения этих результатов, стало очевидно, что такие изменения в экспрессии могут и не быть экспериментальной ошибкой. Ранее мы показали, что в популяции описторхов Западной Сибири существует определенная гетерогенность – часть гельминтов менее подвержены действию празиквантела, и обладают способностью быстрее восстанавливаться после его парализующего действия. Можно предполагать, что

эти гельминты могут отличаться по базовому уровню экспрессии Р-гликопротеинов и по способности их к индукции. Это может быть началом другого исследования по изучению механизмов резистентности к празиквантелу.

Важной находкой работы было то, что азольные соединения являются лигандами (ингибиторами) рекомбинантных цитохромов Р450 описторхид. Это позволило нам исследовать, каким образом направленное ингибирование монооксигеназной активности Р450 отражается на поддержании фенотипа и выживаемости гельминтов. В конечном итоге, некоторые из азольных ингибиторов, как мы показали, обладают высокими антигельминтными свойствами. Более того, эффективность клотримазола и миконазола была выше, чем эффективность празиквантела. Антипаразитарная терапия против цитохромов Р450 гельминтов может быть перспективным подходом с точки зрения перенаправления уже существующих и активно применяемых лекарственных препаратов, разрешенных к применению Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (Food and Drug Administration, FDA, US FDA). Стандарты этого агентства касаются применения многих лекарственных препаратов и взяты за «золотой стандарт» по всему миру. С этой точки зрения многие азольные препараты, в частности миконазол, одобрены FDA и применяются в клинической практике.

В конечном счете, есть все основания считать, что СYP450 и система Р-гликопротеинов представляют собой важные фармацевтические мишени, как для самостоятельной направленной терапии, так и для комбинаторной терапии совместно с другими официально признанными антигельминтными препаратами.

В-целом, необходимо заключить, что в данной работе мы ставили своей целью исследование структурно-функциональной организации системы метаболизма и транспорта ксенобиотиков у описторхид. При этом мы показали структурную организацию, функциональность этой системы в отношении экзогенных субстратов, а также значение активности этой системы для выживаемости гельминтов. Остается еще много вопросов, на которые предстоит ответить исследователям биохимии гельминтов. В частности, остаются неизвестными эндогенные функции этой системы. Кроме того, важным и требующим дальнейших исследований остается вопрос того, как эволюционный аспект симплификации базисной монооксигеназной системы CYPome у

паразитов отражается на функциональности этой системы. Как развивается биохимическая адаптация в эволюционном контексте: уменьшение количества генов сопровождается расширением функций продукта этого гена, т.е. широкой субстратной специфичности белка; либо регрессия остальных белков сопровождается высокой специализацией этого единственного белка.

ВЫВОДЫ

- Впервые установлено, что в геномах описторхид *O. felineus*, *O. viverrini*, *C. sinensis* представлены гены, кодирующие белки биотрансформации и транспорта ксенобиотиков. У паразитических плоских червей печеночных сосальщиков (Opisthorchiidae, Fasciolidae), кровяных двуусток (Schistosomatidae), и цестод (Taeniidae) в геноме присутствует всего один ген CYP, в отличие от десятков генов у свободноживущих видов плоских червей.
- Продукт гена CYP *O. felineus* функционально активен, в тканях гельминта монооксигеназная CYP активность ассоциирована с экскреторной системой; экспрессия гена CYP и его активность важны для поддержания фенотипа и выживаемости взрослых описторхов.
- В лизатах взрослых червей, а также яйцах *O. felineus* найдены специфические генотоксические оксистерольные метаболиты, их состав и количество отличается от метаболитов *O. viverrini* и *F. hepatica*. В крови, моче и желчи зараженных описторхами хомяков найдены оксистерольные метаболиты *O. felineus*, и оксистеролы *O. felineus*, конъюгированные с основаниями ДНК.
- Азольные соединения (клотримазол, кетоконазол, миконазол, эконазол) обладают константами связывания с рекомбинантными цитохромами P450 описторхид в микромолярном диапазоне концентраций и проявляют выраженные антигельминтные свойства.
- В геномах описторхид найдено 4 гена гомолога Р-гликопротеинов человека. Р-гликопротеины описторха участвуют в выведении ксенобиотиков из тканей. Экспрессия гена P4 регулируется в ответ на гемоглобин и желчь хомяков. Активность Р-гликопротеинов описторха сосредоточена в районе экскреторных каналов.
- Впервые установлено, что состав ферментов фазы конъюгации у плоских и круглых червей различен. В геномах круглых червей наиболее представлены гены

УДФ-глюкуронозил трансфераз, в геномах *Opisthorchiidae* и *Schistosomatidae* этот класс ферментов полностью отсутствует.

- СУР и Р-гликопротеины – перспективные молекулярные мишени для разработки антигельминтных препаратов сфокусированного действия, как самостоятельные мишени, так и в качестве комбинаторной терапии с официальными антигельминтными препаратами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Альперович, Б.И. Описторхозные стриктуры большого дуоденального сосочка / Альперович Б.И., Абушахманов В.К. // *Анналы хирургической патологии.* - 1999. - Т. 4. - № 1. - С. 71-77.
2. 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.
3. Беэр, С.А. Биология возбудителя описторхоза/ С.А. Беэр. – Москва, Товарищество научных изданий КМК, 2005. – 336 с.
4. Бражникова, Н.А. Хирургические осложнения хронического описторхоза / Н.А. Бражникова // *Анналы хирургической патологии.* – 1997. – Т. 2. – С. 88-93
5. Бражникова, Н.А. Рак печени, желчных путей и поджелудочной железы при хроническом описторхозе / Бражникова Н.А., Толкаева М.В. // *Бюллетень сибирской медицины.* – 2002. – № 2. – С. 71-77.
6. Бражникова, Н.А. Клиника, диагностика и лечение осложнений описторхоза Бражникова Н.А., Цхай В. Ф. // *Анналы хирургической патологии.* 2004. –Т. 9. - № 2. – С. 40–44.
7. Бражникова, Н.А. Гнойный описторхозный холангит / Бражникова Н.А., Цхай В.Ф. // *Анналы хирургической гепатологии.* – 2009. – Т. 14. – № 4. – С. 28-33.
8. Бронштейн, А.М. Клинико-иммунологическая характеристика очагов описторхоза в Ямало-Ненецком автономном округе и результаты лечения празиквантелом / Бронштейн А.М., Золотухин В.А, Гитсу Г.А., Сабгайда Т.П., Парфенов С.Б. // *Мед. паразитология.* –1991. – № 5. – С. 12-16.
9. Глумов, В.Я. Патогенез и морфология первичного рака печени, развившегося на фоне описторхоза / Глумов В.Я., Котриков В.В., Третьякова Н.А. // *Вопросы онкологии.* – 1974. – № 9. – С. 87-90.
10. Зубов, Н.А. Описторхоз в Тобольске по данным аутопсии за 1950-1987 гг / Зубов Н.А., Беликов Е.С., Зайцева Л.Н. // *Мед. паразитология.* – 1989. – № 5. – С. 10-13.

11. 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.
12. 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.
13. Онищенко, С.В. Острый холангит у больных, проживающих в эндемическом очаге описторхоза / Онищенко С.В., Дарвин В.В., Лысак М.М. // Анналы хирургической гепатологии. – 2009. – Т. 14. – № 2. – С. 38-43.
14. Патютко, Ю.И. Хирургическое лечение первичного рака печени / Патютко Ю.И., Сагайдак И.В., Чучуев Е.С., Гахраманов А.Д., Иванов А.А. // Практическая онкология. – 2008. – Т. 9. – № 4. – С.197-201.
15. 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.
16. Пельгунов, А.Н. Проблемы описторхоза и дифиллоботриоза в нижнем течении Иртыша / Пельгунов А.Н. // Российский паразитологический журнал. – 2012. – № 3. – С. 68-73.
17. Ромашов, Б.В. Описторхоз в бассейне Верхнего Дона (Воронежская область): фауна описторхид, эколого-биологические закономерности циркуляции и очаговость описторхидозов/ Б.В. Ромашов; В.А. Ромашов, В.А. Семенов. – Воронеж: ВГУ, 2005. – 201 с.
18. 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
19. Халиков, С.С. Механохимическая модификация антигельминтных препаратов / Халиков С.С., М.С. Халиков, Е.С. Метелева, С.А. Гуськов, В.И. Евсеенко, А.В.

- Душкин, В.С. Буранбаев, Р.Г. Фазлаев, В.З. Галимова, А.М. Галиуллина. // Химия в интересах устойчивого развития. – 2011. – Т.19. – № 6. – С.699-703.
20. Чаклин, А.В. Итоги эпидемиологических исследований первичного рака печени в Тюменской области / Чаклин А.В., Шайн А.А. // Вопросы онкологии. – 1976. – Т 22. – №1. - С. 76-81.
21. Чистяченко, Ю.С. Физико-химические свойства и противоописторхозное действие механохимически синтезированных супрамолекулярных комплексов албендазола и полисахарида арабиногалактана из лиственниц *Larix sibirica* и *Larix gmelinii* / Чистяченко Ю.С., Хвостов М. В., Белоусов А.И., Жукова Н.А., Пахарукова М.Ю., Катохин А.В., Халиков С.С., Толстикова Т.Г., Душкин А.В., Мордвинов В.А., Ляхов Н.З. // Доклады Академии Наук. – 2014. – Т. 456. –№ 6. – С. 1–3.
22. Завойкин, В.Д. Структура нозоареала описторхоза в Обь Иртышском бассейне / Завойкин В.Д., Дарченкова Н.Н., Зеля О.П. // Мед. паразитол. и паразитарн. болезни. –1991. – № 6. - С. 25-28.
23. Abdulla, M.H. Drug discovery for schistosomiasis: hit and lead compounds identified in a library of known drugs by medium-throughput phenotypic screening. / Abdulla M.H., Ruelas D.S., Wolff B., Snedecor J., Lim K.C., Xu F., Renslo A.R., Williams J., McKerrow J.H., Caffrey C.R. // PLoS Negl Trop Dis. – 2009. – V. 3. – I. 7. – e478.
24. Akuffo, H. Parasites of the Colder Climates. / Akuffo H, Linder E, Ljungström I, Wahlgren M. // London and New York: CRC Press; 2002.
25. Alvarez, L.I. Drug transfer into target helminth parasites. / Alvarez L.I., Mottier M., Lanusse C.E. // Trends Parasitol. – 2007. – V. 23. – I. 3. – P. 97-104.
26. Andrews, P. Praziquantel / Andrews P., Thomas H., Pohlke R., Seubert J. // Med Res Rev. –1983. –V. 3. – I. 2. – P. 147-200.
27. Apinhasmit, W. *Opisthorchis viverrini*: Effect of praziquantel on the adult tegument / Apinhasmit W., Sobhon P. // Southeast Asian J Trop Med Public Health. – 1996. – V. 27. – I. 2. – P.304-311.
28. Benedict, A. Repurposing FDA-approved drugs as therapeutics to treat Rift Valley fever virus infection / Benedict A., Bansal N., Senina S., Hooper I., Lundberg L., de la Fuente C., Narayanan A., Gutting B., Kehn-Hall K. // Front Microbiol. – 2015. 6:676, doi: 10.3389/fmicb.2015.00676.

