

**И. В. Салтыкова, В. А. Петров, Ю. Б. Дорофеева  
В. В. Иванов, А. Э. Сазонов**

**ИССЛЕДОВАНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕМОЗОИНА  
ПРИ ИНВАЗИИ *O. FELINEUS* И ОЦЕНКА ЕГО РОЛИ  
В МОДИФИКАЦИИ МИКРОБИОТЫ ЖЕЛЧНЫХ ПРОТОКОВ**

70

Спектрофотометрически определен уровень накопления гемозоина в различных органах животных при экспериментальном описторхозе, а также оценен вклад гемозоина в способность инвазии *O. felineus* модифицировать микробиоту желчных протоков. Микробиота оценена путем метагеномного анализа образцов желчных протоков интактных животных и животных с описторхозом, также в исследование включены образцы зрелых форм *O. felineus*. Показано, что гемозоин накапливается преимущественно в печени при инвазии *O. felineus*. Инвазия *O. felineus* приводит к увеличению альфа-разнообразия микробиоты желчных протоков у животных, при этом этот эффект не связан с присутствием гемозоина в желчных протоках. Метагеномный анализ выявил, что наиболее представленными таксонами в зрелых формах *O. felineus* являются *Sphingomonas*, *Prevotella*, *Methylobacterium*.

Research works aimed at assessing the interaction in the host-parasite system, pay attention to the products of the vital activity of the parasite. Hemozoin is one of the most promising metabolites that can be used for new methods of parasite diagnostics and treatment. It is known that hemozoin is produced by parasites causing schistosomiasis and malaria. Recent research has shown that hemozoin is produced by the hepatic trematode *Opisthorchis felineus*, but the effects associated with the presence of hemozoin in the bile ducts of the host have not been studied yet. The authors compare the concentration of hemozoin in various organs of animals and study the ability of the *O. felineus* hemozoin to modify the bile ducts microbiota. The authors study the bile duct microbiota of infected and healthy animals and perform the metagenomics analysis. The microbiota is assessed by metagenomic analysis of bile duct samples of intact animals and animals with opisthorchiasis. Samples of mature forms of *O. felineus* are also included in the study. In accordance with the results obtained, hemozoin accumulates mainly in the liver during the invasion of *O. felineus*. The invasion of *O. felineus* leads to an increase in the alpha diversity of the bile duct microbiota in animals, and this effect is not associated with the presence of hemozoin in the bile ducts. Metagenomic analysis revealed that the most representative taxa in the mature forms of *O. felineus* are *Sphingomonas*, *Prevotella*, *Methylobacterium*.

**Ключевые слова:** описторхоз, *Opisthorchis felineus*, гемозоин, микробиота, альфа-разнообразие, метагеномное секвенирование.

**Key words:** Opisthorchiasis, *Opisthorchis felineus*, hemozoin, microbiota, alpha diversity, metagenomic sequencing.



## Введение

Гемозоин, известный как «малярийный пигмент», является продуктом метаболизма паразитов, образование которого происходит в результате переваривания гемоглобина. Способность образования гемозоина у паразитических организмов рассматривают как адаптационный механизм, связанный с гематофагией [1]. Образование гемозоина характерно для *Plasmodium falciparum* [2], внутриклеточных простейших *Haemoproteus columbae* [3], трематод *Schistosoma mansoni* [4] и *S. japonicum* [5]. В случае малярии и шистосомоза распространение гемозоина по организму хозяина происходит с током крови, гемозоин накапливается в печени, селезенке и других органах [6–8]. Показано, что гемозоин играет важную роль в патогенезе малярии. Макрофаги, нейтрофилы, моноциты захватывают гемозоин *Plasmodium falciparum* путем фагоцитоза, что приводит к нарушению регуляции синтеза медиаторов врожденного иммунного ответа [9]. Была выявлена взаимосвязь между наличием моноцитов, инкорпорировавших гемозоин, и ингибированием эритропоэза у детей с выраженной анемией на фоне малярии [10].

