

УДК 615.284.036:616-092.4

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-4-111-119>

Новый подход к оценке эффективности антигельминтных средств *in vitro*

Перина Е.А., Буйко Е.Е., Каминский И.П., Собакин Д.С., Уфандеев А.А., Кайдаш О.А.,
Иванов В.В., Удут Е.В.

Сибирский государственный медицинский университет (СибГМУ)
Россия, 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

РЕЗЮМЕ

Цель. Разработать новый метод определения жизнеспособности описторхов *in vitro* с использованием MTS-реактива и оценить его применимость для анализа эффективности антигельминтных средств при лечении описторхоза.

Материалы и методы. Для создания модели инвазии *O. felineus* использовались золотистые сирийские хомяки. Животные инфицировались метацеркариями, полученными из рыб семейства карповых. Спустя 3 мес после заражения взрослые особи паразитов (мариты) извлечлись из гепатобилиарной системы. Жизнеспособность марит оценивалась с помощью шкалы подвижности и нового метода, основанного на модификации протокола MTS-теста. Для учета различий между размерами и количеством клеток марит результаты были нормализованы относительно содержания белка. Для оценки возможности применения нового подхода в изучении противоописторхозной фармакологической активности проверена жизнеспособность марит в присутствии празиквантела.

Результаты. При инкубации марит описторхов в среде с добавлением MTS-реактива происходит накопление окрашенного водорастворимого формазана. Термическое инактивирование паразитов значительно снижает продукцию этого соединения. Так как исследуемые мариты различались по размеру и количеству клеток, полученные данные об их жизнеспособности были нормированы на содержание белка. Результаты коррелируют с данными о жизнеспособности паразитов, полученными традиционным методом с использованием шкалы подвижности. Оценка эффективности празиквантела в разных концентрациях с помощью двух независимых методов (MTS-тест и шкала подвижности) показала, что результаты MTS-теста согласуются с литературными данными и сопоставимы с результатами, полученными с использованием шкалы подвижности.

Заключение. Разработан новый метод оценки противоописторхозной активности лекарственных препаратов *in vitro*, основанный на оценке продукции водорастворимого формазана маритами *O. felineus* в среде культивирования с использованием MTS-реагента для скрининга противоописторхозной активности новых антигельминтных препаратов.

Ключевые слова: трематодоз, *O. felineus*, жизнеспособность, MTS-тест, празиквантел, антигельминтные средства, двигательная активность

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Исследование выполнено в рамках реализации государственного задания на оказание государственных услуг (выполнение работ) № 056-03-2024-063 от 24.01.2024, дополнительное соглашение № 056-03-2024-063/3 от 29.08.2024 «Разработка нового лекарственного средства на основе природного комплекса фенолгликозидов и арабиногалактанов для терапии трематодозов».

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных центра доклинических исследований центральной научно-исследовательской лаборатории СибГМУ (заключение № 1 от 02.09.2024).

✉ Перина Екатерина Александровна, catherineperina@gmail.com

Для цитирования: Перина Е.А., Буйко Е.Е., Каминский И.П., Собакин Д.С., Уфандеев А.А., Кайдаш О.А., Иванов В.В., Удут Е.В. Новый подход к оценке эффективности антигельминтных средств *in vitro*. *Бюллетень сибирской медицины*. 2024;23(4):111–119. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-4-111-119>.

A new approach to assessing the efficacy of anthelmintic agents *in vitro*

Perina E.A., Buyko E.E., Kaminskiy I.P., Sobakin D.S., Ufandeev A.A., Kaidash O.A., Ivanov V.V., Udut E.V.

Siberian State Medical University

2, Moscow Trakt, Tomsk, Tomsk, 634050, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. To develop a new method to determine the viability of *Opisthorchis felineus in vitro* using the MTS reagent and to evaluate its applicability for analyzing the efficacy of anthelmintic agents in the treatment of opisthorchiasis.

Materials and methods. Golden hamsters were used to create a model of *O. felineus* infection. The animals were infected with metacercariae obtained from fish of the Cyprinidae family. Three months after infection, adult parasites were extracted from the hepatobiliary system. Their viability was assessed using the motility scale and a new method based on the modified MTS test protocol. To account for differences between the size and number of adult parasite cells, the results were normalized with respect to protein content. To evaluate the feasibility of the new approach in the study of pharmacological activity against opisthorchiasis, the viability of adult parasites in the presence of praziquantel was tested.

Results. During incubation of adult flukes in a medium with the addition of the MTS reagent, colored water-soluble formazan was accumulated. Thermal inactivation of parasites significantly decreased the production of this compound. Since the studied adult parasites differed in size and number of cells, the obtained data on their viability were normalized to protein content. The results correlated with the data on parasite viability obtained by the traditional method using the motility scale. Evaluation of praziquantel efficacy at different concentrations using two independent methods (the MTS test and the motility scale) showed that the results of the MTS test were consistent with literature data and comparable with the results obtained using the motility scale.