29. Berasain, P. Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components / Berasain P., Goni F., McGonigle S., Dowd A., Dalton J.P., Frangione B., Carmona C. // *J Parasitol.* – 1997. – 83. – P.1–5.
30. Bertrand, S. Evolutionary crossroads in developmental biology: amphioxus Bertrand S., Escriva H. // *Development.* 2011. – 138. – P. 4819-30.
31. Board, P.G. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology / Board P.G., Menon D. // *Biochim Biophys Acta.* – 2013. – V. 1830. – I. 5. – P. 3267-3288.
32. Brindley, P.J. Why does infection with some helminths cause cancer? / Brindley P.J., Correia da Costa J.M., Sripa B. // *Trends Parasitol.* –2015. –1. –P.174-182.
33. Brusentsov, I.I. Low genetic diversity in wide-spread Eurasian liver fluke *Opisthorchis felineus* suggests special demographic history of this trematode species / Brusentsov I.I., Katokhin A.V., Brusentsova I.V., Shekhovtsov S.V., Borovikov S.N., Goncharenko G.G., Lider L.A., Romashov B.V., Rusinek O.T., Shibitov S.K., Suleymanov M.M., Yevtushenko A.V., Mordvinov V.A. // *PLoS One.* – 2013. – V. 8. – I.4. – e62453.
34. Burke, M.D. Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver / Burke M.D., Thompson S., Weaver R.J., Wolf C.R., Mayer R.T. // *Biochem Pharmacol.* – 1994. – V. 48. – I. 5. – P. 923-936.
35. Callahan, H.L. Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants? / Callahan H.L., Crouch R.K., James E.R. // *Parasitol Today.* –1988. – V. 4. – I. 8. – P. 218-225.
36. Cardot, J.M. Comparison of the pharmacokinetics of miconazole after administration via a bioadhesive slow release tablet and an oral gel to healthy male and female subjects / Cardot J.M., Chaumont C., Dubray C., Costantini D., Aiache J.M. // *Br J Clin Pharmacol.* – 2004. –V. 58. – I 4. – P. 345–351.
37. Cavalieri, E.L. Unbalanced metabolism of endogenous estrogens in the etiology and prevention of human cancer / Cavalieri E.L., Rogan E.G. // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* –2011. –V. 125. – P. 169-180.
38. Chan J.D. Ca²⁺ channels and Praziquantel: A view from the free world // *Parasitol Int.* 2012. –pii: S1383-5769(12)00161-4.
39. 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. // *J Infect Dis.* – 2015. – V. 212. – I. 10. – P. 1636-1645.
40. Chistyachenko, Y.S. A physicochemical and pharmacological study of the newly synthesized complex of albendazole and the polysaccharide arabinogalactan from larch wood / Chistyachenko Y.S., Meteleva E.S., Pakharukova M.Y., Katokhin A.V., Khvostov M.V., Varlamova A.I., Glamazdin I.I., Khalikov S.S., Polyakov N.E., Arkhipov I.A., Tolstikova T.G., Mordvinov V.A., Dushkin A.V., Lyakhov N.Z. // *Current Drug Delivery.* – 2015. – V. 12. – I. 5. – P. 477-490.
41. Chou, T.C. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors / Chou T.C., Talalay P. // *Adv Enzyme Regul.* – 1984. – V. 22. – P. 27-55.
42. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method // *Cancer Res.* – 2010. – V. 70. – I. 2. – P. 440-446.
43. 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., Sripa B., Santos L.L., Santos J.H., Rinaldi G., Brindley P.J. // *Front. Genet* – 2014. – V. 5. – P. 444-447.
44. Cowan, N. Repurposing of anticancer drugs: *in vitro* and *in vivo* activities against *Schistosoma mansoni* / Cowan N., Keiser J. // *Parasit Vectors.* – 2015. – V. 8. – P. 417-421.
45. Cvilink, V. Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths / Cvilink V., Lamka J., Skálová L. // *Drug Metab Rev.* – 2009. – V. 41. – I. 1. – P. 8-26.
46. Dassa E. and Bouige P. The ABC of ABCS: A phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms // *Res Microbiol.* – 2001. V. 152. – P. 211–229.
47. Daorueang, D. Secreted *Opisthorchis viverrini* glutathione S-transferase regulates cell proliferation through AKT and ERK pathways in cholangiocarcinoma / Daorueang D., Thuwajit P., Roittrakul S., Laha T., Kaewkes S., Endo Y., Thuwajit C. // *Parasitol Int.* – 2012. – V. 61. – P. 155–161.

48. Day, T.A. Drug Resistance in Schistosomes. In Maule AG, Marks NJ, editors. Parasitic Flatworms: Molecular Biology, Biochemistry, Immunology and Physiology/ Day T.A., Botros S. – London: CABI, 2006. – P. 256-265.
49. Devine, C. Potentiation of triclabendazole action in vivo against a triclabendazole-resistant isolate of *Fasciola hepatica* following its co-administration with the metabolic inhibitor, ketoconazole / Devine C., Brennan G.P, Lanusse C.E., Alvarez L.I., Trudgett A., Hoey E., Fairweather I. // Vet Parasitol. – 2012. – V. 184. – I. 1. – P. 37-47.
50. Dissous, C. *Schistosoma mansoni* Polo-like kinases and their function in control of mitosis and parasite reproduction / Dissous C., Grevelding C.G., Long T. // An Acad Bras Cienc. – 2011. – V. 83. – I. 2. – P. 627-635.
51. Doenhoff, M.J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis / Doenhoff M.J., Cioli D., Utzinger J. // Curr Opin Infect Dis. – 2008. – V. 21. – I. 6. – P. 659-667.
52. Dong, J. Flavonoids and Naphthoflavonoids: Wider roles in the modulation of cytochrome P450 family1 Enzymes / Dong J., Zhang Q., Cui Q., Huang G., Pan X., Li S. // ChemMedChem. – 2016. – V. 6. – I. 11. – P. 2102-2118.
53. Donnelly, S. Thioredoxin Peroxidase Secreted by *Fasciola hepatica* Induces the Alternative Activation of Macrophages / Donnelly S., O'Neill S.M., Sekiya M., Mulcahy G., Dalton J.P. // Infection and immunity. – 2005. – V. 73. – I. 1. – P. 166–173.
54. Driscoll, M.D. Expression and characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CYP144: common themes and lessons learned in the *M. tuberculosis* P450 enzyme family / Driscoll M.D., McLean K.J., Cheesman M.R., Jowitt T.A., Howard M., Carroll P., Parish T., Munro A.W. // Biochim Biophys Acta. – 2011. – V. 1814. – I. 1. – P.76-87.
55. Dunford, A.J. Rapid P450 Heme Iron Reduction by Laser Photoexcitation of *Mycobacterium tuberculosis* CYP121 and CYP51B1 / Dunford A.J., McLean K.J., Sabri M., Seward H.E., Heyes D.J., Scrutton N.S., Munro A.W.// J Biol Chem. – 2007. – V. 282. – I. 34. – P. 24816-24824.
56. Dushkin, A.V. Complexes of polysaccharides and glycyrrhizic acid with drug molecules. Mechanochemical synthesis and pharmacological activity / Dushkin A.V.,

- T.G. Tolstikova, M.V. Khvostov, G.A. Tolstikov.// in book *The Complex World of Polysaccharides*, ed. by Dr. D.N. Karunaratne. – INTECH. – 2012. – P. 573-602.
57. Fallon, P.G. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific / Fallon P.G., Doenhoff M.J.// *Am J Trop Med Hyg.* – 1994. – V. 51. – P. 83–88.
58. Gottesman, M.M. The molecular basis of multidrug resistance in cancer: The early years of P-glycoprotein research / Gottesman M.M. and Ling V. // *FEBS Lett.* – 2006. – V. 580. – P. 998 – 1009.
59. Gouveia, M.J. Estrogen-like metabolites and DNA-adducts in urogenital schistosomiasis-associated bladder cancer / Gouveia M.J., Santos J., Brindley P.J., Rinaldi G., Santos J., Santos L.L., Correia da Costa J.M., Vale N. // *Cancer Lett.* – 2015. – V. 359. – P. 226-232.
60. Greenberg, R.M. Ca²⁺signalling, voltage-gated Ca²⁺channels and praziquantel in flatworm neuromusculature / R.M. Greenberg // *Parasitology.* – 2005. – V. 131. – Suppl.S97-108.
61. Greenberg, R.M. ABC multidrug transporters in schistosomes and other parasitic flatworms / R.M. Greenberg // *Parasitology international.* – 2013. – V. 62. – I. 6. – P. 647-653.
62. Griffiths, W.J. Bile acids: analysis in biological fluids and tissues / Griffiths W.J., Sjövall J. // *J. Lip. Res.* – 2010. – I. 51. – P. 23-41.
63. Gunatilleke, S.S. Diverse inhibitor chemotypes targeting *Trypanosoma cruzi* CYP51. / Gunatilleke S.S., Calvet C.M., Johnston J.B., Chen C.K., Erenburg G., Gut J., Engel J.C., Ang K.K., Mulvaney J., Chen S., Arkin M.R., McKerrow J.H., Podust L.M. // *PLoS Negl Trop Dis.* – 2012. – V. 6. – I. 7. – e1736.
64. Hagemeyer, C.E. 7-Benzyloxyresorufin-O-dealkylase activity as a marker for measuring cytochrome P450 CYP3A induction in mouse liver / Hagemeyer C.E., Bürck C., Schwab R., Knoth R., Meyer R.P. // *Anal Biochem.* – 2010. – V. 398. – I. 1. – P. 104-111.
65. He, X. Role of metabolic enzymes P450 (CYP) on activating procarcinogen and their polymorphisms on the risk of cancers / He X., Feng S. // *Curr Drug Metab.* – 2015. – V. 16. – I. 10. – P. 850-863.

66. Higgins C.F. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters // Nature. – 2007. – V. 446. – P. 749 – 757.
67. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. Biological agents. Volume 100B. A review of Human carcinogens. IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 2012.
68. IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Biological agents, 1994. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Hum. – V. 61. – P. 121-175.
69. James, C.E. Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest? James C.E., Hudson A.L., Davey M.W. // Trends in Parasitology. – 2009. – V.25. – I. 7. – P. 328-334.
70. James, C.E. Increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermectin resistance in the model nematode *Caenorhabditis elegans* / James C.E., Davey M.W. // Int J Parasitol. – 2009. – V. 39. – I. 2. – P. 213-220.
71. Janssen, I.J. *Caenorhabditis elegans*: modest increase of susceptibility to ivermectin in individual P-glycoprotein loss-of-function strains / Janssen I.J., Krücken J., Demeler J., von Samson-Himmelstjerna G.// Exp Parasitol. – 2013. – V. 134. – I. 2. – P. 171-177.
72. Jaworski, C.J. A family of 12 human gene containing oxysterol-binding domains / Jaworski C.J., Moreira E., Li A., Lee R., Rodriguez I.R. // Genomics. – 2001. – V. 78. – P. 185-196.
73. Jukasul, A. Mechanisms of oxysterol-induced carcinogenesis / Jukasul A., Yongvanit P., Loilome W., Namwat N., Kuver R. // Lip. Health Dis. – 2011. – V. 10. – P. 44-48.
74. Juliano, R.L. Surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants / Juliano R.L. and Ling V. // Biochim Biophys Acta. – 1976. – V. 455. – P. 152–162.
75. Kasinathan, R.S. Genetic knockdown and pharmacological inhibition of parasite multidrug resistance transporters disrupts egg production in *Schistosoma mansoni* / Kasinathan R.S., Morgan W.M., Greenberg R.M. // PLoS Negl Trop Dis. – 2011. – V. 5. – I. 12. – e1425.
76. Keiser, J. Activity of tribendimidine and praziquantel combination therapy against the liver fluke *Opisthorchis viverrini* *in vitro* and *in vivo* / Keiser J., Adelfio R., Vargas M., Odermatt P., Tesana S. // J Helminthol. – 2013. – V. 87. – P. 252-256.

