

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALA

TEZĂ DE DOCTORAT

STUDIUL UNOR MECANISME MOLECULARE ÎN
LEZIUNILE PREMALIGNNE GASTRICE

REZUMAT

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT

Prof. univ. Dr. TUDOREL CIUREA

STUDENT - DOCTORAND

Dr. ANDREI PUIU CÂRSTEA

CRAIOVA 2013

I. PARTEA GENERALĂ

1. INTRODUCERE.

Cancerle digestive și în mod special cele gastrice, continuă să se situeze în primele 5 locuri indiferent de statisticile pe care le-am putea cita; astfel în Europa în 2006, incidența de 159900 de noi cazuri raportate anual (locul 5), produc o mortalitate de 118200 [1,2], precizând că și aici există o variație importantă de peste 3 ori mai mare în estul Europei prin comparație cu vestul. Pe plan mondial morbiditatea prin cancer gastric este aproape de 5 ori mai mare în America de sud și estul Asiei (China, India, și o parte din zonele periferice neindustrializate ale Japoniei, unde s-a raportat o mortalitate foarte ridicată de 12,5%, ceea ce situează neoplasmul gastric pe locul 2 după cancerul pulmonar, [3]).

2. FACTORII DE RISC CANCERIGENI, cu privire la cancerul gastric, au fost clasificați în urma studiilor lui Gomceli și colab. în 3 mari grupe [8]: *factorii genetici* (sexul masculin; poliadenomatoza familială - Lynch II; cancerul gastric difuz genetic cu CDH1 cu mutație genetică E-cadherin, polimorfism genetic pentru citokine pro și anti-inflamatorii, sindromul Peutz-Jeghers), *factori de mediu exogeni* (H. Pylori; virusul Epstein Barr; excesul de alcool; alimentația hipersodată, fumatul și mâncarea uscată; nitriții; nitrații; derivații N-nitroso; fumul; praful; alimentația săracă în fibre și vegetale proaspete; consumul scăzut de antioxidanți - carotenoizi, folați, tocopheroli, ascorbic acid); *factori de risc locali gastrici - leziuni premaligne*

3. LEZIUNI PREMALIGNE GASTRICE. În partea generală sunt prezentate pe scurt, conform datelor din literatura de specialitate [25,35], câteva date definitorii privind cele mai frecvente afecțiuni ale tubului digestiv care sunt incluse în majoritatea tratatelor de gastroenterologie ca și leziuni premaligne gastrice, adică acele situații patologice care în anumite condiții pot evolua spre dezvoltarea unor afecțiuni tumorale gastrice (gastrita atrofică cronică; esofagul Barrett; adenomatoza gastrică; gastrita Menetrie; hamartomul gastric; hiperplazia adenomatoasă polipoidă gastrică; metaplasia gastrică; anemia pernicioasă; rezecție gastrică subtotală cu o vechime de peste 20 de ani; polipi gastrici fundici; ulcerul gastric benign; gastritele cronice cu un grad înalt de displasie).

4. FIZIOPATOLOGIA ONCOGENEZEI GASTRICE. Poliaminele sunt mici molecule cu rol indispensabil pentru creșterea și proliferarea celulară în țesuturile normale, dar din păcate cu același rol și în țesuturile patologice de tip neoplazic [50,51,52,53]. Este cunoscut încă din 1984, din studiile lui Tabor și Tabor [49], faptul că poliaminele și activitatea *ornitin decarboxilazei* (ODC), sunt strâns corelate cu proliferarea și transformarea celulară. Antizimele (AZ) și inhibitorii lor endogeni (AZIN), sunt modulatori ai metabolismului ODC și implicat ai producției de poliamine și deci sunt regulatori negativi în procesul de cariokineză, prin scăderea sau creșterea activității de proliferare, diferențiere și transformare celulară. Raportul dintre nivelul de AZIN față de cel al AZ la nivel celular este deosebit de important deoarece nivelul mai mare de AZ determină condiții de a produce regresie tumorală, după cum preponderența AZIN intracelular predispune la activare cascadei de proliferare și creștere tumorală. Ca o consecință normală găsirea metodelor de degradare a ODC a devenit un scop pe termen lung, dacă privim acest lucru ca pe un posibil tratament curativ antitumoral, astfel încât în acest moment există mai multe trialuri clinice care folosesc inhibitori de ODC în schema terapeutică [86,87].

