



Original Article: RUOLO CASPASI APOPTOSI NEL CANCRO

Citation

Volkova T.O., Kovchur P.I. Ruolo caspasi apoptosi nel cancro. *Italian Science Review*. 2014; 5(14). PP. 177-181.

Available at URL: <http://www.ias-journal.org/archive/2014/may/VolkovaT.pdf>

Authors

Tatyana O. Volkova, Petrozavodsk State University, Russia.

Pavel I. Kovchur, Petrozavodsk State University, Russia.

Submitted: May 1, 2014; Accepted: May 20, 2014; Published: May 31, 2014

Astratto. In questo studio, l'analisi dello sviluppo della patologia cancro mostrato che le cellule mononucleate del sangue periferico attivo caspasi - 8 e 3 era significativamente aumentata da STI cancro cervicale in 76-79 % dei pazienti, il cancro al seno in 48-54 %. Con l'aumento del tasso di crescita del tumore stadio è registrato in oltre il 92 % dei casi. Nel tessuto tumorale, al contrario, nel 65-70 % dei casi registrati diminuire l'attività che induce l'apoptosi di caspasi - 8, e 9, poiché sti onkopatologii indipendentemente dall'origine istogenetica e localizzazione del tumore. In tasso Stii continua a diminuire, e nei pazienti con StIII processo neoplastico è una riduzione dell'attività di queste caspasi nel 100% dei casi. Un modello simile può essere visto in relazione alla effettore caspasi - 3 e 6. Tale separazione attività funzionali caspasi nelle cellule mononucleari del sangue e tessuti tumorali suggerisce un possibile utilizzo di questo gruppo di enzimi come marcatori di ulteriori predittive per lo sviluppo della patologia cancro.

Parole chiave: caspasi; morte cellulare programmata (apoptosi); cancro del collo dell'utero; cancro al seno.

Introduzione. Apoptosi - controllata geneticamente meccanismo di morte cellulare è accompagnato da caratteristici cambiamenti citomorfologici e

biochimiche, nonché l'attivazione di specifici gruppi di geni. Numerosi fattori extracellulari e intracellulari che attivano il programma apoptotico, la cui attuazione avviene nella maggior parte dei casi intracellulare cisteina endopeptidasi - caspasi (CE 3.4.22). L'interazione di ligandi e recettori di morte cellulare è il mezzo principale di indurre apoptosi un percorso "esterno". Quando questa proteina adattatore funzione che interagisce con la DD-domini (Morte di dominio) del recettore svolge FADD (DD-proteina Fas - associato). Inoltre DD-dominio, FADD contiene anche un dominio DED (morte Effettore Domain), necessario per la formazione del complesso DISC (complesso segnalazione-morte induzione). DISC fornisce una piattaforma per multimerizzazione e l'attivazione autocatalytic dell'iniziatore procaspase-8. Interazione FADD con pro - caspasi -8 è basato sulle interazioni omotipiche dei loro DED-domini. Ulteriori caspasi - 8 esegue una elaborazione caspasi effettrici (ad esempio, caspasi - 3, 6 e 7) senza segnale DED - dominio non è in grado di percepire direttamente dal recettore morte [1, 2]. Mitocondriale ("interna") via apoptotica è attuato mediante rilascio proteine apoptogenica dallo spazio intermembrana dei mitocondri nel citoplasma della cellula.

Uno dei modelli della formazione apoptosoma può essere rappresentato come " citocromo c - Apaf - 1 - CARD - procaspase - 9 ", [3, 4]. Così caspasi - 9 recluta procaspase - 3, che comporta la suddivisione di un gran numero di proteine cellulari e strutture che sono necessari per il normale funzionamento, e provoca la morte cellulare. Che la regolamentazione dei processi di cui sopra può essere disturbata durante lo sviluppo di molte malattie, compreso il cancro.