77. Keiser, J. Interactions of mefloquine with praziquantel in the *Schistosoma mansoni* mouse model and *in vitro* / Keiser J., Manneck T., Vargas M. // J Antimicrob Chemother. – 2011. – V. 66. – P. 1791-1797.
78. Keiser, J. Evaluation of the *in vivo* activity of tribendimidine against *Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica*, *Clonorchis sinensis*, and *Opisthorchis viverrini* / Keiser J., Shu-Hua X., Chollet J., Tanner M., Utzinger J. // Antimicrob Agents Chemother. – 2007. – V. 51. – I. 3. – P. 1096-1098.
79. Keiser, J. Artemisinins and synthetic trioxolanes in the treatment of helminth infections / Keiser J., Utzinger J. // Curr Opin Infect Dis. – 2007. – V. 20. – I. 6. – P. 605-612.
80. Keiser, J. The Drugs We Have and the Drugs We Need Against Major Helminth Infections / Keiser J., Utzinger J. // Adv Parasitol. – 2010. – V. 73. – P. 197-230.
81. Kelley, L.A. Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server / Kelley L.A. and Sternberg M.J.E. // Nature Protocols. – 2009. – V. 4. – P. 363-371.
82. Kieu, T.L. (Clonorchiasis in the People's Republic of Vietnam. 2. The clinico-parasitological examination of a focus and a trial of praziquantel treatment) / Kieu T.L., Bronshtein A.M., Sabgaida T.P. // Med Parazitol (Mosk). – 1992. – P. 7-11.
83. King, S. Trematodes of the family Opisthorchiidae: a minireview / King S., Scholz T. // Korean journal of parasitology. – 2001. – V. 39. – I. 3. – P. 209–221.
84. Knudsen, G.M. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* cercarial secretions / Knudsen G.M., Medzihradsky K.F., Lim K.C., Hansell E., McKerrow J.H. // Mol Cell Proteomics. – 2005. – V. 4. . – I. 12. – P. 1862-1875.
85. Kotze, A.C. Recent advances in candidate-gene and whole-genome approaches to the discovery of anthelmintic resistance markers and the description of drug/receptor interactions / Kotze A.C., Hunt P.W., Skuce P., von Samson-Himmelstjerna G., Martin R.J., Sager H., Krücken J., Hodgkinson J., Lespine A., Jex A.R., Gilleard J.S., Beech R.N., Wolstenholme A.J., Demeler J., Robertson A.P., Charvet C.L., Neveu C., Kaminsky R., Rufener L., Alberich M., Menez C., Prichard R.K. // Int J Parasitol Drugs Drug Resist. – 2014. – V. 4. – I. 3. – P. 164-184.
86. Kulas, J. Cytochrome P450-dependent metabolism of eicosapentaenoic acid in the nematode *Caenorhabditis elegans* / Kulas J., Schmidt C., Rothe M., Schunck W.H., Menzel R. // Arch Biochem Biophys. – 2008. – V. 472. – I. 1. – 65-75.

87. Kusel, J.R. The schistosome excretory system: a key to regulation of metabolism, drug excretion and host interaction / Kusel J.R., McVeigh P., Thornhill J.A. // Trends Parasitol. – 2009. – V. 25. – I. 8. – P. 353-358.
88. Lifschitz, A. Macrocyclic lactones and cellular transport-related drug interactions: a perspective from in vitro assays to nematode control in the field / Lifschitz A., Ballent M., Lanusse C. // Curr Pharm Biotechnol. – 2012. – V. 13. – I. 6. – P. 912-923.
89. Lima, R.M. Enantioselective analysis of praziquantel and trans-4-hydroxypraziquantel in human plasma by chiral LC-MS/MS: Application to pharmacokinetics / Lima R.M., Ferreira M.A., Ponte T.M., Marques M.P., Takayanagui O.M., Garcia H.H. // J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. – 2009. – V. 877. – P. 3083-3088.
90. Loukas, A. Receptor for Fc on the surfaces of schistosomes / Loukas A., Jones M.K., King L.T., Brindley P.J., McManus D.P. // Infect Immun. – 2001. – V. 69. – P. 3646–51.
91. 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. – V. 61. – I. 1. – P. 167–172.
92. 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. – 2015. – pii: S1383-5769(15)00166-X.
93. Marcilla, A. Extracellular vesicles from parasitic helminths contain specific excretory/secretory proteins and are internalized in intestinal host cells / Marcilla A., Trelis M., Cortes A., Sotillo J., Cantalapiedra F., Minguez M.T., Valero M.L., Sanchez del Pino M.M., Munoz-Antoli C., Toledo R., Bernal D. // PLoS One. – 2012. – V. 7. – e45974.
94. Marr, J.J. Molecular Medical Parasitology/ Marr J.J., Nilsen T.W., Komuniecki R.W. Elsevier Ltd., 2003. – 488p.
95. Matchimakul, P. Apoptosis of cholangiocytes modulated by thioredoxin of carcinogenic liver fluke / Matchimakul P., Rinaldi G., Suttiprapa S., Mann V.H., Popratiloff A., Laha T., Pimenta R.N., Cochran C.J., Kaewkes S., Sripa B., Brindley P.J. // Int J Biochem Cell Biol. – 2015. – V. 65. – P. 72-80.

96. Matoušková, P. The Role of xenobiotic-metabolizing enzymes in anthelmintic deactivation and resistance in helminths / Matoušková P, Vokřál I, Lamka J, Skálová L. // Trends Parasitol. – 2016. – V. 32. – I. 6. – P. 481-491.
97. McCall, L.I. Targeting Ergosterol biosynthesis in *Leishmania donovani*: essentiality of sterol 14 alpha-demethylase / McCall L.I., El Aroussi A., Choi J.Y., Vieira D.F., De Muylder G., Johnston J.B., Chen S., Kellar D., Siqueira-Neto J.L., Roush W.R., Podust L.M., McKerrow J.H. // PLoS Negl Trop Dis. – 2015. – V. 9. – I. 3. –:e0003588.
98. Mordvinov, V.A. *Opisthorchis felinus* and *Metorchis bilis* are the main agents of liver fluke infection of humans in Russia / Mordvinov V.A., Yurlova N.I., Ogorodova L.M., Katokhin A.V. // Parasitol Int. – 2012. – V. 61. – I. 1. –P. 25-31.
99. Morphew, R.M. Comparative proteomics of excretory-secretory proteins released by the liver fluke *Fasciola hepatica* in sheep host bile and during in vitro culture ex host / Morphew R.M., Wright H.A., LaCourse E.J., Woods D.J., Brophy P.M. // Mol Cell Proteomics. – 2007. – I. 6. – P. 963–972.
100. Mulvenna, J. The secreted and surface proteomes of the adult stage of the carcinogenic human liver fluke *Opisthorchis viverrini* / Mulvenna J., Sripa B., Brindley P.J., Gorman J., Jones M.K., Colgrave M.L., Jones A., Nawaratna S., Laha T., Suttiprapa S., Smout M.J., Loukas A. // Proteomics. – 2010. – I. 10. – P. 1063–1078.
101. Na, B. Critical roles for excretory–secretory cysteine proteases during tissue invasion of *Paragonimus westermani* newly excysted metacercariae / Na B., Kim S., Lee E., Kim T., Bae Y., Kang I., Yu J., Sohn W., Cho S., Kong Y. // Cellular Microbiology. – 2006. – V. 8. – I. 6. – P. 1034–1046.
102. Olliaro, P. The little we know about the pharmacokinetics and pharmacodynamics of praziquantel (racemate and R-enantiomer) / Olliaro P, Delgado-Romero P, Keiser J. // J Antimicrob Chemother. – 2014. – V. 69. – I. 4. – P. 863-870.
103. Omura, T. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature / Omura T. and Sato R. // J Biol Chem. – 1964. – V. 239. – P. 2370-2378.
104. Ortiz de Montellano, P.R. (Ed.) Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry. / Paul R. Ortiz de Montellano (Ed). – 3rd ed. Kluwer Academic, Plenum Publishers, New York, 2005. – 912p.

105. Ovchinnikov, V.Y. Identification of microRNA genes in three opisthorchiids / Ovchinnikov V.Y., Afonnikov D.A., Vasiliev G.V., Kashina E.V., Sripa B., Mordvinov V.A., Katokhin A.V. // PLoS Negl Trop Dis. – 2015. – V. 9. – I. 4. – e0003680.
106. Pakharukova, M.Y. Cytochrome P450 in fluke *Opisthorchis felineus*: Identification and characterization / Pakharukova M.Y., Ershov N.I., Vorontsova E.V., Katokhin A.V., Merkulova T.I., Mordvinov V.A. // Molecular and Biochemical Parasitology. – 2012. – V. 181. – P. 190–194.
107. Pakharukova, M.Y. Identification of thyroid hormone receptor homologs in the fluke *Opisthorchis felineus* (Platyhelminthes) / Pakharukova M.Y., Ershov N.I., Vorontsova E.V., Shilov A.G., Merkulova T.I., Mordvinov V.A. // Molecular and Biochemical Parasitology. – 2014. – V. 194. – I. 1-2. – P. 64-68.
108. Pakharukova, M.Y. The liver fluke *Opisthorchis felineus*: biology, epidemiology, and carcinogenic potential / Pakharukova M.Y. and Mordvinov V.A. // Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. – 2016. – V. 110. – P. 28–36.
109. 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. // Int J Antimicrob Agents. – 2015. – V. 46. – I. 1. – P. 94–100.
110. Pakharukova, M.Y. Functional analysis of the unique cytochrome P450 of the liver fluke *Opisthorchis felineus* / Pakharukova M.Y., Vavilin V.A., Sripa B., Laha T., Brindley P.J., Mordvinov V.A. // PLOS Negl Trop Dis. – 2015. – V. 9. – I. 12. – e0004258.
111. Papatpremsiri, A. Suppression of *Ov-grn-1* encoding granulin of *Opisthorchis viverrini* inhibits proliferation of biliary epithelial cells / Papatpremsiri A., Smout M.J., Loukas A., Brindley P.J., Sripa B., Laha T. // Exp Parasitol. – 2015. – V. 148. – P. 17-23.
112. Park, T.J. Molecular cloning and characterization of a paramyosin from *Clonorchis sinensis* / Park T.J., Kang J.M., Na B.K., Sohn W.M. // Korean J Parasitol. – 2009. – V. 47. – P. 359–367.
113. Peak, E. Development and validation of a quantitative, high-throughput, fluorescent-based bioassay to detect schistosoma viability Peak E., Chalmers I.W., Hoffmann K.F. // PLoS Negl Trop Dis. – 2010. – I. 4. – e759.

