



Геномика и протеомика возбудителя описторхоза *Opisthorchis felineus*

В.А. Мордвинов , Н.И. Ершов, О.Г. Запарина, М.Ю. Пахарукова 

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

 e-mail: mordvin@bionet.nsc.ru; pmaria@yandex.ru

Аннотация. Возбудитель описторхоза, печеночный сосальщик *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884) – один из наиболее распространенных видов гельминтов человека и животных на территории России. Вместе с близкородственными видами печеночных трематод *O. viverrini* (Poirier, 1886) и *Clonorchis sinensis* (Loos, 1907), ареалы которых расположены в Юго-Восточной Азии и на Дальнем Востоке, *O. felineus* составляет триаду эпидемиологически значимых трематод семейства Opisthorchiidae. Половозрелые особи (мариты) *O. felineus* паразитируют в гепатобилиарной системе теплокровных и при длительной инвазии провоцируют развитие тяжелых осложнений, включая малигнизацию эпителия желчных протоков. Высокая медицинская значимость *O. felineus* привлекает внимание исследователей, работающих в различных областях биологии и медицины. Так, в последнее время активно проводятся исследования молекулярной биологии этого представителя паразитических плоских червей. В настоящем обзоре кратко суммированы результаты исследований геномики и протеомики *O. felineus*, являющиеся, на наш взгляд, существенным вкладом в решение вопросов структурно-функциональной организации геномов многоклеточных паразитов со сложным жизненным циклом и изучение молекулярных механизмов взаимодействия паразит–хозяин. Приведены сравнительные данные по количеству генов и размерам ядерных геномов ряда плоских червей, распределению длин интронов, а также анализу синтении геномов описторхид *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*. Отдельное внимание уделено обсуждению особой формы процессинга РНК, известной как транс-сплайсинг, широко представленной в геноме *O. felineus*. В статье приводятся анализ литературных данных по генам системы метаболизма ксенобиотиков, сравнению представленности генов этой системы между различными видами паразитических и свободноживущих плоских червей и обзор литературы по наличию и уровню экспрессии генов гранулинов – потенциальных промоторов неоплазии холангиоцитов. Данные по геномике и протеомике *O. felineus* пополняют базу знаний, обеспечивающую исследование проблем эволюции трематод, патогенеза печеночных гельминтозов и гельминт-ассоциированного канцерогенеза.


Ключевые слова: геномика; трематоды; *Opisthorchis felineus*; транс-сплайсинг; микроинтроны; протеомика; опероны; экспрессия генов.

Для цитирования: Мордвинов В.А., Ершов Н.И., Запарина О.Г., Пахарукова М.Ю. Геномика и протеомика возбудителя описторхоза *Opisthorchis felineus*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(4):383-390. DOI 10.18699/VJ20.44-0

Genomics and proteomics of the liver fluke *Opisthorchis felineus*

V.A. Mordvinov , N.I. Ershov, O.G. Zaparina, M.Y. Pakharukova 

Institute of Cytology and Genetics of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

 e-mail: mordvin@bionet.nsc.ru; pmaria@yandex.ru

Abstract. The causative agent of opisthorchiasis, the liver fluke *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884) is one of the helminths of humans and animals in Russia. Together with closely related species of trematodes *O. viverrini* (Poirier, 1886) and *Clonorchis sinensis* (Loos, 1907), *O. felineus* is a part of a triad of epidemiologically important trematodes in the family Opisthorchiidae. Adult *O. felineus* worms infest the hepatobiliary system of warm-blooded animals and might provoke the development of severe pathologies, including malignancy of bile duct epithelium. The high medical importance of *O. felineus* attracts the attention of researchers. This review briefly summarizes the data about *O. felineus* genomics and proteomics. The review provides a comparative analysis of the number of genes and sizes of nuclear genomes of a number of flatworms, the distribution of intron lengths, as well as results of synteny between the *O. felineus*, *O. viverrini* and *C. sinensis* genomes. Special attention is paid to a particular form of RNA processing known as trans-splicing, widely presented in the opisthorchiid genomes. We also provide the results of a comparative analysis of the xenobiotic metabolizing system between parasitic

and free-living flatworms. Moreover, data on parasitic granulins, which are potential promoters of cholangiocyte neoplasia, are also presented. Data on the *O. felineus* genomics and proteomics provide first insights into the structural and functional organization of the genome of this parasitic flatworm with a complex life cycle as well as provide a significant contribution to our understanding of "host-parasite" interaction and evolution of this group of parasitic flatworms.

Key words: genomics; trematodes; *Opisthorchis felineus*; trans-splicing; microintrones; proteomics; operons; gene expression.

For citation: Mordvinov V.A., Ershov N.I., Zaparina O.G., Pakharukova M.Y. Genomics and proteomics of the liver fluke *Opisthorchis felineus*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020; 24(4):383-390. DOI 10.18699/VJ20.44-0

Введение

В 1884 г. итальянский ученый С. Риволта описал новый вид гельминтов *Distomum felineum* (син. *Opisthorchis felineus*, *D. sibiricum* – двуустка кошачья, двуустка сибирская), паразитирующих в желчных протоках печени кошки. В 1891 г. профессор Томского университета К.Н. Виноградов обнаружил этот вид печеночных трематод у человека (Pozio et al., 2013).

Печеночный сосальщик *O. felineus* обладает сложно организованным жизненным циклом с чередованием двух промежуточных и окончательного хозяев. 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. Человек чрезвычайно легко восприимчив к инвазии *O. felineus* (Безр, 2005).