Conclusion. A new method for *in vitro* evaluation of anti-opisthorchiasis activity of drugs was developed. It is based on the assessment of water-soluble formazan production by adult *O. felineus* flukes in the culture medium using the MTS reagent for screening anti-opisthorchiasis activity of new anthelmintic drugs.

Keywords: trematode infection, *O. felineus*, viability, MTS test, praziquantel, anthelmintic agents, motility

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The study was carried out as part of the state assignment for the provision of public services No. 056-03-2024-063 of 24.01.2024, supplementary agreement No. 056-03-2024-063/3 of 29.08.2024 “Development of a new drug based on a natural complex of phenolic glycosides and arabinogalactanes for the treatment of trematodosis”.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the Commission for the control over the maintenance and use of laboratory animals of the Center for Preclinical Research of the Central Research Laboratory, Siberian State Medical University (Conclusion No. 1 of 02.09.2024).

For citation: Perina E.A., Buyko E.E., Kaminskiy I.P., Sobakin D.S., Ufandeev A.A., Kaidash O.A., Ivanov V.V., Udut E.V. A new approach to assessing the efficacy of anthelmintic agents *in vitro*. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2024;23(4):111–119. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2024-4-111-119>.

ВВЕДЕНИЕ

Печеночный сосальщик *Opisthorchis felineus* (*O. felineus*) входит в триаду эпидемиологически значимых видов печеночных сосальщиков семейства Opisthorchiidae и является основным возбудителем описторхоза на обширной территории, охватывающей Россию, Казахстан и ряд европейских стран [1]. Недавнее исследование, проведенное О.С. Федорова и соавт. (2023), показало, что распространение инфекции *O. felineus* в популяции тесно связано с развитием холангиокарциномы [2]. Кроме того, описторхоз может провоцировать развитие абсцессов печени и панкреатитов [1]. Таким образом, трематодозы являются группой опасных инфекционных заболеваний, представляющих значительную угрозу для общественного здравоохранения [3].

Основной подход, рекомендуемый Всемирной организацией здравоохранения для снижения уровня заболеваемости описторхозом, заключается в повышении доступности безопасного и эффективного медикаментозного лечения. На сегодняшний день единственным рекомендованным средством для терапии описторхоза является празиквантел (PZQ). Разработка новых лекарственных препаратов для лечения трематодозов имеет высокий приоритет, поскольку существует вероятность развития резистентности печеночных сосальщиков к PZQ [4]. Действительно, исследования *in vitro* подтвердили, что штаммы взрослых гельминтов, подвергающиеся постоянному воздействию PZQ, демонстрируют повышенную устойчивость к действию препарата [5]. Кроме того, PZQ не обладает профилактическим действием и неэффективен против личинок паразита, что представляет серьезный пробел при разработке стратегий массовой химиопрофилактики в регионах с высокой заболеваемостью [6].

Таким образом, учитывая ограничения существующих профилактических и терапевтических подходов, необходимо создание новых терапевтических агентов, способных эффективно подавлять активность паразита на всех стадиях его жизненного цикла.

Оценка жизнеспособности трематод играет ключевую роль в создании новых методов борьбы с этими паразитами. В настоящее время широко используется метод оценки подвижности паразитов путем визуального осмотра во время микроскопии [7, 8], реже – изучение ультраструктурной целостности с помощью сканирующей электронной микроскопии [8]. Первый метод является полуколичественным и требует высокого уровня подготовки специалиста,

осуществляющего наблюдения, второй – более трудоемким и сопряжен с существенными экономическими затратами.

На данный момент в фармакологических исследованиях *in vitro* применяется широкий спектр реактивов для анализа жизнеспособности культивируемых клеток. Среди наиболее распространенных методик выделяют методы прижизненного или посмертного окрашивания с последующей спектрофотометрической или флуориметрической детекцией и люминометрический анализ [9]. В отдельных работах упоминается возможность оценки жизнеспособности спорозист *Schistosoma mansoni* путем окрашивания флуоресцентным красителем пропидием йодида [10] или трипановым синим [11]. Отдельный интерес представляет возможность использования 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ), широко применяемого в работе с клеточными культурами, для оценки жизнеспособности паразитов [7, 12].

Однако все обнаруженные упоминания относятся исключительно к исследованию жизнеспособности возбудителей шистосомоза (*Schistosoma mansoni*). Информация о применении протокола, основанного на использовании реактива МТТ в отношении описторхов, в доступной научной литературе отсутствует. Важно отметить, что формазан, образующийся в результате восстановления молекул МТТ митохондриальными ферментами живых клеток, не растворяется в воде и образует в клетках фиолетовые кристаллы [9]. Это означает, что для количественного измерения образованного формазана перед определением оптической плотности требуется использовать органические растворители, такие как диметилсульфоксид (ДМСО) или изопропанол, что усложняет применение этого метода к многоклеточным организмам, включая марит описторхов.

