

УДК 577.151.63:595.121: 595.122

СИСТЕМА БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ У ГЕЛЬМИНТОВ. СХОДСТВО И ОТЛИЧИЕ ОТ АНАЛОГИЧНЫХ СИСТЕМ ХОЗЯЕВ (ОБЗОР)

© Л. П. Смирнов,¹ Е. В. Борвинская,² И. В. Суховская³

^{1, 2, 3} Институт биологии Карельского научного центра РАН
ул. Пушкинская, 11, Петрозаводск, 185910

¹ E-mail: levps@rambler.ru

Поступила 06.06.2016

Анализ литературы показывает, что система биотрансформации ксенобиотиков у гельминтов имеет существенные отличия от таковой позвоночных хозяев. В частности, у паразитов не регистрируется активность основных оксидаз фазы I, таких как СУР или FMO, несмотря на то что гены этих ферментов обнаружены в ДНК. Проведенные исследования свидетельствуют о наличии у гельминтов уникальных форм ферментов фазы II, изучение которых представляет несомненный интерес в связи с их возможной ролью в приспособлении к паразитическому образу жизни. Многие глутатион S-трансферазы гельминтов содержат существенные структурные различия по сравнению с энзимами хозяев, это делает перспективными исследования по поиску паразитоспецифических вакцин. В настоящее время большое внимание уделяется изучению белков фазы III (ABC транспортеров) у паразитов, так как накапливается все больше сведений об участии этих молекул в формировании резистентности к антигельминтикам.

Ключевые слова: фазы I, II и III биотрансформации, ксенобиотики, цитохромы P450, глутатион S-трансфераза, флаavin монооксигеназы, ABC транспортеры.

Большое число видов гельминтов, представителей классов Trematoda, Cestoda, Nematoda, паразитируют у человека и других позвоночных животных, вызывая опасные для здоровья и жизни заболевания. Последние 40 лет ключевым подходом к борьбе с гельминтозами является профилактическое и терапевтическое применение фармакологических препаратов (Cvilinear et al., 2009). Однако ситуация сильно осложняется тем, что число доступных антигельминтиков невелико, они используются в течение длительного времени, и их эффективность снижается из-за развития у гельминтов устойчивости к ним. В настоящее время растет интерес к изучению механизмов биотрансформации чужеродных соединений у паразитических червей, потому что формирование у гельминтов резистентности к лекарственным средствам связано с биохимическими системами,

которые защищают организм от потенциально негативного воздействия ксенобиотиков (Robinson et al., 2004). Знания об отличиях систем детоксикации паразита от таковых хозяина могут быть использованы при создании перспективных антигельминтиков, основанных на селективном ингибировании защитных механизмов. Это, во-первых, может повысить чувствительность гельминтов к лекарственному воздействию и, во-вторых, сделать их менее защищенными в условиях активного иммунного ответа хозяина (Barrett, 1997).

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

По современным представлениям, система биотрансформации ксенобиотиков у животных состоит из 3 фаз (Cvilink et al., 2009). В первой фазе происходит присоединение к чужеродной молекуле реакционноспособных групп, таких как гидроксильная, карбоксильная, аминогруппа или сульфгидрильная группа. Катализ реакции осуществляет ряд ферментов гидролиза и окисления—восстановления. Наиболее важной группой энзимов первой фазы является семейство цитохромов P450 (CYP450), обнаруженных практически у всех живых организмов. Идентифицировано более тысячи различных CYP, которые состоят из нескольких семейств и подсемейств, классифицируемых на базе гомологических последовательностей генов. Иногда CYP450 ошибочно классифицируются как неспецифические НАДФ-зависимые монооксигеназы (ЕС 1.14.14.1). Это связано с тем, что большинство уравнений реакций и систематические наименования в ЕС списке ферментов P450 содержат НАДФН. Однако эти реакции действительны только для объединенных систем, состоящих из P450 и НАДФН-цитохром редуктазы (ЕС 1.6.2.4), но не для P450 как самостоятельной единицы. На долю CYP450 приходится свыше 80 % от общего числа энзимов, задействованных в этой фазе (Whyte et al., 2000). CYP также играют важную роль в эндогенном метаболизме стероидов, жирных кислот и простагландинов.

Кроме CYP450, к ферментам фазы I биотрансформации ксенобиотиков относят также дегидрогеназы, оксидазы, флавопротеинредуктазы, эпоксидгидролазы, эстеразы и амидазы. Спирты, альдегиды и кетоны метаболизируются через активацию редуктаз/дегидрогеназ. Эти ферменты объединены в 3 класса — среднепочечные дегидрогеназы (MDR), короткопочечные дегидрогеназы (SDR) и альдо-кеторедуктазы (AKR) (Jez, Penning, 2001). Их субстратами являются не только ксенобиотики, но и ряд эндогенных соединений. В системе окислительно-восстановительных превращений ксенобиотиков реакциям восстановления отводится минимальное место, но в случае биodeградации кетонов, альдегидов, хинонов, нитросоединений, N-оксидов и S-оксидов это главный метаболический путь (Cvilink et al., 2009).

Флавиносодержащие монооксигеназы (FMO) катализируют окисление большого числа ксенобиотиков, преимущественно содержащих нуклеофильные атомы азота и серы. Семейство генов этих ферментов значительно меньше, чем семейство CYP, а функции этих энзимов пока еще малоопытны (Krueger, Williams, 2005).

