

Партанатоз

при вирус-ассоциированном раке печени и толстого кишечника

УДК 578.264:[616.36+616.34]-006.6

Аннотация. Рассмотрен биологический маркер партанатоза – Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), активация которого связана с патологическими процессами в организме. Исследованы образцы тканей опухолей у пациентов с морфологически верифицированным раком печени и раком толстого кишечника. Контролем выступали ткани данных органов, не пораженные опухолью, и аналогичные прижизненные биоптаты (нативная ткань) неонкологических больных. Оценка концентрации антител к PARP и определение ДНК/РНК вирусов (VEB, HBV, HCV, HPV, CMV, HSV1/2, HHV6) в указанных образцах проведены методами иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции. Результаты исследований показали, что концентрация антител к PARP в экстрактах ткани при опухолевых процессах выше, чем в нативных образцах ($p < 0,05$) и в ткани с отсутствием критериев злокачественности ($p < 0,05$). Зависимость между частотой выделения из тканей опухолей ДНК-содержащих вирусов (HHV6, CMV, VEB) и концентрацией антител к PARP ($p < 0,05$) позволяет утверждать о стимулировании повреждения ДНК клеток под действием вирусов при онкогенезе печени и толстого кишечника.

Ключевые слова: партанатоз, вирусы, рак печени, рак толстого кишечника.

Для цитирования: Кузнецов О., Цыркунов В. Партанатоз при вирус-ассоциированном раке печени и толстого кишечника // Наука и инновации. 2024. №5. С. 79–83.

<https://doi.org/10.29235/1818-9857-2024-05-79-83>



Олег Кузнецов,
директор Института биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси, кандидат биологических наук, доцент;
olegkuznetsov@inbox.ru



Владимир Цыркунов,
профессор кафедры инфекционных болезней Гродненского государственного медицинского университета, профессор;
tvm111@mail.ru

Гибель клетки происходит в результате случайного (ACD) или регулируемого (RCD) процесса. И если первый является биологически неконтролируемым, то второй включает в себя четко структурированные сигнальные каскады и молекулярно-эффекторные механизмы [1].

Партанатоз – вид клеточной гибели, который зависит от фермента PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase) и не поддается ингибированию анти-апоптотическими агентами, например IAPs (Inhibitors of apoptosis proteins) [2]. Инициация партанатоза связана с повреждением ДНК, одним из вариантов которого может быть активация NMDA (N-methyl-D-aspartate) рецептора, находящегося в непосредственном контакте с малоселективным катионным

каналом, который открывается при данном процессе. В связи с этим в цитозоле увеличивается концентрация ионов Na^+ и Ca^{++} , что приводит в действие нейрональную синтазу оксида азота (NO), участвующую в образовании пероксинитритов (ONOO⁻) [3].

Чрезмерный синтез ONOO⁻ способствует разрывам нитей ДНК и активизации фермента PARP, что ведет к 10–500-кратному увеличению аккумуляции поли-АДФ-рибозы (PAR), токсичной для митохондрий, а также исчезновению митохондриального потенциала и освобождению апоптоз-индуцирующего фактора (AIF) [4]. AIF, попадая в ядро, вызывает конденсацию хроматина и включение в работу эндонуклеаз (EndoG), участвующих во фрагментации ДНК и клеточной гибели [5]. Таким образом, партанатоз определен как вариант RCD, инициированный гиперактивацией PARP, реализуемой в виде энергетической катастрофы, связанной с повреждением ДНК, детектированной при гипоксии, оксидативном стрессе и воспалении [6–9].

Злокачественные новообразования проходят различные фазы активации путей клеточной гибели и адаптации, причем относительно более доминирующий тип гибели клеток на каждом этапе ответственен за различные патологические последствия – воспаление, фиброз и онкотрансформацию [10]. Установлено, что реактивные формы азота (RNS), такие как NO, выступают триггером активации PARP и причиной истощения в клетках никотинамид-аденин-динуклеотида (NAD) и АТФ (АТФ). RNS способствуют также накоплению поли-(АДФ-рибоза)-полимеров и поли-(АДФ-рибозилированных)-белков, вызывающих утрату мембранного потенциала митохондрий. Было показано, что фактор, ингибирующий миграцию

макрофагов (MIF), при различных заболеваниях печени способен связывать AIF и катализировать распад ДНК, стимулируя онкогенез [11].

Таким образом, представленные данные указывают на потенциальную роль PARP в канцерогенезе. Его сверхэкспрессия может не только дать опухолевым клеткам преимущество в выживании, но и лежать в основе инициации рака благодаря влиянию на сигнальные пути.