Diversi studi hanno dimostrato che, come oggi utilizzato nei criteri di pratica clinica per la diagnosi della maggior patologia cancro, particolarmente robuste, hanno un numero di limitazioni nella precisione della diagnosi, capacità predittiva della malattia e non consente lo stato individuale dei pazienti [5]. Per ovviare a tali inconvenienti è necessario sviluppare e introdurre nuovi metodi per la diagnosi genetica e biochimica molecolare clinica basata sull'analisi dei cambiamenti nell'espressione / attività delle proteine dei tessuti ed enzimi che sono biomolecole chiave funzionamento delle cellule, tessuti e organi. Che tali enzimi sono caspases cellulari. E 'noto che lo sviluppo del cancro cervicale può essere accompagnata da cambiamenti nell'espressione di caspasi - 8, 3 e 6 nel tessuto tumorale. [6] Una situazione simile si verifica per quanto riguarda la caspasi - 3/7 in tumori in altri siti, come il cancro della mammella, cancro del polmone e cancro del colon [7], e caspasi -3 per il cancro del fegato [8]. Tuttavia, non è ancora aperto sulla scena tumore al quale tali cambiamenti cominciano, e la dipendenza di tali modifiche sull'origine istogenetica del tumore. Pertanto, la questione relativa alla costituzione del rapporto tra i cambiamenti di espressione / attività delle caspasi e le caratteristiche clinico-patologiche del tumore richiede uno studio dettagliato.

Lo scopo di questo studio era di esaminare ed analizzare variazioni dell'attività della caspasi - 3, 6, 8 e 9 nelle cellule mononucleari del sangue periferico

e nel tessuto tumorale nello sviluppo del cancro cervicale e cancro al seno.

Materiali e metodi. I campioni di tessuto e di sangue periferico sono stati ottenuti da 95 pazienti operati in GBUZ "repubblicano Oncology Center" della Repubblica di Karelia nel periodo 2010-2012. Abbiamo esaminato 58 donne con carcinoma a cellule squamose della cervice (tutti i pazienti positivi per il virus del papilloma umano), di cui 22 - con stadio I (età media $38,3 \pm 6,0$), 21 - con stadio II (età media $43,6 \pm 13,2$), 15 - con stadio III (media $46,9 \pm 11,1$ anni); 37 pazienti con cancro al seno, di cui 15 - con stadio I (età, media $56,4 \pm 5,0$), 12 - con la fase II (l'età media di $59,6 \pm 10,2$), 10 - Stage III (età media $61,1 \pm 9,1$). Come controllo per ciascun gruppo di trattamento è stato valutato in parallelo sangue di 15 donne non gravide sane della stessa età, con una storia e non hanno patologie di cancro. I criteri di selezione dei pazienti è stata confermata morfologicamente diagnosticata la patologia del cancro. Stadiazione del cancro stata condotta in accordo con il sistema di classificazione internazionale sul TNM [9]. La diagnosi della patologia cancro basato su un esame clinico completo, risultati di colposcopia estesa, citologico ed esame istologico in conformità agli standard del settore, il volume di algoritmi di screening e di trattamento e il volume della diagnosi e cura del cancro. Tutti i pazienti sono stati informati circa la partecipazione allo studio, e ha dato il consenso scritto volontario.

Materiale raccolse il giorno dell'intervento. Da ogni paziente sono stati ottenuti 2 frammenti di tessuto dalla zona patologica, che è stata determinata visivamente, e un frammento di tessuto morfologicamente normale (controllo), che si trova al di fuori dell'area patologica. I campioni di tessuto sono stati posti direttamente in microtubi con una soluzione per stabilizzare l'RNA in biomateriale EverFresh RNA ("Klonogen", St. Petersburg), congelati e poi conservati a -80° C. Immediatamente prima che l'operazione è stata eseguita in pazienti tubi

di campionamento del sangue venoso VacuTube (5 o 10 ml) contenente citrato di sodio 3,8 %, dopo che i tubi sono stati posti su ghiaccio. Frazione di cellule mononucleate è stato isolato immediatamente dopo il metodo di campionamento del sangue su Ficoll gradiente di densità standard 1.077 g/cm³ Urografin (NPP "PanEco", Russia), la sospensione cellulare risultante è stata usata immediatamente o congelato in mezzo RPMI -1640 ("Biolot", San Pietroburgo) supplementato con siero di vitello fetale 20% e 10 % DMSO e conservati a -80 ° C.

Determinazione dell'attività della caspasi è stata condotta secondo il metodo standard utilizzando substrati specifica marcata con un marcatore fluorescente (7 - ammino -4 - triflormetilummarin - AFC). ("BioRad", USA), un cambiamento rilevabile in fluorescenza o assorbanza [6] Il substrato per la caspasi -3 - DEVD (Asp - Glu - Val - Asp), caspasi - 6 - VEID (Val- Glu - Ile - Asp), caspasi -8 - LETD (Leu - Glu - Thr - Asp), per caspasi - 9 - LEHD (Leu - Glu - His- Asp). Determinazione della quantità di spaccati AFC eseguita da un Biowave spettrofotometro II + ("Biochrom", Regno Unito) a 395 nm a 30, 60, 90, 120, 150, 180 min dopo la reazione. Caspasi attività relativo è stato calcolato come $\Delta S/\Delta t$, dove ΔS - cambiamento di intensità di fluorescenza (densità ottica) (unità relative) Durante l'intervallo di tempo Dt (min)..

