

Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Сибирский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Перина Екатерина Александровна

**«РОЛЬ НАРУШЕНИЙ СИСТЕМЫ ГЛУТАТИОНА В РАЗВИТИИ ФИБРОЗА  
ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОПИСТОРХОЗЕ»**

Специальность 14.03.03 – «Патофизиология»

Научный руководитель:  
кандидат биологических наук,  
доцент  
Иванов Владимир Владимирович

## Введение

Инвазия *Opisthorchis felineus* является региональной патологией, и самый крупный ее очаг сосредоточен в Обь - Иртышском бассейне. Инвазия *O. felineus* сопровождается хроническим воспалением гепатобилиарной системы. В результате механического воздействия при интенсивном питании и передвижении сосальщиков происходит повреждение и воспаление желчных протоков. Хронический воспалительный процесс при инвазии и продукты жизнедеятельности, выделяемые трематодами в окружающую среду, приводят к усиленной генерации активных форм кислорода, активации перекисного окисления липидов, образованию глиоксаля, метилглиоксаля и других соединений с высокой реакционной способностью. На сегодняшний момент известно, что печеночные трематодозы приводят к развитию тяжелых осложнений, таких как гнойный холецистит, абсцессы печени, холангит, фиброз, обструктивная желтуха, гепатомегалия, холецистит, желчнокаменная болезнь (Yongvanit P. et al., 2014).

Для защиты клеток от повреждающего действия активных форм кислорода и продуктов жизнедеятельности паразитов существуют ферментативные системы. В печени ведущим механизмом защиты является система глутатиона, которая включает в себя окисленный и восстановленный глутатион и ферменты антиперекисной защиты: глутатионредуктазу, глутатион – S – трансферазу, глутатионпероксидазу, глиоксилазу и другие [Giuseppina Barrera, 2012].

Известно, что активные формы кислорода усиливают пролиферацию клеток и выработку коллагена в фибробластах, что указывает на тесную связь между окислительным стрессом и развитием фиброза [Sato N. et al., 2009].

### Цель научно-исследовательской работы

Изучить систему глутатиона при инвазии *O. felineus* и ее участие в защите от развития фиброзных изменений печени при экспериментальном описторхозе

### Задачи

1. Изучить показатели системы глутатиона – содержание окисленного и восстановленного глутатиона, активность глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы на разных сроках инвазии *O. felineus*.
2. Определить активность глиоксалазы I и глиоксалазы II в кинетике описторхозной инвазии, индуцированной *O. felineus*.
3. Изучить метаболизм глутатиона на фоне активации синтеза глутатиона под действием N-ацетилцистеина и селективного ингибирования глутаминцистеин-синтетазы под действием L-бутионин-сульфоксимиона.
4. Изучить экспрессию генов системы дезактивации метилглиоксаля GLOI, GLOII, гены, кодирующие ферменты системы глутатиона GPX1, GR и GSTP1.
5. Выявить взаимосвязь изучаемых показателей с морфологическими изменениями ткани печени при описторхозной инвазии и биохимическими маркерами функции гепатобилиарной системы: активностью аминотрансфераз, щелочной фосфатазой и концентрацией билирубина.

### Методы

Модель описторхоза выполнена на золотистых хомяках, которым вводят метацеркарии описторхов, выделенные из рыбы карповых пород (язь, елец, плотва). Исследование включает 3 этапа.

1 этап. Исследование системы глутатиона в динамике описторхозной инвазии. Включает 16 животных зараженных описторхозом и 16 животных интактные (здоровые) животные. Сроки исследования 8 и 48 недель после заражения описторхами (

2 этап. Осуществляли селективное ингибирование глутаминцистеин-синтетазы (ингибирование синтаза глутатиона) L-бутионин-сульфоксимином (BSO) [John P. Richie, 2007] и активацию системы глутатиона N-ацетилцистеином (NAC), который является предшественником внутриклеточного цистеина и глутатиона [S. Flora, 2001]. В печени изучены показатели обмена глутатиона и метилглиоксаля. Материал исследования - ткань печени и сыворотка.

3 этап. Для определения влияния состояния системы глутатиона на процесс заражения экспериментальных хомяки случайным образом на 3 экспериментальные группы по 8 хомяков в каждой. Первая группа - животные с инвазией *O. felineus*. Вторая и третья группы животных за две недели до заражения будут получать с питьевой водой предшественник глутатиона и ингибитор его синтеза соответственно. После заражения животных 50 метацеркариями *O. felineus* хомяки еще 4 недели будут получать с питьевой водой предшественник и селективный ингибитор синтеза глутатиона, после в гепатобилиарном тракте подсчитано количество зрелых форм *O. felineus*.

Методы включают гистологическое исследование печени, оценку выраженности фиброза, биохимические методы определения активности трансаминаз, щелочной фосфатазы и содержание прямого билирубина в сыворотке крови хомяков. В ткани печени определены содержание глутатиона, активность глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы, GLOI GLOII, MG

Для определения уровня экспрессии генов системы дезактивации метилглиоксаля GLOI, GLOII, гены, кодирующие ферменты системы глутатиона GPX1, GR и GSTP1 из печени экспериментальных животных будет выделена РНК с использованием набора реагентов для выделения общей РНК (Qiagen, США). Амплификация исследуемых генов будет проведена с помощью ПЦР в реальном времени с интеркалирующим красителем SYBR Green (Синтол) на амплификаторе Roch LightCycler 480 II. Подбор праймеров для проведения амплификации будет выполнен с использованием лицензионного программного обеспечения CLC Maim Workbench v.6.7.1., CLC bio.

### **Научная новизна**

Относительно других трематодозов (*Schistosoma mansoni*, *Fasciola hepatica*) есть отдельные исследования, направленные на установление роли ферментов метаболизма окислительного стресса в развитии и прогрессировании патологических изменений гепатобилиарной системы при инвазии. Относительно *O. felineus* отсутствуют данные о роли системы глутатиона в качестве компенсаторно-приспособительного механизма при патологических изменениях печени. В ходе выполнения квалификационной работы получены фундаментальные данные о функциональном состоянии системы глутатиона на разных сроках инвазии *O. felineus*, определено участие системы глутатиона в метаболизме

метилглиоксаля и в защите клеток гепатобилиарной системы при патологических изменениях, индуцированных инвазией *O. felineus*.

### **Результаты**

1. Будет изучен редокс-потенциал клеток гепатобилиарной системы, определена активность ферментов системы глутатиона - глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы на разных сроках инвазии *O. felineus*.
2. Создана модель с активацией и селективным ингибированием системы глутатиона на золотистых хомяках *Mesocricetus auratus* с инвазией *O. felineus*.
3. Будет определена экспрессия генов системы дезактивации метилглиоксаля GLOI, GLOII и генов, кодирующие ферменты системы глутатиона GPX1, GR и GSTP1 на разных сроках инвазии *O. felineus*.

### **Внедрение: форма, уровень, эффективность**

1. Форма внедрения – инструктивно-методические документы, статьи;
2. Уровень внедрения – региональный;
3. Эффективность - По результатам исследования получены фундаментальные знания об участии системы глутатиона в компенсаторных и защитных механизмах клеток печени при инвазии *O. felineus*, которые в дальнейшем позволят сформировать методы коррекции течения заболевания и предотвратить формирование осложнений.