

*На правах рукописи*

**Сидор Евгения Александровна**

**КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ГЛИКОГЕНА  
В КАЧЕСТВЕ ПОКАЗАТЕЛЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА  
У ГЕЛЬМИНТОВ**

1.5.17. Паразитология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН).

**Научный руководитель:**

доктор ветеринарных наук

**Андреянов Олег Николаевич**

**Официальные оппоненты:**

**Бибик Оксана Ивановна** - доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры биологии с основами генетики и паразитологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО КемГМУ Минздрава России)

**Иешко Евгений Павлович** - доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории паразитологии животных и растений Института биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук» (ИБ КарНЦ РАН)

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «21» сентября 2022 года в 11<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 24.1.249.02., созданного на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (Москва ЦФО).

**Адрес:** 117218, Москва, ул. Б. Черемушкинская, д.28.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН и на сайте <http://viev.ru/>

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета  
кандидат биологических наук

Емельянова  
Надежда Борисовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Гликоген представляет собой резервный полисахарид, построенный из остатков глюкозы. Одним из ключевых путей ее метаболизма является образование энергетического соединения – аденозинтрифосфата. Данный ресурс необходим для всех энергозависимых процессов в организме: обеспечивает рост, деление, сократительную и функциональную активность клеток. Гликоген является основным резервным субстратом для синтеза энергетических соединений в условиях недостатка кислорода, где использование липидов в качестве источника энергии ограничено. Несмотря на наличие многочисленных путей катаболизма у гельминтов, анаэробный гликолиз является малоэффективным способом получения энергии, так как количество образованного аденозинтрифосфата на молекулу расщепленной глюкозы относительно невелико. Это объясняет значительный расход гликогена при недостатке экзогенных питательных веществ и высокую зависимость гельминтов от достаточного содержания данного соединения для реализации биологического цикла и адаптации к неблагоприятным условиям среды. Изучением данных вопросов, применяя качественные методы определения гликогена, занимались многие исследователи, такие как Гинецинская Т.А. (1963, 1971, 1981), Гридасова Л.Ф. (1969), Переверзева Э.В. (1966, 1972), Яворский И.П. (1988), Бибик О.И. (1997, 2017), Начева Л.В. (1993), von Brand T. (1961), Kozar Z. (1974), Wu Z. (2009) и др.

Гельминты, использующие преимущественно анаэробный тип метаболизма на той или иной стадии развития, при условии доступности субстратов накапливают значительные количества гликогена, что позволяет определять его содержание количественными методами в относительно малом объеме биоматериала и регистрировать достоверные изменения концентрации в большем диапазоне значений. Данные свойства открывают для исследователей возможность применения количественных методов определения гликогена для решения различных задач в области паразитологии, связанных с изучением динамики накопления и расходования данного полисахарида.

В направлении разработки количественных методов описаны различные подходы определения гликогена в гельминтах (R.A. Cornish, 1977, P. Dey, 2020, G.L. Stewart, 1976, L.T. Threadgold, 1982, J.M. Wastling, 1994), тем не менее, они обладают рядом недостатков, устранение которых, а также научно обоснованное усовершенствование и стандартизация, являются важной и актуальной проблемой.

**Степень разработанности темы исследования.** В области паразитологии представлены количественные методы определения содержания гликогена по Montgomery R. (1957), Seifter S. (1950), Pfleiderer G. (1965) и др. Данные методы основаны на гидролизе сахаров и измерении с использованием различных реактивов концентрации свободной глюкозы в анализируемых пробах. Поскольку полученные результаты отражают суммарное содержание углеводов, включая свободную глюкозу и другие сахара, такие методы нельзя назвать специфичными.

Анализ имеющихся сведений о методах, применяемых в иных областях исследований, позволил выявить прямой специфичный спектрофотометрический способ определения концентрации непосредственно гликогена без разрушения его структуры (Е.О. Данченко и А.А. Чиркин, 2010). Возможность использования данного метода, простого технологически и требующего незначительных затрат времени (2,5-4 ч), для определения содержания гликогена в гельминтах представляет интерес для решения не только научных, но и практических задач.

**Цель и задачи.** Цель настоящей работы заключалась в усовершенствовании методики количественного определения содержания гликогена в гельминтах и ее приложении к решению вопросов, связанных с жизненным циклом возбудителей и их сохранности при воздействии неблагоприятных факторов внешней среды.

### **Задачи исследования:**

- адаптировать известную методику определения концентрации гликогена в тканях макроорганизмов к объекту исследования «гельминты» на примере свободноживущей модельной нематоды *Caenorhabditis elegans*;
- определить изменения в содержании гликогена в процессе биологического цикла развития *Trichinella spiralis*;
- исследовать динамику содержания гликогена и некоторые биологические свойства в личинках *T. nativa* и *T. pseudospiralis* на мышечной стадии развития при хранении биоматериала (тушек инвазированных крыс) в зимне-весенний период в естественных условиях среды Центрального региона России;
- изучить влияние различных температур на содержание гликогена, жизнеспособность и инвазионность адолескариев *Fasciola hepatica*;
- проанализировать содержание гликогена в фасциолах *F. hepatica* на преимагинальной стадии развития после терапии крыс антигельминтиками из группы бензимидазолов при однократном введении препаратов;
- оценить изменения в концентрации гликогена в имагинальных *F. hepatica* у крыс после терапии препаратами, производными бензимидазолов, при многократном введении.

**Научная новизна.** Усовершенствована методика количественного определения содержания гликогена в гельминтах.

Получены новые данные о концентрации гликогена в процессе биологического цикла *T. spiralis*. Исследована динамика содержания гликогена, жизнеспособность и инвазионность в мышечных личинках *T. nativa* и *T. pseudospiralis* при хранении в естественных условиях среды в зимне-весенний период в тушках инвазированных крыс. Показано, что данные биологические свойства напрямую зависят от содержания резервного полисахарида: при низком уровне гликогена жизнеспособные личинки утрачивают свои инвазионные свойства.

Изучено изменение показателей содержания гликогена, жизнеспособности и инвазионности адолескариев *F. hepatica* при воздействии различных температур. Определено изменение концентрации гликогена в трематодах *F. hepatica* на преимагинальной и имагинальной стадии развития при терапии хозяина препаратами, производными бензимидазолов, с использованием различных схем лечения.

Научная новизна исследований подтверждена патентом № 2681167 на изобретение «Способ определения количества гликогена в личинках трихинелл для контроля качества обезвреживания инвазионного материала» бюл. №7 от 04.03.2019г.

**Теоретическая и практическая значимость.** Теоретическая значимость настоящей работы заключается в том, что результаты, полученные с помощью описанного метода, позволяют оценить соотношение процессов синтеза и распада энергетического резервного субстрата гельминтов – гликогена, и тем самым дополнить имеющиеся знания об особенностях энергетического метаболизма гельминтов, обеспечивающего их жизнедеятельность и выживание.