Цель работы – определение концентрации антител к PARP при раке печени и толстого кишечника, ассоциированном с различными вирусами.

Материалы и методы

Возраст обследуемых на момент постановки диагноза варьировал от 39 до 87 лет; медиана (Me) – $61,8 \pm 13,7$ лет, нижний квартиль (Q25) – 52 года, верхний (Q75) – 72. Наличие онкологического заболевания подтверждено морфологическими методами в патоморфологической лаборатории Гродненского областного клинического патологоанатомического бюро в соответствии с Международной гистологической классификацией [12].

Материалом для исследования были образцы тканей опухолей пациентов с раком толстого кишечника (РТК, $n=106$, 1-я группа: рак прямой кишки – 54/50,9%, сигмовидной кишки – 8/7,6%, поперечно-ободочной кишки – 7/6,6%, слепой кишки и печеночного изгиба ободочной кишки – 37/34,9%) и образцы тканей печени пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой (ГЦК, $n=43$, 3-я группа).

Дополнительно для сравнения результатов в образцах ткани кишечника лиц с РТК и тканей

Группа	n	PARP, нг/мл		p
		M	± m	
Группа 1 – РТК	106	5,605	2,57	$p_{1-5} = 0,0003$
Группа 2 – РТК <small>ткань, отсутствие злокачественности</small>	34	2,761	0,68	$p_{3-6} = 0,0002$
Группа 3 – ГЦК	43	6,488	1,53	$p_{1-2} = 0,03$
Группа 4 – ГЦК <small>ткань, отсутствие злокачественности</small>	34	3,211	0,89	$p_{3-4} = 0,04$
Группа 5 – НТ <small>кишечник</small>	31	1,493	0,45	
Группа 6 – НТ <small>печень</small>	31	1,806	0,97	

Таблица 1. Концентрация антител к PARP в образцах ткани пациентов с РТК, ГЦК и образцах НТ

Примечание: НТ – нативная ткань с отсутствием злокачественного процесса

печени пациентов с ГЦК проведено исследование на участке ткани с морфологически доказанным отсутствием критериев злокачественности – (группы 2 и 4, $n=34$ в каждой). В качестве контроля исследованы образцы нативной ткани (НТ) толстого кишечника ($n=31$, группа 5) и печени ($n=31$, группа 6) – не измененной, не модифицированной, сохранившей структуру, присущую живым тканям, с отсутствием злокачественного процесса, полученной во время оперативных вмешательств. Время установления диагноза «рак» – от 6 мес. до 13 лет. Среди обследуемых лиц с РТК и ГЦК было 63 женщины (42,3%) и 86 мужчин (57,7%). В контрольных группах ($n=62$) – 35 мужчин (56,5%) и 27 женщин (43,5%), средний возраст $56,5 \pm 8,3$ года.

Определение концентрации антител к PАРР осуществлялось методом иммуноферментного анализа в образцах тканей при помощи набора реагентов «Cloud-Clone Corp.» (США, производство «Wuhan Fine Biological Technology Co. Ltd», Китай) на иммуноферментном анализаторе «Mindray 96RA» (Китай). Вирусологические исследования проведены в соответствии с протоколом пробоподготовки образцов (набор реагентов «MagneSil Genomic, Fixed System», Promega, США). Детекция генома вируса Эпштейна – Барр (ВЭБ/VEB, HHV4), гепатита В (ВГВ/НВВ), гепатита С (ВГС/НСV), папилломы человека (ВПЧ/HPV), цитомегаловируса (ЦМВ/CMV), простого герпеса 1–2-го типа (ВПГ 1/2; HSV 1/2) и вируса герпеса 6-го типа (HHV6) выполнено в 476 гистологических образцах (срезах) тканей. Выделение ДНК/РНК (ПЦР) проводилось согласно инструкциям производителя («Applied Biosystems», США; «Amplisens», Россия) по заданному протоколу в автоматическом режиме на амплификаторе «RotorGene» (Германия), дополнительный контроль количественных и качественных характеристик ДНК/РНК – при помощи спектрофотометра «BioPhotometer Plus» («Eppendorf», Германия).

Результаты, полученные в ходе исследования, заносились в оригинальную базу данных. Их статистическая обработка проведена с использованием стандартного пакета прикладных программ SPSS. Различия между изучаемыми параметрами признавали достоверным при $p < 0,05$. Среди методов математической обработки использовали следующие: изучение вида распределения и получение числовых характеристик, включая расчет M , $\pm \sigma$, $Q75$, Q и M_e ; выявление отклика на воздействие в двухвыборочной задаче, включая t , тест Манна – Уитни (U); модели множественной линейной регрессии.