5. METODE DE CERCETARE ÎN ONCOGENEZĂ.

CULTURI CELULARE. Toate cercetările medicale din ultimii ani, s-au efectuat în mare parte pe culturi celulare recoltate de la nivelul țesuturilor tumorale pentru studierea mecanismelor de inițiere și întreținere a procesului cariokinetic. În anii '90 studiile pe culturi celulare inclusiv cele de cancer gastric uman au căpătat o adevărată amploare. Încă din 1984 s-a înființat The European Collection of Cell Cultures (ECACC), care a reprezentat prima colecție de culturi celulare puse la dispoziția cercetătorilor din întreaga lume, ea devenind ulterior cea mai autentificată și recunoscută bancă de linii de culturi celulare din întreaga lume.

RECTIA DE POLIMERIZARE ÎN LANȚ sau **PCR** (Polymerase Chain Reaction), reprezintă o tehnologie biochimică de laborator care pornind de la amplificarea perechilor de bază ce compun ADN-ul este folosită pentru sinteza in vitro a acestuia. Tehnica este utilizată nu numai în laboratoarele medicale ci și într-o într-un număr foarte mare de domenii cu profile diferite: biologie moleculară, științele mediului, criminalistică, științe medicale, biotehnologie, microbiologie, industria alimentară, epidemiologie etc.

II. PARTEA GENERALĂ

1. MATERIAL ȘI METODĂ.

CULTURI CELULARE. Studiul nostru s-a desfășurat în **două etape**: *prima perioadă* (octombrie 2010-decembrie 2012), a început la CENTRUL DE CERCETARE ÎN GASTROENTEROLOGIE ȘI HEPATOLOGIE, din cadrul Departamentului III de Medicină Internă și Gastroenterologie, Spitalul Clinic Județean de Urgență, UMF Craiova, sub atenta îndrumare a D-nului Prof. univ Dr. TUDOREL CIUREA și s-a concentrat pe aprofundarea și acumularea de cunoștințe și date cât mai actuale legate de cancerul gastric, de leziunile premaligne, de factorii de risc, de morbiditate. A *doua perioadă* (ianuarie – septembrie 2013), s-a materializat printr-o activitate zilnică desfășurată în cadrul UNIVERSITY OF HELSINKI, FACULTY OF MEDICINE, HAARTMAN INSTITUTE, sub îndrumarea D-nului Prof. univ Dr. LEIF ANDERSSON, în cadrul departamentului de Patologie, unde am efectuat studiul in vitro ce face obiectul lucrării de față. Vom prezenta în cele ce urmează cele mai noi metode de identificare, repliere și multiplicare a ADN-ului în celule canceroase pe trei linii de culturi celulare (SW 1353, K562, HGT-1).

TEHNICA WESTERN BLOT, se mai numește și imunoblot și este o metodă care se bazează pe trei pași importanți care au ca rezultat separarea și detecția proteinelor dintr-un amestec.

REAȚIA DE POLIMERIZARE ÎN LANȚ, este o tehnică precisă, complicată și cu o durată lungă de realizare fiind alcătuită din mai multe etape. Iată pe scurt cum se desfășoară un PCR: **Matrița ADN.** Orice reacție de PCR începe prin selectarea moleculelor de ADN linear sau circular care trebuie să fie foarte pur, astfel încât necontaminarea va asigura integritatea în acțiune a ADN polimerazei și în plus moleculele alese trebuie să conțină secvența ce face obiectul amplificării. **Primerii oligonucleotidici**, care se obțin într-o reacție PCR trebuie să aibă o concentrația cuprinsă între 0,1-0,6 Mm, să nu fie complementari intracatenari, să aibă valori apropiate sau chiar identice ale T_m pentru a permite temperaturi de atașare cuprinse între 55-65⁰ C (optim recomandat 62-63⁰ C). **ADN polimerazele termostabile.** Având în vedere importanța stabilității temperaturii la valorile optime pentru reușita PCR, ADN polimerazele folosite astăzi au fost obținute prin manipulări genetice de la microorganisme termofile (*Thermus aquaticus*),