114. Petney, T.N. The zoonotic, fish-borne liver flukes *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis felineus* and *Opisthorchis viverrini* / Petney T.N., Andrews R.H., Saijuntha W., Wenz-Mücke A., Sithithaworn P. // Int J Parasitol. – 2013. – V. 43. – I. 12-13. – P. 1031-1046.
115. Pica-Mattocchia, L. Cytochalasin D abolishes the schistosomicidal activity of praziquantel / Pica-Mattocchia L., Valle C., Basso A., Troiani A.R., Vigorosi F., Liberti P., Festucci A., Cioli D. // Exp Parasitol. – 2007. – V. 115. – I. 4. – P. 344-351.
116. Piccoli, P. *In vivo* CYP2E1 phenotyping as a new potential biomarker of occupational and experimental exposure to benzene / Piccoli P., Carrieri M., Padovano L., Di Mare M., Bartolucci G.B., Fracasso M.E., Lepera J.S., Manno M. // Toxicol Lett. – 2010. – V. 192. – I. 1. – P. 29-33.
117. Pomaznoy, M. Adult *Opisthorchis felineus* major protein fractions deduced from transcripts: comparison with liver flukes *Opisthorchis viverrini* and *Clonorchis sinensis* / Pomaznoy M., Tatkov S., Katokhin A., Afonnikov D., Babenko V., Furman D., Brusentsov I., Belavin P., Najakshin A., Guselnikov S., Vasiliev G., Sivkov A., Prokhortchouk E., Skryabin K., Mordvinov V. // Exp Parasitol. – 2013. – V. 135. – I. 2. – P. 297-306.
118. Porubsky, P.R. Structures of human cytochrome P-450 2E1. Insights into the binding of inhibitors and both small molecular weight and fatty acid substrates / Porubsky P.R., Meneely K.M., Scott E.E. // J Biol Chem. – 2008. – V. 283. – I. 48. – P. 33698-33707.
119. Pozio, E. *Opisthorchis felineus*, an emerging infection in Italy and its implication for the European Union / Pozio E., Armignacco O., Ferri F., Gomez Morales M.A. // Acta Trop. – 2013. – V. 126. – P. 54–62.
120. Robinson, M.W. A family of helminth molecules that modulate innate cell responses via molecular mimicry of host antimicrobial peptides / Robinson M.W., Donnelly S., Hutchinson A.T., To J., Taylor N.L., Norton R.S., Perugini M.A., Dalton J.P. // PLoS Pathog. – 2011. – I. 7. – e1002042.
121. Robinson, M.W. The comparative metabolism of triclabendazole sulphoxide by triclabendazole-susceptible and triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica* Robinson M.W., Lawson J., Trudgett A., Hoey E.M., Fairweather I. // Parasitol Res. – 2004. – V. 92. – I. 3. – P. 205-210.

122. Robinson, M.W. An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: proteins associated with invasion and infection of the mammalian host / Robinson M.W., Menon R., Donnelly S.M., Dalton J.P., Ranganathan S. // Mol Cell Proteomics. – 2009. – I. 8. – P. 1891–1907.
123. Rottiers, V. Hormonal control of *C. elegans* dauer formation and life span by a Rieske-like oxygenase / Rottiers V., Motola D.L., Gerisch B., Cummins C.L., Nishiwaki K., Mangelsdorf D.J., Antebi A. // Dev Cell. – 2006. – V. 10. – I. 4. – P. 473-482.
124. Sabat, J. Characterization of the Proximal Ligand in the P420 Form of Inducible Nitric Oxide Synthase Sabat J., Stuehr D.J., Yeh S.R., Rousseau D.L. // J Am Chem Soc. – 2009. – V. 131. – P. 12186-12192.
125. Saeed, H.M. Evidence for the presence of active cytochrome P450 systems in *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* adult worms / Saeed H.M., Mostafa M.H., O'Connor P.J., Rafferty J.A., Doenhoff M.J. // FEBS Lett. – 2002. – V. 519. – I. 1-3. – P. 205-209.
126. Sambrook J.; Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2001. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York
127. Savoia D. New antimicrobial approaches: reuse of old drugs. Curr Drug Targets. – 2015
128. Schuster, R.K. Liver flukes in dogs and treatment with praziquantel / Schuster R.K., Heidrich J., Pauly A., Nöckler K. // Vet Parasitol. – 2007. – V. 150. – P. 362-365.
129. Sithithaworn, P. Roles of liver fluke infection as risk factor for cholangiocarcinoma / Sithithaworn P., Yongvanit P., Duengai K., Kiatsopit N., Pairojkul C. // J Hepatobiliary Pancreat Sci. – 2014. – V. 21. – I. 5. – P. 301-308.
130. Smout, M.J. A Granulin-Like Growth Factor Secreted by the Carcinogenic Liver Fluke, *Opisthorchis viverrini*, Promotes Proliferation of Host Cells / Smout M.J., Laha T., Mulvenna J., Sripa B., Suttiaprapa S., Jones A., Brindley P.J., Loukas A. // PLoS Pathog. – 2009. – V. 5. – I. 10. – e1000611.
131. Solana, H. Albendazole enantiomeric metabolism and binding to cytosolic proteins in the liver fluke *Fasciola hepatica* / Solana H., Scarcella S., Virkel G., Ceriani C., Rodríguez J., Lanusse C. // Vet Res Commun. – 2009. – V. 33. – P. 163-173.

132. Soukhathammavong, P. Efficacy and safety of mefloquine, artesunate, mefloquine-artesunate, tribendimidine, and praziquantel in patients with *Opisthorchis viverrini*: a randomised, exploratory, open-label, phase 2 trial / Soukhathammavong P., Odermatt P., Sayasone S., Vonghachack Y., Vounatsou P., Hatz C., Akkhavong K., Keiser J. // Lancet Infect Dis. – 2011. – V. 11. – I. 2. – P. 110-118.
133. 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 Parasitol. – 2012. – V. 28. – I. 10. – P. 395-407.
134. 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. – e201.
135. 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. // Adv Parasitol. – 2010. – V. 72. – P. 305-350.
136. Sripa, B. Cholangiocarcinoma: lessons from Thailand / Sripa B., Pairojkul C. // Curr Opin Gastroenterol. – 2008. – V. 24. – I. 3. – P. 349-356.
137. Sripa, B. Toward integrated opisthorchiasis control in northeast Thailand: the Lawa project / Sripa B., Tangkawattana S., Laha T., Kaewkes S., Mallory F.F., Smith J.F., Wilcox B.A. // Acta Trop. – 2015. – V. 141. – Pt B. – P. 361-367.
138. Staudt, U. Light and scanning electron microscopy studies on the effects of the enantiomers of praziquantel and its main metabolite on *Schistosoma mansoni in vitro* / Staudt U., Schmahl G., Blaschke G., Mehlhorn H. // Parasitol Res. – 1992. – V. 78. – P. 392-397.
139. Strube, C. Evaluation of reference genes for quantitative real-time PCR to investigate protein disulfide isomerase transcription pattern in the bovine lungworm *Dictyocaulus viviparus* / Strube C., Buschbaum S., Wolken S., Schnieder T. // Gene. – 2008. – 425. – I. 1-2. – P. 36-43.
140. Sun, L. Novel Conformational Transitions of Human Cytochrome P450 2C8 during Thermal and Acid-induced Unfolding / Sun L., Wang Z., Jiang H., Tan X., Huang Z. // Chin J Chem. – 2010. – V. 28. – P. 1491-1502.
141. Thanasuwan, S. Suppression of aquaporin, a mediator of water channel control in the carcinogenic liver fluke, *Opisthorchis viverrini* / Thanasuwan S., Piratae S.,

- Brindley P.J., Loukas A., Kaewkes S., Laha T.// *Parasit Vectors*. – 2014. – I. 7. – P. 224-229.
142. Theodoulou, F.L. ABC transporter research: going strong 40 years on / Theodoulou F.L., Kerr I.D. // *Biochem Soc Trans*. – 2015. – V. 43. – I. 5. – P. 1033-1040.
143. Thunyaharn, N. Survival of cholangiocarcinoma patients in northeastern Thailand after supportive treatment / Thunyaharn N., Promthet S., Wiangnon S., Suwanrungruang K., Kamsa-ard S.// *Asian Pac J Cancer Prev*. – 2013. – V. 14. – I. 11. – P. 7029-7032.
144. Tsai, I.J. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism Tsai I.J., Zarowiecki M., Holroyd N., Garcarrubio A., Sanchez-Flores A., Brooks K.L., Tracey A., Bobes R.J., Fragoso G., Sciutto E., Aslett M., Beasley H., Bennett H.M., Cai J., Camicia F., Clark R., Cucher M., De Silva N., Day T.A., Deplazes P., Estrada K., Fernández C., Holland P.W., Hou J., Hu S., Huckvale T., Hung S.S., Kamenetzky L., Keane J.A., Kiss F., Koziol U., Lambert O., Liu K., Luo X., Luo Y., Macchiaroli N., Nichol S., Paps J., Parkinson J., Pouchkina-Stantcheva N., Riddiford N., Rosenzvit M., Salinas G., Wasmuth J.D., Zamanian M., Zheng Y.; Taenia solium Genome Consortium, Cai X., Soberón X., Olson P.D., Laclette J.P., Brehm K., Berriman M. // *Nature*. – 2013. – V. 496. – I. 7443. – P. 57-63.
145. Vale, N. Carcinogenic liver fluke *Opisthorchis viverrini* oxysterols survey of soluble fraction parasite extract / Vale N., Gouveia M.J., Botelho M., Sripa B., Suttiaprapa S., Rinaldi G., Gomes P., Brindley P.J., Correia da Costa J.M.// *Parasitol. Int*. – 2013. – V. 62. – P. 535-542.
146. van den Enden E. Pharmacotherapy of helminth infection // *Expert Opin Pharmacother*. – 2009. – V. 10. – I. 3. – P. 435-451.
147. van Lieshout, L. The contribution of host-related factors to low cure rates of praziquantel for the treatment of *Schistosoma mansoni* in Senegal / van Lieshout L., Stelma F.F., Guisse F., Falcao Ferreira S.T., Polman K., van Dam G.J., Diakhate M., Sow S., Deelder A., Gryseels B.// *Am J Trop Med Hyg*. – 1999. – V. 61. – P. 760 -765.
148. Verma, S. CYP5122A1, a novel cytochrome P450 is essential for survival of *Leishmania donovani* / Verma S., Mehta A., Shaha C // *PLoS One*. – 2011. – V. 6. – I. 9. – e25273.

