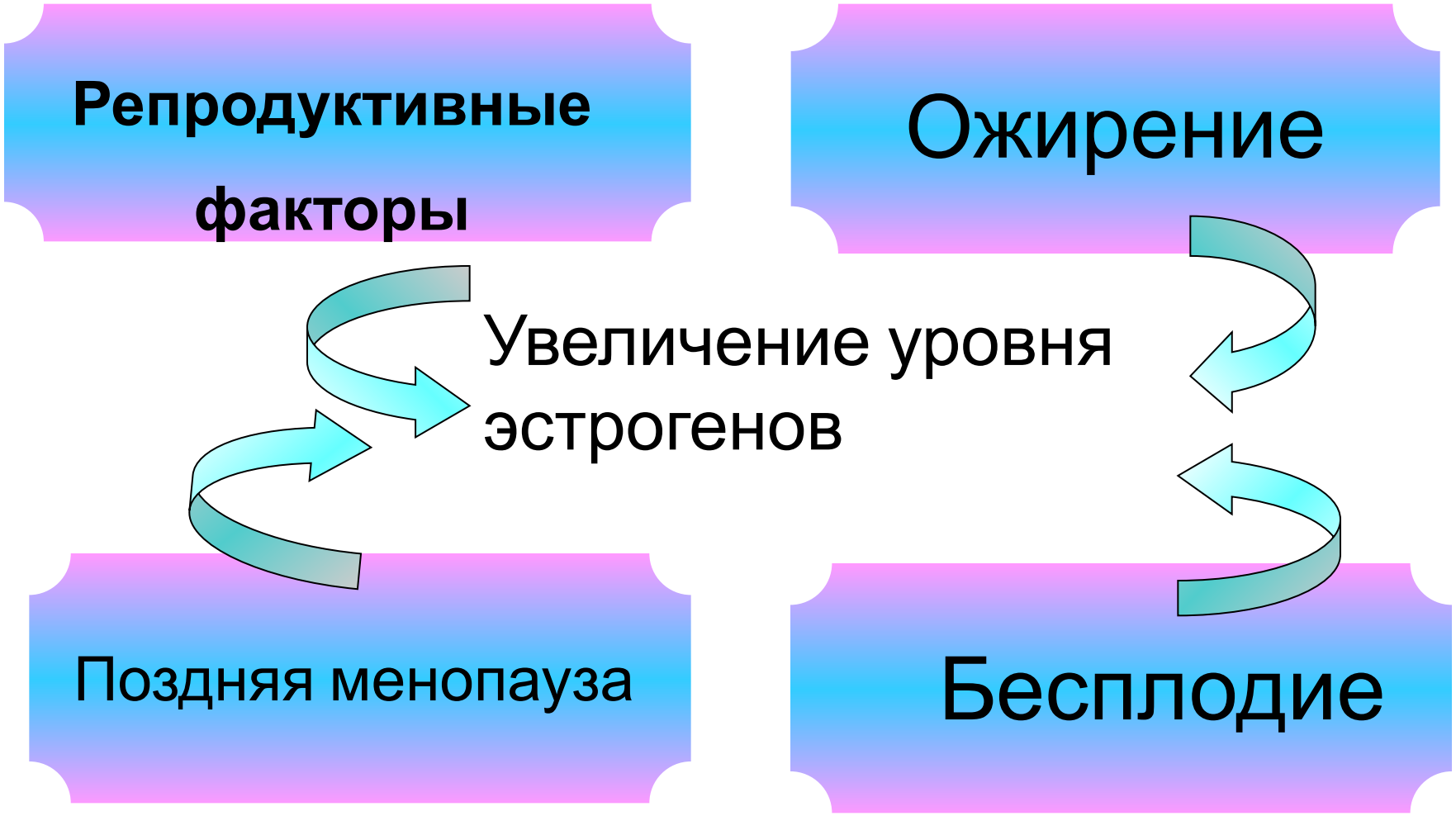
Механизмы гормонального канцерогенеза

Частота гормонозависимых форм рака у женщин в г. Новосибирске (на 100 000)