care au echipamente enzimatică cu temperaturi optime ridicate (peste 70⁰ C) și care sunt capabile să desfășoare activități specifice chiar și după depășirea unor temperaturi foarte mari (peste 100⁰ C). **Dezoxinucleotid-trifosfați (Dntp = Datp, Dgtp, Dctp, Dttp)**. Cele 4 tipuri de molecule de dezoxinucleotid-trifosfați sunt introduși în reacție în cantități echimolare (între 50 și 500 Mm pentru fiecare Dntp) și sunt utilizați de ADN polimerază în reacția de polimerizare. Metoda PCR este des folosită pentru: **amplificare și cuantificare a ADN-ului** în medicina legală și arheologie, rezultatele obținute având un mare grad de exactitate; ca și **metodă de diagnostic medical**, folosită în ultima vreme pentru diagnosticul unor boli cu transmitere genetică, a identificării cancerelor și a bolilor maligne hematologice (tehnica PCR având o sensibilitate de cel puțin 10000 de ori mai înaltă decât oricare altă metodă folosită).

A. DATE DE STUDIU PERSONAL.

În laboratorul de Patologie al Haartman Institute, al Universității din Helsinki, am avut în lucru trei 3 linii celulare pe care am lucrat: **proiectul 1** – linia celulară SW 1353, **proiectul 2** – linia celulară K565 și **proiectul 3** pentru linia celulară HGT-1. Întreg procesul de studiu molecular la care am luat parte este o secvență dintr-un studiu amplu privind activitatea izomerilor de AZIN mai puțin cercetați (AZIN 2, AZIN 3).

PROIECTUL 1 - SW 1353. În acest studiu, linia celulară SW - condrosarcom uman, a fost cercetată prin analiza activității expresiei genice a AZIN2-ARNm, indusă prin tratatarea cu IGF. În acest fel am creat un model in vitro a cărei stabilitate depind de curba - timp și de doze, caracteristici necesare pentru un qPCR corect. Noi am încercat să studiem și să evidențiem nivelul și expresia acesteia și în alte tipuri de celule tumorale și mai ales dependența ei de doză, comparând rezultatul obținut la qPCR cu gena de referință GADPH.

PROIECTUL 2 - K562. Pasul 1 pentru proiectul 2 a constat din determinarea inducției AZIN-2, Rab27A și Rab27B în linia de culturi celulare de tip K562 unde s-a încercat diferențierea megacariocitară prin *tratare cu activatorul tisular de plasminogen (TPA)* 30nM. În **pasul 2**, a doua substanță folosită pentru inducția a AZIN2, Rab27A și Rab27B în celule K562 la care s-a făcut diferențiere eritroidă cu 60μM, a fost Hemina, care este o protoporfirina IX ce conține fier cu un ligand de clorură și este utilizată în tratamentul atacurilor de porfirie, în special

în porfirie acută intermitentă. Proba de control a fost a constituit din-o linie celulară simplă fără nici un reactiv. Ele au fost supuse tehnicilor, western blot, PCR, IF

PROIECTUL 3 – HGT-1. Studiile în domeniul mecanismelor moleculare, implicate în cancerul digestiv, mai ales în cancerul gastric, sunt foarte puține, iar rezultatele sunt neconcludente. Am utilizat o linie celulară umană de adenocarcinom gastric, HGT-1, etablă din tumoră primară, prelevată de la un pacient în vârstă de 60 de ani, diagnosticat cu adenocarcinom gastric [108,119]. Linia celulară HGT-1 a fost caracterizată din punct de vedere de morfologie și al cariotipului. Linia HGT-1 este de origine epitelială și s-a dovedit a fi tumorigenă atunci când a fost transplantată la șoareci imunosupresați, având un cariotip hiperdiploid cu un număr de 57 de cromozomi. Astfel linia de celulele HGT-1 cultivate pe care am lucrat, posedă receptori histaminici H_2 (H_2R) funcționali, care mediază sinteza de adozin 3'-5'-monofosfat ciclic și în consecință și producția și activarea de adenilatciclază. H_2R sunt receptori specifici celulelor parietale normale, secretante de acid clorhidric. Celulele HGT-1 epiteliale gastrice umane nu secretă mucus sau antigen carcinoembrionic. În cadrul acestui studiu, linia celulară HGT-1 a fost transfectată cu Fugene 6, Promega, USA. Transfecția este procesul de introducere intențională a acizilor nucleici în celule. Termenul este adesea folosit pentru metodele non-virale, utilizate pentru celulele eucariote [120]. În laboratorul de Patologie de la Haartman Institute Helsinki University, am folosit transfecția pentru a încerca să urmărim modul în care se realizează expresia genică pe linia de culturi celulare de tip HGT-1, provenite de la un adenocarcinom gastric uman. La ultima citire la 48h, se schimbă iarăși mediul celulelor aflate în transfecție, se adaugă un mediu de cultura ce conține D-MEM+glutamină+FBS+P.S. (penicilina-streptomicina), dar și un antibiotic nou G418, care are particularitatea de a bloca sinteza polipeptidelor prin inhibarea elongării în 2 tipuri de celulele specifice atât procariote cât și eucariote [123]. G418 este frecvent utilizat în cercetările de laborator pentru a selecta în special celulele modificate genetic[124].