МТТ-тест является стандартным методом оценки жизнеспособности клеток и определения цитотоксичности соединений. При его выполнении необходимо учитывать продолжительность инкубации и плотность рассадки клеток, чтобы обеспечить точность и воспроизводимость результатов [9]. Однако существенное ограничение применения МТТ-теста для определения жизнеспособности многоклеточного организма связано с невозможностью корректного учета различий в размерах и количестве клеток, что может привести к искажению итоговых данных и неверной интерпретации результатов.

Более простым и надежным анализом является МТС-тест, основанный на использовании модифи-

цированной молекулы МТТ. Этот тест позволяет живым клеткам непосредственно в культуральной среде производить водорастворимый окрашенный формазан, что упрощает процесс анализа [9].

Разработка простого и доступного протокола для оценки жизнеспособности марит печеночного сосальщика *O. felineus* позволит упростить скрининг потенциальных терапевтических средств, обладающих противоописторхозной активностью.

Цель исследования: разработать новый метод определения жизнеспособности описторхов *in vitro* с использованием MTS-реактива и оценить его применимость для анализа эффективности антигельминтных средств при лечении описторхоза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Золотистые сирийские хомячки (*Mesocricetus auratus*) приобретены в виварии Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск, Россия). Использование животных в рамках настоящего исследования одобрено комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных центра доклинических исследований центральной научно-исследовательской лаборатории СибГМУ (заключение № 1 от 02.09.2024).

В качестве источника первичного биологического материала, содержащего метацеркарии описторхов, использована рыба карповых пород, выловленная в реках Обского бассейна на территории Томской области. Метацеркарии описторхов выделены из зараженной рыбы методом переваривания в искусственном желудочном соке [13, 14].

Через 3 мес после заражения животные подвергнуты эвтаназии, из гепатобилиарного тракта извлечены мариты *O. felineus*. Мариты после промывки в буфере (200 ЕД/мл пенициллина – стрептомицина в 1 × PBS) помещены в лунки планшетов, заполненные культуральной средой (RPMI 1640, 100 ЕД/мл пенициллин – стрептомицин, 10 г/л глюкозы, 2 г/л бикарбоната натрия) при 37 °С в атмосфере 5%-го CO₂ [15]. Оценка жизнеспособности марит описторхов проведена сразу после выделения из желчных протоков печени инфицированных хомячков и через 24 ч инкубации в полной культуральной среде.

Новый предлагаемый метод оценки жизнеспособности взрослых форм *O. felineus* включает использование MTS-реактива и на первых этапах совпадает с ранее предложенными протоколами, включающими использование МТТ-теста [7, 12]. Мариты помещают в эппендорфы (1,5 мл), содержащие 200 мкл фосфатно-солевого буфера (PBS) и 40 мкл MTS реагента (Promega, США), и инкуби-

руют при 37 °С в течение 2 ч. Инкубационную среду отбирают, центрифугируют при 5 000 об/мин 10 мин для осаждения яиц печеночного сосальщика и экскреторно-секреторных продуктов, надосадочную жидкость разносят по лункам 96-луночного планшета и измеряют оптическую плотность среды при 492 нм с использованием многофункционального микропланшетного ридера Tecan 200 infinite pro (Tecan, Австрия). В качестве отрицательного контроля мариты перед тестом подвергают температурной обработке при 65 °С в течение 30 мин, что, как известно, приводит к их гибели [14].

Для компенсации различий в размере и клеточности марит значения оптической плотности были нормализованы по количеству белка, содержание которого во взрослых формах печеночного сосальщика определено методом, основанным на реакции с бицихониновой кислотой, с использованием набора BCA Protein Assay Kit (Sigma Aldrich, США) [16]. Для этого мариты гомогенизировали в лизирующем буфере (0,1%-й SDS, 0,1M NaOH) с последующей обработкой ультразвуком (Bandelin Sonoplus 2070, Германия). После центрифугирования (3 000 g в течение 10 мин) в отобранном супернатанте определено содержание белка.

Итоговую величину жизнеспособности определяли как разницу между оптической плотностью среды в опытных лунках после проведения MTS-теста и средним значением оптической плотности образцов, подвергшихся термической обработке. Полученное значение нормализовано на содержание белка в каждом печеночном сосальщике.