У животных, в том числе гельминтов, есть группа антиоксидантных ферментов, таких как пероксидаза, супероксиддисмутаза, каталаза, глутатион пероксидаза, пероксиредоксин (ПР), которые обычно не рассматриваются как энзимы I фазы биотрансформации, но тем не менее участвуют не только в элиминации повышенных концентраций токсичных активных форм кислорода (АФК), но и в деградации чужеродных соединений.

В фазе II большинство метаболитов, образовавшихся в фазе I, а также ксенобиотики, содержащие функциональные группы, конъюгируют через ферментативный катализ с некоторыми эндогенными соединениями. В результате реакции образуются молекулы с гидрофильными группами.

Основной путь образования электрофильных соединений состоит в конъюгации ксенобиотика с небелковым трипептидом глутатионом (GSH), осуществляемой группой ферментов, называемых глутатион S-трансферазами (GST). Глутатион S-трансферазы (EC 2.5.1.18) — это эволюционно древнее и обширное семейство мультифункциональных энзимов, которые участвуют в детоксикации потенциально опасных молекул экзо- и эндогенного происхождения (канцерогены, лекарственные препараты, продукты перекисного окисления и др.) (Armstrong, 1997).

Еще одним из вариантов конъюгации у млекопитающих является соединение ксенобиотика с глюкуроновой кислотой с помощью УДФ-глюкуронозил трансфераз (Cvilink et al., 2009). Типичными субстратами для этих ферментов являются спирты, фенолы и органические кислоты. Ароматические амины или гидроксилламины могут также подвергаться ацетилрованию, катализируемому N-ацетилтрансферазами. Одной из важных реакций конъюгации является сульфатация ксенобиотиков, в которой участвуют сульфотрансферазы (Cvilink et al., 2009).

В фазе III детоксикации происходит выведение из клеток образовавшихся электрофильных конъюгатов и метаболитов. Эти вещества не могут проходить через бислоиные фосфолипидные клеточные мембраны, поэтому существует система специфических транспортных белков, с помощью которых и осуществляется перенос ксенобиотиков через мембраны. Ключевую роль в удалении ксенобиотиков и собственных метаболитов из клеток играют АТФ-связанные кассетные транспортеры (ABC), которые представляют собой огромное семейство протеинов, характерных как для прокариот, так и эукариот. Молекула ABC транспортера состоит из 2 трансмембранных доменов (TMD) с 6 α -спиральными участками и 2 цитозольных нуклеотид-связывающих доменов (NBD), которые называются АТФ-связывающими кассетами (ABC) (Alvarez et al., 2006). NBD содержат эволюционно высококонсервативные последовательности, необходимые для связывания АТФ и последовательности LSGGQ (лейцил-серил-глицил-глицил-глутамил) — идентификаторы ABC транспортеров (Jones, George, 2005). Формирование трансмембранных каналов происходит через взаимодействие TMD с липидным бислоем мембраны (Ambudkar et al., 2006). NBD представляют собой «молекулярные моторы», которые преобразуют энергию АТФ в конформационные изменения системы транспортер—субстрат, необходимые для осуществления переноса в клетку или удаления из нее различных молекул. Одним из наиболее известных транспортеров, который был описан также и у паразитов, является Р-гликопротеин (Pgp) — архетипная молекула, известная также под

аббревиатурой MDR1 (multi-drug-resistance) (Koerbeuf et al., 2003). Именно формирование множественной устойчивости к различным лекарственным препаратам у животных и обусловило интенсивное изучение этого белка у паразитов человека и насекомых (Ouellette, Legare, 2003).

Четкое функционирование всех трех фаз биотрансформации, обеспечивающих детоксикацию потенциально опасных ксенобиотиков, является критическим моментом защиты от воздействия на организм различных чужеродных соединений, в частности, при развитии устойчивости гельминтов к лекарственным препаратам.

ФЕРМЕНТЫ БИОТРАНСФОРМАЦИИ ФАЗЫ I

Как известно, процессы окисления большого числа ксенобиотиков у бактерий, грибов, растений, насекомых и млекопитающих катализируются главным образом ферментами системы цитохромов P450. В 1980-х годах была проведена серия исследований по выявлению активности CYP у разных видов гельминтов, которые закончились неудачей. В результате был сделан вывод о том, что гельминты являются уникальными организмами, у которых фаза I биотрансформации осуществляется без участия ферментов системы CYP450 (Precious, Barrett, 1989). Тем не менее при генетическом анализе у свободноживущей нематоды *Caenorhabditis elegans* выявлено более 80 CYP-кодирующих генов, которые входят в состав семейства CYP35 (Lindblom, Dodd, 2006). Экспрессия различных генов этого семейства резко возрастала при воздействии ряда индуцирующих CYP веществ, таких как β -нафтофлавоин, атразин, флуорантин, фталаты, тяжелые металлы, тем не менее почти ничего не известно об участии CYP35 в биотрансформации ксенобиотиков (Menzel et al., 2005; Roh et al., 2007). CYP-подобная активность, которая выражалась в эпоксидировании алдрина и деэтилировании этоксикумарина, показана в микросомах личинок *Haemonchus contortus* стадий L1 и L3, в то же время у взрослых нематод ее уровень был чрезвычайно мал — в 10 000 раз ниже, чем в микросомах крыс (Kotze, 1997). Была высказана гипотеза, что для взрослых нематод, обитающих в кишечнике при почти полном отсутствии кислорода, метаболические пути, связанные с окислением ксенобиотиков при участии CYP, менее важны, чем для свободноживущих личиночных стадий (Kotze et al., 2006). Вокрал и соавт. (Vokral et al., 2013) также не выявили реакции CYP у этих нематод со стандартными субстратами для CYP1A (7-этоксирезорурфин), CYP2B (7-пентоксирезорурфин) и CYP3A (7-бензилоксирезорурфин). При анализе первичного варианта генома (draft genome) *H. contortus* выявлено 25 локусов CYP, из которых 16 были полноразмерными и 9 секвенированы частично (Laing et al., 1915). Максимально высокий уровень экспрессии большинства CYP отмечен у личиночных стадий паразита, а в яйцах и у взрослых наблюдали экспрессию только некоторых ферментов. При этом у самцов этот процесс был выражен сильнее, чем у самок. Проявление активности, пусть незначительной, авторы связывают с тем, что в слизистой оболочке кишечника (место паразитирования имаго *H. contortus*) концентрация кислорода выше, чем в просвете, и связана она с капиллярной кровяной сетью. В подтверждение этой гипотезы приводится ссылка на