1. REZULTATE ȘI DISCUȚII.

A. DISCUȚII PRIVIND MORBIDITATEA PRIN CANCER GASTRIC.

1. Factorii de risc cancerigeni. Există totuși câteva elemente documentate științific și enunțate foarte clar de lumea medicală, de care trebuie ținut cont și anume: *factorii de risc endogeni nu pot fi modificați* (factorii genetici, sexul, leziunile premaligne familiale), în timp ce

monitorizarea, controlul și încercarea de diminuare a factorilor de risc exogeni, nu fac decât să îmbunătățească prognosticul persoanelor cu risc. Combaterea intensă și susținută a alimentației hipersaline pare să fie una dintre metodele cele mai ușoare și mai la îndemână pentru scăderea riscului de cancer gastric în rândul grupelor populaționale din anumite zone geografice cu risc, care însumează mai mulți factori de risc, alături sau nu de infestarea cronică cu H. De aceea monitorizarea și controlul factorilor de risc și ai leziunilor premaligne digestive pot fi de un real folos persoanelor cu risc crescut.

2. Leziuni premaligne gastrice. Multe dintre leziunile premaligne pe care le-am prezentat la capitolul de date generale, cu caracteristicile lor clinice obiective și subiective, sunt tratate de multe ori cu ușurință, atât de pacient cât și medicul curant. Pacientul de multe ori renunță cu ușurință la efectuarea de controale periodice pentru a urmări modul în care evoluează afecțiunea cu care tocmai au fost depistați.

3. Fiziopatologia oncogenezei gastrice. În mare măsură echilibrul dintre cele 2 enzime, este acela care influențează în mod primar nivelul de ODC și implicit cel al producerii și preluării de poliamine. Mecanismul de preluare de către celule a poliaminelor, nu este încă pe deplin elucidat, astfel încât orice nouă identificare a unei proteine ce ar putea fi implicată în acest proces poate da noi speranțe pentru găsirea tratamente pentru cancerul uman [109].

B. REZULTATE ȘI DISCUȚII CU PRIVIRE LA EXPRESIA AZIN-2 ÎN CELULA CANCEROASĂ GASTRICĂ – *studiu personal*

Noi am ales să studiem expresia AZIN-2 în celule tumorale din osteosarcom (SW1353), din megakariocite (K565) și din celule tumorale din cancer gastric (HTG-1 din adenocarcinom gastric uman), deci altele decât cele care sunt citate în literatura de specialitate și anume celule cerebrale și testiculare. Rolul și locul AZIN 2 în procesul de oncogeneză este bine stabilit, dar din păcate stabilitatea precară a izoenzimei a făcut ca aceasta să fie studiată mai puțin.

PROIECTUL 1 – SW 1352. Rezultatele obținute de noi la sfârșitul experimentelor efectuate pe prima linie de celule SW 1353 sunt prezentate în tabelele și graficele din teză, unde au fost efectuate 4 citiri din 24 în 24 de ore și unde s-a cuantificat expresia genică a AZIN-2 în proba control și în cea colorată cu IGF. Deși la toate citirile diferența dintre valorile medii ale AZIN2 măsurate pentru probele de control și cele tratate cu IGF se mărește, nu putem afirma că

este vorba despre o diferență semnificativă statistic, deoarece valoarea p obținută prin testul t Student este $p=0,085 > 0,05$, deci peste pragul maxim de semnificație. Lipsa semnificației statistice se datorează variabilității mari întâlnite între rezultatele probelor individuale.

În finalul experimentului efectuat sub denumirea de **proiectul 1** pentru a întări datele prezentate prin tabele și grafice, obiectivăm prezența expresiei genice din celulele de cultură prin ilustrarea cu imagini de imunofluorescență care atestă colorațiile de tip granular la nivel *membranal și/sau nuclear* al anticorpilor folosiți ca markeri celulari.