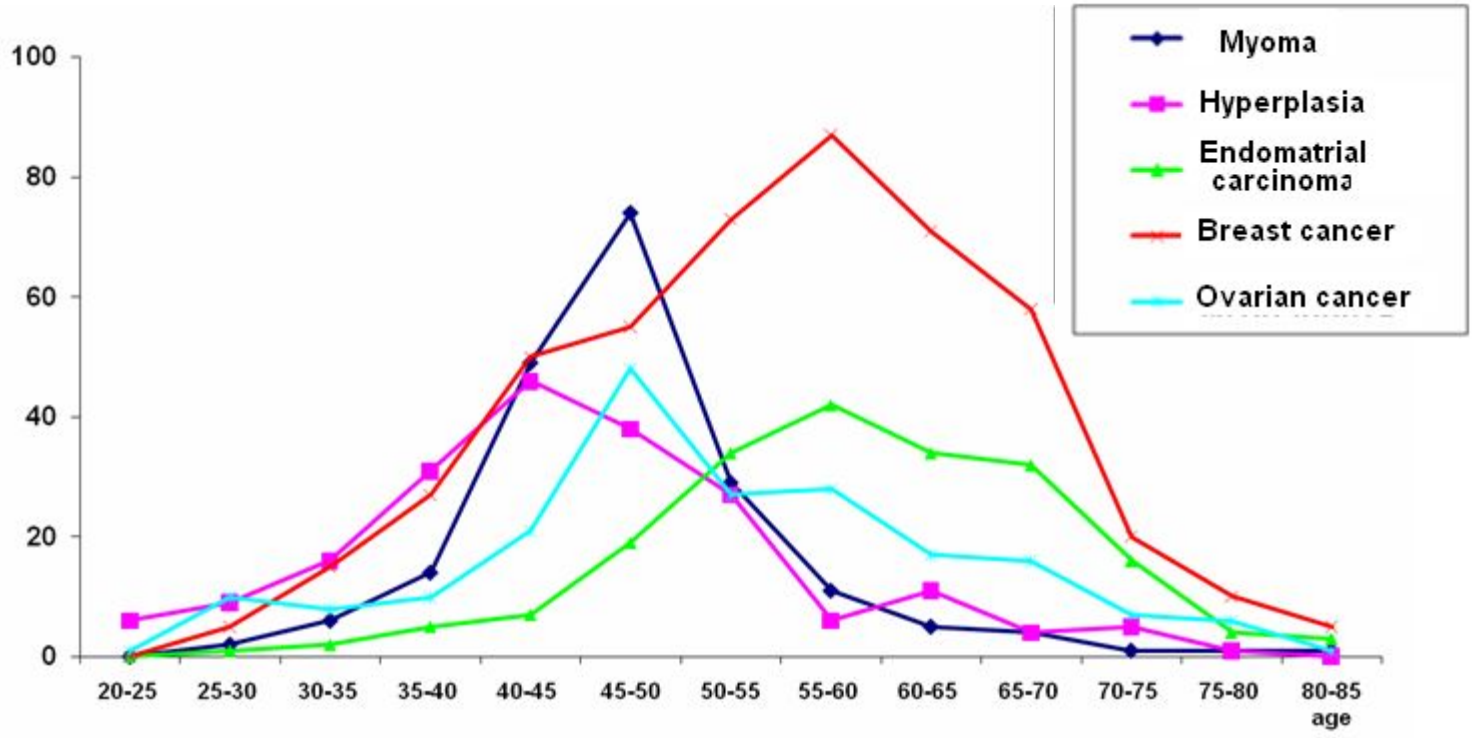
Рак молочной железы	80
Рак эндометрия	25
Рак яичников	12
Миома	20-30%