Вирусы	ДНК/РНК (абс./%)	Женский пол		Мужской пол	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
HSV 1/2	18/41,9	12	27,9	6	14,0
HHV6	10/23,2	1	2,3	9	20,9
CMV	6/13,9	2	4,6	4	9,3
HCV	4/9,3	1	2,3	3	7,0
HPV	2/4,7	0	0	2	4,7
HBV	2/4,7	1	2,33	1	2,33
VEB	1/2,3	1	2,3	0	0
Микст-персистенция	11/25,6*	4	9,3	7	16,3

Таблица 2. Встречаемость ДНК/РНК вирусов в образцах тканей опухоли при ГЦК, абс./%

Примечание: * – относительно всех образцов ткани при ГЦК

Вирусы	ДНК/РНК (абс./%)	Женский пол		Мужской пол	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
HSV 1/2	59/55,7	48	45,3	11	10,4
HHV6	22/20,7	3	2,8	19	17,9
VEB	13/12,2	3	2,8	10	9,4
CMV	7/6,6	4	3,8	3	2,8
HCV	3/2,8	0	0	3	2,8
HBV	2/1,88	1	0,94	1	0,94
Микст-персистенция	8/7,5*	1	0,9	7	6,6

Таблица 3. Встречаемость ДНК/РНК вирусов в образцах ткани опухоли при РТК абс, %

Примечание: * – относительно всех образцов ткани при РТК

Результаты исследования

Концентрации антител к PАРР в экстрактах ткани пациентов с РТК, ГЦК и образцах НТ представлены в табл. 1.

Установленные пределы колебаний концентрации антител к PАРР в образцах ткани опухолевой природы печени и кишечника достоверно не отличались друг от друга ($p=0,267$) и составили: для ткани печени – от 1,913 нг/мл до 12,452 нг/мл; для ткани кишечника – от 1,801 нг/мл до 11,128 нг/мл.

Концентрация антител к PАРР в экстрактах ткани печени и кишечника пациентов с РТК и ГЦК

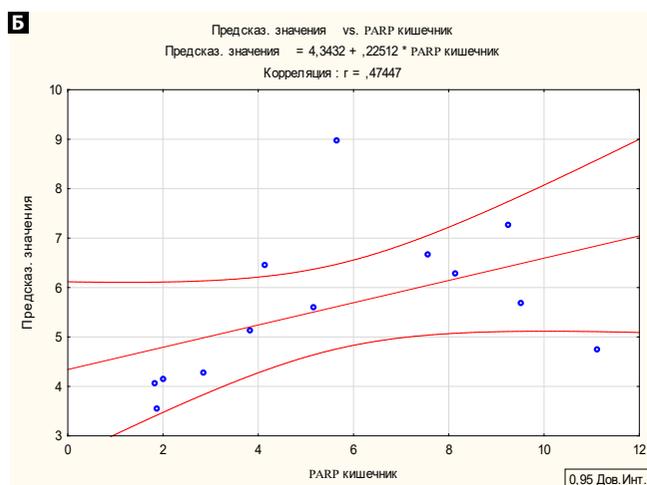
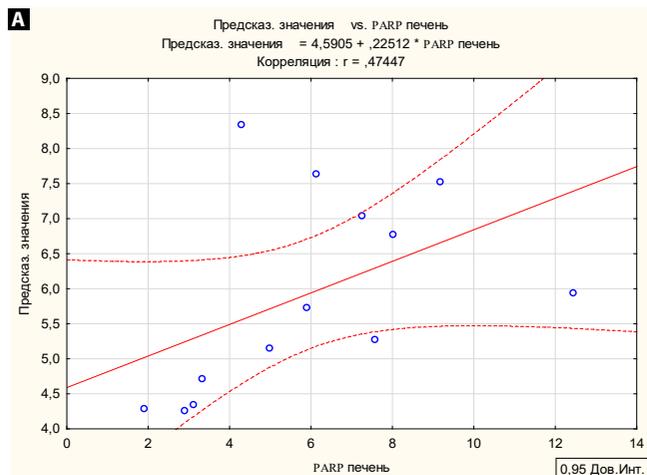


Рисунок. Предсказанное значение концентрации антител к PARP в ткани для лиц со злокачественными процессами: А – ГЦК, В – РТК

имела достоверные отличия от таковых в образцах НТ: $p=0,0003$ и $p=0,0002$ соответственно, как и уровень концентраций антител к PARP в образцах опухолевой ткани кишечника и печени на участке ткани с отсутствием критериев злокачественности по сравнению с опухолью ($p=0,03$, $p=0,04$), что указывало на повреждение ДНК, связанное с активацией PARP при РТК и ГЦК.