PROIECTUL 2 - K562, a fost realizat în mare măsură pe același schelet ca și protocol pentru linia de culturi celulare de tip SW1353. Astfel proiectul a început cu inducția a AZIN-2, Rab27A și Rab27B în celulele K562, ceea ce a dus la diferențierea megacariocitară prin tratare cu TPA 30nM. Altă probă a fost tratată cu Hemin care permite diferențiere eritrocitară a liniei K562. În urma aceluiași etape efectuate la proiectul 1 cele două linii celulare K562 diferențiate au făcut obiectul citirilor la 24 de ore timp de 4 zile, cu scopul de a aprecia expresia genică a AZIN-2 comparându-le cu proba de control. În acest proiect expresia genică a AZIN-2 a fost găsită crescută semnificativ statistic, prin comparație cu proba cu TPA și cea de control, deasemenea și în corelație cu variabila timp, în sensul că valorile cele mai ridice au fost găsite la citirea de la 72 de ore. În final am făcut comparație între cele două linii studiate și am observat că expresia genică este mai mare la proba de la linia de celule K562 tratate cu Hemin, deci AZIN-2 are specificitate mai mare la celula tumorală sanguină de tip eritrocitar.

PROIECTUL 3- HGT-1. Liniile de culturi celulare de tip HGT-1, sunt puține și greu de crescut din culturi proprii în laboratoarele de cercetare. Rezultatele obținute de Xin-Pu Miao și colaboratorii [107] sugerează că ODC poate fi utilizată ca biomarker pentru screening-ul și diagnosticul leziunilor premaligne, putând prevesti uneori momentul transformării și proliferării maligne a unei leziuni aparent benigne la momentul diagnosticării. Această linie celulară HTG-1 va constitui un model experimental foarte bun pentru studiul mecanismelor moleculare implicate în secreția gastrică și implicat în leziunile premaligne gastrice.

CONCLUZII.

1. Cancerul gastric și leziunile precancerose, rămân în continuare pe locul al doilea în ierarhia morbidității mondiale prin cancer, în ciuda progreselor medicale; alături de excesul de sare, leziunile premaligne gastrice și infestarea cu *Helicobacter Pylori*, au implicații directe în oncogeneza gastrică.
2. Studiile de microbiologie și biochimie au demonstrat că la nivel celular echilibrul dintre 2 enzime, AZ și AZIN, este cel care influențează în mod primar nivelul de ODC și implicit cel al producerii și preluării de poliamine responsabile de proliferarea și creșterea celulară, atât în celulele normale precum și în cele tumorale.
3. Studiul de față încearcă să demonstreze existenței expresiei genice a AZIN-2, și în alte celule tumorele decât cele studiate și acceptate până în prezent (celula cerebrală și testiculară), adică în 3 tipuri de linii celulare distincte: SW1353 (ostosarcom), K562 (megacariocite) și HGT-1 (adenosarcom gastric).
4. Expresia genică a AZIN-2 în cele două linii de culturi celulare a fost mai bine evidențiată în linia K562 față de linia celulară SW1353, dacă este să comparăm rezultatele obținute la colorarea prin IF sau la linia tratată cu Hemin. Putem spune deci, că există expresie genică a AZIN-2 și în celule tumorale osoase și sanguine alturi de cele descrise până acum adică cerebral și testicular.
5. Evidențierea prezenței AZIN-2 în HGT-1 pare să fie confirmată, dar la nivele mult mai mici. Rezultatele nu sunt definitive și nici complete, deoarece studiul este doar la început și în afară de imunofluorescență și transfecția Fugene 6 și cu G418, nu s-au încercat încă și alte tipuri de antibiotice care ar putea evidenția mai bine prezența expresiei genice a AZIN-2 în celulele HGT-1. Studiul este însă în derulare.
6. Motivul pentru continuarea studierii liniei celulare HGT-1 este și faptul că evidențierea expresiei genice slabe la acest tip celular, poate să conducă la creerea unui model experimental pentru studiul mecanismelor moleculare ale secreției gastrice și ale mecanismelor intime ale proliferării celulare patologice din cancerele gastrice, sau de studierea mecanismelor oncogenice ce duc la evoluția tumorală a leziunilor premaligne gastrice.