Инфицирование животных и человека происходит в результате употребления в пищу сырой рыбы, инвазированной метацеркариями *O. felineus*. После попадания в пищеварительный тракт окончательного хозяина оболочка цисты метацеркарий разрушается и эксцистированные описторхи проникают в желчные протоки печени. По достижении половой зрелости паразиты производят в большом количестве яйца, содержащие мирацидии – инвазивную форму *O. felineus* для первого промежуточного хозяина, моллюсков сем. *Bithyniidae*. С экскрементами млекопитающих яйца попадают в водоем, где поглощаются этими моллюсками. В тканях первого промежуточного хозяина трематоды *O. felineus* последовательно проходят этапы развития с бесполом размножением – спороцисты, редии и церкарии. Последние покидают улитку и инфицируют второго промежуточного хозяина – рыб семейства карповых. В рыбе церкарии инкапсулируются и превращаются в метацеркарии – единственную инфекционную для плотоядных стадию развития *O. felineus*.

У человека инвазия *O. felineus*, описторхоз, отличается длительностью, протекает с частыми обострениями и может способствовать возникновению первичного рака печени. Описторхоз относится к природно-очаговым заболеваниям и, как правило, распространен в равнинных областях, расположенных 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* (Pakharukova, Mordvinov, 2016).

Помимо Западной Сибири, ареал *O. felineus* распространяется также на Восточную, Западную и Южную

Европу. Этот вид гельминтов обнаружен на территории Центральной России, Белоруссии и Украины, в странах Балтии, Германии (Schuster et al., 1999), Италии (Pozio et al., 2013), на Балканском и Пиренейском полуостровах (Petney et al., 2013). По предварительным оценкам, в мире не менее 1.6 млн человек инфицированы *O. felineus* (Keiser, Utzinger, 2009). В Российской Федерации ежегодно выявляется до 40 тыс. случаев описторхоза (Роспотребнадзор..., 2015). Однако эти цифры, скорее всего, не отражают реального уровня заболеваемости. Первые этапы развития описторхоза и переход заболевания в хроническую стадию часто проходят незаметно, а постепенно появляющиеся симптомы не обладают специфичностью. Вследствие этого истинное число больных описторхозом может значительно превышать данные официальной статистики.

Существующая терапия описторхоза не гарантирует полного освобождения от паразитов и не препятствует повторной инвазии. Кроме того, химиотерапия этого заболевания обладает побочными эффектами и может иметь негативные последствия для пациентов. В связи с этим весьма актуален вопрос о возможности создания новых эффективных и безопасных средств для лечения описторхоза. Глубокое изучение молекулярной биологии *O. felineus* дает ключ к пониманию молекулярных механизмов взаимодействия паразит–хозяин и определению потенциальных фармакологических мишеней для терапии описторхоза.

Настоящий обзор посвящен исследованиям геномики и протеомики *O. felineus*, результаты которых существенно пополняют наши знания в области фундаментальных проблем молекулярной паразитологии и генетики, а также развитие прикладных работ, связанных с диагностикой, профилактикой и лечением описторхоза.

Геномика *Opisthorchis felineus*

Ядерный геном

Размер существующей сборки ядерного генома *O. felineus* составляет 684 млн пар оснований, 30.3 % генома представлено повторяющимися элементами, в основном ретротранспозонами. По этим характеристикам, геном *O. felineus* очень близок к геномам двух других эпидемиологически значимых представителей семейства *Opisthorchiidae*, печеночных сосальщиков *O. viverrini* и *Clonorchis sinensis*, и существенно отличается от геномов представителей семейств *Schistosomatidae* и *Fasciolidae*, трематод *Schistosoma mansoni* и *Fasciola hepatica* (табл. 1). В геноме

Таблица 1. Характеристики геномов пяти видов трематод

Вид	Размер генома	Число генов	Повторяющиеся элементы, %
<i>O. felineus</i> (Ershov et al., 2019)	680.0 Мб	11455	30.3
<i>C. sinensis</i> (Wang et al., 2011)	516 Мб	16000	29.6
<i>O. viverrini</i> (Young et al., 2014)	634.5 Мб	16379	30.9
<i>S. mansoni</i> (Berriman et al., 2009)	364.5 Мб	11809	40
<i>F. hepatica</i> (Cwiklinski et al., 2015)	1.3 Гб	11700	54.2

O. felineus аннотировано 11455 белок-кодирующих генов (Ershov et al., 2019), а также 55 генов, кодирующих микроРНК (Ovchinnikov et al., 2015). Суммарное число генов *O. felineus* почти на одну треть меньше, чем у *O. viverrini* и *C. sinensis*, и практически совпадает с числом генов *S. mansoni* и *F. hepatica*.

При анализе синтении геномов описторхид *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis* обнаружена существенная структурная вариабельность. Установлено, что по расположению гомологичных локусов степень сходства геномов *O. felineus* и *C. sinensis* выше, чем у *O. viverrini* с *O. felineus* и *C. sinensis* (Ershov et al., 2019). Эти данные хорошо коррелируют с результатами кариологического анализа: *O. felineus* и *C. sinensis* обладают семью, *O. viverrini* – шестью парами хромосом (Zadesenets et al., 2012).

Результаты анализа синтении геномов подтверждаются также данными филогенетических исследований с использованием отдельных генетических маркеров и полногеномных данных трех видов описторхид. Эти исследования указывают на принадлежность *C. sinensis* к роду *Opisthorchis* и не поддерживают выделение этого вида в отдельный род *Clonorchis* (Shekhovtsov et al., 2009; Cai et al., 2012; Pomaznoy et al., 2016; Ershov et al., 2019). Таким образом, согласно выводам молекулярно-биологических исследований, таксономическое положение *C. sinensis* должно быть пересмотрено.