Факторы риска

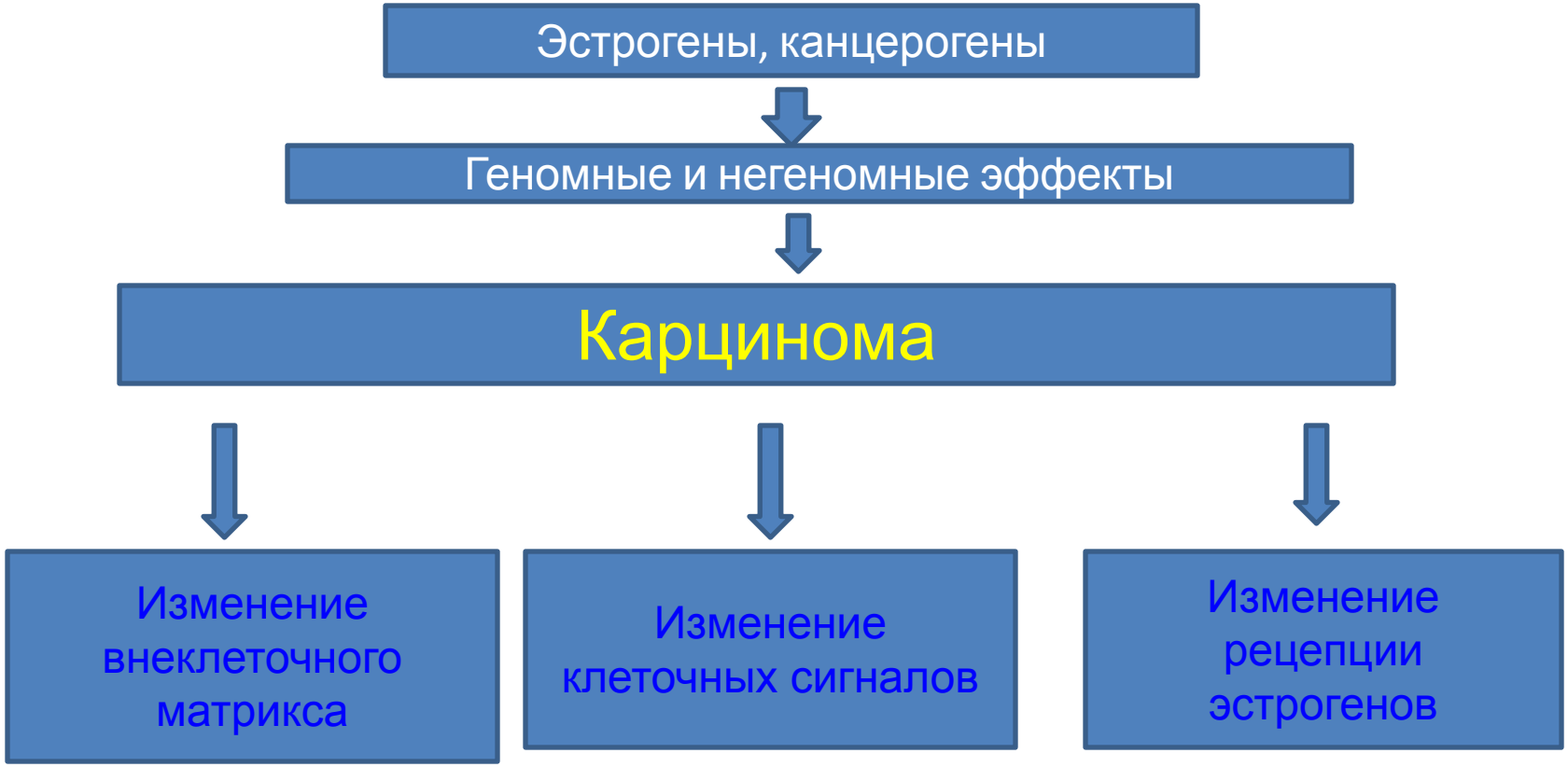


Зависимость случаев гормоно-зависимых видов рака от возраста

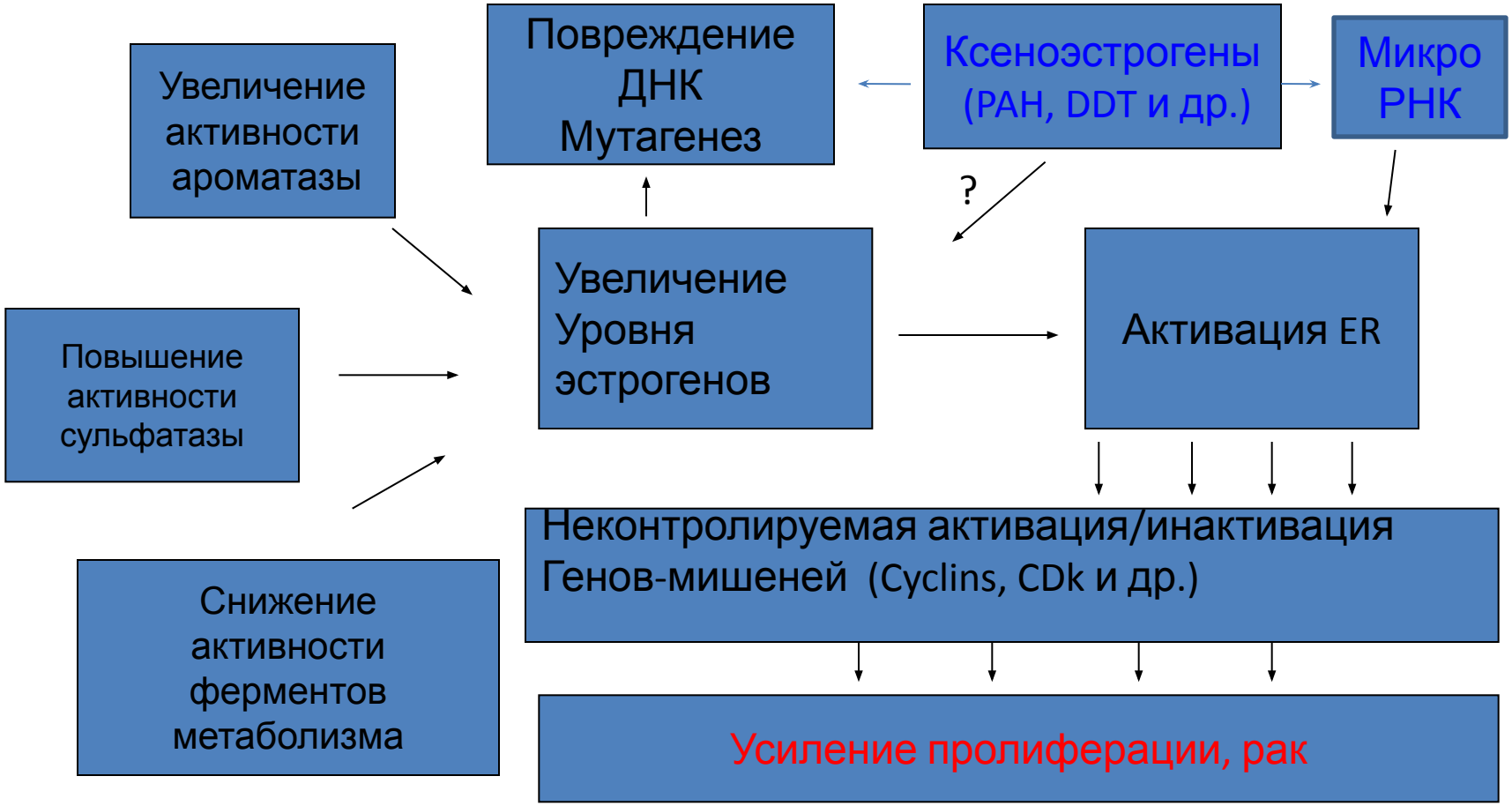
(n=3850)



Патогенез гормонального рака



Концепция гормонального канцерогенеза



ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ ГОРМОНОЗАВИСИМЫХ ФОРМ РАКА

Сигнальная трансдукция в гормональном канцерогенезе

Передача клеточного сигнала (Сигнальная трансдукция – СТ)