Для оценки перспектив применения нового подхода в изучении специфической фармакологической активности противоописторхозных средств, изолированные мариты печеночного сосальщика культивировали в полной среде в течение 24 ч в присутствии PZQ в конечных концентрациях 0,1; 0,5; 1 и 10 мкг/мл. После инкубации с PZQ жизнеспособность марит описторхов оценивали двумя независимыми методами: стандартным полуколичественным методом оценки подвижности паразитов и новым разработанным количественным методом, основанным на продукции водорастворимого формазана живыми клетками марит в среду инкубации при использовании MTS-реактива с учетом количественного содержания белка.

Двигательную активность марит *O. felineus* оценивали визуально с использованием общепринятой шкалы [14, 17]. Качественные характеристики двигательной активности описывали с помощью абсолютной частоты, а также с использованием величины процентного отношения. Для каждой концентрации

PZQ использовали 10 марит. Подвижность жизнеспособных червей оценивалась по шкале от 0 до 3 ([+++] очень активный (движение аналогично контрольным сосальщикам), [++] активный (снижение подвижности по сравнению с контролем, однако движения тела сохранены), [+] снижение жизнеспособности (только движения ротовой присоски) и [–] неподвижность) [17]. Средний показатель подвижности паразитов рассчитывали для каждой концентрации PZQ и выражали в процентах относительно контрольных значений.

Экспериментальные данные обработаны с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Все результаты представлены в виде среднего и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Для проверки значимости различий между исследуемыми группами использованы непараметрические критерии Краскела – Уоллиса и Шапиро – Уилка с применением поправки на множественное сравнение Бенжамини – Хохтеберга. Статистически значимые считали различия при уровне значимости $p < 0,05$ и $p < 0,001$. Для расчета концентрации PZQ, при которой жизнеспособность червей снижалась на 50% (IC50) после 24 ч инкубации, был использован нормализованный нелинейный регрессионный анализ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты экспериментов показали, что при инкубации свежееизвлеченных из печени зараженных хомяков марит описторхов с добавлением MTS-реактива в культуральной среде образуется окрашенный водорастворимый формаза, причем среднее значение оптической плотности в лунках составило $1,018 \pm 0,109$ ($n = 10$) (рис. 1).

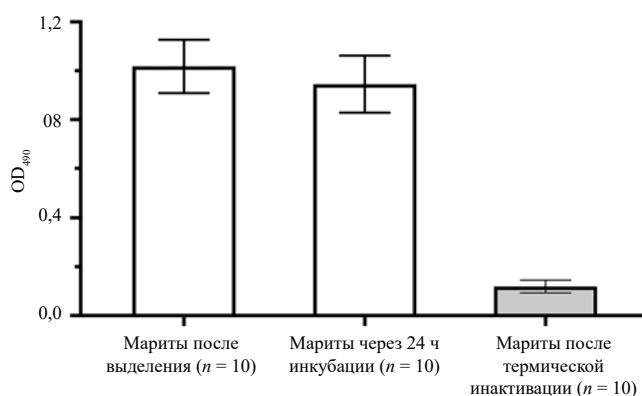


Рис. 1. Продукция водорастворимого формаза в среде инкубации марит непосредственно после выделения из желчных протоков печени инфицированных хомяков, через 24 ч инкубации в полной культуральной среде и после термической инактивации (65 °C, 30 мин)

Известно, что повышенная температура (65 °C в течение 30 мин) приводит к гибели марит [14]. Действительно, после термической инактивации марит в этих условиях в среде инкубации не отмечалось значительного образования формаза (см. рис. 1). Поэтому в дальнейшем при расчете жизнеспособности марит с использованием MTS-реактива эта лунка в планшете принималась за контрольный образец (blank), относительно которого проводились измерения.

После 24-часовой инкубации марит в полной культуральной среде в CO₂-инкубаторе при температуре 37 °C количество формаза в среде, определенное с помощью MTS-теста, не отличалось от показателей, полученных для свежееизвлеченных зрелых форм *O. felinus* (см. рис. 1). Эти результаты, во-первых, подтверждают сохранение жизнеспособности марит описторхов в указанных условиях культивирования и, во-вторых, свидетельствуют о том, что накопление водорастворимого формаза в среде инкубации при проведении MTS-теста действительно отражает жизнеспособность марит.

Процесс восстановления тетразолия происходит в ходе окислительного метаболизма в митохондриях клеток [9], а изолированные из печени хомяков печеночные сосальщики отличаются по размеру и клеточности. Поэтому более объективным показателем для оценки жизнеспособности червей является нормализация количества образовавшегося формаза на содержание белка в марите.

Действительно, количество образующегося формазанового продукта, выраженное в единицах оптической плотности после выполнения MTS-теста, положительно коррелирует с содержанием белка в маритах *O. felinus* (рис. 2). Поэтому в дальнейших экспериментах полученные данные о жизнеспособности паразитов были нормализованы по количеству белка.