При исследовании генома и транскриптома *O. felineus* было обнаружено, что регуляция экспрессии почти 50 % генов осуществляется с участием транс-сплайсинга (Ershov et al., 2019). Эта особая форма процессинга РНК довольно часто встречается у плоских червей, однако столь широкое вовлечение транс-сплайсинга у трематод – явление необычное. Например, у *Schistosoma mansoni* транс-сплайсинг участвует в регуляции транскрипции только 11 % генов (Protasio et al., 2012).

Транс-сплайсинг, регулирующий экспрессию генов *O. felineus*, относится к лидер-зависимому типу. В результате этого процесса 5'-участок новосинтезированной пре-мРНК меняется на короткую последовательность сплайс-лидера, кодируемого отдельным геном. У плоских червей эта встраиваемая последовательность оканчивается консервативным триплетом AUG. Вполне вероятно, что этот триплет может выступать в роли старт-кодона

при трансляции зрелой мРНК, подвергшейся транс-сплайсингу. С другой стороны, причиной экспансии транс-сплайсинга у *O. felineus* может быть его роль в удалении длинных 5'-некодирующих областей из пре-мРНК, что необходимо для эффективной трансляции зрелых транскриптов.

Еще одна гипотеза заключается в том, что транс-сплайсинг необходим для регуляции экспрессии отдельных генов в оперонах. В геноме *O. felineus* найдено 355 потенциальных оперонов, объединяющих 736 генов, разделенных сайтами транс-сплайсинга (Ershov et al., 2019). Предсказанные опероны содержат от двух до четырех генов, демонстрирующих различные уровни экспрессии. Не исключено, что стабильность уровней экспрессии генов оперонов достигается тем, что процессинг пре-мРНК, синтезированных под контролем одного и того же промотора, регулируется при помощи транс-сплайсинга.

Большинство генов *O. felineus*, экспрессия которых контролируется этим механизмом, кодирует белки базовых клеточных процессов (Ershov et al., 2019). Подобные данные были получены при анализе генома *Caenorhabditis elegans* – наиболее консервативные сайты транс-сплайсинга были найдены в рибосомальных генах этого вида нематод (Sleumer et al., 2010). При анализе геномных данных *O. viverrini* и *C. sinensis* также обнаружена высокая консервативность мишеней транс-сплайсинга, вовлеченного в посттранскрипционную регуляцию по большей части генов «домашнего хозяйства». Очевидно, этот механизм играет важную роль в жизнедеятельности плоских и круглых червей, хотя в настоящее время функциональное значение транс-сплайсинга окончательно не установлено.

В результате анализа длин интронов в геноме *O. felineus* обнаружено (Ershov et al., 2019), что распределение длин этих элементов характеризуется наличием большого пика на 3000 п. н. и двух дополнительных пиков с максимумами 37 и 90 п. н. Ультракоткие интроны или микроинтроны длиной менее 75 п. н. составляют порядка 34 % от всех аннотированных интронов и входят в структуру 4997 (44 %) генов. Микроинтроны также широко представлены в генах *O. viverrini* и *C. sinensis*. Наличие двух пиков коротких интронов ранее было описано у ленточных червей, причем предполагалось, что бимодальное распределение микроинтронов является отличительной чертой этой группы гельминтов (Tsai et al., 2013). Однако такое своеобразие прослеживается, хоть и менее выражено, и у трематод семейства Opisthorchiidae.

Распределение микроинтронов в геноме *O. felineus* имеет некоторые особенности (Ershov et al., 2019). Во-первых, при наличии нескольких микроинтронов в гене они, как правило, формируют кластеры. Во-вторых, микроинтроны чаще расположены в начале экзонной порции гена, т. е. тяготеют к старту транскрипции (Ershov et al., 2019). Эти факты указывают на обособленную функциональную значимость данного класса интронов в механизмах транскрипции и процессинга. Так, кластеризация может быть связана с распознаванием интрон-экзонной структуры сплайсосомой (intron-definition mechanism), а небольшой размер интронов способствует повышению транскрипционной эффективности (Urrutia, Hurst, 2003; Belshaw, Bensasson, 2006).

Митохондриальный геном

Размер митохондриального генома *O. felineus* составляет 13 875 п. н., он содержит 36 генов: 12 белок-кодирующих генов, два гена рибосомальных РНК и 22 гена транспортных РНК. Митохондриальные гены *O. felineus*, *C. sinensis*, *F. hepatica* и *Paragonimus westermani* идентичны, но отличаются от генов шистосоматид (Shekhovtsov et al., 2010).

Протеомика и система метаболизма ксенобиотиков *O. felineus*

Жизненный цикл трематод сопровождается сменой репертуара генов, экспрессирующихся на определенной стадии развития паразитов. Недавно были опубликованы результаты сравнительного исследования транскриптомов метацеркарии и взрослой особи *O. felineus* (Pomaznou et al., 2016; Ershov et al., 2019). Показано, что транскриптомные профили двух стадий развития кошачьей двуустки существенно различаются: экспрессия 903 и 648 генов зарегистрирована только в марите или метацеркарии соответственно (Pomaznou et al., 2016). У взрослых червей наиболее высокую экспрессию демонстрируют гены, кодирующие протеазы, миоглобин, белок оболочки яиц, глутатион S-трансферазы, а также белки, модулирующие процессинг антигена клетками иммунной системы хозяина. В метацеркарии же наибольшей экспрессией обладают гены, кодирующие белки домашнего хозяйства, например рибосомальные белки, убиквитин и белки теплового шока.

При сравнении между собой транскриптомов взрослых особей *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis* было установлено, что уровни экспрессии подавляющего большинства генов у трех видов описторхид отличаются незначительно (Ershov et al., 2019). Это указывает на высокое сходство организации биологических процессов, обеспечивающих жизнедеятельность гельминтов в организме окончательного хозяина. Тем не менее из всего множества генов в геноме экспрессия нескольких десятков генов обладала видовой специфичностью. Важно, что большинство таких генов кодирует белки экскреторно-секреторного продукта (ЭСП) описторхид. Не исключено, что видоспецифическая экспрессия белков ЭСП может отражать особенности эволюции трематод в контексте развития механизмов взаимодействия паразит–хозяин.