149. Vieira, D.F. Binding mode and potency of N-indolyloxopyridinyl-4-aminopropanyl-based inhibitors targeting *Trypanosoma cruzi* CYP51 / Vieira D.F., Choi J.Y., Calvet C.M., Siqueira-Neto J.L., Johnston J.B., Kellar D., Gut J., Cameron M.D., McKerrow J.H., Roush W.R., Podust L.M. // J Med Chem. – 2014. – V. 57. – I. 23. – P. 10162-10175.
150. Warrilow, A.G. Azole Affinity of Sterol 14-Demethylase (CYP51) Enzymes from *Candida albicans* and *Homo sapiens* Warrilow A.G., Parker J.E., Kelly D.E., Kelly S.L. // Antimicrob Agents Chemother. – 2013. – V. 57. – I. 3. – P. 1352-13560.
151. Werck-Reichhart, D.W. Cytochromes P450: a success story / Werck-Reichhart D.W. and Feyereisen R. // Genome Biology. – 2000. – 1(6). – reviews3003.1-9.
152. Wu, W. New insight into praziquantel against various developmental stages of schistosomes / Wu W., Wang W., Huang Y.X. // Parasitol Res. – 2011. – V. 109. – P. 1501-1507.
153. Xiao, S.H. Comparative effect of mebendazole, albendazole, tribendimidine, and praziquantel in treatment of rats infected with *Clonorchis sinensis* / Xiao S.H., Xue J., Xu L.L., Zhang Y.N., Qiang H.Q. // Parasitol Res. – 2011. – V. 108. – I. 3. – P. 723-730.
154. Xu, C. Induction of Phase I, II and III Drug Metabolism/Transport by Xenobiotics Xu C., Li C. Y., Kong A.T. // Arch Pharm Res. – 2005. – V. 28. – I. 3. – P. 249-268.
155. Xu, L.L. (*In vitro* effect of seven anthelmintic agents against adult *Clonorchis sinensis*) Xu L.L., Xue J., Zhang Y.N., Qiang H.Q., Xiao S.H. // Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi. – 2011. – V. 29. – P. 10-15.
156. Yan, R. The role of several ABC transporter genes in ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans* / Yan R., Urdaneta-Marquez L., Keller K., James C.E., Davey M.W., Prichard R.K. // Vet Parasitol. – 2012. – V. 190. – I. 3-4. – P. 519-529.
157. Young, N.D. The *Opisthorchis viverrini* genome provides insights into life in the bile duct / Young N.D., Nagarajan N., Lin S.J., Korhonen P.K., Jex A.R., Hall R.S., Safavi-Hemami H., Kaewkong W., Bertrand D., Gao S., Seet Q., Wongkham S., Teh B.T., Wongkham C., Intapan P.M., Maleewong W., Yang X., Hu M., Wang Z., Hofmann A., Sternberg P.W., Tan P., Wang J., Gasser R.B. // Nat Commun. – 2014. – I. 5:4378.

158. Zhang, W. Inhibition of cytochromes P450 by antifungal imidazole derivatives / Zhang W., Ramamoorthy Y., Kilicarslan T., Nolte H., Tyndale R.F., Sellers E.M. // Drug Metab Dispos. – 2002. – V. 30. – I. 3. – P. 314-318.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

CYP, P450	– цитохромы P450
CYPome	– совокупность цитохромов P450 у одного организма
ЭСП	– экскреторно-секреторный продукт
GST	– глутатион-S-трансферазы
AP-сайт	– апуриновый сайт
ABC-транспортеры	– ATP-binding cassette, АТФ-связывающие белки
УГТ	– UDP-глюкуронозилтрансферазы
NAT	– N-ацетилтрансферазы
MT	– метилтрансферазы
MDR	– множественная лекарственная устойчивость
ФМО	– флаavin-содержащие монооксигеназы
HDM	– host defense molecule, белки защиты хозяина
PZQ	– празиквантел
АБЗ	– альбендазол
CLZ	– хлорзоксазон
6OH-CLZ	– 6-гидрокси хлорзоксазон
4PIМ	– 4-фенил имидазол
MZ	– миконазол
KZ	– кетоконазол
BITC	– бензил изотиоцианат
DS	– дисульфирам
CZ	– клотримазол
IC ₅₀	– концентрация полумаксимального ингибирования
LC-MS/MS	– метод жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией

ПЕРЕЧЕНЬ ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

- Таблица 1 Список используемых праймеров
- Таблица 2 Выбор штамма и условий для экспрессии в *E.coli* рекомбинантных белков CYP450 *O. felineus*, *C. sinensis*.
- Таблица. 3 Величины констант связывания ингибиторов и цитохрома P450 *C. sinensis*.
- Таблица 4 Гены белков ABCB1 *O. felineus* гомологичные Р-гликопротеинам человека (MDR1).
- Таблица 5 Результаты тестирования празиквантела *in vivo* на хомяках с острым (1 мес) и хроническим (3 мес) описторхозом.
- Таблица 6 Результаты тестирования празиквантела *in vitro* на взрослых маритах и эксцистированных метацеркариях *O. felineus*.
- Таблица 7 Исследование антигельминтного действия альбендазола (АБЗ) и его композиции с АГ в массовых соотношениях 1:5, 1:10 и 1:20 *in vivo* на модели экспериментального описторхоза.
- Таблица 8 Значения IC₅₀ тестируемых соединений ингибиторов гем-содержащих ферментов человека против взрослой и ювенильной (эксцистированные метацеркарии) форм *Opisthorchis felineus*.
- Рисунок 1 Жизненный цикл *Opisthorchis felineus*.
- Рисунок 2 *O. felineus* и природная среда обитания (Pakharukova, Mordvinov, 2016).
- Рисунок 3 Карта распространенности заболеваемости описторхозом на территории Западной Сибири согласно данным Росэпидемнадзора за 2012 год (Pakharukova, Mordvinov, 2016).
- Рисунок 4 Позиции окисления стероидного кольца и пример 2-3 катехолэстрогена *S. haematobium*.

- Рисунок 5 Апуриновый сайт в структуре ДНК.
- Рисунок 6 Потенциальные механизмы развития холангиокарциномы (Sripa and Pairojkul, 2008).
- Рисунок 7 Цитохром P450.
- Рисунок 8 Строение АТФ-связывающего канала.
- Рисунок 9 Схема строения тегумента *Schistosoma mansoni*.
- Рисунок 10 Вектор pCW-lac для экспрессии рекомбинантных CYP450.
- Рисунок 11 Результаты анализа растворимых фракций взрослых червей и яиц *O. felineus* с помощью жидкостной хроматографии и двойной масс-спектрометрии.
- Рисунок 12 Оксистерол-подобные молекулы, найденные с помощью LC-MS/MS в экстрактах *O. felineus*.
- Рисунок 13 Метаболиты оксистерольной структуры, найденные в экстрактах яиц *O. felineus*.
- Рисунок 14 Сравнение результатов исследований растворимых фракций взрослых червей *O. felineus*, *O. viverrini*, *Fasciola hepatica* с помощью жидкостной хроматографии и двойной масс-спектрометрии.
- Рисунок 15 Сравнение оксистеролов в разных биологических жидкостях у зараженных хомяков.
- Рисунок 16 Гистопатология печени контрольных (А) и зараженных *O. felineus* хомяков (В-Е) через 3 месяца после инвазии.
- Рисунок 17 *In silico*: состав системы CYP в геномах Platyhelminthes.
- Рисунок 18 Схематическая структура и консервативные районы в последовательности белка CYP *O. felineus*.
- Рисунок 19 Моделирование 3D структуры OF CYP (Phyre2).

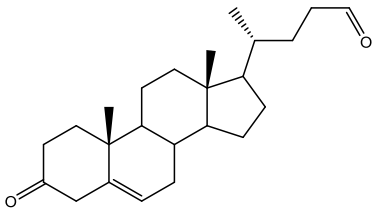
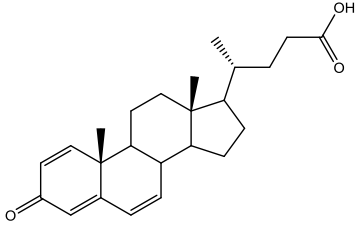
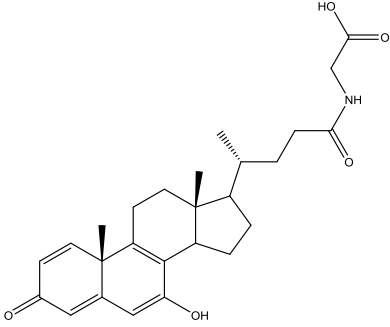
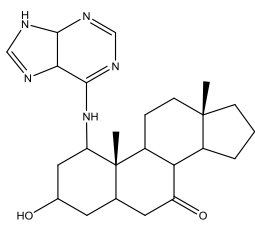
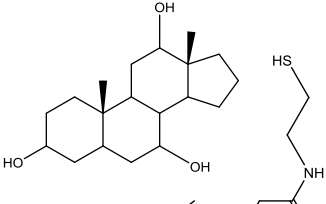
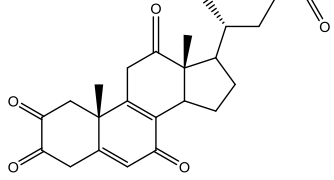
- Рисунок 20 Суперпозиция OF CYP с human CYP2E1 (Phyre2). Голубым
- Рисунок 21 Последовательность белка *O. felineus* CYP и экспрессия мРНК этого гена на разных стадиях жизненного цикла.
- Рисунок 22 Спектроскопический анализ микросомальной фракции, выделенной из взрослой особи *O. felineus* при различных рН (7.4-8.5).
- Рисунок 23 Уровень мРНК OF CYP после обработки *in vitro* *O. felineus* в течение 20 часов различными ксенобиотиками (оценка методом ПЦР в режиме реального времени (А, В) и Цифровой капельной ПЦР (С)).
- Рисунок 24 Схемы, иллюстрирующие регуляторные области гена CYP *O. felineus*; доменную структуру транскрипционных фактора NR1 *O. felineus*; схему альтернативного сплайсинга гена ThRA1.
- Рисунок 25 Результаты хроматографического разделения продуктов в лизате взрослых особей описторхов в контроле (А) и с хлорзоксазоном (В, С, D).
- Рисунок 26 Структуры алкоксирезорурфинов.
- Рисунок 27 Исследование монооксигеназной активности CYP *in situ* в тканях описторхов при добавлении алкоксирезорурфинов в среду.
- Рисунок 28 Результаты РНК-интерференции гена CYP у взрослых особей *Opisthorchis felineus*.
- Рисунок 29 Кривые выживаемости Каплана-Мейера и пентоксирезорурфин-метаболизирующая активность в тканях червей после РНК-интерференции.
- Рисунок 30 Результаты Вестерн-блот анализа с антителами против His-остатков с лизатами различных штаммов *E.coli*, используемых для экспрессии цитохрома P450 *C. sinensis* и *O. felineus*.

- Рисунок 31. Дифференциальные спектры поглощения в области спектра 300-600 нм, полученные в растворимых бактериальных лизатах после индукции экспрессии цитохромов P450 *C.sinensis* (А) и *O. felineus* (Б) после добавления газообразного монооксида углерода и дитионата натрия.
- Рисунок 32. Выделение и очистка Cs CYP.
- Рисунок 33. Связывание цитохрома P450 с лигандом.
- Рисунок 34. Структуры наиболее эффективных ингибиторов P450.
- Рисунок 35. Спектр аннотированных генов нематод и трематод, содержащих консервативные домены белков “фазы II конъюгации” (REACT_6959.4).
- Рисунок 36. Схематичная структура консервативных доменов на примере белка P2 *O. felineus*.
- Рисунок 37. Экзон-интронная структура гена P2.
- Рисунок 38. 3D модель Pgp2, (многоматричное моделирование Phyte2 при 100% уровне соответствия).
- Рисунок 39. Экспрессия генов P-гликопротеинов на трех жизненных стадиях: взрослой (adult) и эксцистированной метацеркарии (NEM) и метацеркарий (metacercariae) методом Цифровой капельной ПЦР.
- Рисунок 40. Визуализация активности P-гликопротеинов в контроле (А) и при прокраске с субстратом (резорудином R) (Б-Е) и ингибиторами P-гликопротеинов тариквидаром (Д) и верапамилом (Е).
- Рисунок 41. Экспрессия генов P-гликопротеинов в контроле (с) и при обработки эксцистированных метацеркарий в течение 24 часов биологическими индукторами: гемоглобином (heme), желчью хомяка (bile) и плазмой крови (plasma).

