

ПАРАЗИТОЛОГИЯ / PARASITOLOGY

DOI: <https://doi.org/10.23670/IRJ.2022.123.20>

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА-СУПРЕССОРА *TP53* В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АСКАРИДОЗЕ НА РАЗЛИЧНЫХ СРОКАХ НАБЛЮДЕНИЯ ВО ВРЕМЯ ВОСПРОИЗВЕДЕНИЯ ОПУХОЛЕВОЙ МОДЕЛИ ГЛИОМЫ КРЫС C6 IN SITU

Научная статья

Побяржин В.В.^{1,*}

¹ ORCID : 0000-0002-3508-9995;

¹ Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, Витебск, Беларусь

* Корреспондирующий автор (tulovo22[at]rambler.ru)

Аннотация

В статье представлены результаты оригинальных исследований, посвященных изучению изменения экспрессии гена-супрессора *TP53* в тканях экспериментальных крыс при аскаридозе на различных сроках наблюдения во время воспроизведения опухолевой модели глиомы крыс C6 in situ.

В результате выявлено, что инвазия хозяина яйцами *Ascaris suum* во время роста глиомы приводит к росту экспрессии *TP53* в опухолевой ткани, легких, печени, головном мозге с достоверным отличием от серии «контроль с опухолью» и результатов здоровых животных на всех сроках развития паразита.

Выявленная индукция *Trp53* может быть направлена на задержку клеточного цикла для последующей репарации повреждений или естественную гибель клеток, препятствуя, таким образом, нарушению целостности генома и приобретению опухолевого фенотипа.

Ключевые слова: глиома, экспрессия, ген-супрессор *TP53*, крысы, *Ascaris suum*.

CHANGES IN TP53 SUPPRESSOR GENE EXPRESSION IN RAT TISSUES IN EXPERIMENTAL ASCARIASIS AT DIFFERENT OBSERVATION PERIODS DURING REPRODUCTION OF THE RAT GLIOMA C6 TUMOR MODEL IN SITU

Research article

Pobyarzhin V.V.^{1,*}

¹ ORCID : 0000-0002-3508-9995;

¹ Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

* Corresponding author (tulovo22[at]rambler.ru)

Abstract

This article presents the results of original research dedicated to the study of changes in *TP53* suppressor gene expression in tissues of experimental rats with ascariasis at different observation periods during reproduction of the rat glioma C6 tumor model in situ.

As a result, it was found that host invasion by *Ascaris suum* eggs during glioma growth leads to an increase in *TP53* expression in tumor tissue, lung, liver, brain with a significant difference from the "control with tumor" series and results of healthy animals at all periods of parasite development.

The identified induction of *TP53* may be aimed at delaying the cell cycle for subsequent damage repair or natural cell death, thus preventing the disruption of genome integrity and the acquisition of a tumorigenic phenotype.

Keywords: glioma, expression, *TP53* suppressor gene, rats, *Ascaris suum*.

Введение

Одним из важнейших генов-супрессоров, контролирующих перерождение нормальной клетки в опухолевую, является ген *TP53*. Его биологическая роль заключается в обеспечении стабильности генома и генетической однородности клеток в целостном организме. В ходе роста и деления нормальных клеток постоянно происходит накопление нарушений первичной структуры ДНК в результате естественного мутагенеза или ошибок в процессе ее удвоения (репликации ДНК). Специальная система для их устранения, включающая цепь репаративных белков, работает в определенных фазах клеточного цикла [1], [2].

Белок p53 является продуктом гена-супрессора опухоли *TP53* и экспрессируется во всех клетках организма. При отсутствии повреждений генетического аппарата белок p53 находится в неактивном состоянии, а при появлении повреждений ДНК активируется [3], [4].

Показано, что индукция *Trp53* вызывает задержку клеточного цикла с последующей репарацией повреждений или естественную гибель клеток, препятствуя, таким образом, нарушению целостности генома и приобретению опухолевого фенотипа. Именно поэтому ген *Trp53* часто называют «страж генома», «ангел-хранитель», «ген совести клетки», а мутантный ген – «падший ангел».

У клеток с дефектным или отсутствующим геном *Trp53* контрольный пункт G1/S фазы митоза неполноценен, в результате чего в популяции накапливаются клетки с множественными нарушениями структуры ДНК; возникает нестабильность генома. При этом появляются все новые клоны клеток. Их естественный отбор лежит в основе опухолевой прогрессии, клетки становятся все менее чувствительными к действию цитостатиков, все больше нарушается контактное взаимодействие клеток, возникает метастазирование.