С практической стороны является перспективным использование метода в области изучения биологических основ профилактики гельминтозоонозов животных и человека и тестирования средств и методов обезвреживания зараженного материала, поскольку анализируемый полисахарид может рассматриваться в качестве дополнительного критерия при оценке инвазионности. Определение концентрации гликогена позволяет исследовать влияние определенных факторов внешней среды в контролируемых условиях на выживаемость культуры гельминтов.

Данные, полученные при изучении содержания гликогена в личинках трихинелл, могут быть использованы при разработке профилактических мероприятий при трихинеллезе.

Исследования содержания гликогена позволяют изучить реактивность фасциол после воздействия препаратов из группы бензимидазолов и могут быть полезны при

разработке новых схем и методов терапии и профилактики фасциоза. Определение концентрации гликогена спектрофотометрическим методом позволяет повысить информативность оценки эффективности воздействия антигельминтиков на гельминтов и раскрыть некоторые аспекты механизма действия химиопрепаратов.

На основании результатов исследований разработаны и одобрены секцией «Инвазионные болезни» ВНИИП - филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (протокол №3 от 25.10.2019 г.) «Методические положения оценки инвазионной способности личинок гельминтозоонозов по содержанию гликогена».

**Методология и методы исследования.** Методологическим подходом в достижении цели и решении поставленных задач явилось системное изучение объектов исследования, анализ, сравнение и обобщение литературных данных и полученных собственных результатов. Предметом исследования стало усовершенствование способа определения концентрации гликогена в гельминтах для последующего решения ряда задач в области паразитологии.

При выполнении диссертационной работы использовали микроскопические, микробиологические, паразитологические, патологоанатомические, физико-химические и статистические методы исследований.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Оптимизирована методика специфического количественного спектрофотометрического определения содержания гликогена, адаптированная для применения в области гельминтологии на примере представителей классов нематода и трематода.

2. Инвазионность и жизнеспособность личинок трихинелл зависит от количественного содержания в них гликогена.

3. Динамика расщедования гликогена адолескарями фасциол связана с температурой окружающей среды и коррелирует с изменением показателя жизнеспособности.

4. Контроль содержания гликогена в гельминтах может служить в качестве дополнительного критерия оценки эффективности действия антигельминтных препаратов.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность результатов определяется использованием общепринятых методов исследований, достаточного объема выборки изучаемых объектов и соответствием контрольных значений, полученных в настоящей работе и представленных в литературных источниках. Достоверность результатов подтверждена статистической обработкой данных с использованием t-критерия Стьюдента.

Материалы диссертационной работы были доложены и представлены на международной научной конференции «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями» (Москва, 2019, 2020, 2021 г.) и на 15th International Conference on Trichinellosis (Румыния, 2019 г.).

**Публикации.** По материалам диссертационной работы опубликовано 12 научных статей, из которых 3 в изданиях, рецензируемых ВАК РФ, и 4 в журналах, включенных в базу данных Scopus, в которых изложены основные положения и выводы по изучаемым вопросам. Получен патент на изобретение.

**Личный вклад автора.** Автором лично проведены анализ литературных данных, культивирование нематоды *C. elegans*, пробоподготовка и спектрофотометрические исследования содержания гликогена, в том числе отработка метода на различных объектах и оптимизация условий проведения анализа, в части экспериментов – выделение и определение жизнеспособности гельминтов, постановка экспериментов по изучению влияния антигельминтиков на фасциол, анализ и статистическая обработка полученных данных.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 129 страницах компьютерного набора текста и состоит из введения, обзора литературы,

раздела собственных исследований, включающего материалы и методы, результаты и обсуждение результатов, заключения, практических предложений, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и приложения. Диссертация иллюстрирована 14 таблицами и 12 рисунками. Список литературы включает 262 источника (86 отечественных и 176 иностранных авторов).

## ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Представлены литературные данные о роли гликогена в энергетическом обмене гельминтов и особенностях его метаболизма. Описаны процессы накопления и расходования гликогена в процессе биологического цикла развития нематоды *T. spiralis* и трематоды *F. hepatica*. Приведены краткие сведения о применяемых в гельминтологии методах детектирования гликогена и их использовании при изучении действия антигельминтных препаратов.

## СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 1. Материалы и методы

Основные исследования по теме диссертации были проведены на экспериментальной базе лаборатории паразитарных зоонозов «Всероссийского научно-исследовательского института фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений имени К.И. Скрябина» («ВНИИП») – филиала ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН и в его виварии с 2017 по 2021 г.

Объектами исследования служили представители классов нематода (*C. elegans*, *T. spiralis*, *T. nativa*, *T. pseudospiralis*) и трематода (*F. hepatica*).

Культивирование полученных из коллекции Института проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова (ФГБУН ИПЭЭ РАН) свободноживущей нематоды *C. elegans* и бактериальной культуры *E. coli*, использующейся в составе ксенической среды, проводили на агаризованных питательных средах согласно общепринятой методике (Т. Stiernagle, 1999). Культуры возбудителей трихинеллеза и фасциолеза с момента получения и по настоящее время поддерживаются пассированием на беспородных белых крысах в условиях вивария ВНИИП – филиала ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН. Культура адолескариев *F. hepatica*, полученная при искусственном выводе церкариев из промежуточного хозяина, предоставлена Постевым А.Н., сотрудником лаборатории эпизоотологии и прогнозирования ВНИИП – филиала ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.

В качестве лабораторной модели инвазии изучаемых возбудителей использовали белых крыс линии Вистар. Выделение фасциол и кишечных трихинелл проводили методом гельминтологического вскрытия по К.И. Скрябину (1928). Личинок трихинелл выделяли методом пассивного переваривания в искусственном желудочном соке по Березанцеву Ю.А. (1960) и автоматизированного пептолиза с использованием аппаратов типа (серии) АВТ.

Определение жизнеспособности личинок трихинелл проводили согласно методике, разработанной Скворцовой Ф.К. и др. (2009). Жизнеспособность трематод *F. hepatica* определяли по регистрации двигательной активности при прогревании среды (для адолескариев) и непосредственно после выделения из организма хозяина (для преимагинальных и имагинальных стадий развития). Показатель жизнеспособности гельминтов количественно определяли как соотношение числа жизнеспособных (подвижных) особей к общему числу обследованных гельминтов и выражали в процентах (%).