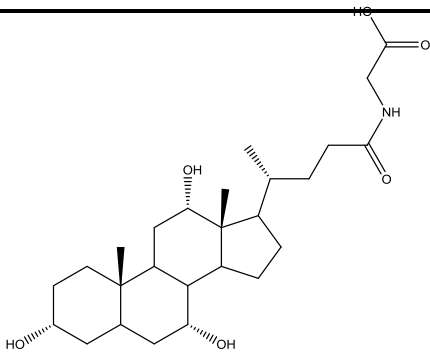
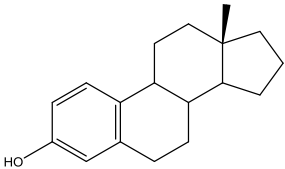
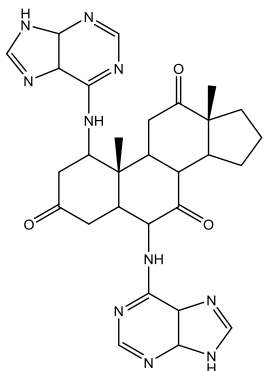
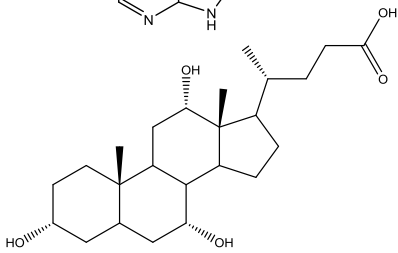
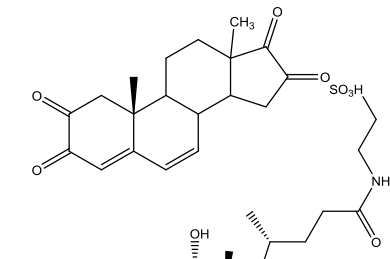
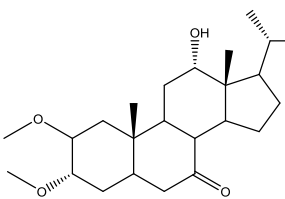
- Рисунок 42 Результаты РНК-интерференции гена Р4.
- Рисунок 43 Взрослые мариты, выделенные из желчных протоков контрольных животных (А) и обработанных PZQ в дозе 75 мг/кг (В, С).
- Рисунок 44 Фенотипические изменения эксцистированных метацеркарий, обработанных празиквантелом *in vitro*.
- Рисунок 45 Оценка повреждений поверхности взрослых марит *O. felineus* с помощью окрашивания пропидиум иодидом.
- Рисунок 46 Общий вид взрослых червей (D-F) *O. felineus* и эксцистированных метацеркарий (А-С) через 1 день после обработки миконазолом и клотримазолом *in vitro*.
- Рисунок 47 Структуры тестируемых ингибиторов (А) и кривые выживаемости Каплана-Мейера (В)

ПРИЛОЖЕНИЯ

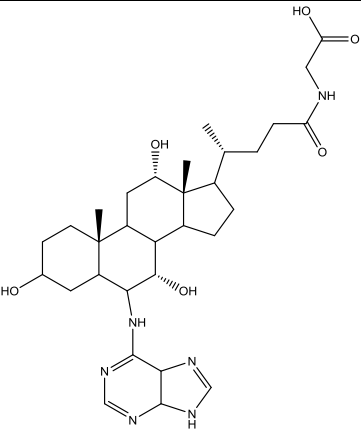
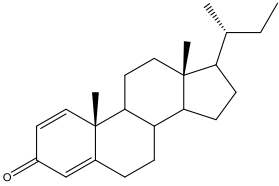
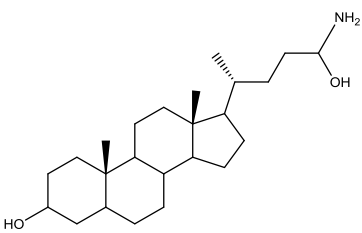
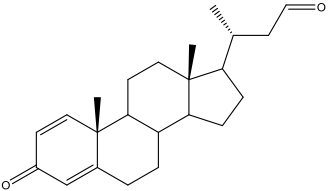
Приложение 1. Структуры оксистеролов, одинаковой структуры в лизатах *Opisthorchis viverrini* и *Opisthorchis felineus* (LC-MS/MS); MS масса к заряду, MS² фрагментация начального пика, r.t. – время удерживания (retention time (min)).

#	Структура	m/z		r.t.(мин)
		MS	MS ²	
25		356.19	312.31 268.18 338.27	25.28
26		367.08	351.21 274.24 338.22	26.08
27		438.10	_____	26.47
28		425.29	383.36 408.39 208.13	35.12
29		307.17	263.11 188.06 246.02	39.19
30		471.21	_____	39.75

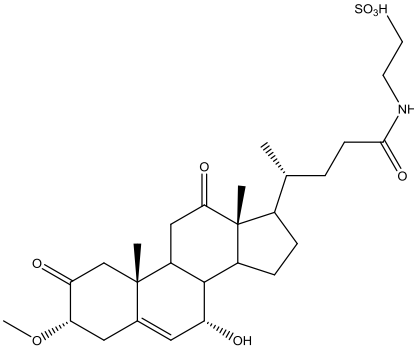
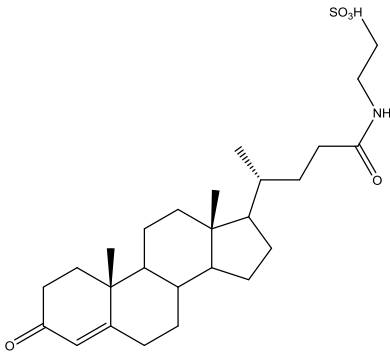
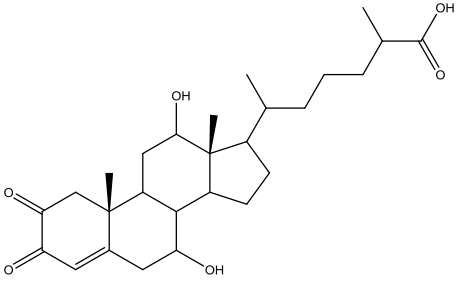
(Таблица продолжение.)

#	Структура	m/z		r.t.(мин)
		MS	MS ²	
31		464.30	403.39 420.49 446.39	51.09
32		255.23	236.98 187.27 178.92	58.57
33		571.29	_____	58.57
34		407.28	343.39 353.28 371.36	58.62
35		311.17	182.95 311.24 263.24	59.76
36		557.31	377.52 558.51 241.02	60.48

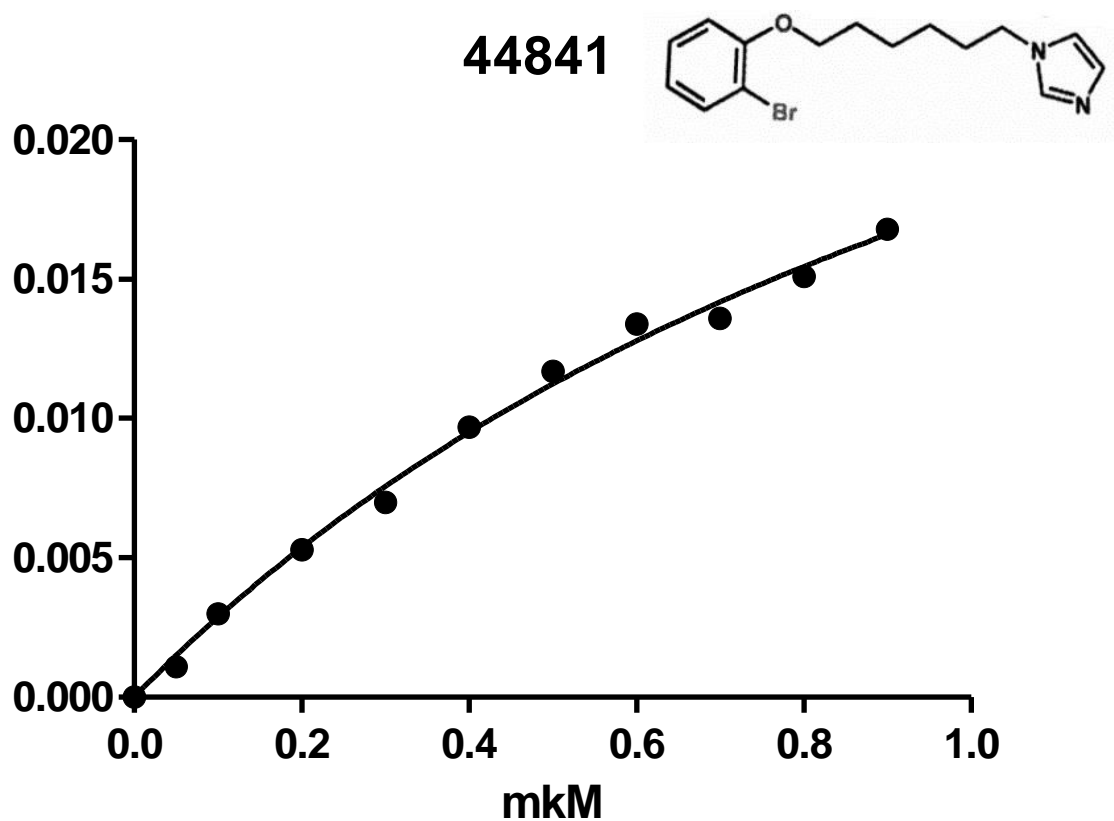
(Таблица Продолжение)

#	Структура	m/z		r.t.(min)
		MS	MS ²	
37		599.32	600.48 283.32 241.02 315.19	65.51
38		325.18	183.06 325.32 261.35	67.01
39		377.27	293.36 331.32 375.41	67.03
40		339.20	183.00 339.23 275.32	76.58