работу Саида с соавт. (Saeed et al., 2002), которые обнаружили высокую СУР-подобную активность в отношении ряда субстратов (за исключением 7-этоксирезорурфина (СУР1А) и анилина) у взрослых трематод *Schistosoma mansoni*, паразитирующих фактически в аэробных условиях в венозной системе млекопитающих. Применение антител к СУР крыс для детекции СУР у гельминта выявило взаимодействие анти-СУР2Е1 и анти-СУР2В с белками *S. mansoni* и отсутствие иммунной реакции с антисывороткой к СУР1А.

Из проведенных к настоящему времени исследований невозможно сделать определенный вывод об обязательном участии СУР в процессах биотрансформации ксенобиотиков у гельминтов, особенно кишечных форм. Это связано, во-первых, с тем, что число исследованных видов остается весьма незначительным. Во-вторых, пока что не учитывается генетический аспект проблемы. В частности, суперсемейство генов цитохромов Р450 позвоночных животных можно условно разделить на 2 группы — семейства «стабильных» и «нестабильных» генов (Thomas, 2007). К первой группе относятся гены, которые кодируют цитохромы Р450, являющиеся необходимым звеном жизненно важных метаболических процессов, таких как синтез и деградация стероидных, ретиноидных гормонов, простагландинов и жирных кислот. Эти гены сохраняются в процессе эволюции в виде одиночных копий. «Нестабильные» гены подвержены частым дупликациям и потерям в процессе так называемой эволюции рождения—смерти (birth—death evolution), скорость которой в этой группе существенно выше, чем у «стабильных» генов. Подавляющее большинство генов, входящих в группу «нестабильных», кодируют СУР450, участвующие в детоксикации ксенобиотиков. «Нестабильные» гены являются субъектом позитивной селекции, в результате которой изменяется аминокислотная последовательность в молекулах ферментов в ответ на изменения в составе чужеродной среды. Границы варибельности «нестабильных» генов могут иметь выраженную видовую специфику. Например, по данным Института геномики исследовательского фонда Новартиса (Genomics Institute of the Novartis Research Foundation, 2003), генам цитохрома СУР2W1 у позвоночных свойственна очень низкая эволюционная изменчивость. В то же время у амфибий и костистых рыб для этих генов характерно разнообразие, возникающее в результате экстенсивной дупликации. Поскольку механизмы эволюции едины для всего живого, то все, что сказано выше о генетике СУР у позвоночных, в равной мере относится и к гельминтам.

В процессе сопряженной эволюции паразита и хозяина у гельминта происходят адаптивные изменения метаболизма, позволяющие ему успешно оккупировать чужой организм, но которые, вероятно, не затрагивают в значительной мере систему биотрансформации ксенобиотиков, эволюционирующей самостоятельно у каждого из сочленов системы паразит—хозяин. Например, если у человека СУР3А метаболизирует паразитоцид широкого спектра действия — ивермектин, то у *C. elegans* и *H. contortus* метаболизм ивермектина не обнаружен (Laing et al., 2015). Поэтому исследователи могут получить отрицательный результат, пытаясь выявить активность СУР у гельминтов с помощью стандартных субстратов для цитохромов Р450 позвоночных хозяев.

Как отмечено выше, окислительные процессы в фазе I биотрансформации катализируют не только СУР, но и ФМО, осуществляющие у позвоночных присоединение атома кислорода к гетероатому нуклеофильных ксенобиотиков. Семейство генов ФМО древнее, его представители обнаружены почти у всех исследованных к настоящему времени организмов (Cvilink et al., 2009). В геноме *C. elegans* и родственной *C. briggsae* обнаружено 5 генов, кодирующих предполагаемые аналоги ФМО млекопитающих, один из которых классифицирован как ФМО15. Тем не менее функция этого белка остается неизвестной (Petalcorn et al., 2005). У линий *H. contortus*, как чувствительных, так и резистентных к антигельминтикам, не выявлено активности ФМО с тиобензамидом (специфическим субстратом ФМО млекопитающих) (Vokral et al., 2013).

Ряд антиоксидантных ферментов (пероксидаза, ксантин оксидаза) млекопитающих катализируют окисление ксенобиотиков (Testa, van de Waterbeemd, 2007, цит. по: Cvilink et al., 2009). У взрослых *H. contortus* выявлена высокая активность пероксидазы, более 50 % которой приходилось на водорастворимую белковую фракцию (Kotze, 1999), тогда как у других гельминтов — на митохондриальную (Paul, Barrett, 1980; McKelvey, Fioravanti, 1986; Preston, Barrett, 1987). У личинок *H. contortus* активность пероксидазы не выявлена (Kotze, 1999). При объяснении этого факта автор ссылается на Каллахена с соавт. (Callahen et al., 1988), по мнению которых активность пероксидазы в цитозоле связана с защитой паразита от атаки перекисными соединениями хозяина, появляющимися в результате ответной реакции на инвазию, в то время как митохондриальные ферменты нужны для дезактивации токсичных побочных продуктов собственного метаболизма. Вовлечение пероксидаз в процессы детоксикации ксенобиотиков у гельминтов было подробно рассмотрено в обзоре Бэррита (Barrett, 1997). В настоящее время какой-либо дополнительной информации по этому вопросу в доступной нам литературе не обнаружено.