Инвазионность личинок возбудителей гельминтозов определяли путем постановки биопробы на лабораторных животных: мышях линии С57BL/10 и монгольских песчанках. Культуру трихинелл считали инвазионной при регистрации личинок методами

компрессорной трихинеллоскопии и переваривания тушек мышей в искусственном желудочном соке (Ю.А. Березанцев, 1960). Культуру адолескариев считали инвазионной при регистрации миграционных путей и/или ювенильных трематод в паренхиме и протоках печени песчанок на 14 сутки и половозрелых фасциол и их яиц на 90-е сутки при проведении неполного гельминтологического вскрытия по К.И. Скрыбину (1928).

Концентрацию гликогена в гельминтах определяли адаптированным для применения в области гельминтологии специфичным спектрофотометрическим методом. Содержание гликогена рассчитывали по градуировочному графику, построенному в пакете программ Microsoft Excel 2008 (Microsoft Corporation, США), для чего готовили серию стандартных растворов с известным содержанием гликогена и определяли их оптическую плотность. Измерение оптического пути проводили с использованием микроколориметра медицинского фотоэлектрического МКМФ-02.

Расчет концентрации гликогена проводили по следующей формуле:

$$C = E \times k / F \times n,$$

где  $C$  — концентрация гликогена в гельминте (мг/экз.),

$E$  — оптическая плотность анализируемой пробы (ед.),

$F$  — фактор, который рассчитывается как тангенс угла наклона градуировочной кривой,

$k$  — коэффициент разведения пробы,

$n$  — количество гельминтов в пробе (экз.).

Определение количества микроорганизмов в пробе проводили путем подсчета в камере Мигачевой-Котельникова (1987), повторяя операцию 3 раза и находя среднее значение.

Статистический анализ полученных результатов проводили по методу Плохинского Н.А. (1978) с использованием программы Microsoft Excel 2008.

## 2. Отработка и адаптация спектрофотометрического метода определения концентрации гликогена в гельминтах на культуре нематоды *C. elegans*

Выбор *C. elegans* в качестве модели для отработки спектрофотометрического метода определения гликогена в гельминтах обусловлен относительной простотой культивирования в лабораторных условиях, низкими затратами на обслуживание, возможностью получения в короткие сроки достаточного объема биомассы и безопасностью работы с данной культурой. Результаты определения содержания гликогена представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты определения содержания гликогена в исследуемых пробах *C. elegans*

№ пробы	Количество нематод в пробе, экз.	Показатель оптической плотности, ед.	Содержание гликогена в пробе, мг	Содержание гликогена в одной нематоде, нг	Среднее содержание гликогена в одной нематоде, нг
1	67520±2120	0,161	0,124	1,834	1,821±0,004
2	75680±3650	0,179	0,138	1,819	
3	84120±4060	0,198	0,152	1,811	

## 3. Изучение влияния хлорида аммония на оптическую плотность анализируемых растворов при различных температурах

Для стандартизации спектрофотометрического метода определения содержания гликогена были проведены исследования по оценке влияния температуры в интервале 10-30°C на результаты анализа. В литературных источниках имеются сведения о влиянии хлорида кальция на оптическую плотность растворов при изменении температуры на 10°C

(C.R. Krisman, 1962), в то же время влияние температур на растворимость хлорида аммония в рамках спектрофотометрического определения содержания гликогена ранее практически не изучено. Установлено, что наибольшие отклонения от заданной концентрации, составляющей 0,1 мг в пробе, происходят при температуре 25-30°C (табл. 2).

Таблица 2 – Результаты измерения оптической плотности и расчета содержания гликогена в анализируемых растворах с известным содержанием гликогена (0,1 мг)

Хлорид аммония	Температура, °С				
	10	15	20	25	30
Оптическая плотность, ед.					
-	0,235	0,216	0,208	0,189	0,182
+	0,230	0,233	0,240	0,251	0,262
Содержание гликогена, мг					
-	0,102	0,094	0,090	0,082	0,079
+	0,100	0,101	0,104	0,109	0,114

Полученные сведения о влиянии температуры на оптическую плотность растворов без хлорида аммония оказались схожи с результатами Krisman C.R. (1962), сообщающей об отклонении оптической плотности на 11% в интервале 10°C. В присутствии хлорида аммония отклонение оптической плотности находилось в пределах 4-8,5% при изменении температуры на 10°C в исследованном интервале (табл. 3).

Данные свидетельствуют о том, что проведение исследований в широких диапазонах температур может привести к искажению результатов при определении концентрации гликогена спектрофотометрическим методом. В таком случае возникает необходимость стабилизации температурного режима при анализе проб. Исключение термостатирования допустимо при проведении исследований в диапазоне 10-20°C.

Таблица 3 – Отклонение показателя оптической плотности анализируемых растворов в зависимости от интервала температур, выраженное в %

Хлорид аммония	Температурный интервал, °С			Среднее значение
	10-20	15-25	20-30	
-	11,3	12,5	12,5	12,1
+	4,0	7,0	8,5	6,5

#### 4. Определение необходимого количества биомассы трихинелл в границах чувствительности спектрофотометрического метода

Необходимое для экспериментов количество биомассы трихинелл в границах чувствительности спектрофотометрического метода определяли на примере личинок нематоды *T. nativa*, выделенных от трех экспериментально инвазированных крыс. Опыт проводили в трех повторах. Фиксируемое изменение окраски анализируемых растворов было выявлено только в пробах с содержанием личинок трихинелл на уровне 1050±50 и 10100±150 экземпляров (табл. 4).

Таблица 4 – Содержание гликогена в личинках нематоды *T. nativa*

№ опыта, п/п	Количество личинок в пробе, экз.	Среднее значение оптической плотности, ед.	Содержание гликогена в пробе, мг	Содержание гликогена в одной личинке, нг
1	1	0	-	-
2	10±1	0	-	-
3	100±2	0	-	-
4	1050±50	0,060±0,002	0,046±0,001	46,4±1,4
5	10100±150	0,598±0,016	0,460±0,009	46,0±0,9



## 5. Динамика изменения концентрации гликогена в личинках *T. spiralis* на мышечной стадии развития

Концентрацию гликогена в личинках трихинелл определяли, начиная с 14 суток после инвазии лабораторных животных и заканчивая 20-месячным возрастом личинок. Лабораторных крыс в количестве 69 голов заражали личинками *T. spiralis* и подвергали эвтаназии (по 3 крысы) в определенные сроки после заражения. После выделения личинок трихинелл устанавливали их жизнеспособность. Для личинок 14- и 21-суточного возраста определяли инвазионность, в каждом опыте использовали по 3 мыши.