КОНТРОЛЬ

дифференцировка

пролиферация

апоптоз

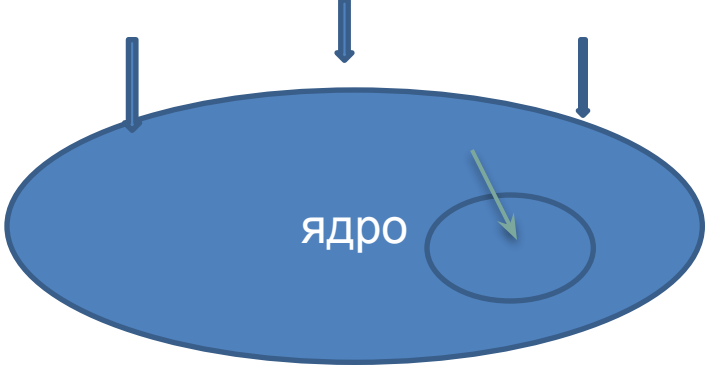
межклеточные взаимодействия

цитоскелет

миграция

метаболизм лекарств

энергетический метаболизм



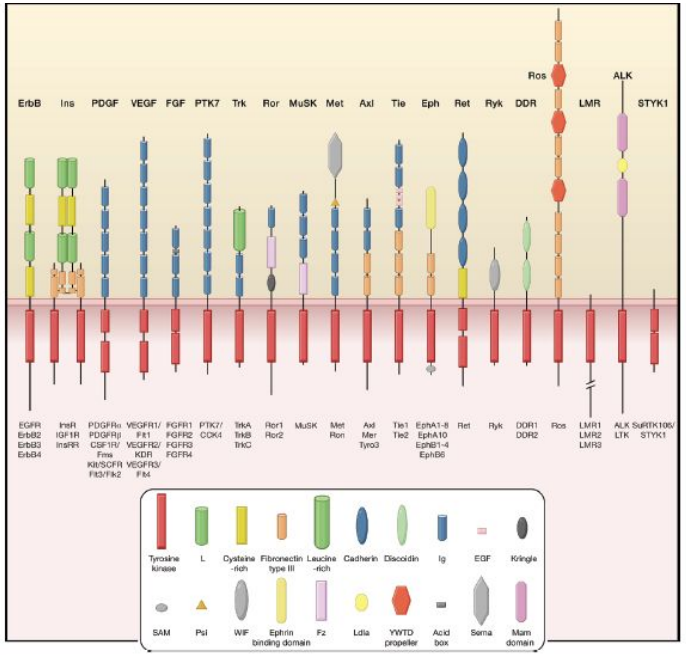
Клетка постоянно получает сигналы из внеклеточного пространства, передает их и формирует адекватный ответ. СТ-механизм основан на пост-трансляционных модификациях белков, где ключевую роль играет фосфорилирование:

MgATP + protein—OH= Protein—OPO_3 + MgADP

Эукариотическая клетка содержат большой набор киназ (у человека около 518) .