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando i Statgraphics Plus Program 2.1. Per confronto, i campioni sono stati usati non parametrico di Wilcoxon - test di Mann - Whitney. Analisi della correlazione è stata effettuata utilizzando ANOVA (One - way ANOVA).

Risultati e discussione. La carta è stata analizzata variazioni dell'attività della caspasi - 3, 6, 8 e 9, in campioni di sangue e di tessuto tumorale di pazienti con diagnosi di cancro cervicale e cancro al seno. La decisione di includere nell'analisi è uno spettro di caspasi è stata dettata dal seguente: 1) la caratteristica fondamentale dello sviluppo della patologia del cancro -

instabilità genomica generale - dà ragione di credere che la principale fonte di segnali pro- apoptotici nelle cellule tumorali sono rotture del DNA, e il sensore principale di questi segnali - caspasi -9 ('interna' via apoptosi caspasi principali iniziatori); Inoltre, l'apoptosi può avvenire attraverso la recettori delle cellule CD95 e ulteriormente attraverso la caspasi -8 (caspasi iniziatrici primarie via apoptotica "esterna"); 2) caspasi - 3 è un effettore caspasi universale come "interno" ed "esterno" via; 3), caspasi - 6 è uno dei rappresentanti meno esplorati di questa famiglia di endopeptidasi, tuttavia, il nuovo punto dati per il suo ruolo in reazioni di amplificazione apoptotici; anche scoperto che la gamma del suo spettro obiettivo proteolitici non si sovrappone ad altri obiettivi della caspasi effettrici [2, 3, 6].

Quando si analizza lo sviluppo del cancro studio patologia dimostrato che le cellule mononucleate del sangue periferico, l'attività della caspasi - 3 e 8 sti cancro cervicale significativamente elevati in 76-79 % dei pazienti, mentre caspasi -6 - 87% (Fig. 1). Nel carcinoma mammario sti aumentato caspasi - 3 e 8 (48-54 % dei casi, fig. 2). Con l'aumento del tumore stadio STII per aumentare i dati sulle prestazioni è registrato in oltre il 92 % dei casi. Cancro cervicale Stii anche un aumento della caspasi - 6 (98 % dei pazienti), e diminuita attività della caspasi -9 (95 % dei pazienti).

Nel tessuto tumorale, al contrario, nel 65-70 % dei casi registrati diminuire l'attività che induce l'apoptosi di caspasi - 8, e 9, poiché sti onkopatologii indipendentemente dall'origine istogenetica e localizzazione del tumore (Fig. 1, 2). In tasso Stii continua a diminuire, e nei pazienti con StIII processo neoplastico è una riduzione dell'attività di queste caspasi nel 100% dei casi. Un modello simile può essere visto in relazione alla effettore caspasi - 3 e 6. L'analisi di campioni di tessuto tumorale per tutti caspasi indagati è stata trovata correlazione negativa significativa dell'attività proteolitica con stadio clinico. Questi dati suggeriscono che

la crescita tumorale e sviluppo accompagnati da multilaterali processi apoptotici anomale che vengono implementate nel funzionamento globale delle caspasi e soppressione della resistenza multipla delle cellule tumorali a stimoli apoptotici. Va osservato che, in base a questi risultati, l'inibizione dell'attività della caspasi - un evento precoce nella progressione del cancro cervicale e cancro al seno, come si osserva nella stragrande maggioranza dei campioni analizzati nelle fasi iniziali dello sviluppo tumorale, e ovviamente riflette la comparsa di un fenotipo aggressivo.

Analizzando i fatti e i risultati, si può affermare con certezza che la caspasi occupano una posizione chiave nello sviluppo del cancro. Separazione delle attività funzionali di caspasi nelle cellule mononucleari del sangue e tessuti tumorali suggerisce un possibile utilizzo di questo gruppo di enzimi come marcatori di ulteriori predittive per lo sviluppo della patologia cancro.