Установлено, что на 14 сутки после заражения лабораторных крыс в мышечных личинках трихинелл отмечается низкий уровень гликогена, равный  $2,8 \pm 1,2$  нг. На 21 сутки гликоген в личинках регистрируется в количестве  $5,4 \pm 2,7$  нг, на 28 сутки –  $13,6 \pm 2,4$  нг, на 45 сутки –  $77,1 \pm 2,5$  нг, а максимальной концентрации гликоген достигает в 4 месяца –  $93,0 \pm 2,9$  нг. Затем содержание гликогена начинает медленно снижаться:  $91,6 \pm 3,1$  нг в 6,5 месяцев,  $87,4 \pm 2,8$  нг в 8 месяцев,  $84,4 \pm 2,7$  нг в 11 месяцев,  $82,9 \pm 2,8$  в 12 месяцев и  $78,6 \pm 2,3$  нг в 20 месяцев (рис. 1).

Личинки 14-тисуточного возраста подвижны, но не инвазионны. Начиная с 21 суток после заражения они становятся инвазионными. Отмечено, что с 11 месяца после инвазии в мышечной ткани образуются соли кальция на полюсах капсулы. Жизнеспособность личинок после переваривания в искусственном желудочном соке к 20 месяцам снижается на 5%, что, вероятно, связано с процессом обызвествления капсулы.

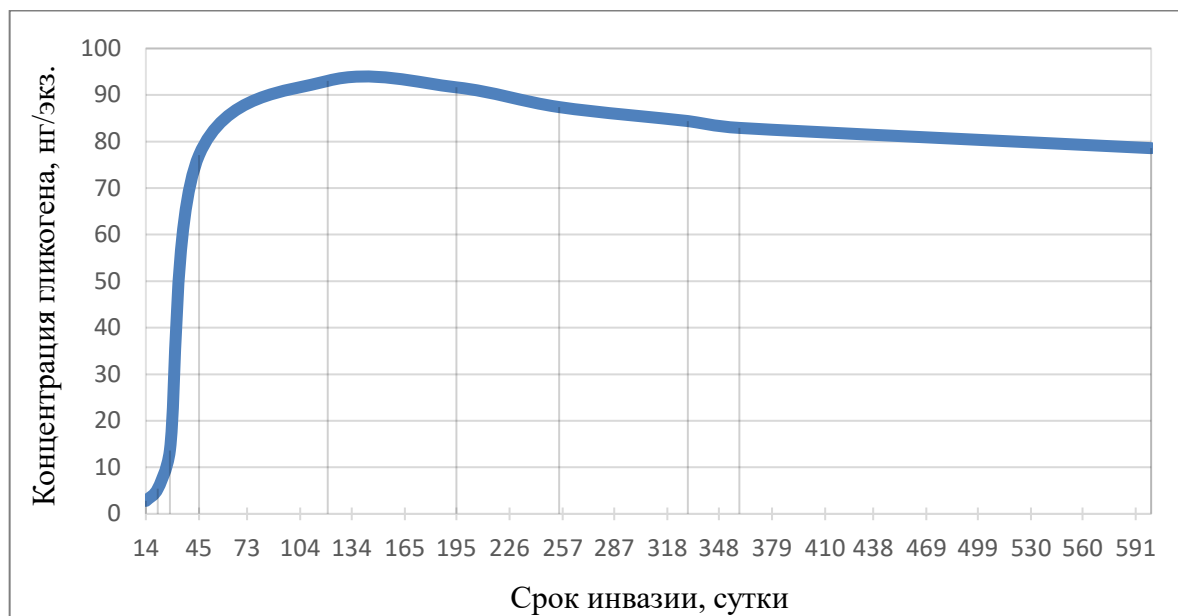


Рисунок 1 – Содержание гликогена в мышечных личинках трихинелл в зависимости от срока инвазии

## 6. Содержание гликогена в трихинеллах в течение первых суток после заражения лабораторных животных

Изучено содержание гликогена в *T. spiralis*, выделенных из тонкого кишечника спустя 3, 6 и 24 ч после заражения крыс. Животных не кормили в течение суток до и после инвазии. По результатам эксперимента концентрация гликогена в личинках трихинелл, используемых для заражения крыс, составила  $90 \pm 1,8$  нг. Через 3 ч после заражения уровень гликогена в трихинеллах понизился до  $47,2 \pm 0,3$  нг. Спустя 6 ч содержание данного вещества достигло значения  $27,2 \pm 0,2$  нг. Через сутки гликоген не детектировался (рис. 2).

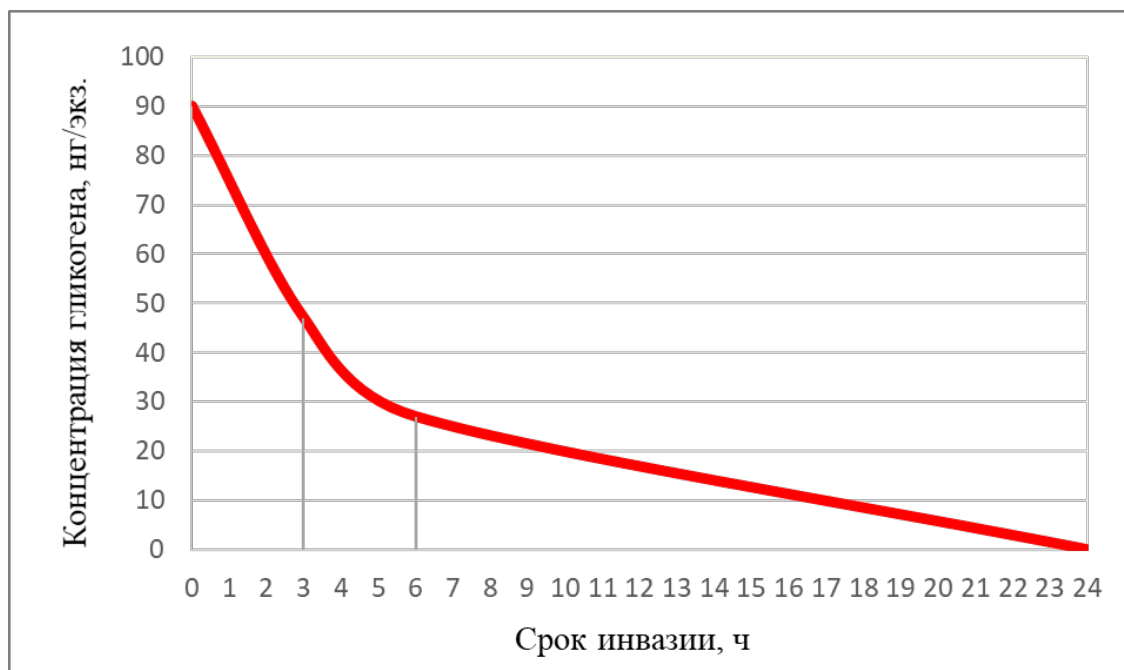


Рисунок 2 – Содержание гликогена в трихинеллах в течение 24 ч после заражения

Быстрое расходование запасенного на мышечной стадии развития гликогена у трихинелл в кишечнике крыс свидетельствует о высокой интенсивности потребления глюкозы для энергетических и пластических потребностей и недостаточном поступлении экзогенных питательных веществ. В первые часы в кишечнике хозяина трихинеллы, из-за низкой проницаемости кутикулы и ограниченного доступа питательных веществ, находятся в сильной зависимости от содержания данного вещества, запасенного на предыдущей стадии развития.