В ходе собственных исследований было показано, что гемозоин — продукт жизнедеятельности печеночной трематоды *Opisthorchis felineus* [11]. Описторхоз, вызываемый *O. felineus*, является распространенным гельминтозом на территории Российской Федерации, естественные очаги описторхоза расположены вблизи р. Оби, Иртыша, Урала, Волги, Камы, Дона, Днепра, Северной Двины и Бирюсы [12–14]. Зрелые формы *O. felineus* паразитируют в желчных протоках печени хозяина, для данного гельминтоза характерно поражение гепатобилиарной системы человека [15]. Гемозоин экскретируется зрелыми формами *O. felineus* в просвет желчных протоков, что приводит к формированию эктазий желчных протоков, заполненных пигментом [11]. Данные о роли гемозоина в патогенезе описторхозной инвазии малочисленны, остается неисследованным вопрос о возможности распространения гемозоина при описторхозе с током крови (клетками крови), также неизвестны локальные эффекты гемозоина на желчные протоки печени.

В данной работе определен уровень накопления гемозоина в различных органах модельных животных, а также проведено исследование гемозоина в контексте влияния данного метаболита на микробиотический состав желчных протоков при экспериментальной инвазии *O. felineus*. Ранее для инвазии *O. felineus* была показана способность приводить к модификации микробиотического состава желчи у человека [16]. Было предположено, что одним из факторов, который может быть связан с модификацией микробиоты желчи, является окклюзия желчных протоков гемозоином. Скопление гемозоина в желчных протоках может приводить к появлению специфической «экологической ниши» для микроорганизмов, в частности для железопотребляющих бактерий. Таким образом, для выявления локального эффекта гемозоина и определения его влияния на микробиоту желчных протоков проведена оценка микробиотического состава желчных протоков в зависимости от присутствия/отсутствия скоплений гемозоина *O. felineus*.



## Методы исследования

Для количественного определения концентрации гемозоина в органах золотистых хомячков (*Mesocricetus. Auratus*) были сформированы три группы, каждая по пять животных: контрольная группа (без инвазии *O. felineus*), группа острого описторхоза (8-я неделя инвазии), группа хронического описторхоза (38-я неделя инвазии *O. felineus*). Животные были получены из SPF-вивария Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск). Источником метацеркариев стала рыба карповых пород из р. Томь, жизнеспособность метацеркариев определяли с использованием микроскопии. Заражение проводили путем введения внутрижелудочно 50 метацеркариев *O. felineus* в изотоническом растворе [17].

Выделение гемозоина и определения его концентрации в органах проводили согласно методике, описанной в [18]. Приготавливали навески следующих органов по 45 мг с помощью аналитических весов (OHAUS, США): печень, селезенка, почки, легкие, мышцы, сердце. Концентрацию гемозоина в них определяли на спектрофотометре UNICO 2800 (США). В качестве стандарта использовали серию разведенный гематина (0,25–10 мкМ). Оптическую плотность измеряли на рабочей длине волны  $\lambda = 401$  нм и длине волны максимального поглощения вещества  $\lambda = 700$  нм. Для оценки данных распределения гемозоина использовали пакет прикладных программ SPSS 16.0. Для установления статистически значимых различий при оценке концентраций гемозоина у зараженных и интактных животных использовался непараметрический U-критерий Манна-Уитни при  $p < 0,05$ .

Для оценки микробиотического состава желчных протоков в зависимости от присутствия гемозоина в исследование включили животных с инвазией *O. felineus* ( $n = 7$ ) и 5 интактных животных. От инвазированных хомячков были получены 7 образцов тканей желчных протоков с гемозоином и 5 образцов тканей желчных протоков без гемозоина: от интактных животных — 5 образцов тканей желчных протоков. Также в исследование включили 5 образцов зрелых форм *O. felineus*. Для выделения микробной ДНК из образцов проводили гомогенизацию образцов в лизирующем буфере (500 mM NaCl; 500 mM TrisHCl pH = 8; 50 mM EDTA, 4 % SDS) с использованием бисерной мельницы Mini-Beadbeater-24 с очисткой ДНК фенол-хлороформным методом с последующим спиртовым осозданием в присутствии 3M ацетата натрия. Высокопроизводительное секвенирование проведено с использованием праймеров Next-16S-1st-F: TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG и Next-16S-1st-R: GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAA GAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC, обеспечивающих амплификацию гипервариабельных участков V4/V5 16S рРНК. Секвенирование проводили на приборе Miseq (Illumina, США) с длиной прочтения по 300 нуклеотидов с двух концов.