Другие ферменты из вышеприведенного списка также участвуют в защите паразитов от АФК. В частности, показано участие каталазы, глутатион пероксидазы, ПР в защите личинок и взрослых *H. contortus* от экзогенной перекиси водорода (Kotze, McClure, 2001; Bagnall, Kotze, 2004). Пероксиредоксины, вероятно, играют очень важную роль в антиоксидантной защите клеток, поскольку субклеточная локализация ПР указывает на то, что эти ферменты активируются в условиях как эндогенного, так и экзогенного окислительного стресса (Henkle-Dührsen, Kampkötter, 2001). У трематоды *S. mansoni* обнаружены как бактериоподобные ПР (устойчивы к окислительной дезактивации, что важно для регуляции клеточных сигнальных путей), так и аналоги ПР млекопитающих (Sayed, Williams, 2004). У шистосом отсутствует активность каталазы, они имеют относительно низкую активность глутатион пероксидазы (Mkoji et al., 1988; Mei, LoVerde, 1997). Поэтому именно пероксиредоксин играет главную роль в антиоксидантной защите у этих гельминтов и экспрессируется как у самцов, так и у самок (Kwatia et al., 2000). У *S. mansoni* найдены гены, кодирующие две формы 2-Цис пероксиредоксина. Они эффективно утилизируют восстановительные эквиваленты из систем тиоредоксина и глутатиона. Способность ПР шистосом использовать альтернативные доноры электронов может указывать на то, что механизмы поддержания редокс баланса у

паразита отличаются от таковых хозяина (Sayed, Williams, 2004). У трематоды *Fasciola hepatica* отсутствует активность каталазы, активность глутатион пероксидазы очень мала, поэтому именно ПР является главным «дезактиватором» перекиси водорода (McGonigle et al., 1997). Аналогичный вывод был сделан в отношении пероксиредоксина *Ascaris suum* (Tsuji, Kasuga-Aoki, 2001). Активность этого фермента выявлена в белковых экстрактах и экскреторно-секреторных продуктах нематоды *Diriofilaria immitis* (Chandrashekar et al., 2000).

ФЕРМЕНТЫ БИОТРАНСФОРМАЦИИ ФАЗЫ II

Основными реакциями фазы II биотрансформации у млекопитающих и растений являются глюкоронизация, сульфатация, ацетилирование, метилирование, конъюгация с глутатионом и аминокислотами (Cvilink et al., 2009). В отличие от указанных групп организмов, у гельминтов эти реакции остаются практически неисследованными, за исключением реакций конъюгации с глутатионом, катализируемых ферментами семейства глутатион S-трансфераз (GST), к которым проявляется большой интерес в связи с поиском новых способов борьбы с гельминтозами человека и домашних животных. Так как многочисленные результаты исследований GST суммированы в ряде обзорных статей (Torres-Rivera, Landa, 2008; Cvilink et al., 2009; Смирнов и др., 2015), то нет необходимости в подробном освещении данного вопроса. Тем не менее стоит обратить внимание на некоторые проблемы в исследовании глутатион S-трансфераз гельминтов.

К сожалению, до конца не выяснены вопросы номенклатуры глутатион S-трансфераз у паразитических червей, что также является проблемой при описании этих белков и у других животных (Борвинская и др., 2013). Это связано с тем, что первоначально наиболее полно и подробно были описаны cGST млекопитающих, и разработанные для них критерии традиционно применяются для характеристики всех вновь открываемых энзимов. Однако многие авторы отмечают, что такой подход связан с большими трудностями при описании ферментов, имеющих промежуточные свойства. Выяснение особенностей строения и функционирования GST гельминтов имеет большое значение для пополнения базы данных об эволюции этого фермента, на основе которой возможно создание новых принципов номенклатуры семейства.

Данные литературы свидетельствуют о наличии у гельминтов уникальных форм ферментов, изучение которых представляет несомненный интерес в связи с их возможной ролью в приспособлении к паразитическому образу жизни. Несмотря на то что многие cGST гельминтов в большей или меньшей степени схожи с ферментами M, P, S и O классов других организмов, тем не менее они содержат существенные структурные различия по сравнению с энзимами хозяев, это делает перспективными исследования по поиску паразитоспецифических вакцин. Некоторые успехи в этом направлении уже достигнуты. Например, иммунизация собак и хомяков клонированной из *Ancylostoma caninum* Ac-GST-1 снижала у них приживаемость нематоды на 40 и 50 % соответственно (Zhan et al., 2005). Определенные успехи достигнуты при использовании cGST в качестве

вакцин при шистозомозе и фасциолезе (Capron et al., 1992; Sexton et al., 1990).

У млекопитающих в реакциях конъюгации с ксенобиотиками кроме глутатион S-трансфераз могут участвовать и другие трансферазы, такие как УДФ-глюкоронилтрансфераза, N-ацетилтрансфераза, метилтрансфераза и сульфотрансфераза. У гельминтов также обнаружены различные виды реакций конъюгации, однако они были ассоциированы с метаболизмом продуктов собственного обмена, а не ксенобиотиков (Cvilink et al., 2009). Айзек с соавт. (Isaac et al., 1990) выявили у нематоды *Brugia pahangi* способность к N-ацетилированию в присутствии ацетил-CoA таких биогенных аминов, как дофамин, октопамин, серотонин. Активность N-ацетилтрансферазы выявлена у *Ascaridia galli* (Isaac et al., 1991).