#### 7. Динамика содержания гликогена, жизнеспособность и инвазионность личинок трихинелл *T. nativa* и *T. pseudospiralis* в естественных условиях в зимне-весенний период в Центральном регионе России

Для проведения исследования лабораторных крыс в количестве 27 голов инвазировали личинками *T. nativa* (15 крыс) и *T. pseudospiralis* (12 крыс). По 3 крысы из каждой группы служили контролем (К). Через 9 месяцев после заражения (в декабре) животных подвергали эвтаназии. Контрольные группы исследовали на жизнеспособность личинок трихинелл и концентрацию в них гликогена. Цельные тушки опытных крыс, изолированных друг от друга, закладывали в пластиковые контейнеры под снежный покров на территории охотничьего хозяйства Рязанской области. Во время проведения исследования температурный режим окружающей среды находился в пределах от  $-8,4^{\circ}\text{C}$  в январе до  $+11,5^{\circ}\text{C}$  в мае. Под снежным покровом, где хранились тушки экспериментально зараженных животных, температура была постоянной и составляла  $3-4^{\circ}\text{C}$ . Ежемесячно, с января по май, из места хранения извлекали по 3 тушки животных из обеих опытных групп, выделяли трихинелл, определяли их жизнеспособность и содержание гликогена. Инвазионность личинок трихинелл определяли в последний месяц исследований, в каждом опыте использовали по 3 животных.

Исследование проб мышечных личинок *T. nativa* проводили с января по апрель включительно. На протяжении данного отрезка времени жизнеспособность личинок гельминтов сохранялась на высоком уровне: 99,5-100% (табл. 5). Однако по результатам биопробы зараженным оказалось одно животное из трех.

В период с февраля по май была исследована жизнеспособность мышечных личинок *T. pseudospiralis*. В течение первых 3 месяцев данный показатель сохранялся в пределах 99,3-100%, в апреле опустился до 85,7%. В мае жизнеспособность личинок

*T. pseudospiralis* значительно снизилась и достигла значения 54,7% (табл. 6). Личинки оказались неинвазионными в последний месяц исследований.

Таблица 5 – Жизнеспособность и инвазионность мышечных личинок *T. nativa* в тушках лабораторных крыс

Показатели в пробе	Период наблюдения, сутки			
	декабрь (К)	январь (1)	февраль (2)	апрель (3) *
Всего, экз.	189±8	163±10	193±5	191±7
Жизнеспособных, экз.	189±8	163±10	192±4	190±6
Жизнеспособных, %	100	100	99,5±0,5	99,5±0,5
Примечание: * - инвазионность 33%				

Таблица 6 – Жизнеспособность и инвазионность мышечных личинок *T. pseudospiralis* в тушках белых крыс

Показатели в пробе	Период наблюдения, сутки				
	декабрь (К)	февраль (1)	март (2)	апрель (3)	май (4) *
Всего, экз.	186±7	179±9	203±10	172±8	49±5
Жизнеспособных, экз.	186±7	178±9	202±10	147±4	27±5
Жизнеспособных, %	100	99,3±0,4	99,3±0,4	85,7±1,6	54,7±5,8
Примечание: * - инвазионность 0%					

Подсчет личинок трихинелл перед определением в них содержания гликогена для упрощения и удобства осуществлялся в каплях. Результаты эксперимента представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Результаты определения содержания гликогена в личинках трихинелл

№ опыта, п/п	Среднее количество личинок в капле, экз.	Количество капель в одной пробе, ед.		Среднее содержание гликогена в одной личинке, нг
<i>Личинки трихинелл вида T. nativa</i>				
К	6930±380	1		45,7±3,1
1	6520±400	1		41,3±1,4
2	7733±190	1		32,7±0,8
3	7653±260	1	2	14,8±1,0
<i>Личинки трихинелл вида T. pseudospiralis</i>				
К	7528±380	1		32,7±0,6
1	7160±370	1		20,3±0,3
2	8120±410	1		11,5±0,2
3	6920±330	1	2	3,2±0,3
4	1973±210	8		2,3±0,3

В последние два месяца эксперимента содержание гликогена в личинках *T. pseudospiralis* отличалось мало. Учитывая, что численность нежизнеспособных личинок *T. pseudospiralis* в этот период значительно увеличилась, можно предположить, что запасы гликогена приблизились к минимальному уровню, способному обеспечить жизнеспособность исследуемых организмов, или же условия их среды обитания стали настолько агрессивными, что нарушилось функционирование системы поддержания жизнеспособности трихинелл, что также отразилось на уровне инвазионности.

Из анализа данных следует, что динамика содержания гликогена в личинках *T. nativa* и *T. pseudospiralis* во время хранения биологического материала в естественных условиях в зимне-весенний период сопоставима между собой и характеризуется различием в содержании изучаемого полисахарида, составляющем около 12,0 нг/экз., что продемонстрировано на рисунке 3.

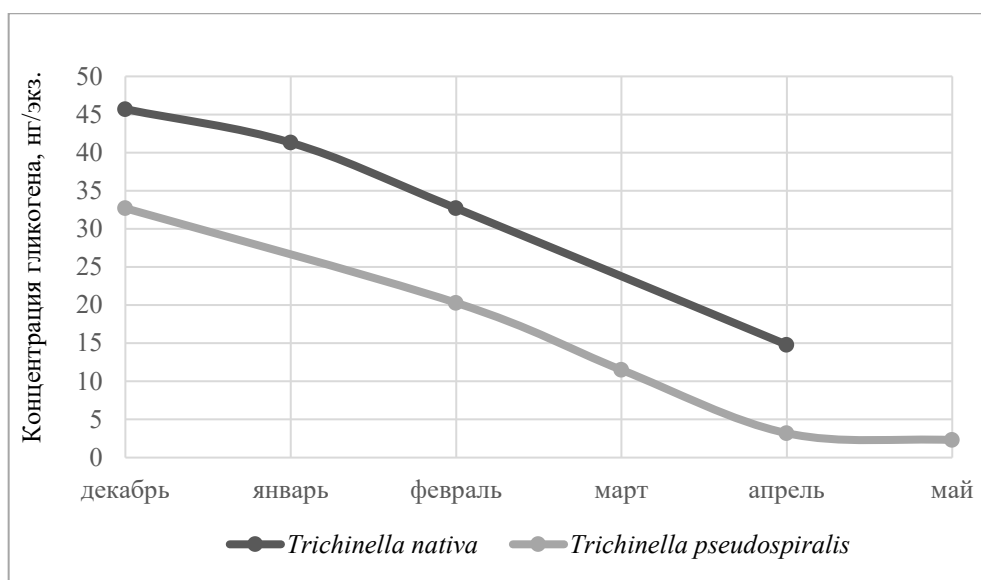


Рисунок 3 – Динамика содержания гликогена в мышечных личинках трихинелл при хранении биологического материала в естественных условиях (зима-весна)