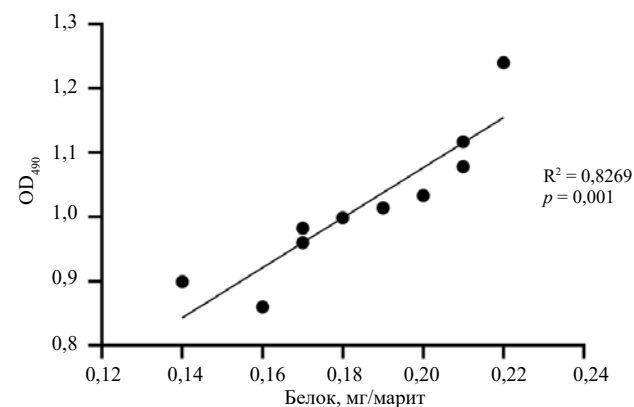


Рис. 2. Взаимосвязь между накоплением формаза в среде инкубации марит при проведении MTS-теста и содержанием в них белка, $n = 10$

Празиквантел в настоящее время является одним из самых распространенных противопаразитарных препаратов, используемых для лечения таких заболеваний, как описторхоз, клонорхоз, шистосомоз и других трематодозов. В ряде эндемичных регионов он активно применяется в рамках программ профилактической химиотерапии против паразитарных инфекций [18, 19]. На модели *in vitro* мы изучили влияние празиквантела PZQ в концентрациях 0,1; 0,5; 1 и 10 мкг/мл на жизнеспособность марит *O. felinus* в среде инкубации. Инкубация марит в течение 24 ч с возрастающими концентрациями PZQ в культуральной среде (0,1; 0,5; 1 и 10 мкг/мл) приводит к дозозависимому снижению подвижности червей вплоть до полной иммобилизации, а также частичному изменению их окраски (таблица).

Таблица

Двигательная активность марит <i>O. felinus</i> через 24 ч после добавления в среду различных концентраций празиквантела (PZQ) <i>in vitro</i>				
Концентрация PZQ, мкг/мл	Количество марит <i>O. felinus</i> (%) в соответствии со шкалой подвижности			
	0	1	2	3
0	0	0	0	10
	0	0	0	100
0,1	0	9	1	0
	0	90	10	0
0,5	6	4	0	0
	60	40	0	0
1	8	2	0	0
	80	20	0	0
10	10	0	0	0
	100	0	0	0

Примечание. Шкала подвижности: 3 – нормальная двигательная активность марит *O. felinus*; 2 – редуцированная двигательная активность; 1 – очень слабая двигательная активность, видимая только при увеличении микроскопа $\times 20$; 0 – отсутствие двигательной активности или смерть марит *O. felinus*, регистрируется при отсутствии движения в течение 2 мин наблюдения только при $\times 20$.

Внесение PZQ в концентрации 0,1 мкг/мл в среду культивирования паразитов приводит к параличу мышечной ткани *O. felinus*, снижая до минимальных значений их двигательную активность, но сохраняя их жизнеспособность в течение 24 ч экспозиции. При концентрации PZQ 0,5 мкг/мл 40% марит *O. felinus* характеризовались очень слабой двигательной активностью (по шкале подвижности соответствует 1), а у 60% двигательная активность отсутствовала. При повышении концентрации PZQ в инкубационной среде до 1 мкг/мл 80% марит *O. felinus* демонстрировали отсутствие двигательной активности (по шкале подвижности соответствует 0). В концентрации PZQ 10 мкг/мл у 100% марит

двигательная активность также отсутствовала (см. таблицу).

При этом наблюдается дозозависимое уменьшение выработки водорастворимого формазана в среде инкубации под воздействием препарата. Процент жизнеспособности культивируемых марит составил 63,7; 38,9; 26,5 и 6,4% при концентрациях празиквантела 0,1; 0,5; 1 и 10 мкг/мл соответственно (за 100% взяты значения продукции формазана в инкубационной среде без препарата) (рис. 3). Результаты соотносятся с данными, полученными независимым методом по оценке жизнеспособности марит с использованием шкалы подвижности (см. таблицу).