У *Schistosoma mansoni* выявлена активность, сходная с таковой сульфотрансфераз, которая проявилась при воздействии на эту трематоду антигельминтика оксамнихина (Pica-Matocchia et al., 2006) и конкурентно ингибировалась обычными субстратами этих ферментов — β -эстрадиолом и кверцетином. Сульфотрансфераза этого паразита на 40 аминокислотных остатков короче, чем аналогичный фермент человека, отличается по топологии и имеет дополнительную α -спираль (Valentim et al., 2013). У родственной *S. mansoni* трематоды *S. hematobium* в молекуле сульфотрансферазы выявлены 3 аминокислотные замены, которые не позволяют энзиму связываться с оксамнихином. Поэтому этот паразит устойчив к действию данного антигельминтика. У цестоды *Hymenolepis diminuta* активность сульфотрансфераз не выявлена (Raines, Barrett, 1988).

ФАЗА III БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ

Как отмечено выше, в фазе III биотрансформации происходит выведение из клеток токсических метаболитов, образовавшихся из предшественников как экзогенного, так и эндогенного происхождения. Эти вещества не могут проходить через бислоиные фосфолипидные клеточные мембраны, поэтому существует система специфических мембраносвязанных транспортных белков, с помощью которых и осуществляется перенос ксенобиотиков через мембраны. Существует 2 основных типа транспортных белков — первые импортируют ксенобиотики внутрь клетки (они характерны для прокариот), вторые осуществляют выведение ксенобиотиков и их метаболитов из клеток. Наибольший исследовательский интерес у специалистов по биохимии гельминтов вызывают белки второй группы из-за их участия в формировании устойчивости к лекарственным препаратам.

Джонс и Джордж (Jones, George, 2005) насчитали у паразитических организмов более 60 генов ABC транспортеров (<http://www.ebi.ac.uk/parasites/parasite-genome.html>).

Первые исследования по идентификации Pgp у гельминтов были проведены на *Caenorhabditis elegans* (Linke et al., 1992). Экспрессия двух генов P-гликопротеинов подсемейства ABCB показана в клетках кишечника у трансгенных *C. elegans* (Alvarez et al., 2006). Была расшифрована полная нуклеотидная последовательность гена Pgp-A у *H. contortus*, который, ве-

роятно, участвует в формировании устойчивости паразита к ивермектину (Sangster, 1994; Xu et al., 1998). Некоторые Pgp, такие как Pgp-A, а также Pgp-9 (Hco-Pgp-9) у *H. contortus* активно экспрессируются у линий, устойчивых к ивермектину (Prichard, Roulet, 2007; Ardelli, Prichard, 2013). В геноме *H. contortus*, который недавно был полностью секвенирован, описано по меньшей мере 10 Hco-Pgp генов (Laing et al., 2013). Если Pgp-A при окрашивании интенсивно визуализируется в глотке и кишечнике, то Hco-PGP-9 в матке. Функция последнего неизвестна, но предполагается, что его роль аналогична ABC транспортерам (ABCB 1) млекопитающих и состоит в выведении ксенобиотиков из матки и транспорте некоторых липидных молекул, необходимых для созревания яиц (Godoy et al., 2016). Два гомолога Pgp выявлены у *Onchocerca volvulus* (Jones, George, 2005).

У *S. mansoni* обнаружены 3 Pgp, из которых SMDR1 и SMDR2 были гомологичны Pgp млекопитающих (Bosch et al., 1994). Из *F. hepatica* выделен ген Pgp, который по нуклеотидной последовательности сходен с SMDR2 *S. mansoni* и человеческим MDR1 на 43 и 36 % соответственно (Reed et al., 1998). Показана связь между уровнем экспрессии Pgp и устойчивостью *S. mansoni* к празиквантелу и *F. hepatica* к триклабендазолу (Greenberg, 2014). У самок *S. mansoni*, обработанных ингибиторами экспрессии Pgp, не только снижалось количество продуцируемых яиц, но и обнаружены морфологические изменения при их развитии (Kasinathan et al., 2011).

ABC транспортер был найден у *E. granulosus*. Однако его гомология с другими Pgp была низкой (Kerboeuf et al., 2003).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе эволюции в клетках как прокариот, так и эукариот сформировалась система биотрансформации ксенобиотиков, четкое и слаженное функционирование которой обеспечивает выживание живых организмов при изменении химической составляющей окружающей среды. В фазе I осуществляется окисление, восстановление или гидролиз ксенобиотиков путем введения в молекулу или раскрытие в ее структуре реактивных и гидрофильных групп. В фазе II ксенобиотики или их метаболиты из фазы I подвергаются конъюгации с эндогенными соединениями, главными из которых являются глутатион, глюконовая кислота, аминокислоты и сульфаты. Активный транспорт субстратов, метаболитов и конъюгатов через клеточные липидные мембраны осуществляется специальными транспортными белками. Этот процесс в настоящее время рассматривается как фаза III. Анализ литературы показывает, что система биотрансформации ксенобиотиков у гельминтов имеет существенные отличия от таковой позвоночных хозяев. В частности, у паразитов не регистрируется активность основных оксидаз фазы I, таких как СУР или FMO, несмотря на то что гены этих ферментов обнаружены в ДНК. Так как этот феномен проявляется главным образом у имагинальных форм гельминтов, обитающих в кишечнике позвоночных хозяев, то выдвинута гипотеза, что он связан с возникшей в процессе эволюции адаптацией к обитанию в условиях резкого дефицита кислорода (Kotze et al., 2006).