Обработку результатов секвенирования, расчет альфа и бета разнообразия проводили с использованием программного обеспечения



QIIME [19]. Для определения таксономической принадлежности прочтений использовали базу данных GreenGenes версии 13.5 [20]. Для оценки альфа-разнообразия образцы прореживали на уровне образца с минимальной представленностью операционных таксономических единиц (118 ОТЕ/образец) с последующим подсчетом индекса таксономического разнообразия Chao 1 в исследуемых группах и сравнением их с использованием непараметрического Т-критерия при 9999 перестановках. Оценку бета-разнообразия проводили методом анализа главных координат (PCoA) в метрике weighted Unifrac с предварительной нормализацией данных по алгоритму CSS [21]. Для определения силы эффекта R и оценки уровня его достоверности использовали метод анализа общности (ANalysis Of SIMilarity, ANOSIM) с оценкой достоверности при 9999 перестановках. Для статистического анализа представленности бактериальных таксонов в образцах использовали модель FitFeatureModel пакета metagenomeSeq языка R [22]. Коррекцию значений  $p$  на множественное сравнение проводили методом Бенджамини-Хохберга различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$  после применения поправки.

### Результаты исследования

При сравнении концентрации гемозоина в различных органах у инвазированных и интактных животных были получены статистически значимые различия только для печени. Увеличение концентрации гемозоина в печени было характерно для 8-й и 38-й недели инвазии при сравнении с контрольной группой животных (рис. 1), что свидетельствует о преимущественном накоплении гемозоина в печени и минимальном распространении гемозоина по другим органам и тканям хозяина с кровью при экспериментальном описторхозе.

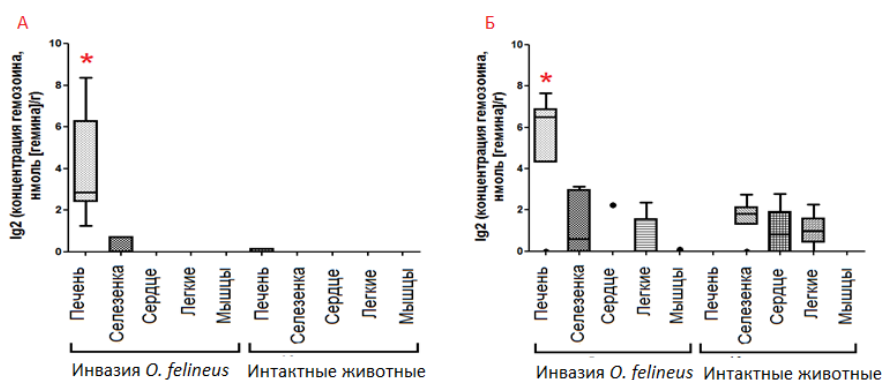


Рис. 1. Увеличение концентрации гемозоина в печени:

*a* — концентрация гемозоина в тканях животных с описторхозом на 8-й неделе инвазии ( $n = 5$ ) и у интактных животных ( $n = 5$ ); *b* — концентрация гемозоина в тканях животных с описторхозом на 38-й неделе инвазии ( $n = 5$ ) и у интактных животных ( $n = 5$ );

\* — статистически значимые различия при сравнении с контрольной группой животных



При анализе микробиотического состава желчных протоков образцов, включенных в исследование, методом высокопроизводительного секвенирования гена *16S рРНК* было получено 56439 ридов. Проводили сравнение образцов желчных протоков от интактных животных (OF-), желчных протоков от животных с описторхозом, учитывая факт наличия гемозоина (OFHz+) и (OFHz-). При оценке альфа-разнообразия на основе индекса Chao1 выявлено, что микробиота желчных протоков инвазированных животных характеризовалась большим альфа-разнообразием при сравнении с интактными животными (рис. 2, а). При этом не обнаружено статистически значимых различий по альфа-разнообразию микробиоты при сравнении желчных протоков в зависимости от присутствия гемозоина. При оценке бета-разнообразия микробиоты желчных протоков методом анализа главных координат различий между интактными и инвазированными животными не обнаружено (рис. 2, б).

Полученный нами результат свидетельствует о том, что инвазия *O. felineus* приводит к увеличению альфа-разнообразия микробиоты в желчных протоках, при этом присутствие гемозоина не оказывает существенного влияния на микробиотический состав желчных протоков. Ранее было показано, что гельминтная инвазия кишечника может приводить к увеличению альфа-разнообразия микробиоты [23; 24]. Для кишечника увеличение альфа-разнообразия микробиоты оценивают как фактор с протективным эффектом в отношении ожирения и других болезней [25]. Однако роль увеличения альфа-разнообразия микробиоты желчных протоков на формирование заболеваний, в частности болезней печени, на данный момент остается неисследованной.