Мутации этого гена могут быть сопряжены с агрессивным течением заболевания и устойчивостью опухолевых клеток к воздействию противоопухолевых лекарств и лучевой терапии. Появление мутантного *Trp53* в ткани опухоли обнаруживается уже на ранних стадиях болезни. Установлено также, что наиболее часто экспрессия мутантного *Trp53* наблюдается при серозной цистаденокарциноме (57,9%) и сравнительно реже отмечается при эндометриоидной (25,6%), муцинозной аденокарциноме (22 %). По данным многих авторов высокая экспрессия белка p53 коррелирует с низкой общей выживаемостью [5], [6], [7].

Агрессивные метаболиты, выступающие в роли проканцерогенов, могут быть физической, химической и биологической природы. Они способны прочно связываться с участками молекулы ДНК.

Аскарида человеческая – геогельминт, паразитирование которого и вызывает заболевание «аскаридоз». Аскаридоз выявляется у ¼ населения мира. Это заболевание распространено в большинстве стран среднего Востока, Африке, Северной Америке, Новой Зеландии, Австралии, Северной Европе, Индии, Турции. По оценкам ВОЗ аскаридами инвазировано более одного миллиарда человек.

Известно, что при паразитировании гельминта может развиться реакция гиперчувствительности немедленного типа, что проявляется токсико-аллергическими явлениями: кашлем, ринитом, отеком Квинке, крапивницей, кожным зудом, повышением уровня Ig E в крови.

Напряженность иммунного ответа организма хозяина изменяется в зависимости от стадии развития паразита. Это связано со сменой антигенного спектра и иммуногенных свойств гельминта, который претерпевает метаморфоз в течение биологического цикла. Наиболее выражен иммунный ответ в миграционную стадию. Одной из важных причин органных и системных поражений является образование иммунных комплексов, которые активируют систему комплемента и цитокины. Однако, несмотря на напряженность иммунного ответа хозяина, гельминты оказывают иммуносупрессивное действие, что способствует их адаптации и выживанию в организме. В итоге возникает иммунодефицитное состояние, способствующее снижению резистентности инвазированного организма к бактериальным, вирусным и другим инфекциям, что может приводить к их затяжному течению, развитию осложнений и формированию носительства.

Кроме того, в местах паразитирования гельминты наносят механическое повреждение, вызывая раздражение и воспалительные реакции. Их скопление может приводить к возникновению объемных образований, вызывающих сдавливание жизненно важных органов хозяина с соответствующей клинической картиной и тяжелыми последствиями.

Одним из значимых патогенетических механизмов развития заболевания является поглощение паразитами питательных веществ из полости кишечника: продуктов переваривания белков, липидов и углеводов, витаминов и микроэлементов.

Показано, что в клинической картине гельминтозов нередко преобладают вегетативные и неврологические симптомы. Вегетативные нарушения нервной системы проявляются в виде изменений дермографизма, повышенного слюноотделения, ночного недержания мочи.

Известны случаи отягощения аскаридозом различных инфекционных и неинфекционных заболеваний. Зафиксированы наблюдения о более тяжелом течении туберкулеза, дифтерии, атопического дерматита, бронхиальной астмы, развитие злокачественных новообразований [8], [9], [10], [11].

Таким образом, действие аскаридного аллергена, развитие неспецифического синдрома комплекса интоксикации, аллергизации, иммунодепрессии, дисбиоза кишечника создает благоприятный фон для возникновения соматической (в том числе опухолевой) патологии.

В связи с вышеизложенным исследованием по влиянию воздействий гельминтов класса нематод на процесс изменения экспрессии антионкогена *TP53* у млекопитающих позволит определить их роль в молекулярно-генетических механизмах канцерогенных процессов. Кроме того, фундаментальные исследования, направленные на изучение молекулярно-генетических аспектов экспрессии и репрессии антионкогенов, могут помочь в разработке более эффективных методов лечения со стратегией комплексной антиангиогенной терапии, включая ингибирование альтернативных проангиогенных путей совместно с антиинвазивными препаратами, препятствующими локальной инвазии и метастатическому распространению.

Целью настоящего исследования служило изучение и анализ изменения экспрессии гена-супрессора *TP53* в тканях экспериментальных крыс при аскаридозе на различных сроках наблюдения во время воспроизведения опухолевой модели глиомы крыс C6 *in situ*.