#### 8. Динамика содержания гликогена, инвазионности и жизнеспособности адолескариев *F. hepatica* при различных температурах

В настоящем исследовании определяли динамику содержания гликогена, жизнеспособность и инвазионность культуры адолескариев *F. hepatica* в процессе хранения при  $-2\pm 2^\circ\text{C}$ ,  $6\pm 2^\circ\text{C}$  и  $38\pm 2^\circ\text{C}$ . Для постановки биопробы использовали 42 монгольские песчанки (в каждом опыте по 3 животных). При отсутствии жизнеспособных адолескариев в опытном образце дальнейшие исследования не проводили.

Содержание гликогена в адолескариях *F. hepatica* в начале эксперимента (жизнеспособность 100%) составляло в среднем  $0,120\pm 0,002$  мг/экз. В процессе хранения опытного материала уровень гликогена и показатели жизнеспособности и инвазионности личинок снижались с зависимой от температуры скоростью (табл. 8).

Таблица 8 – Биологические свойства и содержание гликогена в адолескариях *F. hepatica*

Время хранения	Биологические свойства			Среднее количество адолескариев в пробе, экз.	Содержание гликогена, мг/экз.
	Жизнеспособность, %	Инвазионность			
		14 суток после инвазии	90 суток после инвазии		
$-2\pm 2^\circ\text{C}$					
48 сут.	92,5±3,2	+++	+++	1100±50	0,112±0,002
72 сут.	87,2±5,0	++-	++-	1200±50	0,092±0,004
$6\pm 2^\circ\text{C}$					
1 мес.	93,2±1,8	+++	+++	1050±250	0,115±0,001
7 мес.	71,8±3,5	+++	+++	680±130	0,103±0,002
13 мес.	6,5±1,6	+++	+-	840±40	0,061±0,002
$38\pm 2^\circ\text{C}$					
1 сут.	91,5±2,4	+++	+++	1000±20	0,109±0,003
2 сут.	13,2±4,3	+++	+-	1100±50	0,081±0,003
Примечание: «+» – положительная биопроба, «-» – отрицательная биопроба					

Наиболее благоприятными для сохранения адолескариев явились температуры  $-2\pm 2^\circ\text{C}$  и  $6\pm 2^\circ\text{C}$ : личинки оставались жизнеспособными и инвазионными в течение нескольких месяцев. Адолескарии полностью утратили двигательную активность при

отрицательных температурах на 3-й месяц эксперимента, при положительных – на 15-й месяц. Под действием температуры  $38\pm 2^\circ\text{C}$  показатели жизнеспособности, инвазионности и концентрация гликогена значительно снизились уже на 2-е сутки хранения, на третьи сутки подвижных особей не выявлено.

### 9. Обработка спектрофотометрического метода определения концентрации гликогена в фасциолах. Сравнение содержания гликогена в свежесодержанном и подвергнутом недолговременной заморозке материале

Целью данного исследования являлась обработка методики определения гликогена в трематодах *F. hepatica* и изучение вопроса о влиянии недолговременного замораживания биоматериала на детектирование изучаемого полисахарида в пробах. Содержание гликогена определяли в первой группе (n=5) непосредственно сразу после выделения фасциол, во второй (n=5) – после 3 суток хранения в морозильной камере при  $-20^\circ\text{C}$  и последующем оттаивании.

Среднее содержание гликогена в первой группе составило  $0,0438\pm 0,0012$  мг/мг, во второй –  $0,0431\pm 0,0015$  мг/мг. Достоверных различий между выборками не выявлено ( $p>0,05$ ), что позволяет прийти к выводу о возможности недолговременного замораживания образцов для исследований.

### 10. Определение содержания гликогена в трематодах *F. hepatica* на преимагинальной стадии развития после однократного введения крысам антигельминтиков из группы бензимидазолов

Возможность применения предлагаемого нами метода в области химиотерапии изучали на примере сравнения действия антигельминтиков, альбендазола и триклабендазола, на преимагинальных фасциол. Всего в эксперименте использовали 20 крыс, которые были распределены на контрольную (2 животных) и три опытные (по 6 животных в каждой) группы. Терапевтические препараты задавали в дозах, рекомендуемых производителями для неполовозрелых фасциол. На 40-ые сутки после заражения первой опытной группе перорально вводили супрамолекулярный комплекс триклабендазола (ТКБ) с поливинилпирролидоном (ПВП) в дозе по действующему веществу 1 мг/кг, второй группе – ТКБ в дозе 5 мг/кг, третьей – альбендазол (АБ) в дозе 15 мг/кг. Животные из контрольной группы препаратов не получали. Через сутки, двое и трое суток по 2 животных из каждой группы подвергали эвтаназии и выделяли фасциол.

В контрольной группе гликоген содержался в количестве  $0,041\pm 0,002$  мг/мг фасциолы. Результаты представлены в табл. 9.

Таблица 9 – Содержание гликогена в преимагинальных *F. hepatica* (мг/мг) после лечения крыс антигельминтиками

Время после терапии, сутки	ТКБ	ТКБ+ПВП	АБ
1	<b><math>0,027\pm 0,002^*</math></b>	<b><math>0,025\pm 0,002^*</math></b>	$0,032\pm 0,005$
2	$0,032\pm 0,007$	$0,033\pm 0,006$	$0,038\pm 0,006$
3	$0,039\pm 0,006$	$0,038\pm 0,007$	$0,042\pm 0,004$
Примечание: * – Снижение концентрации гликогена в группе статистически значимо по сравнению с контролем ( $P<0,05$ ).			

Концентрация гликогена в преимагинальных фасциолах после терапии снижается (или имеет тенденцию к снижению для АБ) в течение первых суток. В последующие сроки наблюдается постепенное восстановление резервов исследуемого полисахарида до исходного уровня. В отличие от препаратов с ТКБ, достоверного влияния АБ на содержание гликогена в преимагинальных фасциолах не выявлено.