References:

1. Lavrik I.N., Krammer P.H., 2012. Fas Regulation of signaling at the DISC. *Cell Death Differ.* p. 36-41.
2. Volkova T.O., Poltorak A.N., 2012. Caspases Cellular: new targets for the action of pharmacological agents. "Apoptosis and medicine." *InTech.* pp. 175-204.
3. Pennarun B., Meijer A., de Vries E.G., Kleibeuker J.H., Kruyt F., de Jong S. 2010. Playing the DISC: turning on TRAIL death receptor-mediated apoptosis in cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* p. 123-40.
4. Haunstetter A., Izumo S. 1998. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. p. 1111-29.
5. Merabishvili V.M., Laliantsi E.I., Subbotina O.I. 2012. Cervical cancer: morbidity and mortality (population-based study). p. 41-44.
6. Volkova T.S., Kovchur P.I., Kurmyshkina O.V., Bagina U.S., Bahlaev I.E., Nemova N.N. 2011. Expression of CD95 and caspases in peripheral blood lymphocytes and tumor female reproductive system (for example, cancer of the cervix). *Russian Allergology magazine.* pp. 71-72.
7. Lin Yu.F., Lai T.C., Chang C.K., Chen C.L., Huang M.S., Yang C.J., Liu H.G., Dong J.J., Chou Yu.A., Teng K.H., Chen S.H., Tian W.T., Jan Yu.H., Hsiao M., Liang P.H. 2013. targeting the XIAP caspase-7 complex selectively kills caspase-3 - deficient malignancies. p. 3861-75.
8. But J., Zou C., Guo L., Seneviratne D.S., Tan X., Kwon Yu.K., An J., R. Bowser, Defrances M.C., Zarnegar R. 2013. Novel Death Defying Domain in meth entraps the active site of caspase - 3 and blocks apoptosis in hepatocytes. *Hepatology.*
9. International Union Against Cancer (UICC). 2009.

Figura 1. Sti numero di casi clinici di cancro cervicale (%) registrabile con cambiamenti nell'attività caspasi nelle cellule mononucleate del sangue periferico (A) e tessuto tumorale (B)

- Il livello di controllo;
 - Incremento relativo al controllo; - Riduzione relativa al controllo

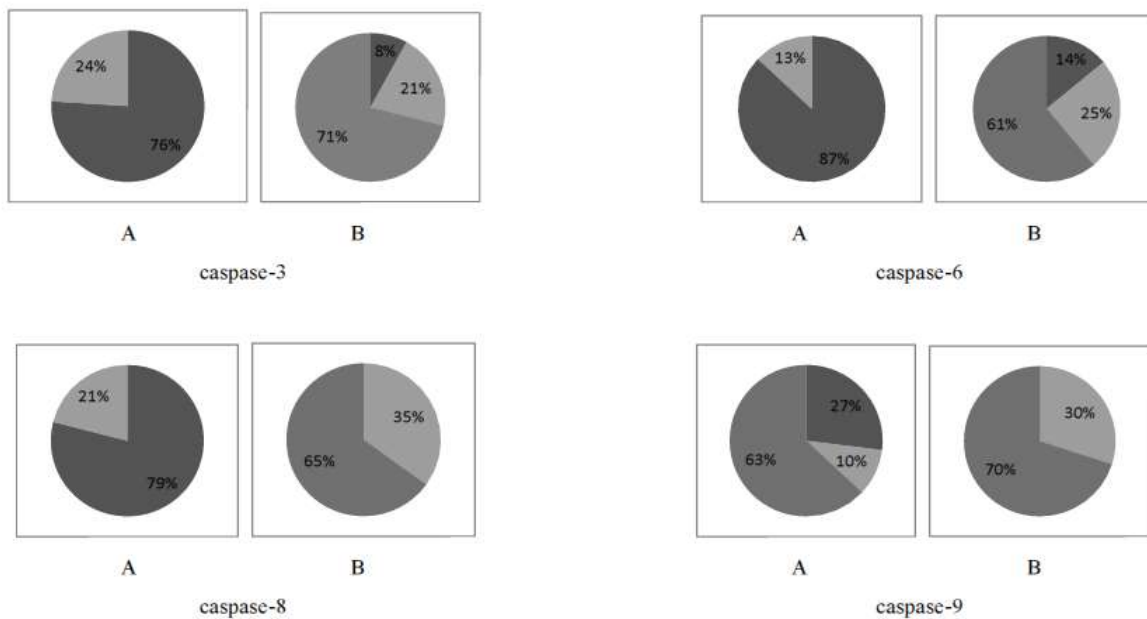


Figura 2. Sti numero di casi clinici di cancro al seno (%) registrabile con cambiamenti nell'attività caspasi nelle cellule mononucleate del sangue periferico (A) e tessuto tumorale (B)

- Il livello di controllo;
 - Incremento relativo al controllo; - Riduzione relativa al controllo