Данные литературы свидетельствуют о наличии у гельминтов уникальных форм ферментов фазы II, изучение которых представляет несомненный интерес в связи с их возможной ролью в приспособлении к паразитическому образу жизни. Несмотря на то что многие cGST гельминтов в большей или меньшей степени схожи с ферментами M, P, S и O классов других организмов, тем не менее они содержат существенные структурные различия по сравнению с энзимами хозяев, это делает перспективными исследования по поиску паразитоспецифических вакцин.

В настоящее время большое внимание исследователи уделяют изучению белков фазы III, так как накапливается все больше сведений об участии ABC транспортеров паразитов в формировании резистентности к антигельминтикам. В частности, показана взаимосвязь между уровнем экспрессии Pgp и устойчивостью *S. mansoni* и *F. hepatica* к таким широко используемым гельминтоцидам, как празиквантел и триклабендазол.

Таким образом, накопление знаний об энзиматических системах, которые либо отсутствуют, либо специфичны для паразита, может обнаружить большое число белков, играющих решающую роль при выживании в хозяине, что может оказаться существенным при развитии методов химиотерапии паразитозов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке средств федерального бюджета на выполнение государственного задания № 0221-2014-0003.

Список литературы

- Борвинская Е. В., Смирнов Л. П., Немова Н. Н. 2013. Глутатион S-трансферазы у рыб. Тр. Карельского научного центра Российской академии наук. Сер. Экспериментальная биология. 3 : 3—9.
- Смирнов Л. П., Борвинская Е. В., Кочнева А. А., Суховская И. В. 2015. Глутатион S-трансферазы у гельминтов. Тр. Карельского научного центра Российской академии наук. Сер. Экспериментальная биология. 11 : 3—14.
- Alvarez A. I., Merino G., Molina A. J., Pulido M. M., McKellar Q. A., Prieto J. G. 2006. Role of ABC Transporters in Veterinary Drug Research and Parasite Resistance. *Current Drug Delivery*. 3 : 199—206.
- Ambudkar S. V., Kim I-W., Sauna Z. E. 2006. The power of the pump: Mechanisms of action of P-glycoprotein (ABCB1). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 27 : 392—400.
- Ardelli B. F., Prichard R. K. Inhibition of P-glycoprotein enhances sensitivity of *Caenorhabditis elegans* to ivermectin. *Veterinary Parasitology*. 191 : 264—275.
- Armstrong R. N. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione S-transferases. *Chemical Research in Toxicology*. 10 : 2—18.
- Bagnall N. H., Kotze A. C. 2004. cDNA cloning and expression patterns of a peroxiredoxin, a catalase and a glutathione peroxidase from *Haemonchus contortus*. *Parasitology Research*. 94 (4) : 283—289.
- Barrett J. 1997. Helminth detoxification mechanisms. *Journal of Helminthology*. 71 : 85—89.
- Brophy P. M., Barrett J. 1990. Glutathione transferases in helminthes. *Parasitology*. 100 : 345—349.
- Bosch I. B., Wang Z. X., Tao L. F., Shoemaker C. B. 1994. Two *Schistosoma mansoni* cDNAs encoding ATP-binding cassette (ABC) family proteins. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 65 (2) : 351—356.

- Callahan H. L., Crouch R. K., James E. R. 1988. Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants. *Parasitology Today*. 4 : 318—225.
- Capron A., Dessaint J. P., Capron M., Pierce R. J. 1992. Vaccine strategies against schistosomiasis. *Immunobiology*. 184 (2—3) : 282—294.
- Chandrashekar R., Tsuji N., Morales T. H., Carmody A. B., Ozols V. O., Welton J., Tang L. 2000. Removal of hydrogenperoxide by a l-cysteine peroxiredoxin enzyme of the filarial parasite *Dirofilaria immitis*. *Parasitology Research*. 86 : 200—206.
- Cvilink V., Lamka J., Skalova L. 2009. Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminthes. *Drug Metabolism Reviews*. 41 : 8—26.
- Genomics Institute of the Novartis Research Foundation. 2003. GNF SymAtlas, version 1.2.4 [web application and database]. Режим доступа: <http://symatlas.gnf.org/SymAtlas> (10 марта 2007).
- Godoy P., Che H., Beech R. N., Prichard R. K. 2016. Characterisation of P-glycoprotein-9.1 in *Haemonchus contortus*. *Parasites & Vectors*. 9 : 52.
- Greenberg R. M. 2014. Schistosome ABC multidrug transporters: From pharmacology to physiology. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 4 : 301—309.
- Henkle-Dührsen K., Kampkötter A. 2001. Antioxidant enzyme families in parasitic nematodes. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 114 : 129—141.
- Isaac R. E., Muimo R., Macgregor A. N. 1990. N-Acetylation of serotonin, octopamine, and dopamine by adult *Brugia pahangi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 43 : 193—198.
- Isaac R. E., Eaves L., Muimo R., Lamango N. 1991. N-acetylation of biogenic amines in *Ascaridia galli*. *Parasitology*. 102 (pt 3) : 445—450.
- Jez J. M., Penning T. M. The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update. *Chemico-Biological Interactions*. 130—132 : 499—525.
- Jones P. M., George A. M. 2005. Multidrug resistance in parasites: ABC transporters, P-glycoproteins and molecular modeling. *International Journal for Parasitology*. 35 (5) : 555—566.
- Kasinathan R. S., Morgan W. M., Greenberg R. M. 2011. Genetic knockdown and pharmacological inhibition of parasite multidrug resistance transporters disrupts egg production in *Schistosoma mansoni*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 5 : e1425.
- Kerboeuf D., Blackhall W., Kaminsky R., Samson-Himmelstjerna G. 2003. P-glycoprotein in helminthes: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 22 : 332—346.
- Kotze A. C. 1997. Cytochrome P450 monooxygenase activity in *Haemonchus contortus* (Nematoda). *International Journal for Parasitology*. 27 (I) : 33—40.
- Kotze A. C. 1999. Peroxide-supported *in vitro* cytochrome P450 activities in *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*. 29 : 389—396.
- Kotze A. C., McClure S. J. 2001. *Haemonchus contortus* utilizes catalase in defense against exogenous hydrogen peroxide *in vitro*. *International Journal for Parasitology*. 31 : 1563—1571.
- Kotze A. C., Dobson R. J., Chandler D. 2006. Synergism of rotenone by piperonylbutoxide in *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis in vitro*: Potential for drug-synergism through inhibition of nematode oxidative detoxification pathways. *Veterinary Parasitology*. 136 : 275—282.
- Krueger S. K., Williams D. E. 2005. Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms, and role in drug metabolism. *Pharmacology and Therapeutics*. 106 : 357—387.
- Kwatia M. A., Botkin D. J., Williams D. L. 2000. Molecular and enzymatic characterization of *Schistosoma mansoni* thioredoxin peroxidase. *Journal for Parasitology*. 86 : 908—915.
- Laing R., Kikuchi T., Martinelli A., Tsai I. J., Beech R. N., Redman E. et al. 2013. The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. *Genome Biology*. 14 : R88.