В состав ЭСП *O. felineus* входят белки, обладающие различными свойствами: белки защиты от активных форм кислорода, протеолитические ферменты и ферменты углеводного обмена, белки защиты гельминтов от иммунной системы хозяина, белки цитоскелета и др. (Львова и др., 2014). Наиболее представленный компонент ЭСП *O. felineus* – глутатион S-трансфераза σ (ГСТ- σ). Этот фермент сохраняет свою активность в среде инкубации *in vitro* и присутствует в тканях печени инфицированных животных и пациентов, страдающих описторхозом. Согласно данным сравнительного анализа транскриптомов взрослых особей *O. felineus*, *O. viverrini* и *C. sinensis*, представленность мРНК ГСТ- σ в транскриптоме *O. felineus* многократно выше, чем в транскриптоме других описторхид. Вполне вероятно, что этот фермент выполняет важную функцию в системе взаимодействий паразит–хозяин и может опосредовать видоспецифические проявления патогенеза описторхоза, вызванного *O. felineus*. Важно от-

метить, что ГСТ- σ входит в состав большой группы ферментов, принимающих участие в метаболизме эндогенных субстратов и ксенобиотиков (экзогенных субстратов), включая лекарственные препараты.

Система метаболизма ксенобиотиков *O. felineus*

В настоящее время отсутствуют вакцины или какие-либо другие средства специфической профилактики описторхоза, а имеющиеся препараты для химиотерапии этого заболевания вызывают много нареканий (Prichard et al., 2012). В связи с этим исследование системы метаболизма ксенобиотиков печеночных сосальщиков, компоненты которой представляют собой перспективные фармакологические мишени (Bartley et al., 2012; Prichard et al., 2012), имеет особое значение.

За очень немногими исключениями экзогенные субстраты, попадающие в живые организмы, подвергаются одному или нескольким этапам биотрансформации, которые выполняют ферментативные системы трех фаз метаболизма ксенобиотиков. Ферменты фазы 1, среди которых наиболее представлены белки семейства P450 (CYPs), осуществляют окисление, восстановление или гидролитические реакции. В результате анализа доступных геномных и транскриптомных данных паразитических и свободноживущих плоских червей было установлено, что состав CYPs у этих групп животных кардинально различается. У свободноживущих видов, как и у большинства изученных организмов, обнаружены десятки слабо гомологичных друг другу дивергировавших форм CYPs (табл. 2). Однако у паразитических видов семейств Opisthorchiidae, Schistosomatidae, Taeniidae и Fasciolidae выявлен всего один ген, кодирующий цитохром P450 (Pakharukova et al., 2012, 2015). Показано, что продукт этого гена, *O. felineus* CYP, участвует в метаболизме экзогенных субстратов, важен для выживаемости взрослых особей и представляет собой перспективную мишень для антигельминтной терапии (Pakharukova et al., 2015; Mordvinov et al., 2017b).

Помимо гена, кодирующего CYP, в составе генома кошачьей двуустки найдены и другие гены, кодирующие ферменты фазы 1 метаболизма ксенобиотиков, в частности гены альдо-кето редуктазы, альдегиддегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы (Ershov et al., 2019). Однако гены флаavin-монооксигеназ, также относящихся к ферментам фазы 1, в геноме *O. felineus* не найдены. Интересно, что последовательности этих генов не обнаружены также в доступных геномных базах данных паразитических плоских червей.

В реализации фазы 2 метаболизма ксенобиотиков активно задействованы глутатион-пероксидазы и глутатион-S-трансферазы. В геноме *O. felineus* представлено девять генов глутатион S-трансфераз, наиболее высоко экспрессируемых среди всех генов системы метаболизма ксенобиотиков этого печеночного сосальщика. Особенно активен ген, кодирующий ГСТ- σ , его экспрессия у взрослых червей на два-три порядка превышает экспрессию других генов системы метаболизма ксенобиотиков. Как уже упомянуто выше, ГСТ- σ входит в состав ЭСП гельминтов и попадает в ткани окончательного хозяина *O. felineus* (Pakharukova et al., 2017). Важно упомянуть, что

Таблица 2. Число генов СУР у паразитических и свободноживущих плоских червей

Вид	Класс	Семейство	Число генов СУР
<i>Opisthorchis felineus</i>	Trematoda	Opisthorchiidae	1
<i>Clonorchis sinensis</i>	Trematoda	Opisthorchiidae	1
<i>Opisthorchis viverrini</i>	Trematoda	Opisthorchiidae	1
<i>Schistosoma mansoni</i>	Trematoda	Schistosomatidae	1
<i>Schistosoma japonicum</i>	Trematoda	Schistosomatidae	1
<i>Fasciola hepatica</i>	Trematoda	Fasciolidae	1
<i>Fasciola gigantica</i>	Trematoda	Fasciolidae	1
<i>Taenia solium</i>	Cestoda	Taeniidae	1
<i>Schmidtea mediterranea</i>	Rhabditophora	Dugesiiidae	35
<i>Macrostomum lignano</i>	Turbellaria	Macrostomidae	39

помимо трансферазной активности, ГСТ-σ обладает свойствами простагландин-синтазы, участвует в продукции простагландинов в клетках гельминтов и, вероятно, сохраняет эту энзиматическую активность в тканях хозяина (Morphew et al., 2007).

