

УДК 571.27

БИОКРИСТАЛЛ ГЕМОЗОИН, КАК ИНСТРУМЕНТ ИССЛЕДОВАНИЯ РОЛИ ИНВАЗИИ *O.FELINEUS*

Паршуткина Т.А. (ФГБОУ «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ), **Перина Е.А.** (ФГБОУ «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ), **Салтыкова И.В.** (ФГБОУ «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ), **Першина А.Г.** (ФГБОУ «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ)

**Научный руководитель – д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, заслуженный
деятель науки РФ Огородова Л.М.**

(ФГБОУ «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ)

Экспериментально установлен факт иммуномодуляции при ряде паразитарных инвазий, идентифицирован и описан экскреторный продукт гематофаговых паразитов – гемозоин, роль *Opisthorchis felinus* (*O.felineus*) в модуляции воспалительных заболеваний отмечена рядом учёных. Так как иммуномодулирующий потенциал кристаллов гемозоина *O.felineus* не изучен, разработан и внедрен протокол выделения гемозоина, получены и опубликованы данные о способности гемозоина *O.felineus* к индукции провоспалительных цитокинов. Исследования экскреторного продукта *O.felineus* будут продолжены с целью установления роли *O.felineus* в реализации воспаления.

Введение.

Ежегодно на территории России регистрируется около 35 тыс. больных описторхозом, на него приходится 74,4% всех гельминтозов. Западная Сибирь высокоэндемична по описторхозу, зараженность населения достигает 51,8%, в отдельных районах свыше 95%. На территории Томской области около 30% детей в возрасте от 7 до 15 лет имеют инвазию *O.felineus*, с колебаниями показателя от 10,5 до 57,1% в зависимости от региона проживания.

Установлено, что описторхоз влияет на широкий спектр заболеваний, среди которых вирусные и бактериальные инфекции, атеросклероз, сахарный диабет, воспалительные заболевания желудочно-кишечного тракта, а также холангиокарцинома. Кроме того, по данным эпидемиологических исследований, инвазия *O.felineus* отрицательно коррелирует с распространенностью и тяжестью аллергических заболеваний (бронхиальная астма, атопический дерматит, пищевая аллергия).

Ранее не увенчались успехом поиски механизма регуляции иммунного ответа для *O.felineus* и вещества, непосредственно влияющего на иммунную систему хозяина.

В 2015 году обнаружен экскреторный продукт *O.felineus* – гемозоин. Это инертный темно-коричневый кристаллический полимер феррипротопорфирина IX, его продуцентами также являются гематофаговые паразиты *Rhodnius prolixus*, *Schistosoma mansoni*, *Plasmodium falciparum*, *Echinostoma trivolvis*, *Haemoproteus columbae*, *Clonorchis sinensis*. Доказано иммуномодулирующее действие гемозоина *Schistosoma mansoni* и *Plasmodium falciparum*.

Для формирования представления о гемозоине *O.felineus* и его свойствах было принято решение о создании протокола выделения данного вещества и проведении лабораторного иммунологического исследования для оценки иммунобиологических свойств экстрагированного гемозоина, в частности, при внесении его в клеточные культуры дендритных клеток пациентов с бронхиальной астмой.

Основная часть.

Зарубежными коллегами для исследований иммуномодулирующего действия *Schistosoma mansoni* и *Plasmodium falciparum* были разработаны протоколы выделения гемозоина (Truscott, 2013 и Skorohod, 2004; соответственно). На основании отчетов о методах указанных

исследований нами был разработан модифицированный протокол выделения гемозоина *O. felinus* и его очистки для удаления белковых и липидных фракций хозяина и/или паразита, адсорбированных на поверхности кристалла.

Зрелые формы гельминтов получены из желчных протоков инвазированных сирийских хомяков, предварительно перорально зараженных метацеркариями *O. felinus* - 50 метацеркариев/1 хомяк. Мариты описторхисов собраны в 1,5 мл пробирки и трехкратно промыты в фосфатно-буферном физиологическом растворе (PBS). Отмытые гельминты (7мл) гомогенизированы ультразвуком на льду, полученный лизат был очищен методом градиентного центрифугирования (с ускорением 1000g) с раствором сахарозы и перкола при комнатной температуре в течение 60 секунд.

Верхняя часть супернатанта, содержащая максимальное количество пигментированного гемозоина, перенесена в новую пробирку, а осадок, содержащий гемозоин в меньших концентрациях, подвергнут ресуспендированию в PBS. Всё повторно центрифугировано для дальнейшей очистки при 8000g в течение 20 мин, после чего полученные гранулы гемозоина ресуспендированы в PBS, а затем гемозоин осажден в хлороформе, метаноле и воде.

Гранулы гемозоина вновь были ресуспендированы в 2 мл PBS, гомогенизированы кратковременным воздействием ультразвука на льду и инкубированы с добавлением 1% протеиназы К при 37°C в течение 18 ч. Затем произведено повторное осаждение гемозоина центрифугированием при 10000g в течение 20 минут с последующей поэтапной промывкой: сначала трехкратно в PBS, содержащем 2% додецилсульфата натрия (SDS), затем трижды в растворе 0,1M NaHCO₃ (pH 9,1), содержащем 2,5% SDS, и наконец, пятикратно в дистиллированной воде.

Отсутствие контаминации полученного гемозоина яйцами *O. felinus* было подтверждено световой микроскопией (1мкл на предметном стекле).

В Центральной научно-исследовательской лаборатории на базе СибГМУ (г.Томск) с использованием очищенного согласно настоящему протоколу гемозоина *O. felinus* проведено научное исследование. Методом магнитного сортирования из периферической крови пациентов с бронхиальной астмой выделены дендритные (ДК) и Т-клетки. Методом иммуноферментного анализа (ELISA) оценена продукция провоспалительных цитокинов (IL-10, IL-12β, TNF-α и TGF-β) Т-клетками при сокультивировании с ДК без воздействия и с воздействием выделенным гемозоином *O. felinus*. То же самое произведено в контрольной группе здоровых. Результаты опубликованы (Saltykova I.V. et al, 2019).

Выводы.

Разработанный протокол выделения гемозоина использован для получения гемозоина *O. felinus* и исследования его способности к индукции провоспалительных цитокинов.

Установлено, что гемозоин *O. felinus* при внесении в клеточные культуры дендритных клеток пациентов с бронхиальной астмой *in vitro* повышает уровень экспрессии IL-10, IL-12β. Полученные результаты улучшают понимание механизмов, посредством которых описторхоз опосредует иммуномодуляцию при бронхиальной астме в эндемичных регионах.