

**МОДУЛЯЦИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В АНТИПАРАЗИТАРНОЙ ТЕРАПИИ
ИНВАЗИИ OPISTHORCHIS FELINEUS**

Е.А. Перина¹, Е.Е. Буйко²

Научный руководитель: доцент, к.б.н. В.В. Иванов¹

¹Сибирский государственный медицинский университет,

Россия, г. Томск, Московский тракт, 2, 634050

²Национальный исследовательский Томский политехнический университет,

Россия, г. Томск, пр. Ленина, 30, 634050

E-mail: catherineperina@gmail.com

**MODULATION OF OXIDATIVE STRESS IN ANTI-PARASITIC THERAPY OF OPISTHORCHIS
FELINEUS INFECTION**

E.A. Perina¹, E.E. Buyko²

Scientific Supervisor: Associate Professor, Ph.D. V.V. Ivanov¹

¹Siberian State Medical University, Russia, Tomsk, Moskovskii tract, 2, 634050

²Tomsk Polytechnic University, Russia, Tomsk, Lenin str., 30, 634050

E-mail: catherineperina@gmail.com

Abstract. *The influence of oxidative stress caused by L-butionine-sulfoximine and hydrogen peroxide on the O. felineus mature forms viability and egg production was determined. Oxidative stress induced by H₂O₂ at 125 μM and 250 μM did not affect the viability of O. felineus mature forms. Also, it caused a decrease in egg production. After the pre-incubation of O. felineus mature forms with inhibitor of the main antioxidant enzyme (glutathione) synthesis L-butionine-sulfoximine, the hydrogen peroxide leads to the marit cells death at lower concentrations of prooxidant (0.125 and 0.250 mM H₂O₂). Thus, γ-glutamylcysteineligase inhibition by L-butionine-sulfoximine leads to an increase in the O. felineus mature forms sensitivity to exogenous reactive oxygen species, which makes it possible to consider this key glutathione synthesis enzyme as a promising potential therapeutic target in the opisthorchiasis treatment.*

Введение. Описторхоз - природно-очаговое заболевание, вызываемое трематодами рода *Opisthorchis* [1]. Печеночные трематодозы приводят к развитию тяжелых осложнений, таких как гнойный холецистит, абсцессы печени, желчекаменная болезнь, холангит, цирроз, обструктивная желтуха, холецистит. Зрелые формы паразита в гепатобилиарном тракте постоянно подвергаются воздействию активных форм кислорода (АФК), продуцируемыми активированными иммунными клетками хозяина и образующимися в дыхательной цепи митохондрий клеток марит. Для поддержания внутриклеточного редокс баланса существуют эндогенная антиоксидантна система, ключевым компонентом которой является восстановлены глутатион. По сравнению с млекопитающими трематоды обладают ограниченной антиоксидантной способностью, поэтому редокс-зависимые сигнальные пути у трематод можно рассматривать как терапевтические мишени [2].

Поэтому цель исследования – изучение влияние окислительного стресса на жизнеспособность печеночного сосальщика *O. felineus* и продукцию им яиц.

Экспериментальная часть. Модель экспериментального описторхоза воспроизведена согласно рекомендациям фармакологического комитета Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития на самцах золотистых хомяков *Mesocricetus auratus* массой 80-110 г. (разрешение локального этического комитета № 6080 от 08.10.2018) [3]. Спустя 3 месяца после заражения из гепатобилиарного тракта хомяков извлечены жизнеспособные мариты *O. felineus*.

Для оценки влияния окислительного стресса, вызванного L-бутионин-сульфоксином (BSO), на жизнеспособность марит *O. felineus* и продукцию ими яиц взрослые формы инкубировали в стерильных чашках Петри при 37 °С в атмосфере углекислого газа (5%) в среде RPMI 1640, содержащей 100 мкг/мл и стрептомицина 100 Ед/мл с различными концентрациями перекиси водорода и селективного ингибитора γ -глутамилцистеинлигазы соответственно. Для оценки жизнеспособности зрелых форм *O. felineus* использовали MTS - тест [4], для чего взрослые формы *O. felineus* инкубировали в 200 мкл фосфатно-солевого буфера с добавлением 40 мкл MTS реагента (Promega) при 37 °С в течение 1 часа. После инкубационную среду помещали в 96 луночный планшет и измеряли абсорбцию при 492 нм с использованием микропланшетного фотометра (Sunrise, Австрия). Для оценки продукции яиц взрослые формы были инкубированы в течение 24 часов, культуральную среду отбирали, центрифугировали 10 минут 3500 об/мин., надосадок отбирали, осадок пипетировали и в камере Горяева подсчитывали количество яиц.