Методы и принципы исследования

Для достижения поставленной цели было воспроизведено 2 серии эксперимента. В качестве контроля (незараженные животные с глиомой) использовали 40 самок крыс линии *Wistar*, которых разделяли на 4 группы по 10 особей в каждой. Животным проводили подкожное введение опухолевых клеток крысиной глиомы C6 для воспроизведения опухоли по разработанному нами способу [12]. Самок крыс умерщвляли под воздействием эфирного наркоза на 14-е, 21-е, 28-е, 35-е сутки развития опухоли и проводили забор материала (опухоль) для определения экспрессии гена-супрессора *TP53* в сравнении с генами референсами - β -актином (*ACTB*) и *GAPDH*. Результаты использовали как «контроль с опухолью».

Во второй серии изучали воздействие гельминтов при воспроизведении экспериментальной глиомы *in situ*, в зависимости от срока развития аскарид в организме хозяина и дозы заражения, использовали 40 самок крыс линии *Wistar*. Животных разделяли на 4 группы по 10 особей в каждой. Самкам всех групп проводили введение опухолевых клеток крысиной глиомы C6 по разработанному способу подкожно. На 7-е сутки после введения опухолевых клеток, самок заражали в дозе 20 яиц *A. suum* на 1 грамм массы тела животного. На 7-е сутки, после заражения, а также на 14-е, 21-е, 28-е сутки крыс умерщвляли путем дислокации шейных позвонков под воздействием эфирного наркоза и проводили забор материала (опухоль, печень, легкие, головной мозг).

Анализ экспрессии проводился Real-Time PCR программой qbase+. Результат нормализованной экспрессии рассчитывали с учетом соотношения анализируемого антионкогена к референсным генам *ACTIN-β* (*ACTB*) и *GAPDH*.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10.0. Результаты в тексте отображали в виде средней и ДИ. Различия считали достоверными при уровне значимости менее 0,05 ($p < 0,05$).

Основные результаты

В группе животных первой серии «контроль с опухолью» выявлено, что в тканях опухоли экспрессия гена-супрессора *TP53* на 14-е сутки составила 0,34 относительных единицы (95% ДИ: 0,24-0,47), на 21-е - 0,26 (95% ДИ: 0,19-0,35), 28-е - 0,38 (95% ДИ: 0,32-0,46), а на 35-е сутки - 0,27 относительных единиц (95% ДИ: 0,20-0,38).

В свою очередь, уровень экспрессии *TP53* в лёгких составил к 14-м суткам 0,19 относительных единиц (95% ДИ: 0,13-0,30), к 21-м - 0,11 (95% ДИ: 0,045-0,26), к 28-м - 0,13 (95% ДИ: 0,051-0,34), к 35-м - 0,10 (95% ДИ: 0,037-0,27) относительных единиц.

В тканях печени экспрессия *TP53* к 14-м суткам находилась на уровне 0,16 (95% ДИ: 0,12-0,22), к 21-м - 0,18 (95% ДИ: 0,11-0,28), к 28-м - 0,18 (95% ДИ: 0,098-0,34), к 35-м - 0,22 (95% ДИ: 0,15-0,31) относительных единиц.

В биоптатах головного мозга экспрессия *TP53* на 14-е сутки составила 0,16 (95% ДИ: 0,12-0,21), на 21-е - 0,18 (95% ДИ: 0,12-0,25), 28-е сутки - 0,20 (95% ДИ: 0,12-0,33), на 35-е сутки - 0,21 (95% ДИ: 0,13-0,34) относительных единиц.

Экспрессия *TP53* в опухолевой ткани глиомы животных, зараженных в дозе 20 яиц аскарид на 1 г массы тела, к 7-м суткам развития паразита составила 0,45 относительных единиц (95% ДИ: 0,35-0,57), к 14-м суткам - 0,37 (95% ДИ: 0,29-0,47), к 21-м - 0,50 (95% ДИ: 0,44-0,57), а к 28-м - 0,39 (95% ДИ: 0,31-0,49) относительных единиц.

Выявлено достоверное отличие в сторону повышения при сравнении с неинвазированными животными с глиомой (1 серия) на всех этапах наблюдения ($p=0,0091-0,049$).

В биоптатах легких показатели *TP53* зафиксированы на следующих уровнях: 7-е сутки - 0,40 относительных единиц (95% ДИ: 0,19-0,57), 14-е сутки после заражения - 0,34 (95% ДИ: 0,049-0,41), 21-е сутки - 0,41 (95% ДИ: 0,058-0,62), 28-е сутки - 0,46 (95% ДИ: 0,053-0,54) относительных единиц.