Еще одна группа ферментов, обычно участвующих в реализации фазы 2 метаболизма ксенобиотиков у эукариота, – УДФ-глюкуроилтрансферазы (УГТ). Функции этих белков – повышение гидрофильности субстратов и их доступности для белков-транспортёров заключительного этапа метаболизма, фазы 3. Надсемейство УГТ состоит из двух семейств, УГТ1 и УГТ2, объединяющих более 20 изоферментов. В геномах паразитических и свободноживущих нематод обнаружено от 30 до 70 генов, кодирующих УГТ (Matouskova et al., 2016). Установлено, что эти ферменты играют важную роль в формировании устойчивости паразитов к антигельминтикам (Lindblom et al., 2006; Laing et al., 2013; Matouskova et al., 2016). Однако ни в геноме *O. felineus*, ни в геномах других видов Opisthorchiidae и Schistosomatidae гены, кодирующие УГТ, не найдены. Кроме того, в геномах описторхид и шистосоматид не обнаружены гены ариламин N-ацетилтрансфераз, ферментов фазы 2 метаболизма ксенобиотиков у позвоночных (Ershov et al., 2019).

Белки фазы 3 метаболизма ксенобиотиков отвечают за выведение из клеток во внеклеточное пространство соединений, образовавшихся в результате действия ферментов фаз 1 и 2. Выведение осуществляют белки, принадлежащие к пяти семействам мембранных транспортёров. Наиболее хорошо изучены АВС транспортёры, поскольку эти белки участвуют в механизмах лекарственной устойчивости клеток эукариот и прокариот (Saier et al., 2014; Wong et al., 2014). В геноме *O. felineus* обнаружено 23 гена, кодирующих АВС транспортёры (Mordvinov et al., 2017a). Интересно, что 4 из них, P1–P4, обладают большим сходством с однокопийным геном Р-гликопротеина человека. Продукт этого гена известен также как белок множественной лекарственной устойчивости 1 (Saier et al., 2014; Wong et al., 2014). Установлено, что у двух генов Р-гликопротеинов *O. felineus* уровень экспрессии зависит от стадии развития паразита. Так, у взрослых гельминтов экспрессия генов P1 и P4 в 20–30 раз выше, чем у метациркий и у недавно экцистированных личинок. Вероятно,

именно эти белки наиболее значимы для метаболизма ксенобиотиков у взрослых особей паразитов.

В заключение следует подчеркнуть, что система метаболизма ксенобиотиков *O. felineus*, как, вероятно, и ряда других видов паразитических плоских червей, имеет четкие структурные и функциональные особенности. Прежде всего, она существенно отличается от системы метаболизма экзогенных субстратов хозяев этих паразитов. Детальное изучение системы метаболизма ксенобиотиков *O. felineus* и других описторхид позволит расширить наши представления о формировании механизмов паразитизма и эволюции трематод. Знания о структуре и функциях этой системы метаболизма могут быть применены в работах по идентификации фармакологических мишеней и созданию новых лекарств для терапии описторхоза.

Продуктами системы метаболизма ксенобиотиков *O. felineus* и других трематод могут быть метаболиты экзогенных и эндогенных соединений, входящие в ЭСП паразитов. Из низкомолекулярных компонентов ЭСП *O. felineus* в настоящее время известны паразит-специфические метаболиты холестерина (Gouveia et al., 2017) Эти оксистерол-подобные соединения обладают генотоксическими свойствами и могут вызывать повреждения ДНК клеток хозяина. Накопление таких повреждений ведет к злокачественной трансформации тканей желчных протоков. Не исключено, что специфические оксистеролы *O. felineus* участвуют в запуске механизмов холангиокарциногенеза при описторхозе.

Синтез паразит-специфических оксистеролов могут осуществлять СУР и другие ферменты *O. felineus*, участвующие в окислительно-восстановительных реакциях, такие как глутатион-S-трансферазы, тиоредоксинпероксидазы и др. Поиск белков, вовлеченных в ферментативный путь генерации специфических генотоксических оксистеролов гельминтов, остается приоритетной задачей молекулярной паразитологии.

Гранулины – потенциальные промоторы неоплазии холангиоцитов

Существует гипотеза, что в канцерогенных процессах, связанных с заражением гельминтами, может участвовать гранулин – белок, входящий в состав ЭСП описторхид (Smout et al., 2015). Гранулины канцерогенных описторхид

O. felineus, *O. viverrini* и *C. sinensis*, являются консервативными белками и обладают гомологией с гранулином человека. Гранулины человека и гельминтов стимулируют пролиферацию эпителиальных клеток, включая холангиоциты (Smout et al., 2015), однако используют для этого различные клеточные сигнальные пути. Гранулин человека взаимодействует с рецепторами фактора некроза опухоли (ФНО) и действует как антагонист пути передачи сигнала ФНО. Клеточный рецептор гранулина гельминтов неизвестен, однако установлено, что гранулин *O. viverrini* проникает в холангиоциты и активирует систему MAP-киназ и сигнальный путь рецептора эпидермального фактора роста. Это намного более мощный путь активации пролиферации, чем используемый гранулином человека.

Гранулин *O. viverrini* эффективно способствует заживлению повреждений, возникающих в результате двигательной активности гельминтов и при их питании (Smout et al., 2015). Кроме того, этот белок стимулирует рост кровяных сосудов (Smout et al., 2015) и может, вероятно, активировать клеточную миграцию. Таким образом, гранулин обладает свойствами, необходимыми для стимуляции пролиферации малигнизированных холангиоцитов, возникающих при хроническом описторхозе, и формирования злокачественной опухоли желчных протоков, холангиокарциномы.

В геноме *O. felineus*, как и в геномах *O. viverrini* и *C. sinensis*, обнаружено четыре гена, GRN-1–GRN-4, кодирующие однодоменные гранулины, а также один ген мультисаитового програнулина (PGRN) (Ershov et al., 2019). Гены однодоменных гранулинов локализованы в одном хромосомном локусе и формируют консервативную синтенную группу генов. Последовательности, кодирующие GRN-1 и GRN-4 *O. felineus*, обладают 95 % гомологией, что предполагает дубликацию одного из них. Фиксация этой дубликации в геномах описторхид может быть связана, вероятно, со значительной функциональной нагрузкой гранулина.