Встречаемость ДНК/РНК вирусов в образцах ткани печени с ГЦК представлена в *табл. 2*.

При ГЦК выделение вирусной ДНК/РНК из ткани опухоли составило: HSV 1/2 – 41,9%, HHV6 – 23,2%, CMV – 13,9%, HCV – 9,3%, HPV – 4,7%, HBV – 4,7%, VEB – 2,3%. Микст-персистирование вирусов установлено в 11/25,6% случаев, преимущественно среди мужчин (7), одновременное наличие 2 вирусов – в 9/21,9% случаев, 3 – в 2/4,9%. Более частыми в составе вирусов-микст были HHV6 (7), CMV (6) и HCV (по 4).

Встречаемость ДНК/РНК вирусов в образцах ткани толстого кишечника лиц с установленным диагнозом РТК представлена в *табл. 3*.

Микст-персистирование вирусов в ткани РТК было представлено 6 сочетаниями: VEB + HHV6; HSV 1/2 типа + VEB; HSV 1/2 типа + HHV6; HCV + HHV6; CMV + VEB; CMV + VEB + HHV6. В целом, в структуре микст-вирусов преобладали VEB (6), HHV6 (4) и CMV (4).

Результаты оценки концентрации антител к PARP в исследуемых образцах тканей с учетом наличия ДНК/РНК вирусов представлены в *табл. 4*.

Данные *табл. 4*, безусловно, нельзя признать истинно достоверными из-за небольшого числа наблюдений в группах. Тем не менее нами

Вирусы	n	PARP, нг/мл
Ткань печени		
CMV + HCV + HHV6	1	12,5±0,81*
HBV + VEB	1	11,2±0,74*
VEB	1	9,2±0,71*
HSV 1/2 + CMV	2	9,1±0,59*
CMV + HHV6	2	8,0±0,98*
CMV + HCV	1	7,6±0,57*
HSV 1/2 + HCV + HHV6	1	7,3±0,48*
HSV 1/2 + HHV6	2	6,1±0,19*
CMV	6	5,9±0,57*
HHV6	10	5,0±0,34*
HCV + HHV6	1	4,4±0,56*
HSV 1/2	18	3,3±0,41*
HBV	2	3,1±0,23*
HCV	4	2,9±0,61
HPV	2	1,9±0,22
Ткань кишечника		
CMV + VEB + HHV6	1	11,1±0,49*
CMV + VEB	3	9,5±0,71*
VEB	13	9,3±0,85*
HSV 1/2 + VEB	1	8,2±0,68*
HSV /2 + HHV6	1	7,5±0,87*
VEB + HHV6	1	5,6±0,42*
CMV	7	5,2±0,81*
HCV + HHV6	1	4,1±0,28*
HHV6	22	3,8±0,52*
HSV 1/2	59	2,8±0,61*
HBV	2	2,0±0,21
HCV	3	1,8±0,42

Таблица 4. Концентрация антител к PARP в образцах тканей опухолей с наличием ДНК/РНК вирусов
Примечание: * – $p<0,01$, в сравнении с концентрацией антител к PARP в образцах нативной ткани печени и кишечника

специально проведена дифференцировка по выявленным вирусам (моно- и микст-вариантам) для того, чтобы обратить внимание на те вирусы, которые обнаруживались чаще, в частности – HHV6 и CMV. Более высокая частота выделения данных штаммов совпадала с наиболее высокой концентрацией антител к PARP, свидетельствующей о механизмах партанатоза (повреждение ДНК) в образцах тканей опухолей печени и толстого кишечника, особенно при микст-персистенции, в сравнении с концентрацией антител к PARP в образцах НТ печени (1,806±0,97 нг/мл) и НТ кишечника (1,493±0,45 нг/мл), представленных в *табл. 1* ($p=0,01$).

По результатам множественной регрессии концентрации PARP, с учетом групп лиц с установленным диагнозом РТК и ГЦК, оценено предсказанное значение концентраций антител к PARP для лиц со злокачественными процессами (*рисунок*).

Для лиц с ГЦК в образцах ткани печени оно составило 4,59±0,22 нг/мл ($p=0,0488$), для лиц с РТК в образцах ткани кишечника – 4,34±0,225 нг/мл ($p=0,02$).