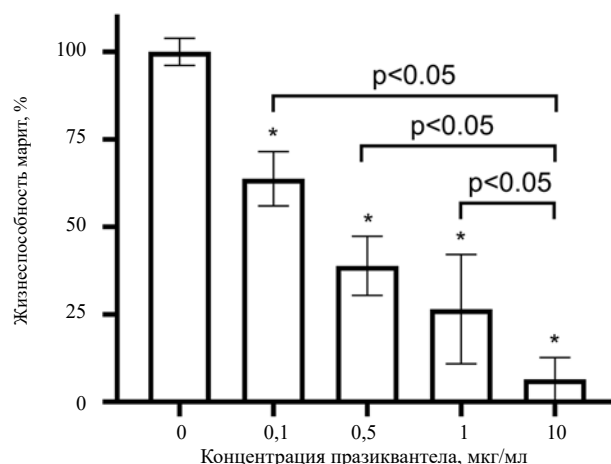


Рис. 3. Влияние различных концентраций празиквантела (мкг/мл) на жизнеспособность марит описторхов при их культивировании в течение 24 ч, $n = 10$. * $p < 0,05$ в сравнении с контролем

В качестве интегрального показателя, характеризующего противоописторхозную активность PZQ, использовали значение IC50 (концентрация, вызывающая гибель 50% клеток марит через 24 ч инкубации с препаратом). Нелинейный регрессионный анализ показал, что величина IC50 для марит *O. felinus* через 24 ч инкубации с PZQ составила 0,24 мкг/мл.

Таким образом, предложенный подход с использованием MTS-теста, учитывающий содержание белка в пробах, представляет собой объективный количественный метод анализа жизнеспособности марит печеночного сосальщика *O. felinus* и может применяться для оценки эффективности новых антигельминтных средств *in vitro*.

ОБСУЖДЕНИЕ

На сегодняшний день PZQ остается единственным препаратом выбора для лечения описторхоза. Учитывая потенциальный риск развития резистентности у печеночных сосальщиков к PZQ, разработка

новых лекарственных средств для лечения трематодозов остается актуальной задачей и имеет высокий приоритет [4].

При оценке антигельминтных свойств новых соединений часто требуется определение жизнеспособности паразита *in vitro* при его инкубации с разными концентрациями исследуемого лекарственного вещества. В настоящее время для определения жизнеспособности *O. felineus* применяют шкалу подвижности паразита от 0 до 3 [14]. Данный метод не стандартизован, трудоемок и зависит от субъективной оценки исследователя.

Более объективный подход к оценке жизнеспособности трематод впервые был продемонстрирован в экспериментах с *Schistosoma mansoni* с использованием МТТ-теста [19]. Этот метод наиболее часто используется для оценки количества жизнеспособных клеток в культуре и основан на способности митохондриальных и цитоплазматических дегидрогеназ живых и метаболически активных клеток восстанавливать производные тетразолия – МТТ-реагент в водонерастворимый формазан, для определения количества которого необходима экстракция красителя ДМСО [20]. Однако в данном исследовании не учитываются различия в клеточности зрелых форм *S. mansoni*, что является важным ограничением при интерпретации результатов.

Недавно в арсенале лабораторных методов оценки жизнеспособности клеток появился тетразолиевый краситель второго поколения – МТS [21], который с участием феназинметасульфата восстанавливается в среде культивирования до окрашенного водорастворимого формазана, что позволяет значительно ускорить анализ и получить более объективные результаты.

В данном исследовании была предпринята попытка разработать скрининговый метод оценки противоописторхозной активности лекарственных препаратов *in vitro* с использованием МТS-теста.

При анализе результатов проведенных экспериментов установлено, что при инкубации марит описторхов в среде с добавлением реагента МТS-теста накапливается окрашенный водорастворимый формазан. Термическая инактивация паразитов приводит кратно меньшей продукции окрашенного соединения. Это подтверждает, что МТS-тест, традиционно используемый для оценки жизнеспособности клеток при культивировании *in vitro* [22], действительно позволяет оценить митохондриальную метаболическую активность клеток многоклеточных организмов, таких как мариты, и таким образом определять их жизнеспособность.

Так как исследованные мариты различались по размеру и, соответственно, количеству клеток, дан-

ные об их жизнеспособности были нормализованы по содержанию белка. Продукция формазана маритами, выраженная через содержание в них белка, соответствовала результатам оценки жизнеспособности паразита, полученным с помощью традиционного метода с использованием шкалы подвижности [13].

Также двумя независимыми методами (МТS-тест и использование шкалы подвижности) было исследовано влияние разных концентраций PZQ, препарата выбора для лечения описторхоза, на жизнеспособность марит *in vitro*. Результаты, полученные при использовании МТS-теста, соответствуют данным по оценке жизнеспособности марит с использованием шкалы подвижности. Для PZQ был рассчитан показатель IC₅₀, определяемый как концентрация, необходимая для гибели 50% клеток марит через 24 ч инкубации с препаратом, которая составила 0,24 мкг/мл. Полученные результаты сопоставимы с литературными данными о том, что IC₅₀ для PZQ, определенная другими методами, составляет 0,16 мкг/мл для *O. viverrini* [23] и 0,14 мкг/мл *O. felineus* [14].