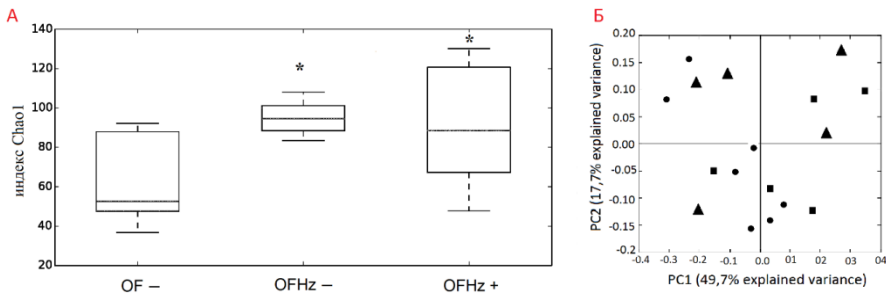


Рис. 2. Оценка альфа- и бета-разнообразий:

а – альфа-разнообразие на основе индекса Chao1 (представлены медианы и индеквартельный размах). (OF-) – микробиота желчных протоков интактных животных; (OFHz-) – микробиота желчных протоков с инвазией без гемозоина; (OFHz+) – микробиота желчных протоков, заполненных гемозоином, от инвазированных животных;

б – график первых двух компонент метода главных координат (PCoA).

По осям: главные компоненты PC1, PC2, в скобках для каждой главной компоненты указана объясняемая ею доля вариабельности данных. Треугольники-образцы желчных протоков без гемозоина от инвазированных животных, квадраты-образцы желчных протоков от интактных животных, круги-образцы желчных протоков, содержащие гемозоин у животных с описторхозом; \* – статистически значимые различия при сравнении с контрольной группой животных



Ранее влияние описторхозной инвазии на микробиотический состав желчи было оценено у людей с желчекаменной болезнью. Было показано, что описторхозная инвазия не оказывает влияния на альфа-разнообразие микробиоты желчи, однако имеет вклад в бета-разнообразие микробиоты. Были выявлены микроорганизмы желчи, которые ассоциированы с инвазией *O. felineus* [16]. В данном исследовании микробиоты желчных протоков на фоне описторхоза не обнаружены микроорганизмы, представленность которых менялась бы на фоне инвазии.

Проведен метагеномный анализ образцов зрелых форм *O. felineus*, на рисунке 3 изображена тепловая карта представленности преобладающих таксонов микроорганизмов (90 % суммарного покрытия) в метагеномных образцах зрелых форм *O. felineus*. Наиболее представленными родами микроорганизмов в образцах зрелых форм *O. felineus* являются *Sphingomonas*, *Prevotella*, *Methylobacterium*.

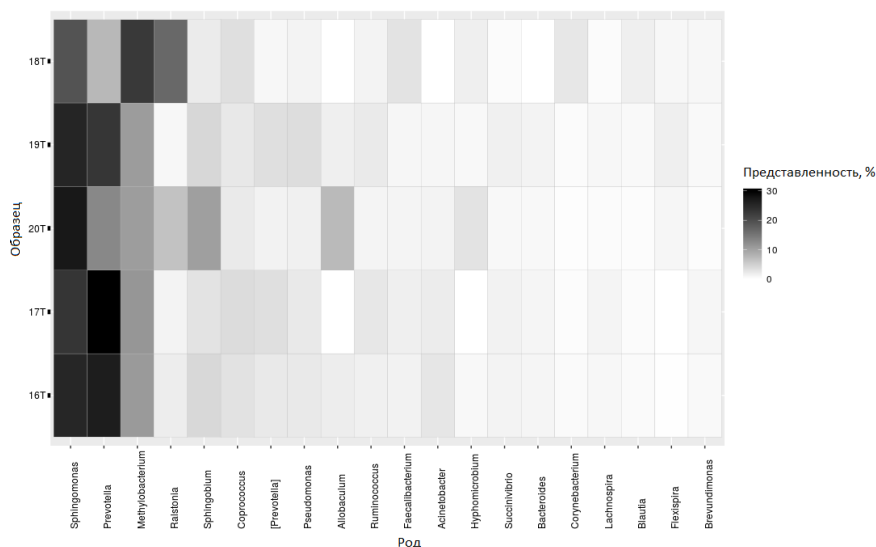


Рис. 3. Тепловая карта содержания найденных таксонов (на уровне родов) в образцах зрелых форм *O. felineus* (n = 5)

Родственным видом опистрхид для *O. felineus* является *O. viverrini* [26], вызывающий описторхоз на территории Юго-Восточной Азии [27]. Для микробиоты *O. viverrini* характерно преобладание таксонов *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium*, *Eubacterium* [28], представленность которых в образцах *O. felineus* была низкой. Можно предполагать, что на микробиоту гельминта существенное влияние оказывает факторы внешней среды, в случае паразитирования воздействие факторов определено организмом хозяина, в частности его собственной микробиотой. Полученные нами данные находятся в соответствии с гипотезой о тесном взаимодействии микробиоты организма хозяина и паразита [28].