■ **Summary.** The biological marker of parthanatos is Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), the activation of which is associated with various pathological processes in the body. Tumor tissue samples from patients with morphologically verified liver and colon cancer were studied. The control consisted of liver and intestinal tissues of the same patients not affected by a tumor, and intravital biopsies (native tissue) of the liver and intestines of non-cancer patients. Determination of the concentration of antibodies to PARP and determination of DNA/RNA viruses (VEB, HBV, HCV, HPV, CMV, HSV1/2, HHV6) in tissue samples was carried out by enzyme immunoassay and polymerase chain reaction method. The research results showed that the concentration of antibodies to PARP in tissue extracts from tumor processes is higher than in native tissue samples ($p<0,05$) and in tissue with «no criteria for malignancy» ($p<0,05$). The relationship between the frequency of isolation of DNA-containing viruses (HHV6, CMV, VEB) from tumor tissues and the concentration of PARP antibodies ($p<0,05$) suggests that DNA damage to cells is stimulated by viruses during oncogenesis of the liver and colon.

■ **Keywords:** parthanatos, viruses, liver and colon cancer.

■ <https://doi.org/10.29235/1818-9857-2024-05-79-83>

Статья поступила в редакцию
04.02.2024 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Результаты анализа изменений PARP как биомаркера партанатоза показали, что данная подпрограмма регулируемой клеточной гибели (RCD) реализуется как при раке печени, так и при раке толстого кишечника. Установленная зависимость между частотой выделения ДНК-содержащих вирусов (преимущественно HHV6 и CMV) из тканей опухолей при РТК и ГЦК и концентрацией антител PARP (предварительные данные) является свидетельством включения в онкогенез опухолей данной локализации молекулярно-эффektorных механизмов, сопровождающихся сверхэкспрессией PARP, которая выступает основой инициации онкогенеза благодаря влиянию на сигнальные пути. ■

Исследование выполнено при финансовой поддержке
Гранта Президента Республики Беларусь

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. The molecular machinery of regulated cell death / D. Tang [et al.] // Cell Res. 2019. Vol. 29(5). P. 347–364. Doi: 10.1038/s41422-019-0164-5. Epub 2019 Apr 4. PMID: 30948788; PMCID: PMC6796845.
2. Fatokun A. S. Mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities / A. S. Fatokun, V. Dawson, T. Dawson // Br. J. Pharmacol. 2014. Vol. 171(8). P. 2000–2016.
3. Andrabi S. D. Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: parthanatos / S. D. Andrabi, T. Dawson, V. Dawson // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2008. Vol. 1147. P. 233–412.
4. Venderova K. A. Programmed cell death in Parkinson's disease / K. A. Venderova, D. Park // Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2012. Vol. 2(8). P. 714–743.
5. Poly (ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos / Y. K. Wang [et al.] // Exp. Neurol. 2009. Vol. 218(2). P. 193–202.
6. Jain P. G. Medicinal chemistry approaches of poly ADP-Ribose polymerase 1 (PARP1) inhibitors as anticancer agents – A recent update / P. G. Jain, B. D. Patel // Eur J Med Chem. 2019. Vol. 165. P. 198–215. Doi: 10.1016/j.ejmech.2019.01.024. Epub 2019 Jan 12. PMID: 30684797.
7. Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death / S. W. Yu [et al.] // Proc Natl Acad Sci U S A. 2006. Vol. 103(48). P. 18314–9. Doi: 10.1073/pnas.0606528103. Epub 2006 Nov 20. PMID: 17116881; PMCID: PMC1838748.
8. PARP1: Liaison of Chromatin Remodeling and Transcription / W. Zong [et al.] // Cancers (Basel). 2022. Vol. 14(17). P. 41–62. Doi: 10.3390/cancers14174162. PMID: 36077699; PMCID: PMC9454564.
9. Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 / L. Galluzzi [et al.] // Cell Death Differ. 2018. Vol. 25. P. 486–541. Doi: 10.1038/s41418-017-0012-4.
10. Inhibition of AKT induces p53/SIRT6/PARP1-dependent parthanatos to suppress tumor growth / Y. Zhang [et al.] // Cell Commun Signal. 2022. Vol. 20(1). P. 93. Doi: 10.1186/s12964-022-00897-1. PMID: 35715817; PMCID: PMC9205131.
11. A nuclease that mediates cell death induced by DNA damage and poly (ADPribose) polymerase-1. Science / Y. Wang [et al.] // Science. 2016. Vol. 354(6308). P. 68–72. Doi: 10.1126/science.aad6872. PMID: 27846469; PMCID: PMC5134926. 2016; 354. Doi: 10.1126/science.aad6872. aad6872.
12. Morson B.C. Invasion of veins by carcinoma of rectum: method of detection, histological features and significance / B.C. Morson // Mater Med Pol. – 1981. Vol. 13. №2. – P. 85–92.