- Laing R., Bartley D. J., Morrison A. A., Rezansoff A., Martinelli A., Laing S. T., Gilleard J. S. 2015. The cytochrome P450 family in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*. 45 : 243—251.
- Lincke C. R., The I., van Groenigen M., Borst P. 1992. The P-glycoprotein gene family of *Caenorhabditis elegans*. Cloning and characterization of genomic and complementary DNA sequences. *Journal of Molecular Biology*. 228 : 701—711.
- Lindblom T. H., Dodd A. K. 2006. Xenobiotic defoxification in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Experimental Zoology. Part A. Comparative Experimental Biology*. 305 : 720—730.
- McKelvey J. R., Fioravanti C. F. 1986. Localization of cytochrome C oxidase and cytochrome C peroxidase in mitochondria of *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). *Comparative Biochemistry and Parasitology*. 85B : 333—335.
- McGonigle S., Curley G. P., Dalton J. P. 1997. Cloning of peroxiredoxin, a novel antioxidant enzyme, from the helminth parasite *Fasciola hepatica*. *Parasitology*. 115 : 101—104.
- Mei H., LoVerde P. T. 1997. *Schistosoma mansoni*: the developmental regulation and immunolocalization of antioxidant enzymes. *Experimental Parasitology*. 86 : 69—78.
- Menzel R., Rodel M., Kulas J., Steinberg C. E. 2005. CYP35: xenobiotically induced gene expression in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Archives Biochemistry Biophysics*. 438 : 93—102.
- Mkoji G. M., Smith J. M., Prichard R. K. 1988. Antioxidant systems in *Schistosoma mansoni*: correlation between susceptibility to oxidant killing and the levels of scavengers of hydrogen peroxide and oxygen free radicals. *International Journal for Parasitology*. 18 : 661—666.
- Ouellette M., Legare D. 2003. Drug resistance mediated by ABC transporters in parasites of human. In: Holland I. D., (ed.). *ABC Proteins*. London: Academic Press. 317—335.
- Paul J. M., Barrett J. 1980. Peroxide metabolism in the cestode *Hymenolepis diminuta* and *Moniezia expansa*. *International Journal for Parasitology*. 10 : 121—124.
- Petalcorin M. I. R., Joshua G. W., Agapow P.-M., Dolphin C. T. 2005. The fmo genes of *Caenorhabditis elegans* and *C. briggsae*: characterization, gene expression and comparative genomic analysis. *Gene*. 346 : 83—96.
- Pica-Matocchia L., Carlini D., Guidi A., Cimica V., Vigorosi F., Cioli D. 2006. The schistosome enzyme that activates oxaminiquine has the characteristics of a sulfotransferase. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 101 (Suppl. 1) : 307—312.
- Precious W. Y., Barrett J. 1989. The possible absence of cytochrome P-450—linked xenobiotic metabolism in helminthes. *Biochimical Biophysics Acta*. 992 : 215—222.
- Preston C. M., Barrett J. 1987. *Heligmosomoides polygyrus*: peroxidase activity. *Experimental Parasitology*. 64 : 24—28.
- Prichard R. K., Roulet A. 2007. ABC transporters and β -tubulin in macrocyclic lactone resistance: prospects for marker development. *Parasitology*. 134 : 1123—1132.
- Raines P. S., Barrett J. 1988. *Hymenolepis diminuta* — lack of culfate activation and sulfotransferase activity. *Experimental Parasitology*. 65 : 209—213.
- Reed M. B., Panaccio M., Strugnelli R. A., Spithill T. W. Developmental expression of a *Fasciola hepatica* sequence homologous to ABC transporters. *International Journal for Parasitology*. 28 (9) : 1375—1381.
- Robinson M. W., Lawson J., Trudgett A., Hoey E. M., Fairweather I. 2004. The comparative metabolism of triclabendazole sulphoxide by triclabendazole-susceptible and thiclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research*. 92 : 205—210.
- Roh J. Y., Jung I. H., Lee J. Y., Choi J. 2007. Toxic effects of di(2-ethylhexyl)phthalate on mortality, growth, reproduction, and stress-related gene expression in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology*. 237 : 126—133.
- Saeed H. M., Mostafa M. H., O'Connor P. J., Rafferty J. A., Doenhoff M. J. 2002. Evidence for the presence of active cytochrome P450 systems in *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* adult worms. *FEBS Letters*. 519 : 205—209.
- Sangster N. C. 1994. P-glycoproteins in nematodes. *Parasitology Today*. 10 : 319—322.