## 11. Определение содержания гликогена в имагинальных фасциолах после многократного введения крысам препаратов, производных бензимидазолов

Для изучения влияния антигельминтиков группы бензимидазолов на содержание гликогена в имагинальных фасциолах использовали схему терапии, направленную на более длительное сохранение метаболитов действующих веществ лекарственных препаратов в организме крыс. Всего использовали 30 крыс, которые были распределены на контрольную (6 животных) и две опытные (по 12 животных в каждой) группы. Через 8 месяцев после заражения крысам задавали терапевтические препараты в дозах, рекомендуемых производителями для половозрелых фасциол. Животным первой опытной группы вводили АБ в дозе по действующему веществу 15 мг/кг, а второй – супрамолекулярный комплекс ТКБ с ПВП в дозе по действующему веществу 2 мг/кг. Терапию зараженных крыс проводили в заданные промежутки времени по следующей схеме: 0 ч, 6 ч, 24 ч, 30 ч, 48 ч. Животные контрольной группы антигельминтных препаратов не получали. Опытных крыс подвергали эвтаназии (по 2 животных) через 6, 24, 30, 48, 54 и 240 ч после первого получения препарата. Контрольных крыс (так же по 2 животных) подвергали эвтаназии на 0 ч, 48 ч и 240 ч от начала эксперимента.

Начальное содержание гликогена в фасциолах составило  $0,045 \pm 0,001$  мг/мг. Через 6 ч после введения препаратов крысам уровень гликогена в гельминтах опустился до  $0,033 \pm 0,004$  мг/мг (ТКБ) и до  $0,038 \pm 0,003$  мг/мг (АБ), через 24 ч – до  $0,022 \pm 0,005$  мг/мг и  $0,027 \pm 0,005$  мг/мг, соответственно. На 30 ч эксперимента значение исследуемого полисахарида несколько повысилось и составило  $0,027 \pm 0,005$  мг/мг (ТКБ) и  $0,032 \pm 0,006$  мг/мг (АБ), а затем, на вторые сутки после терапии, достигло минимального отмеченного значения:  $0,019 \pm 0,003$  мг/мг (ТКБ) и  $0,021 \pm 0,004$  мг/мг (АБ). На 54 ч опыта концентрация гликогена увеличилась до  $0,022 \pm 0,004$  мг/мг (ТКБ) и до  $0,027 \pm 0,002$  мг/мг (АБ), на 10-е сутки до  $0,038 \pm 0,006$  мг/мг и  $0,042 \pm 0,006$  мг/мг, соответственно (рис. 4). Снижение уровня гликогена в фасциолах после терапии крыс является достоверным ( $P < 0,05$ ), в то время как значимых отличий между двумя группами, получавшими разные антигельминтики, обнаружено не было ( $P > 0,05$ ).

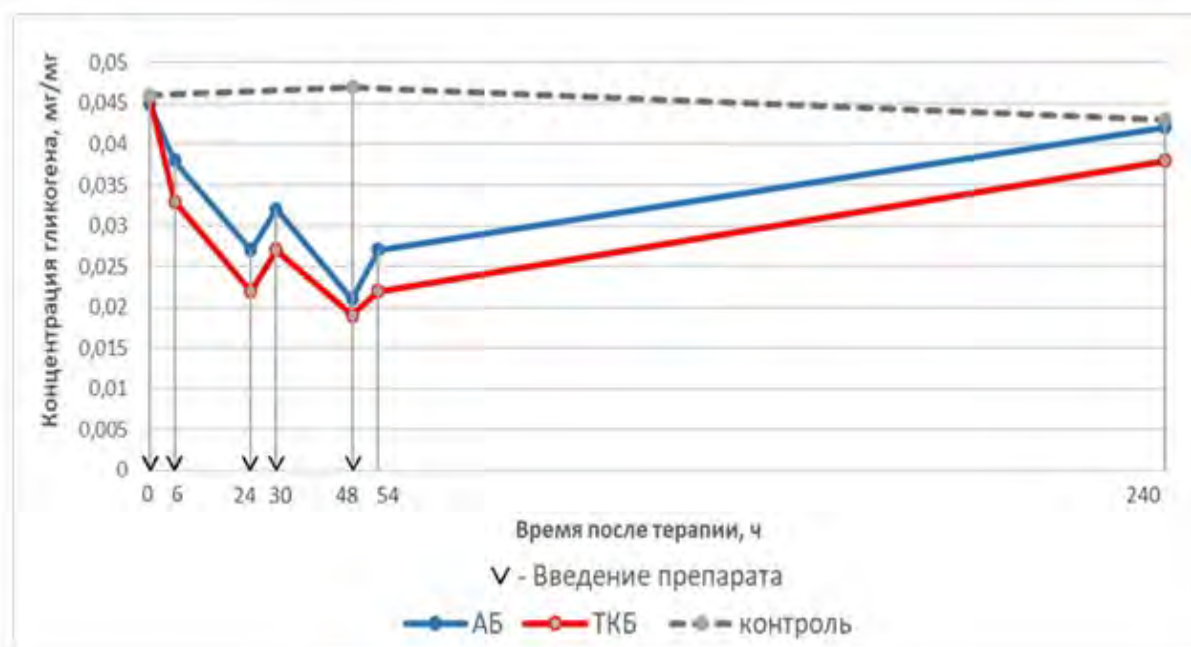


Рисунок 4 – Содержание гликогена (мг/мг) в имагинальных *F. hepatica* после лечения крыс антигельминтиками

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Усовершенствована спектрофотометрическая методика количественного определения гликогена в гельминтах, позволяющая специфично определять содержание данного полисахарида в динамике. Оптимизирован процесс пробоподготовки, определено минимальное необходимое количество биоматериала для детектирования искомого вещества в пробах (для изучаемых объектов) и температурные условия проведения анализа.

2. Установлена зависимость инвазионности и жизнеспособности трихинелл от содержания гликогена. На примере *T. pseudospiralis* показано, что при низком уровне гликогена ( $2,3 \pm 0,3$  нг/экз.) жизнеспособные личинки утрачивают инвазионные свойства.

3. Расходование резервного энергетического субстрата личинками двух видов трихинелл, капсулообразующего (*T. nativa*) и бескапсульного (*T. pseudospiralis*), характеризуется схожей динамикой в естественных условиях зимне-весеннего периода в Центральном регионе, при этом абсолютное содержание гликогена в них различается на 12 нг/экз.

4. Установлена корреляционная зависимость ( $r=0,91$ ) между содержанием гликогена и показателем жизнеспособности адолескариев фасциолы под действием различных температур.

5. Динамика содержания гликогена в фасциолах после терапии препаратами, производными бензимидазолов, отражает степень влияния антигельминтиков на паразита на уровне метаболизма и характеризует реактивность фасциол. Подтверждена низкая эффективность альбендазола против преимагинальных фасциол по сравнению с триклабендазолом и высокая оценка эффективности супрамолекулярного комплекса триклабендазола с поливинилпирролидоном.