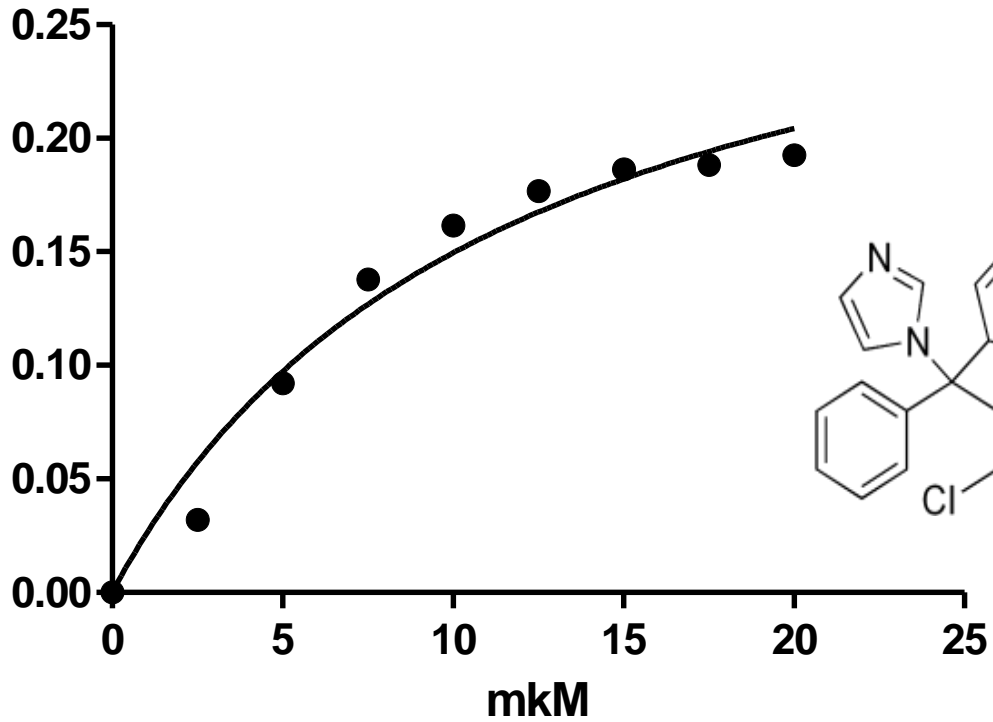
Приложение 2 . Структуры оксистеролов, представленные только у *O. viverrini* (LC-MS/MS)

Compound #	Postulate Structure	m/z		r.t.(min)
		MS	MS ²	
41		539.26	—	39.19
42		478.29	281.30	62.12
43		459.20	—	67.03

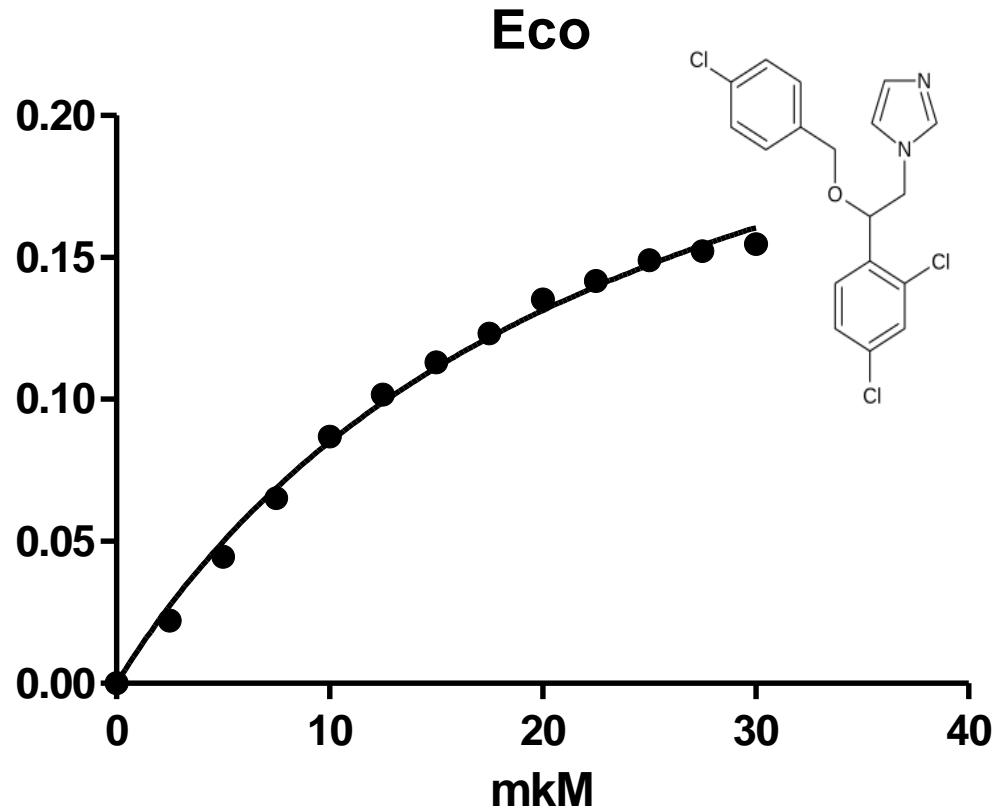
Приложение 3. Вычисление констант ингибирования рекомбинантного белка P450 *C. sinensis* с различными ингибиторами



One site -- Specific binding	
Best-fit values	
Bmax	0.04129
Kd	1.339
Std. Error	
Bmax	0.004677
Kd	0.2239
95% Confidence Intervals	
Bmax	0.03071 to 0.05187
Kd	0.8320 to 1.845
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	9
R ²	0.9953
Absolute Sum of Squares	1.625e-006
Sy.x	0.0004249
Number of points	
Analyzed	11

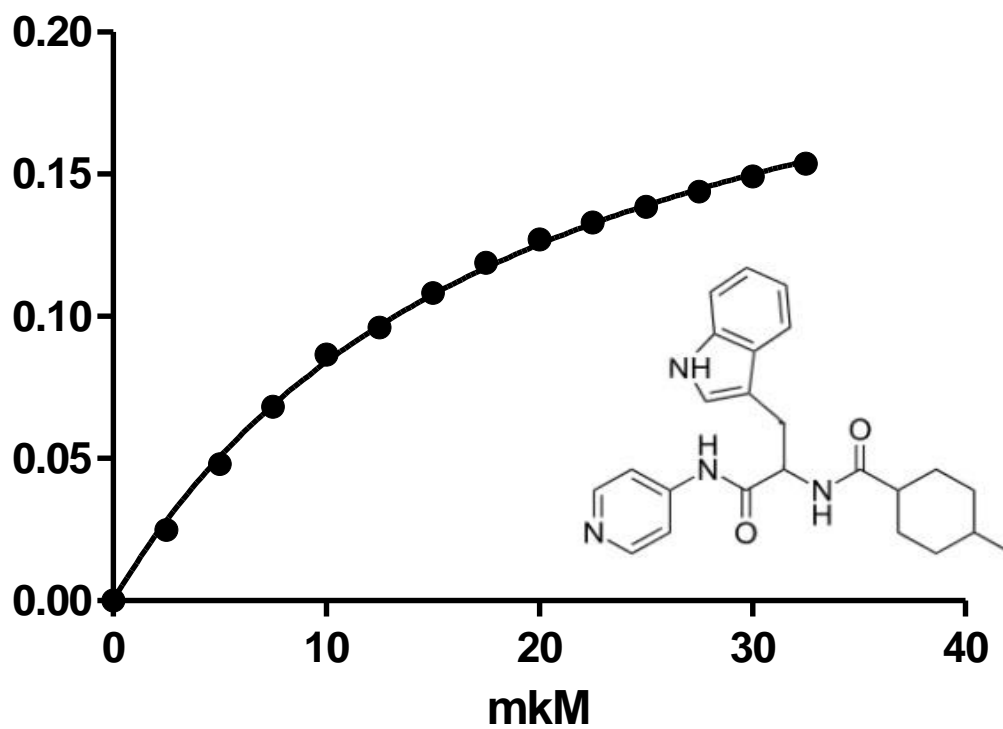
CZ

One site -- Specific binding	
Best-fit values	
Bmax	0.3224
Kd	11.56
Std. Error	
Bmax	0.04542
Kd	3.421
95% Confidence Intervals	
Bmax	0.2150 to 0.4299
Kd	3.475 to 19.65
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	7
R ²	0.9709
Absolute Sum of Squares	0.001214
Sy.x	0.01317
Number of points	
Analyzed	9



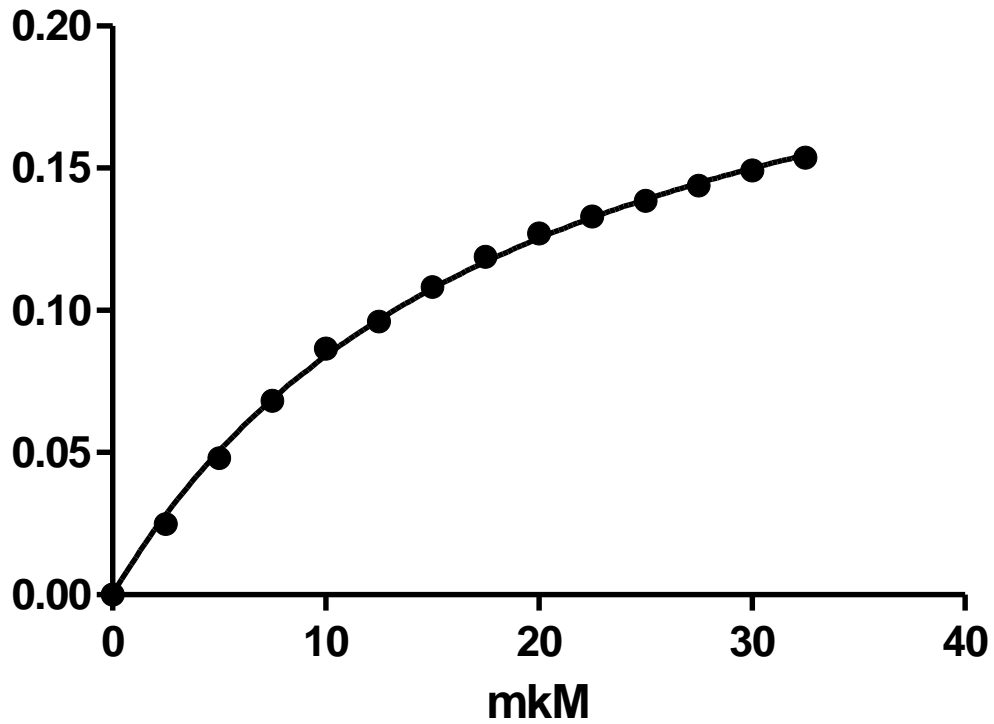
One site -- Specific binding	
Best-fit values	
Bmax	0.2889
Kd	24.01
Std. Error	
Bmax	0.01531
Kd	2.315
95% Confidence Intervals	
Bmax	0.2552 to 0.3226
Kd	18.91 to 29.10
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	11
R ²	0.9956
Absolute Sum of Squares	0.0001427
Sy.x	0.003602
Number of points	
Analyzed	13

LP10



One site -- Specific binding	
Best-fit values	
Bmax	0.2472
Kd	19.45
Std. Error	
Bmax	0.004884
Kd	0.7871
95% Confidence Intervals	
Bmax	0.2366 to 0.2579
Kd	17.73 to 21.16
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	12
R ²	0.9989
Absolute Sum of Squares	3.394e-005
Sy.x	0.001682
Number of points	
Analyzed	14