Результаты. Использование перекиси водорода для модуляции окислительного стресса *in vitro* является классическим подходом для исследования влияния окислительного стресса на жизнеспособность и функциональное состояние клеток. В результате экспериментов установлено, что H_2O_2 в концентрациях 0,125 мМ и 0,250 мМ через 24 часа инкубации не влияла на жизнеспособность зрелых форм *O. felineus*, а в концентрации 0,5 мМ и выше вызывала значительное снижение жизнеспособности марит (рисунок 1А).

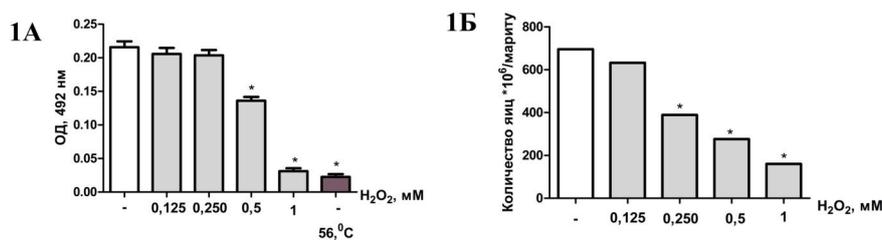


Рис. 1. Жизнеспособность взрослых форм *O. felineus* (А) и продукция ими яиц (Б) за 24 часа при инкубации с различными концентрациями перекиси водорода

* - статистически значимый уровень различий относительно контрольной группы $p < 0,05$

У марит, обработанных 1 мМ H_2O_2 в течение 24 часов смертность через 24 ч составила 100 %, а при светооптическом исследовании отмечалось изменение морфологии тигумента. Установлено, что возрастающие концентрации H_2O_2 приводили к дозозависимому снижению содержания яиц в инкубационной среде (Рисунок 1Б). При этом уменьшение продукции яиц при инкубации марит с высокими концентрациями H_2O_2 (0,5 и 1 мМ) обусловлено снижением жизнеспособности клеток. Более низкие концентрации H_2O_2 (0,125 и 0,250 мМ) не приводили к гибели клеток марит, но уменьшали продукцию ими яиц. Это может быть обусловлено снижением функционального состояния клеток зрелых форм *O. felineus* в присутствии прооксиданта. Для изучения участия эндогенных

антиоксидантных систем в защите от проокислительного действия H_2O_2 у трематод, было исследовано сочетанное действие различных концентраций перекиси водорода и селективного ингибитора синтеза глутатиона - L-бутионин-сульфоксимиона (Рисунок 2).

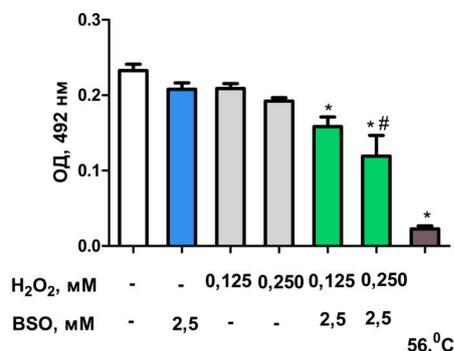


Рис. 2. Влияние L-бутионин-сульфоксимиона и H_2O_2 на жизнеспособность взрослых форм *O. felineus*. * - статистически значимый уровень различий относительно контрольной группы $p < 0,05$, # - статистически значимый уровень различий относительно группы, которые инкубировали с 0,125 mM H_2O_2 + 2,5 mM BSO, $p < 0,05$

В результате экспериментов установлено, что после преинкубации зрелых форм *O. felineus* с L-бутионин-сульфоксимином, перекись водорода приводила к гибели клеток марит при более низких концентрациях проокислителя (0,125 и 0,250 mM) (Рисунок 2).

Заключение. В результате проведенных исследований установлено, что ингибирование γ -глутамилцистеинлигазы L-бутионин-сульфоксимином приводит к повышению чувствительности зрелых форм *O. felineus* к экзогенным активным формам кислорода, что позволяет рассматривать ключевой фермент синтеза глутатиона как перспективную потенциальную терапевтическую мишень при лечении описторхоза.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и администрации Томской области в рамках научного проекта № 18-415-703011.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Описторхоз в РФ. Взгляд на проблему в 21 веке / Л.М. Огородова [и др.]; науч. ред. Л.М. Огородова, А.Э. Сазонов; М-во здравоохранения РФ, Сиб. гос. ун-т. – Новосибирск: Издательство СО РАН, 2016. – 130 с.
2. Huang H. H., Rigouin C., L Williams D. The redox biology of schistosome parasites and applications for drug development //Current pharmaceutical design. – 2012. – Т. 18., №. 24. – С. 3595-3611.
3. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных / под ред. А.М. Миронова. – М. : Гриф и К, 2012. – 944 с.
4. Berridge M. V., Herst P. M., Tan A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction //Biotechnology annual review. – 2005. – Т. 11. – С. 127-152.