- Sayed A. A., Williams D. L. 2004. Biochemical characterization of 2-Cys peroxiredoxins from *Schistosoma mansoni*. Journal of Biological Chemistry. 279 : 26 159—26 166.
- Sexton J. L., Milner A. R., Panaccio M. et al. 1990. Glutathione S-transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. Journal of Immunology. 45 (11) : 3905—3910.
- Thomas J. H. 2007. Rapid birth—death evolution specific to xenobiotic cytochrome P450 genes in vertebrates, PLoS Genetics. 3 : e67.
- Torres-Rivera A., Landa A. 2008. Glutathione transferases from parasites: A biochemical view, Acta Tropica. 105 : 99—112.
- Tsuji N., Kasuga-Aoki H. 2001. Cloning and characterization of a peroxiredoxin from the swine round worm *Ascaris suum*. International Journal for Parasitology. 30 : 125—128.
- Valentim C. L. L., Cioli D., Chevalier F. D., Cao X., Taylor A. B., Holloway S. P., Pica-Matocchia L., Guidi A., Basso A., Tsai I. J., Berriman M., Carcalho-Queiroz C., Almeda M., Aguilar H. et al. 2013. Genetic and molecular basis of drug resistance and species-specific drug action in *Schistosoma* parasites. Science. 342 (6164) : 1385—1389.
- Vokral I., Jirasko R., Stuchlikova L., Bartikova H., Szotakova B., Lamka J., Varady M., Skalova L. 2013. Biotransformation of albendazole and activities of selected detoxification enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. Veterinary Parasitology. 196 : 373—381.
- Whyte J. J., Jung R. E., Schmitt C. J., Tillitt D. E. 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Activity in Fish as a Biomarker of Chemical Exposure. Critical Reviews in Toxicology. 30 (4) : 347—570.
- Xu M., Molento M., Blackhall W., Ribeiro P., Beech R., Prichard R. 1998. Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog. Molecular and Biochemical Parasitology. 91 (2) : 327—335.
- Zhan B., Liu S., Perally S., Xue J., Fujiwara R., Brophy P., Xiao S., Liu Y., Feng J., Williamson A., Wang Y., Bueno L. L., Mendez S., Goud G., Bethony J. M., Hawdon J. M., Loukas A., Jones K., Hotez P. J. 2005. Biochemical characterization and vaccine potential of a heme-binding glutathione transferase from the adult hookworm *Ancylostoma caninum* Infection and Immunity. 73 : 6903—6911.

THE SYSTEM OF XENOBIOTICS BIOTRANSFORMATION OF HELMINTHS.
RESEMBLANCE AND DIFFERENCES FROM SIMILAR HOST SYSTEMS
(REWEW)

L. P. Smirnov, E. V. Borvinskaya, I. V. Suhovskaya

Key words: biotransformation, xenobiotics, cytochrome P450, glutathione S-transferase, ABC transporters.

SUMMARY

The three phases system xenobiotic biotransformation in cells as prokaryotes as eukaryotes was formed during the process of evolution. Clear and managed function of all three links of this system guarantee the survival of living organisms at alteration of chemical component of environment. Oxidation, reduction or hydrolysis of xenobiotics realize in phase I by insertion or opening reactive and hydrophilic groups in structure of drug molecule. In phase II xenobiotics or their metabolites from phase I conjugate with endogenous compounds, main of there are glutathione, glucuronic acid, amino acids and sulphates. Active transport of substrata, metabolites and conjugates through cell lipid membranes special transport proteins carry out (phase III).

The system of xenobiotics biotransformation of helminths has essential differences from the same of vertebrate hosts. In particular, parasites do not reveal the activity of pri-

me oxidases of phase I, such as CYP or FMO, in spite of the genes of these enzymes in DNA. As this phenomenon displays mainly in adult helminths, living in guts of vertebrates, then the hypothesis was formulated that this effect is related with adaptation to conditions of strong deficiency of oxygen, arise in a process of evolution (Kotze et al., 2006).

Literature data testify the existence in helminths of unique forms of enzymes of phase II, the investigation of which present doubtless interest in relation with possible role in adaptation to parasitic mode of life. Notwithstanding that many of helminths GST in greater or lesser degree similar with enzymes of M, P, S and O classes of other organisms, nevertheless they have essential structural differences as compared with enzymes of hosts that makes perspective the search of specific anthelmintics vaccines.

Transport of xenobiotics is now considered phase III of biotransformation. It was shown that proteins of this phase (ATP binding cassette transporters (ABC) of parasites) play a key role in efflux of lipophilic xenobiotics, hydrophilic metabolites and conjugates and take part in forming of anthelmintics resistance. Some of these transporters, such as P-glycoprotein (Pgp), are important for drug resistance of helminths. In particular, a correlation between the level of expression of Pgp and resistance of *S. mansoni* and *F. hepatica* to widely used anthelmintics as praziquantel and triclabendazol exist.