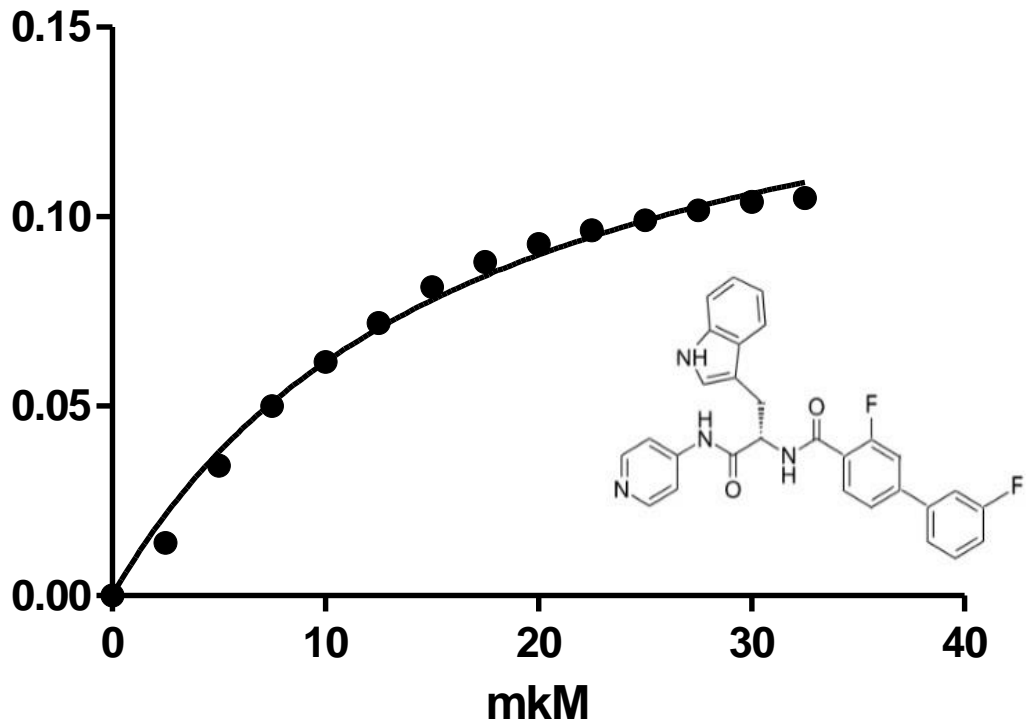
LP10



One site -- Specific binding	
Best-fit values	
Bmax	0.2472
Kd	19.45
Std. Error	
Bmax	0.004884
Kd	0.7871
95% Confidence Intervals	
Bmax	0.2366 to 0.2579
Kd	17.73 to 21.16
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	12
R ²	0.9989
Absolute Sum of Squares	3.394e-005
Sy.x	0.001682
Number of points	
Analyzed	14

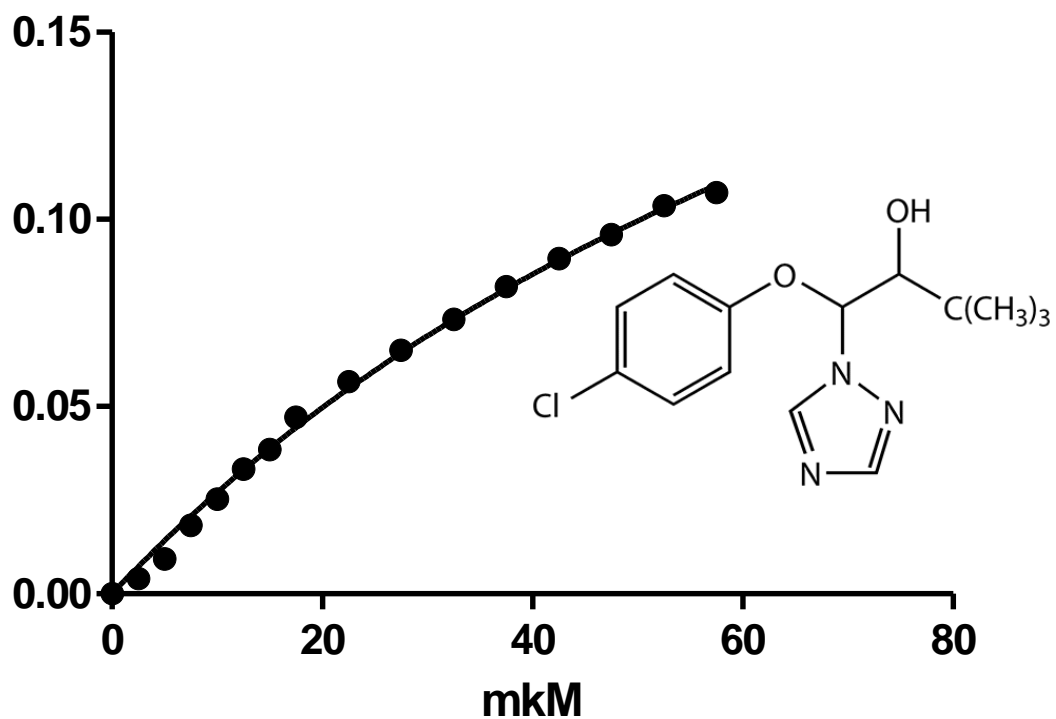
MZ

CYP-I-181



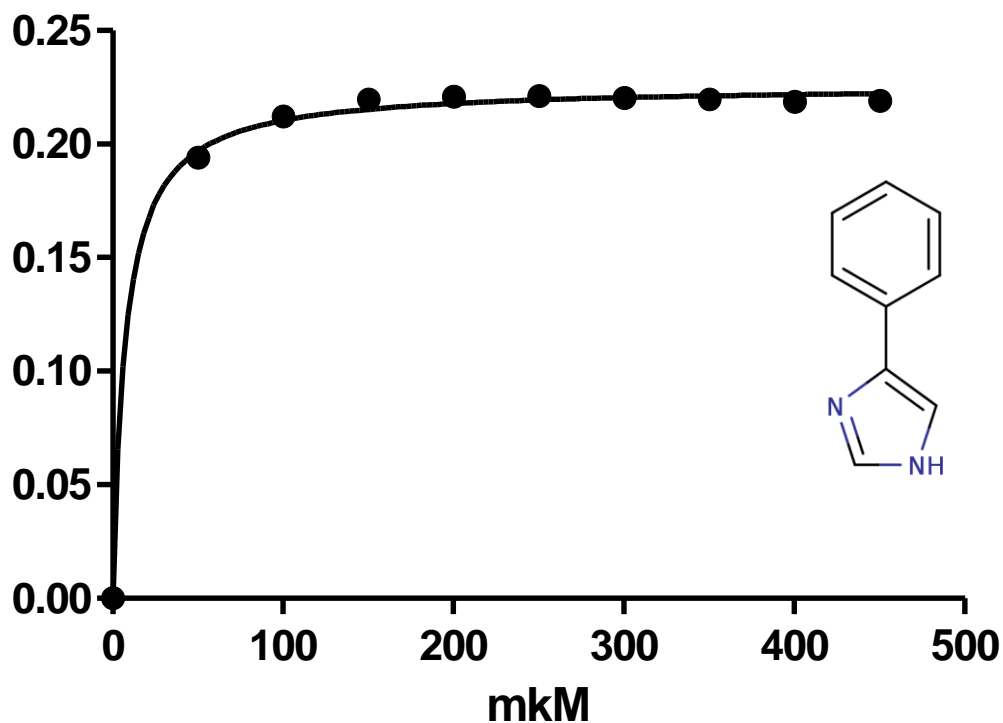
One site -- Specific binding	
Best-fit values	
Bmax	0.1658
Kd	16.90
Std. Error	
Bmax	0.008250
Kd	1.832
95% Confidence Intervals	
Bmax	0.1478 to 0.1838
Kd	12.91 to 20.89
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	12
R ²	0.9916
Absolute Sum of Squares	0.0001319
Sy.x	0.003315
Number of points	
Analyzed	14

Triademinol



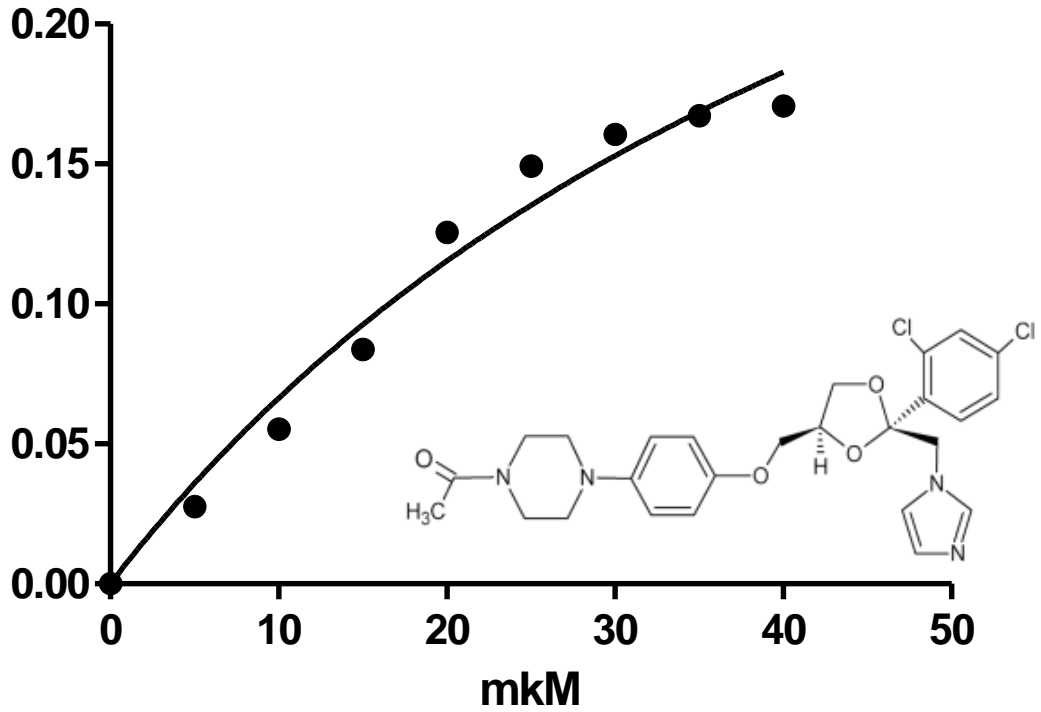
One site -- Specific binding	
Best-fit values	
Bmax	0.3014
Kd	101.2
Std. Error	
Bmax	0.02414
Kd	11.28
95% Confidence Intervals	
Bmax	0.2496 to 0.3532
Kd	77.05 to 125.4
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	14
R ²	0.9969
Absolute Sum of Squares	6.109e-005
Sy.x	0.002089
Number of points	
Analyzed	16

4PIM



One site -- Specific binding	
Best-fit values	
Bmax	0.2259
Kd	7.351
Std. Error	
Bmax	0.001601
Kd	1.009
95% Confidence Intervals	
Bmax	0.2222 to 0.2296
Kd	5.024 to 9.679
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	8
R ²	0.9985
Absolute Sum of Squares	6.482e-005
Sy.x	0.002847
Number of points	
Analyzed	10

Ketoconazole



One site -- Specific binding	
Best-fit values	
Bmax	0.4407
Kd	56.45
Std. Error	
Bmax	0.1140
Kd	21.97
95% Confidence Intervals	
Bmax	0.1711 to 0.7103
Kd	4.481 to 108.4
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	7
R ²	0.9770
Absolute Sum of Squares	0.0007744
Sy.x	0.01052
Number of points	
Analyzed	9