Отмечалось повышение экспрессии исследуемого гена *TP53* на всех сроках развития гельминта по сравнению с первой серией ($p=0,0002-0,04$).

Экспрессия *TP53* в печени самок экспериментальных самок к 7-м суткам составила 0,33 относительных единицы (95% ДИ: 0,15-0,45), к 14-м - 0,42 (95% ДИ: 0,11-0,53), к 21-м - 0,40 (95% ДИ: 0,11-0,52), к 28-м - 0,30 (95% ДИ: 0,14-0,35) относительных единиц. Сравнение с данными группы неинвазированных животных с глиомой показало рост экспрессии на всех этапах ($p=0,0002-0,041$).

В свою очередь, выраженность экспрессии изучаемого антионкогена в головном мозге составила на 7-е сутки после инвазии - 0,33 (95% ДИ: 0,20-0,36), на 14-е сутки - 0,36 (95% ДИ: 0,13-0,41), на 21-е - 0,33 (95% ДИ: 0,12-0,37), 28-е сутки - 0,31 (95% ДИ: 0,14-0,33).

Анализ статистической значимости различий с уровнем экспрессии *TP53* в ткани мозга второй серии показал достоверное отличие от результатов животных «контроль с опухолью» ($p=0,0002-0,044$).

Заключение

Экспрессия *TP53* в опухолевой ткани глиомы, легких, печени, головного мозга животных достоверно возрастает при заражении в дозе 20 яиц *A. suum* на 1 г массы тела животного по сравнению с данными серии «контроль с опухолью» на всех сроках развития паразита. Рост экспрессии *TP53* говорит о том, что аскариды могут вызывать повреждение генетического аппарата клетки.

Белок p53 является продуктом гена-супрессора опухоли *TP53* и экспрессируется во всех клетках организма. При отсутствии повреждений генетического аппарата белок p53 находится в неактивном состоянии, а при появлении повреждений ДНК активируется. Белок p53 активирует транскрипцию гена *BAX* и аналогичных ему генов, которые ингибируют белки, оказывающие антиапоптотическое действие. Выявленная индукция *Trp53* направлена на задержку клеточного цикла для последующей репарации повреждений или естественную гибель клеток, препятствуя, таким образом, нарушению целостности генома и приобретению опухолевого фенотипа.

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Conflict of Interest

None declared.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы / References

1. Chien J. TP53 mutations, tetraploidy and homologous recombination repair defects in early stage high-grade serous ovarian cancer / J. Chien et al. // Nucleic. Acids. Res. – 2018. – Vol. 43. – № 14. – P. 6945–6958.
2. Rønneberg J.A. Methylation profiling with a panel of cancer related genes: Association with estrogen receptor, TP53 mutation status and expression subtypes in sporadic breast cancer / J.A. Rønneberg et al. // Mol. Oncol. – 2011. – Vol. 5. – № 1. – P. 61–76.

3. Xu Y. Short-term responders of non-small cell lung cancer patients to EGFR tyrosine kinase inhibitors display high prevalence of TP53 mutations and primary resistance mechanisms / Y. Xu et al. // *Transl. Oncol.* – 2018. – Vol. 11. – № 6. – P. 1364–1369.
4. Tirode F. Genomic landscape of ewing sarcoma defines an aggressive subtype with co-association of STAG2 and TP53 mutations / F. Tirode et al. // *Cancer Discov.* – 2014. – Vol. 4. – № 11. – P. 1342–1353.
5. Sánchez-Servín A. TP53 Polymorphisms allow for genetic sub-grouping of the canine transmissible venereal tumor / A. Sánchez-Servín et al. // *J. Vet. Sci.* – 2009. – Vol. 10. – № 4. – P. 353–355.
6. Wang H. Overexpression of centromere protein K (CENP-K) gene in hepatocellular carcinoma promote cell proliferation by activating AKT/TP53 signal pathway / H. Wang et al. // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8. – № 43. – P. 73994–74005.
7. Dastjerdi M.N. Association of TP53 gene codon 72 polymorphism with endometriosis risk in Isfahan / M.N. Dastjerdi, R. Aboutorabi, B.E. Farsani // *Iran J. Reprod. Med.* – 2013. – Vol. 11. – № 6. – P. 473–478.
8. Midha A. Reciprocal interactions between nematodes and their microbial environments / A. Midha, J. Schlosser, S. Hartmann // *Front Cell. Infect. Microbiol.* – 2017. – Vol. 7. – P. 144.
9. Leung A.K.C. Human Ascariasis: An Updated Review / A.K.C. Leung et al. // *Recent. Pat. Inflamm. Allergy Drug. Discov.* – 2020. – Vol. 14. – № 2. – P. 133–145.
10. Dold C. Ascaris and ascariasis / C. Dold, C.V. Holland // *Microbes Infect.* – 2011. – Vol. 13. – № 7. – P. 632–637.
11. Zang W. Interpretation of Diagnosis of Ascariasis (WS/565-2017) / W. Zang et al. // *Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi.* – 2019. – Vol. 31. – № 2. – P. 207–209.
12. Пашинская Е.С. Способ воспроизведения экспериментальной крысиной глиомы C6 insitu / Е.С. Пашинская, В.В. Побяржин // *Мед.-биол. проблемы жизнедеятельности.* – 2019. – № 2 (22). – С. 50–54.
13. Ding J. *Trichinella spiralis*: inflammation modulator / J. Ding et al. // *J. Helminthol.* – 2020. – Vol. 94. – e193.