Таким образом, нами был разработан количественный метод исследования противоописторхозной активности лекарственных препаратов *in vitro*, основанный на оценке продукции водорастворимого формазана маритами *O. felineus* в среде культивирования методом МТS-теста с учетом содержания белка в образце.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанный новый метод оценки противоописторхозной активности лекарственных препаратов *in vitro* основан на оценке продукции водорастворимого формазана маритами *O. felineus* в среде культивирования с использованием МТS-реагента. Полученные результаты совпадают с показателями жизнеспособности паразитов, определенными по традиционной методике с применением шкалы подвижности. Более объективным показателем для выражения жизнеспособности марит *O. felineus* является нормализация оптической плотности образующегося формазана на количество белка в паразите.

Результаты оценки эффективности препарата выбора для лечения описторхоза – PZQ с использованием МТS-теста *in vitro* соотносятся с опубликованными научными данными, что позволяет считать разработанный подход простым и доступным методом для исследования противоописторхозной активности новых антигельминтных средств.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Pakharukova M.Y., Mordvinov V.A. The liver fluke *Opisthorchis felineus*: biology, epidemiology and carcinogenic

- potential. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2016;110(1):28–36. DOI: 10.1093/trstmh/trv085.
2. Fedorova O.S., Kovshirina A.E., Kovshirina Y.V., Hattendorf J., Onishchenko S.V., Katanakhova L.L. et al. *Opisthorchis felinus* infection is a risk factor for cholangiocarcinoma in Western Siberia: A hospital-based case-control study. *Clinical Infectious Diseases*. 2023;7(3):e1392–e1398. DOI: 10.1093/cid/ciac497.
 3. Khalil R.G., Ibrahim A.M., Bakery H.H. Juglone: “A novel immunomodulatory, antifibrotic, and schistosomicidal agent to ameliorate liver damage in murine schistosomiasis mansoni”. *International Immunopharmacology*. 2022;113:109415. DOI: 10.1016/j.intimp.2022.109415.
 4. Pakharukova M.Y., Samsonov V.A., Serbina E.A., Mordvinov, V.A. A study of tribendimidine effects *in vitro* and *in vivo* on the liver fluke *Opisthorchis felinus*. *Parasites Vectors*. 2019;12(23):1–6. DOI: 10.1186/s13071-019-3288-z.
 5. Harder A. Activation of transient receptor potential channel Sm. (*Schistosoma mansoni*) TRPM PZQ by PZQ, enhanced Ca⁺⁺ influx, spastic paralysis, and tegumental disruption—the deadly cascade in parasitic schistosomes, other trematodes, and cestodes. *Parasitology Research*. 2020;119:2371–2382. DOI: 10.1007/s00436-020-06763-8.
 6. Spangenberg T. Alternatives to praziquantel for the prevention and control of schistosomiasis. *ACS Infectious Diseases*. 2020;7(5):939–942. DOI: 10.1021/acinfed.0c00542.
 7. Detoni M.B., Bortoleti B.T.D.S., Tomiotto-Pellissier F., Concato V.M., Gonçalves M.D., Silva T.F. et al. Biogenic silver nanoparticle exhibits schistosomicidal activity *in vitro* and reduces the parasitic burden in experimental *Schistosomiasis mansoni*. *Microbes and Infection*. 2023;25(7):105145. DOI: 10.1016/j.micinf.2023.105145.
 8. Rehman L., Ullah R., Rehman A., Khan M.A.H., Beg M.A., Wasim S. et al. Clinostomum complanatum: Anthelmintic potential of curcumin on the infective progenetic metacercarial stage. *Experimental Parasitology*. 2023;249:108514. DOI: 10.1016/j.exppara.2023.108514.
 9. Aslantürk Ö.S. *In vitro* cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. *Genotoxicity-A Predictable Risk to Our Actual World*. 2018;64–80. DOI: 10.5772/intechopen.71923.
 10. Mourão M.M., Dinguirard N., Franco G.R., Yoshino T.P. Role of the endogenous antioxidant system in the protection of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts against exogenous oxidative stress. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2009;3(11):e550. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000550.
 11. Moné Y., Mitta G., Duval D., Gourbal B.E. Effect of amphotericin B on the infection success of *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. *Experimental Parasitology*. 2019;125(2):70–75. DOI: 10.1016/j.exppara.2009.12.024.
 12. De Paula R.G., de Magalhães Ornelas A.M., Morais E.R., de Souza Gomes M., de Paula Aguiar D. et al. Proteasome stress responses in *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research*. 2015;114:1747–1760. DOI: 10.1007/s00436-015-4360-z.
 13. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д., Васильев А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К., 2012:944.
 14. Pakharukova M.Y., Shilov A.G., Pirozhkova D.S., Katokhin A.V., Mordvinov V.A. The first comprehensive study of praziquantel effects *in vivo* and *in vitro* on European liver fluke *Opisthorchis felinus* (Trematoda). *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2015;46(1):94–100. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2015.02.012.
 15. Wong Y., Pearson M.S., Fedorova O., Ivanov V., Khmelevskaya E., Tedla B. et al. Secreted and surface proteome and transcriptome of *Opisthorchis felinus*. *Frontiers in Parasitology*. 2023;1195457. DOI: 10.3389/fpara.2023.1195457.
 16. Olson B.J., Markwell J. Assays for determination of protein concentration. *Current Protocols in Pharmacology*. 2007;38(1):A–3A. DOI: 10.1002/0471140864.ps0304s48.
 17. Marcos L., Maco V., Terashima A. Triclabendazole for the treatment of human fascioliasis and the threat of treatment failures. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 2021;19(7):817–823.
 18. Olliaro P., Delgado-Romero P., Keiser J. The little we know about the pharmacokinetics and pharmacodynamics of praziquantel (racemate and R-enantiomer). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014;69(4):863–870. DOI: 10.1093/jac/dkt491.
 19. Oliveira M.F., d’Avila J.C., Tempone A.J., Soares J.B., Rumjanek F.D., Ferreira-Pereira A. et al. Inhibition of heme aggregation by chloroquine reduces *Schistosoma mansoni* infection. *Journal of Infectious Diseases*. 2004;190(4):843–852. DOI: 10.1086/422759.
 20. Ghasemi M., Turnbull T., Sebastian S., Kempson I. The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(23):12827. DOI: 10.3390/ijms222312827.
 21. Stockert J.C., Horobin R.W., Colombo L.L., Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica*. 2018;120(3):159–167. DOI: 10.1016/j.acthis.2018.02.005.
 22. Stone V., Johnston H., Schins R.P. Development of *in vitro* systems for nanotoxicology: methodological considerations. *Critical Reviews in Toxicology*. 2009;39(7):613–626. DOI: 10.1080/10408440903120975.
 23. Keiser J., Manneck T., Vargas M. Interactions of mefloquine with praziquantel in the *Schistosoma mansoni* mouse model and *in vitro*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011;66(8):1791–1797. DOI: 10.1093/jac/dkr178.