Наиболее высокий уровень экспрессии генов, кодирующих GRN-1 и GRN-4 *O. felineus*, зарегистрирован у взрослых гельминтов, тогда как у метацеркарий доминантно экспрессирующимся является ген GRN-3 (Ershov et al., 2019). Все экспериментальные работы по определению потенциально канцерогенных свойств гранулинов описторхид были выполнены с GRN-1 *O. viverrini*. Однако можно предположить, что митогенными, ангиогенными свойствами и способностью увеличивать миграцию клеток обладает также и GRN-4. У взрослых особей экспрессия генов, кодирующих GRN-2 и GRN-3, практически отсутствует. Вполне вероятно, что продукты этих генов могут быть функционально вовлечены в механизмы взаимоотношений паразит–хозяин в промежуточных хозяевах трематод, моллюсках и рыбе.

Заключение

Возбудитель описторхоза печеночный сосальщик *O. felineus* входит в триаду эпидемиологически значимых видов трематод семейства Opisthorchiidae. Его ареал охватывает огромные территории Европы и Азии, и вспышки описторхоза, вызванного этим гельминтом, можно ожидать во многих странах. Нельзя не учитывать также растущую

миграцию населения и туристический поток между различными странами. Вследствие этих факторов пациенты, страдающие от инвазии *O. felineus*, могут быть выявлены далеко за пределами эндемичных районов. Таким образом, описторхоз, вызванный *O. felineus*, становится глобальной проблемой, выходящей за рамки биомедицинских проблем отдельных регионов.

Появление геномных и протеомных данных *O. felineus* существенно укрепляет базу молекулярно-биологических исследований эпидемиологически важных печеночных сосальщиков. Глубокие исследования геномики и протеомики *O. felineus* позволят генерировать обоснованные гипотезы о механизмах канцерогенеза, ассоциированных с описторхозом, идентифицировать видоспецифические механизмы патогенеза печеночных гельминтозов, проводить направленный поиск молекулярных мишеней для терапии заболеваний. Развитие этих работ должно учитывать острую потребность практического здравоохранения в эффективных средствах терапии и профилактики трематодозов.

Список литературы / References

- Безр С.А. Биология возбудителя описторхоза. М.: Т-во научных изданий «КМК», 2005.
- [Beer S.A. The Biology of the Opisthorchiasis Agent. Moscow: KMK Publ., 2005. (in Russian)]
- Львова М.Н., Дужак Т.Г., Центалович Ю.П., Катохин А.В., Мординов В.А. Секретом мариты печеночного сосальщика *Opisthorchis felineus*. *Паразитология*. 2014;48(3):169-184.
- [Lvova M.N., Duzhak T.G., Tsentalovitch Y.P., Katokhin A.V., Mordvinov V.A. Secretome of the adult liver fluke *Opisthorchis felineus*. *Parazitologiya = Parasitology*. 2014;48(3):169-184. (in Russian)]
- Роспотребнадзор. О мерах профилактики описторхоза. 2015. https://rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=3480&sphrase_id=462082.
- [Rosspotrebnadzor. On Preventive Measures against Opisthorchiasis. 2015. https://rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=3480&sphrase_id=462082. (in Russian)]
- Bartley D.J., Morrison A.A., Dupuy J., Bartley Y., Sutra J.F., Menez C., Alvinerie M., Jackson F., Devin L., Lespine A. Influence of Pluronic 85 and ketoconazole on disposition and efficacy of ivermectin in sheep infected with a multiple resistant *Haemonchus contortus* isolate. *Vet. Parasitol.* 2012;187:464-472. DOI 10.1016/j.vetpar.2012.02.011.
- Belshaw R., Bensasson D. The rise and falls of introns. *Heredity*. 2006; 96:208-213. DOI 10.1038/sj.hdy.6800791.
- Berriman M., Haas B.J., LoVerde P.T., Wilson R.A., Dillon G.P., Cerqueira G.C., Mashiyama S.T., Al-Lazikani B., Andrade L.F., Ashton P.D., Aslett M.A., Bartholomeu D.C., Blandin G., Caffrey C.R., Coghlan A., Coulson R., Day T.A., Delcher A., DeMarco R., Djikeng A., Eyre T., Gamble J.A., Ghedin E., Gu Y., Hertz-Fowler C., Hirai H., Hirai Y., Houston R., Ivans A., Johnston D.A., Lacerda D., Macedo C.D., McVeigh P., Ning Z., Oliveira G., Overington J.P., Parkhill J., Pertea M., Pierce R.J., Protasio A.V., Quail M.A., Rajandream M.A., Rogers J., Sajid M., Salzberg S.L., Stanke M., Tivey A.R., White O., Williams D.L., Wortman J., Wu W., Zamanian M., Zerlotini A., Fraser-Liggett C.M., Barrell B.G., El-Sayed N.M. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature*. 2009;460:352-358. DOI 10.1038/nature08160.
- Cai X.Q., Liu G.H., Song H.Q., Wu C.Y., Zou F.C., Yan H.K., Yuan Z.G., Lin R.Q., Zhu X.Q. Sequences and gene organization of the mitochondrial genomes of the liver flukes *Opisthorchis viverrini*