Таким образом, в результате проведенного исследования оценено распределение гемозоина в различных органах при эксперименталь-



ном описторхозе, были получены данные о преимущественном накоплении гемозоина в печени как при острой, так и при хронической описторхозной инвазии. Такая картина не соответствует ситуации при малярии, при которой гемозоин накапливается полиорганно. С учетом того, что зрелые формы описторхов продуцируют значительное количество гемозоина, который практически весь локализуется в печени, необходимо обращать более пристальное внимание на данный фактор и его роль в патогенезе описторхоза и прежде всего исследовать его иммуномодулирующие свойства.

При исследовании микробиоты желчных путей на фоне инвазии было показано, что инвазия *O. felineus* приводит к увеличению альфа-разнообразия желчных протоков, однако этот эффект не связан с накоплением гемозоина в желчных протоках. Отсутствие выраженного изменения состава микробиоты при окклюзии желчных протоков гемозоином удивительно, однако может объясняться его иммуномодулирующим действием.

В ходе исследования охарактеризованы метагеномные образцы зрелых форм *O. felineus*. Наиболее представленными таксонами в образцах зрелых форм *O. felineis* являются *Sphingomonas*, *Prevotella*, *Methylobacterium*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (договор №16-34-00403) (мол\_а).

### Список литературы

1. Toh S. Q. et al. Heme and blood-feeding parasites: friends or foes? // Parasites & vectors. 2010. Vol. 3, №1. P. 108.
2. Orjih A. U., Fitch C. D. Hemozoin production by Plasmodium falciparum: variation with strain and exposure to chloroquine // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 1993. Vol. 1157, №2. P. 270–274.
3. Chen M. M., Shi L., Sullivan D. J. Haemoproteus and Schistosoma synthesize heme polymers similar to Plasmodium hemozoin and  $\beta$ -hematin // Molecular and biochemical parasitology. 2001. Vol. 113, №1. P. 1–8.
4. Oliveira M. F. et al. Structural and morphological characterization of hemozoin produced by Schistosoma mansoni and Rhodnius prolixus // Febs letters. 2005. Vol. 579, №27. P. 6010–6016.
5. Sun J., Li C., Wang S. Organism-like formation of Schistosoma hemozoin and its function suggest a mechanism for anti-malarial action of artemisinin // Scientific reports. 2016. Vol. 6.
6. Lamikanra A. A. et al. Hemozoin (malarial pigment) directly promotes apoptosis of erythroid precursors // PloS one. 2009. Vol. 4, №12. P. e8446.
7. Deroost K. et al. Hemozoin induces hepatic inflammation in mice and is differentially associated with liver pathology depending on the Plasmodium strain // PloS one. 2014. Vol. 9, №11. P. e113519.
8. Truscott M. et al. Schistosoma mansoni hemozoin modulates alternative activation of macrophages via specific suppression of Retnla expression and secretion // Infection and immunity. 2013. Vol. 81, №1. P. 133–142.
9. Perkins D. J. et al. Severe malarial anemia: innate immunity and pathogenesis // International journal of biological sciences. 2011. Vol. 7, №9. P. 1427.



10. Awandare G. A. et al. Role of monocyte-acquired hemozoin in suppression of macrophage migration inhibitory factor in children with severe malarial anemia // *Infection and immunity*. 2007. Vol. 75, №1. P. 201–210.

11. Pershina A. G. et al. Hemozoin “knobs” in *Opisthorchis felinus* infected liver // *Parasites & vectors*. 2015. Vol. 8, №1. P. 459.

12. Бычков В. Г., Крылов Г. Г., Плотников А. О. Описторхоз в Обь-Иртышском бассейне (вопросы этиологии и патогенеза) // *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. 2007. №4. С. 1–6.

13. Ромашов Б. В. и др. Описторхоз в бассейне Верхнего Дона (Воронежская область). Воронеж, 2005.