6. Концентрация гликогена в фасциолах после терапии инвазированных крыс изменяется в соответствии с уровнем метаболитов действующих веществ в организме хозяина. Повторный прием антигельминтиков обеспечил более существенное воздействие на углеводный и энергетический метаболизм фасциол, что выразилось в наиболее низком по сравнению с контролем ( $0,045 \pm 0,001$  мг/мг) содержании гликогена, составляющем  $0,019 \pm 0,003$  мг/мг после терапии триклабендазолом и  $0,021 \pm 0,004$  мг/мг – альбендазолом.

7. Определение концентрации гликогена в гельминтах позволяет повысить информативность оценки эффективности действия антигельминтных препаратов и может служить дополнительным критерием при разработке средств и методов терапии инвазий.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Предлагаемый в настоящей работе спектрофотометрический метод определения содержания гликогена в гельминтах может быть использован как в научных, так и в прикладных целях.

С его помощью можно существенным образом дополнить имеющиеся знания об энергетическом метаболизме у гельминтов, обеспечивающем их жизнедеятельность и выживание в процессе реализации биологического цикла и при воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды за счет энергетического резервного субстрата – гликогена.

Метод может быть применим в области изучения биологических основ профилактики гельминтозоонозов животных и человека. В частности, данные, полученные при изучении содержания гликогена в личинках трихинелл, выделенных из тушек экспериментально инвазированных крыс, хранившихся в зимне-весенний период в естественных условиях Центрального региона России, могут быть использованы при разработке профилактических мероприятий при трихинеллезе.

Описанный метод перспективен для тестирования средств и методов обезвреживания инвазионного материала, поскольку анализируемый полисахарид может рассматриваться в качестве дополнительного критерия при оценке инвазионности. Особенно интересным в данном отношении является тот факт, что при недостаточном уровне гликогена, даже оставаясь при этом жизнеспособным, возбудитель может утрачивать инвазионные свойства, что показано нами на примере трихинелл.

Показана возможность применения метода в области терапии, при изучении действия антигельминтных препаратов. На примере фасциол продемонстрировано, что гликоген является достаточно чувствительным индикатором влияния химиопрепаратов на метаболизм гельминтов. Определение содержания гликогена спектрофотометрическим методом позволяет повысить информативность оценки эффективности действия антигельминтиков на гельминтов, раскрыть некоторые аспекты механизма действия химиопрепаратов и использоваться для разработки новых и совершенствования старых схем терапии.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК

1. **Сидор, Е.А.** Чувствительность методики определения содержания гликогена в личинках трихинелл / Е.А. Сидор, О.Н. Андреянов // Ветеринарная патология. – 2019. – №. 4. – С. 10-15.
2. Андреянов, О.Н. Биологические показатели возбудителя трихинеллеза искусственно замороженного инвазионного материала / О.Н. Андреянов, А.В. Успенский, **Е.А. Сидор**, О.Г. Тимофеева // Ветеринария. – 2019. – №. 11. – С. 38-40.
3. **Сидор, Е.А.** Влияние антигельминтиков группы бензимидазолов на содержание гликогена в преимагинальных трематодах *Fasciola hepatica* / Е.А. Сидор, С.С. Халиков, И.А. Архипов, М.Б. Мусаев // Ветеринарная патология. – 2020. – №. 4. – С. 17-22.

### Статьи в рецензируемых научных изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования (SCOPUS, WoS)

4. **Sidor, E.A.** The Role of Glycogen in Biological Cycle of *Trichinella spiralis* / E.A. Sidor, O.N. Andreyanov // World Veterinary Journal. – 2020. – V. 10. – №. 4. – P. 30-34.
5. Rudneva, O.V. The retention and concentration of glycogen in *Trichinella nativa* in the winter-spring period / O.V. Rudneva, O.N. Andreyanov, **E.A. Sidor** // Veterinary Parasitology. – 2020. – V. 288. – P. 109303.
6. **Sidor, E.A.** Effect of benzimidazole drugs on glycogen levels of mature *Fasciola hepatica* / E.A. Sidor, O.N. Andreyanov // Journal of Veterinary Parasitology. – 2021. – V. 35. – №. 1. – P. 30-35.
7. Andreyanov, O.N. The effect of ambient temperature on biological properties and energy metabolism of *Fasciola hepatica* metacercariae / O.N. Andreyanov, A.N. Postevoy, **E.A. Sidor** // Veterinary Parasitology. – 2021. – V. 299. – P. 109576.

### Основные работы, опубликованные в других изданиях

8. **Сидор, Е.А.** Роль гликогена в биологическом цикле развития возбудителей трихинеллеза / Е.А. Сидор // Молодой ученый. – 2019. – № 8 (246). – С. 50-54.
9. **Сидор, Е.А.** Влияние положительных температур на содержание гликогена в личинках трихинелл / Е.А. Сидор, О.Н. Андреянов // Материалы докладов научной конференции «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями». – Москва. – 2019 г. – В. 20. – С. 585-588.



10. Rudneva, O.V. Changes in the level of glycogen and the invasive ability of the *Trichinella nativa* larvae stored in natural conditions / O.V. Rudneva, O.N. Andreyanov, **E.A. Sidor** // Scientia Parasitologica. – Volum 20, Special issue: Abstract Book 15th International Conference on Trichinellosis, 26-30 August, 2019. – Cluj-Napoca, Romania. – pp. 35-36.

11. **Сидор, Е.А.** Спектрофотометрический метод для оценки уровня содержания гликогена в модельной нематоде *Caenorhabditis elegans* / Е.А. Сидор, О.Н. Андреев // Материалы докладов научной конференции «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями». – Москва. – 2020 г. – В. 21. – С. 383-387.

12. **Сидор, Е.А.** Спектрофотометрический метод определения концентрации гликогена в гельминтах: влияние хлорида аммония в разном температурном диапазоне / Е.А. Сидор // Материалы докладов научной конференции «Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями». – Москва. – 2021. – В. 22. – С. 489-493.

### **Методические положения**

1. Методические положения оценки инвазионной способности личинок гельминтозоонозов по содержанию гликогена (протокол №3 от 25.10.2019 г.) / Андреев О.Н., **Сидор Е.А.**, Постевой А.Н., Успенский А.В. – М., 2019 г. – 32 с.

### **Патенты и свидетельства РФ на изобретения**

1. Способ определения количества гликогена в личинках трихинелл для контроля качества обезвреживания инвазионного материала. О.Н. Андреев, **Е.А. Сидор**, О.Г. Тимофеева / Патент на изобретение № 2681167 Рос. Федерация: МПК С12Q 1/06 G01N 33/48. Заявитель и патентообладатель ВНИИП - филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН. — № 2018106639; заявл. 22.02.2018; опубл. 04.03.2019, Бюл. № 7.