- and *Clonorchis sinensis* (Trematoda). *Parasitol. Res.* 2012;110:235-243. DOI 10.1007/s00436-011-2477-2.
- Cwiklinski K., Dalton J.P., Dufresne P.J., La Course J., Williams D.J., Hodgkinson J., Paterson S. The *Fasciola hepatica* genome: gene duplication and polymorphism reveals adaptation to the host environment and the capacity for rapid evolution. *Genome Biol.* 2015; 16:71. DOI 10.1186/s13059-015-0632-2.
- Ershov N.I., Mordvinov V.A., Prokhortchouk E.B., Pakharukova M.Y., Gunbin K.V., Ustyantsev K., Genaev M.A., Blinov A.G., Mazur A., Boulygina E., Tsygankova S., Khrameeva E., Chekanov N., Fan G., Xiao A., Zhang H., Xu X., Yang H., Solovyev V., Lee S.M., Liu X., Afonnikov D.A., Skryabin K.G. New insights from *Opisthorchis felineus* genome: update on genomics of the epidemiologically important liver flukes. *BMC Genomics.* 2019;20:399. DOI 10.1186/s12864-019-5752-8.
- Gouveia M.J., Pakharukova M.Y., Laha T., Sripa B., Maksimova G.A., Rinaldi G., Brindley P.J., Mordvinov V.A., Amaro T., Santos L.L., Costa J.M.C.D., Vale N. Infection with *Opisthorchis felineus* induces intraepithelial neoplasia of the biliary tract in a rodent model. *Carcinogenesis.* 2017;38:929-937. DOI 10.1093/carcin/bgx042.
- Keiser J., Utzinger J. Food-borne trematodiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2009;22(3):466-483. DOI 10.1128/CMR.00012-09.
- Laing R., Kikuchi T., Martinelli A., Tsai I.J., Beech R.N., Redman E., Holroyd N., Bartley D.J., Beasley H., Britton C., Curran D., Devaney E., Gilabert A., Hunt M., Jackson F., Johnston S.L., Kryukov I., Li K., Morrison A.A., Reid A.J., Sargison N., Saunders G.I., Wasmuth J.D., Wolstenholme A., Berriman M., Gilleard J.S., Cotton J.A. The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. *Genome Biol.* 2013; 14:R88. DOI 10.1186/gb-2013-14-8-r88.
- Lindblom T.H., Dodd A.K. Xenobiotic detoxification in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Exp. Zool. A. Comp. Exp. Biol.* 2006; 305(9):720-729. DOI 10.1002/jez.a.324.
- Matousova P., Vokral I., Lamka J., Skalova L. The role of xenobiotic-metabolizing enzymes in anthelmintic deactivation and resistance in helminths. *Trends Parasitol.* 2016;32:481-491. DOI 10.1016/j.pt.2016.02.004.
- Mordvinov V.A., Ershov N.I., Pirozhkova D.S., Pakharukov Y.V., Pakharukova M.Y. ABC transporters in the liver fluke *Opisthorchis felineus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2017a;216:60-68. DOI 10.1016/j.molbiopara.2017.07.001.
- Mordvinov V.A., Shilov A.G., Pakharukova M.Y. Anthelmintic activity of cytochrome P450 inhibitors miconazole and clotrimazole: in-vitro effect on the liver fluke *Opisthorchis felineus*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2017b;50:97-100. DOI 10.1016/j.ijantimicag.2017.01.037.
- Morphew R.M., Wright H.A., LaCourse E.J., Woods D.J., Brophy P.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. *Mol. Cell. Proteomics.* 2007;6:963-972. DOI 10.1074/mcp.M600375-MCP200.
- Ovchinnikov V.Y., Afonnikov D.A., Vasiliev G.V., Kashina E.V., Sripa B., Mordvinov V.A., Katokhin A.V. Identification of micro-RNA genes in three opisthorchiids. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015;9: e0003680. DOI 10.1371/journal.pntd.0003680.
- Pakharukova M.Y., Ershov N.I., Vorontsova E.V., Katokhin A.V., Merkulova T.I., Mordvinov V.A. Cytochrome P450 in fluke *Opisthorchis felineus*: Identification and characterization. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2012;181:190-194. DOI 10.1016/j.molbiopara.2011.11.005.
- Pakharukova M.Y., Kovner A.V., Trigolubov A.N., Fedin E.N., Mikhailova E.S., Autenshlyus A.I., Mordvinov V.A., Shtofin S.G. Mechanisms of trematodiasis pathogenicity: the presence of the secretory proteins from the liver fluke *Opisthorchis felineus* in the gallbladder tissues of the patients with chronic opisthorchiasis. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2017;21:312-316. DOI 10.18699/VJ16.17-0.
- Pakharukova M.Y., Mordvinov V.A. The liver fluke *Opisthorchis felineus*: biology, epidemiology and carcinogenic potential. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2016;110(1):28-36. DOI 10.1093/trstmh/trv085.
- Pakharukova M.Y., Vavilin V.A., Sripa B., Laha T., Brindley P.J., Mordvinov V.A. Functional analysis of the unique cytochrome P450 of the liver fluke *Opisthorchis felineus*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(12):e0004258. DOI 10.1371/journal.pntd.0004258.
- Petney T.N., Andrews R.H., Saijuntha W., Wenz-Mücke A., Sithithaworn P. The zoonotic, fish-borne liver flukes *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis felineus* and *Opisthorchis viverrini*. *Int. J. Parasitol.* 2013;43(12-13):1031-1046. DOI 10.1016/j.ijpara.2013.07.007.
- Pomaznoy M.Y., Logacheva M.D., Young N.D., Penin A.A., Ershov N.I., Katokhin A.V., Mordvinov V.A. Whole transcriptome profiling of adult and infective stages of the trematode *Opisthorchis felineus*. *Parasitol. Int.* 2016;65(1):12-19. DOI 10.1016/j.parint.2015.09.002.