14. Огородова Л. М. и др. Распространенность гельминтной инвазии *Opisthorchis felinus* у детей в Томске и Томской области // *Вопросы современной педиатрии*. 2011. Т. 10, №3.

15. Fedorova O. S. et al. *Opisthorchis felinus* infection and cholangiocarcinoma in the Russian Federation: A review of medical statistics // *Parasitology international*. 2017. Vol. 66, №4. P. 365–371.

16. Saltykova I. V. et al. Biliary Microbiota, Gallstone Disease and Infection with *Opisthorchis felinus* // *PLoS neglected tropical diseases*. 2016. Vol. 10, №7. P. e0004809.

17. Максимова Г. А. и др. Экспериментальная модель описторхоза на хомяках (*Mesocricetus auratus*) // *Бюллетень сибирской медицины*. 2012. Т. 11, №6.

18. Deroost K. et al. Improved methods for haemozoin quantification in tissues yield organ-and parasite-specific information in malaria-infected mice // *Malaria journal*. 2012. Vol. 11, №1. P. 166.

19. Caporaso J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // *Nature methods*. 2010. Vol. 7, №5. P. 335–336.

20. DeSantis T. Z. et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB // *Applied and environmental microbiology*. 2006. Vol. 72, №7. P. 5069–5072.

21. Paulson J. N. et al. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys // *Nature methods*. 2013. Vol. 10, №12. P. 1200–1202.

22. Paulson J. N. et al. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys // *Nature methods*. 2013. Vol. 10, №12. P. 1200–1202.

23. Berrilli F. et al. Interactions between parasites and microbial communities in the human gut // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2012. Vol. 2.

24. Gause W. C., Maizels R. M. Microbiota—helminths as active participants and partners of the microbiota in host intestinal homeostasis // *Current opinion in microbiology*. 2016. Vol. 32. P. 14–18.

25. Mosca A., Leclerc M., Hugot J. P. Gut microbiota diversity and human diseases: should we reintroduce key predators in our ecosystem? // *Frontiers in microbiology*. 2016. Vol. 7.

26. Katokhin A. V. et al. Assessment of the genetic distinctions of *Opisthorchis felinus* from *O. viverrini* and *Clonorchis sinensis* by ITS2 and CO1 sequences // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. MAIK Nauka/Interperiodica, 2008. Vol. 421, №1. P. 214–217.

27. Kaewpitoon N. et al. *Opisthorchis viverrini*: the carcinogenic human liver fluke // *World journal of gastroenterology: WJG*. 2008. Vol. 14, №5. P. 666.

28. Chng K. R. et al. Tissue microbiome profiling identifies an enrichment of specific enteric bacteria in *Opisthorchis viverrini* associated cholangiocarcinoma // *EBioMedicine*. 2016. Vol. 8. P. 195–202.

29. Loke P., Lim Y. A. L. Helminths and the microbiota: parts of the hygiene hypothesis // *Parasite immunology*. 2015. Vol. 37, №6. P. 314–323.





### Об авторах

Ирина Владимировна Салтыкова — канд. мед. наук, научный сотрудник, Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия.

E-mail: ira.saltikova@mail.ru

Вячеслав Алексеевич Петров — младший научный сотрудник, Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия.

E-mail: vyacheslav.a.petrov@mail.ru

Юлия Борисовна Дорофеева — младший научный сотрудник, ассист., Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия.

E-mail: julia.dorofeeva25@gmail.com

Владимир Владимирович Иванов — канд. биол. наук, доц., Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия.

E-mail: ivanovvv1953@gmail.com

Алексей Эдуардович Сазонов — д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник, Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России).

E-mail: sazonov\_al@mail.ru

### The authors

Dr Irina V. Saltykova, Researcher, the Central Research Laboratory, Siberian State Medical University, Russia.

E-mail: ira.saltikova@mail.ru

Vyacheslav A. Petrov, Researcher, Central Research Laboratory, Siberian State Medical University, Russia.

E-mail: vyacheslav.a.petrov@mail.ru

Yulia B. Dorofeeva, Researcher, Central Research Laboratory, Siberian State Medical University, Russia.

E-mail julia.dorofeeva25@gmail.com

Dr Vladimir V. Ivanov, Assistant professor, Senior Researcher, Central Research Laboratory, Siberian State Medical University, Russia.

E-mail: ivanovvv1953@gmail.com

Prof Alexey E. Sazonov, Leading Researcher, Central Research Laboratory, Siberian State Medical University, Russia.

E-mail: sazonov\_al@mail.ru