Вклад авторов

Перина Е.А. — анализ литературы, культивирование зрелых форм печеночного сосальщика, определение жизнеспособности *in vitro*. Буйко Е.Е. — анализ литературы, получение и интерпретация экспериментальных данных, написание текста статьи. Каминский И.П. — воспроизведение описторхозной инвазии. Собакин Д.С. — получение экспериментальных данных. Уфандеев А.А.,

Кайдаш О.А. – анализ литературы, написание текста статьи. Иванов В.В. – разработка концепции и дизайна исследования, координация выполнения исследования, написание текста статьи, окончательное утверждение содержания для публикации рукописи. Удут Е.В. – координация выполнения исследования, окончательное утверждение содержания для публикации рукописи.

Информация об авторах

Перина Екатерина Александровна – мл. науч. сотрудник, центр доклинических исследований, центральная научно-исследовательская лаборатория, СибГМУ, г. Томск, catherineperina@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-4273-8228>

Буйко Евгений Евгеньевич – мл. науч. сотрудник, центр доклинических исследований, центральная научно-исследовательская лаборатория, СибГМУ, г. Томск, buykoevgen@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-6714-1938>

Каминский Илья Петрович – канд. фармацевт. наук, доцент, кафедра фармацевтического анализа, СибГМУ, г. Томск, kaminskiy.ip@ssmu.ru, <http://orcid.org/0000-0003-4597-1743>

Собакин Данил Сергеевич – лаборант-исследователь, лаборатория трансляционной медицины, СибГМУ, г. Томск, sobakin.ds@ssmu.ru, <http://orcid.org/0009-0003-1920-2622>

Уфандеев Александр Анатольевич – мл. науч. сотрудник, центр доклинических исследований, центральная научно-исследовательская лаборатория, СибГМУ, г. Томск, ufandeev@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-3837-1179>

Кайдаш Ольга Александровна – канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, центр доклинических исследований, центральная научно-исследовательская лаборатория, СибГМУ, г. Томск, kaidash_2011@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-8761-7537>

Иванов Владимир Владимирович – канд. биол. наук, доцент, руководитель центра доклинических исследований, центральная научно-исследовательская лаборатория, СибГМУ, г. Томск, ivanovvv1953@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0003-3326-729X>

Удут Елена Владимировна – д-р мед. наук, профессор РАН, зав. центральной научно-исследовательской лабораторией, СибГМУ, г. Томск, udut.ev@ssmu.ru, <http://orcid.org/0000-0002-61-4782>.

(✉) **Перина Екатерина Александровна**, catherineperina@gmail.com

Поступила в редакцию 24.09.2024;
одобрена после рецензирования 03.10.2024;
принята к публикации 04.10.2024