Список литературы на английском языке / References in English

1. Chien J. TP53 mutations, tetraploidy and homologous recombination repair defects in early stage high-grade serous ovarian cancer / J. Chien et al. // *Nucleic. Acids. Res.* – 2018. – Vol. 43. – № 14. – P. 6945–6958.
2. Rønneberg J.A. Methylation profiling with a panel of cancer related genes: Association with estrogen receptor, TP53 mutation status and expression subtypes in sporadic breast cancer / J.A. Rønneberg et al. // *Mol. Oncol.* – 2011. – Vol. 5. – № 1. – P. 61–76.
3. Xu Y. Short-term responders of non-small cell lung cancer patients to EGFR tyrosine kinase inhibitors display high prevalence of TP53 mutations and primary resistance mechanisms / Y. Xu et al. // *Transl. Oncol.* – 2018. – Vol. 11. – № 6. – P. 1364–1369.
4. Tirode F. Genomic landscape of ewing sarcoma defines an aggressive subtype with co-association of STAG2 and TP53 mutations / F. Tirode et al. // *Cancer Discov.* – 2014. – Vol. 4. – № 11. – P. 1342–1353.
5. Sánchez-Servín A. TP53 Polymorphisms allow for genetic sub-grouping of the canine transmissible venereal tumor / A. Sánchez-Servín et al. // *J. Vet. Sci.* – 2009. – Vol. 10. – № 4. – P. 353–355.
6. Wang H. Overexpression of centromere protein K (CENP-K) gene in hepatocellular carcinoma promote cell proliferation by activating AKT/TP53 signal pathway / H. Wang et al. // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8. – № 43. – P. 73994–74005.
7. Dastjerdi M.N. Association of TP53 gene codon 72 polymorphism with endometriosis risk in Isfahan / M.N. Dastjerdi, R. Aboutorabi, B.E. Farsani // *Iran J. Reprod. Med.* – 2013. – Vol. 11. – № 6. – P. 473–478.
8. Midha A. Reciprocal interactions between nematodes and their microbial environments / A. Midha, J. Schlosser, S. Hartmann // *Front Cell. Infect. Microbiol.* – 2017. – Vol. 7. – P. 144.
9. Leung A.K.C. Human Ascariasis: An Updated Review / A.K.C. Leung et al. // *Recent. Pat. Inflamm. Allergy Drug. Discov.* – 2020. – Vol. 14. – № 2. – P. 133–145.
10. Dold C. Ascaris and ascariasis / C. Dold, C.V. Holland // *Microbes Infect.* – 2011. – Vol. 13. – № 7. – P. 632–637.
11. Zang W. Interpretation of Diagnosis of Ascariasis (WS/565-2017) / W. Zang et al. // *Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi.* – 2019. – Vol. 31. – № 2. – P. 207–209.
12. Pashinskaja E.S. Sposob vosproizvedeniya jeksperimental'noj krysinoj gliomy S6 insitu [Method of reproduction of experimental rat glioma C6 insitu] / E.S. Pashinskaja, V.V. Pobjzrhin // *Med.-biol. problemy zhiznedejatel'nosti* [Medical and biological life problems]. – 2019. – № 2 (22). – P. 50–54. [in Russian]
13. Ding J. *Trichinella spiralis*: inflammation modulator / J. Ding et al. // *J. Helminthol.* – 2020. – Vol. 94. – e193.