- Pozio E., Armignacco O., Ferri F., Gomez Morales M.A. *Opisthorchis felineus*, an emerging infection in Italy and its implication for the European Union. *Acta Trop.* 2013;126(1):54-62. DOI 10.1016/j.actatropica.2013.01.005.
- Prichard R.K., Basanez M.G., Boatman B.A., McCarthy J.S., Garcia H.H., Yang G.J., Sripa B., Lustigman S. A research agenda for helminth diseases of humans: intervention for control and elimination. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012;6:e1549. DOI 10.1371/journal.pntd.0001549.
- Protasio A.V., Tsai I.J., Babbage A., Nichol S., Hunt M., Aslett M.A., De Silva N., Velarde G.S., Anderson T.J., Clark R.C., Davidson C., Dillon G.P., Holroyd N.E., LoVerde P.T., Lloyd C., McQuillan J., Oliveira G., Otto T.D., Parker-Manuel S.J., Quail M.A., Wilson R.A., Zerlotini A., Dunne D.W., Berriman M. A systematically improved high quality genome and transcriptome of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012;6:e1455. DOI 10.1371/journal.pntd.0001455.
- Saier M.H. Jr., Reddy V.S., Tamang D.G., Västermark A. The transporter classification database. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:D251-D258. DOI 10.1093/nar/gkt1097.
- Schuster R., Bonin J., Staubach C., Heidrich R. Liver fluke (*Opisthorchiidae*) findings in red foxes (*Vulpes vulpes*) in the eastern part of the Federal State Brandenburg, Germany – a contribution to the epidemiology of opisthorchiidosis. *Parasitol. Res.* 1999;85(2):142-146. DOI 10.1007/s004360050523.
- Shekhovtsov S.V., Katokhin A.V., Kolchanov N.A., Mordvinov V.A. The complete mitochondrial genomes of the liver flukes *Opisthorchis felineus* and *Clonorchis sinensis* (Trematoda). *Parasitol. Int.* 2010;59:100-103. DOI 10.1016/j.parint.2009.10.012.
- Shekhovtsov S.V., Katokhin A.V., Romanov K.V., Besprozvanykh V.V., Fedorov K.P., Yurlova N.I., Serbina E.A., Sithithaworn P., Kolchanov N.A., Mordvinov V.A. A novel nuclear marker, Pm-int9, for phylogenetic studies of *Opisthorchis felineus*, *Opisthorchis viverrini*, and *Clonorchis sinensis* (Opisthorchiidae, Trematoda). *Parasitol. Res.* 2009;106:293-297. DOI 10.1007/s00436-009-1628-1.
- Sleumer M.C., Mah A.K., Baillie D.L., Jones S.J. Conserved elements associated with ribosomal genes and their trans-splice acceptor sites in *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(9):2990-3004. DOI 10.1093/nar/gkq003.
- Smout M.J., Sotillo J., Laha T., Papatprem Siri A., Rinaldi G., Pimental R.N., Chan L.Y., Johnson M.S., Turnbull L., Whitchurch C.B., Giacomini P.R., Moran C.S., Golledge J., Daly N., Sripa B., Mulvanna J.P., Brindley P.J., Loukas A. Carcinogenic parasite secretes growth factor that accelerates wound healing and potentially promotes neoplasia. *PLoS Pathog.* 2015;11:e1005209. DOI 10.1371/journal.ppat.1005209.
- Tsai I.J., Zarowiecki M., Holroyd N., Garcarrubio A., Sánchez-Flores A., Brooks K.L., Tracey A., Bobes R.J., Frago G., Sciuotto E., Aslett M., Beasley H., Bennett H.M., Cai X., Camicia F., Clark R., Cucher M., De Silva N., Day T.A., Deplazes P., Estrada K., Fernández C., Holland P.W.H., 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 J., Soberón X., Olson P.D., Laclette J.P., Brehm K., Berriman M. The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature*. 2013;496:57-63. DOI 10.1038/nature12031.
- Urrutia A.O., Hurst L.D. The signature of selection mediated by expression on human genes. *Genome Res*. 2003;13:2260-2264. DOI 10.1101/gr.641103.
- Wang X., Chen W., Huang Y., Sun J., Men J., Liu H., Luo F., Guo L., Lv X., Deng C., Zhou C., Fan Y., Li X., Huang L., Hu Y., Liang C., Hu X., Xu J., Yu X. The draft genome of the carcinogenic human liver fluke *Clonorchis sinensis*. *Genome Biol*. 2011;12:R107. DOI 10.1186/gb-2011-12-10-r107.
- Wong K., Ma J., Rothnie A., Biggin P.C., Kerr I.D. Towards understanding promiscuity in multidrug efflux pumps. *Trends Biochem. Sci*. 2014;39:8-16. DOI 10.1016/j.tibs.2013.11.002.
- 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. The *Opisthorchis viverrini* genome provides insights into life in the bile duct. *Nat. Commun*. 2014;5:4378. DOI 10.1038/ncomms5378.
- Zadesenets K.S., Katokhin A.V., Mordvinov V.A., Rubtsov N.B. Comparative cytogenetics of opisthorchid species (Trematoda, Opisthorchiidae). *Parasitol. Int*. 2012;61:87-89. DOI 10.1016/j.parint.2011.07.006.

ORCID ID

V.A. Mordvinov orcid.org/0000-0002-6173-0774
N.I. Ershov orcid.org/0000-0003-3423-3497
M.Y. Pakharukova orcid.org/0000-0003-1054-2068

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ 18-04-00417-A (ВАМ), № 19-34-90060-Аспиранты (ЗО)) и бюджетных проектов ИЦиГ СО РАН (0324-2019-0041 (МЮП), № 0259-2019-0010 (ЗО)).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 25.10.2019. После доработки 20.12.2019. Принята к публикации 20.12.2019. Опубликована онлайн 23.04.2020.