Характеристика RTKs

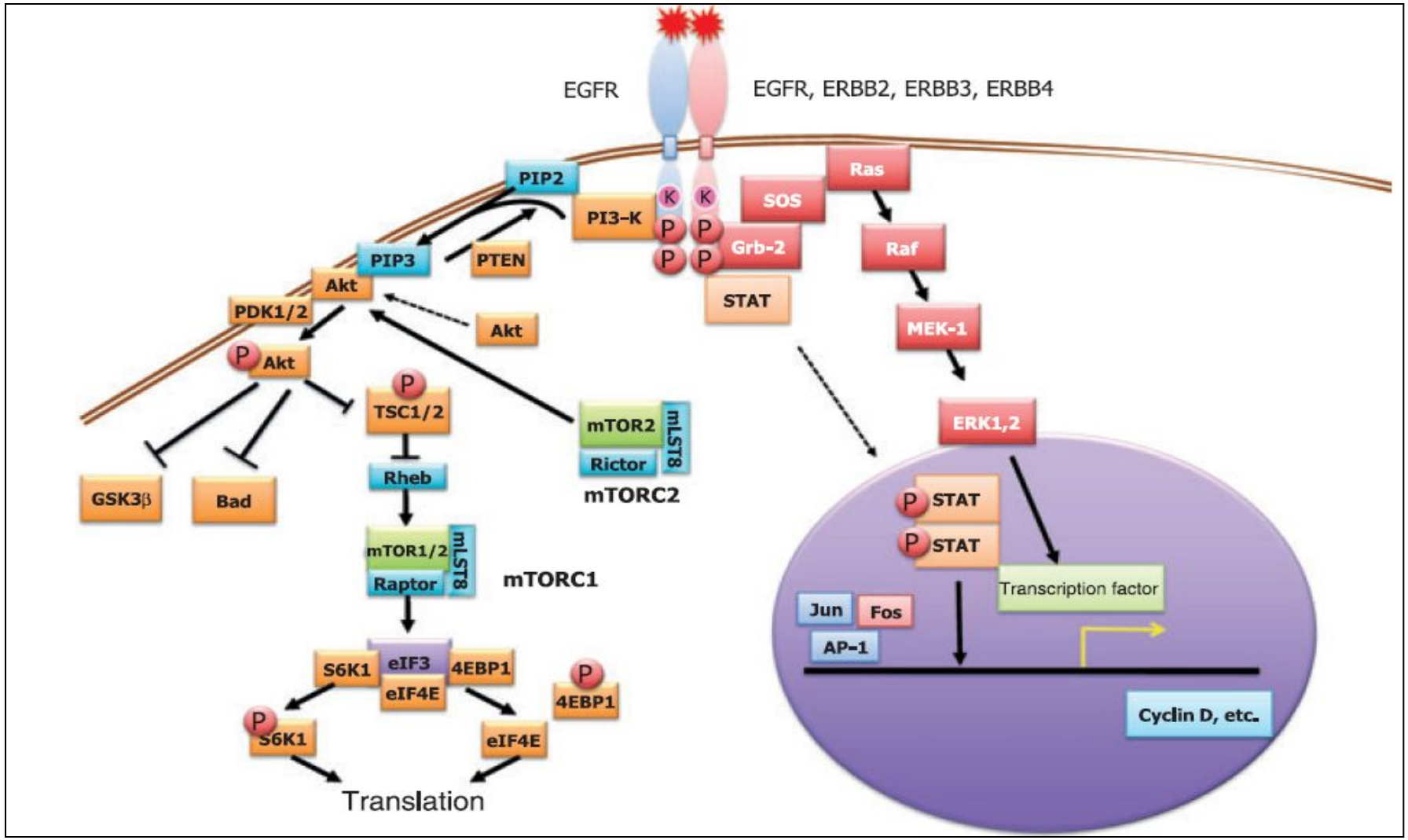
- **У человека идентифицировано 58 RTKs, которые подразделяются на 20 подсемейств**
- **Все рецепторы имеют сходную молекулярную архитектуру: внеклеточный лиганд-связывающий домен, одиночную трансмембранную спираль, цитоплазматический участок, который содержит тирозин-киназный домен и дополнительный С-терминальный участок и околомембранный регуляторный участок**



Семейство Epidermal growth factor receptor (EGFR)

- EGF был изолирован в1962 Stanley Cohen.
- Его взаимодействие с EGFR подтверждено в 1975.
- В 80-х установлено сходство EGFR с v-erbB (avian erythroblastosis virus)
- EGFR (также известен как ERBB1/HER1), ERBB2/HER2/NEU, ERBB3/HER3 и ERBB4/HER4.
- ERBB2, ERBB3 и ERBB4 показывают экстраклеточную гомологию
- относительно EGFR 44, 36 и 48%, соответственно, тогда как для тирозин-киназного домена - 82, 59 and 79%, соответственно.
- EGFR ген локализован на хромосоме 7p12-13 и кодирует
- 170kDa рецептор тирозин киназу.

Активируемые пути СТ



- Нарушение метаболизма и рецепции эстрогенов

Нарушение метаболизма эстрогенов запускает гормональный канцерогенез, образование злокачественной опухоли в гормонозависимой ткани

2 типа гормонального канцерогенеза

Промоторный

Рецептор-опосредованное взаимодействие

Генотоксический

Метаболическая активация эстрогенов, ДНК-аддукты

Промоторный тип канцерогенеза

Переэкспрессия (увеличение количества и активности) эстрогеновых рецепторов в клетках-мишенях

Нарушение рецепции ER

Изменение экспрессии ключевых генов-мишеней, участвующих в клеточном делении, дифференцировке и пр.

Переэкспрессия ER-α в нормальной ткани увеличивает чувствительность к эстрогенам, повышает риск возникновения гормонозависимой опухоли. Многочисленными исследованиями показано, что пролиферация и доля ER-α-позитивных клеток выше в трансформированной ткани, чем в нормальной ткани молочной железы. Кроме того, эстрогены стимулируют синтез факторов роста в ER-α-позитивных клеток, а это, в свою очередь, приводит к пролиферации близлежащих ER-α-негативных клеток.

ER-опосредованные сигналы

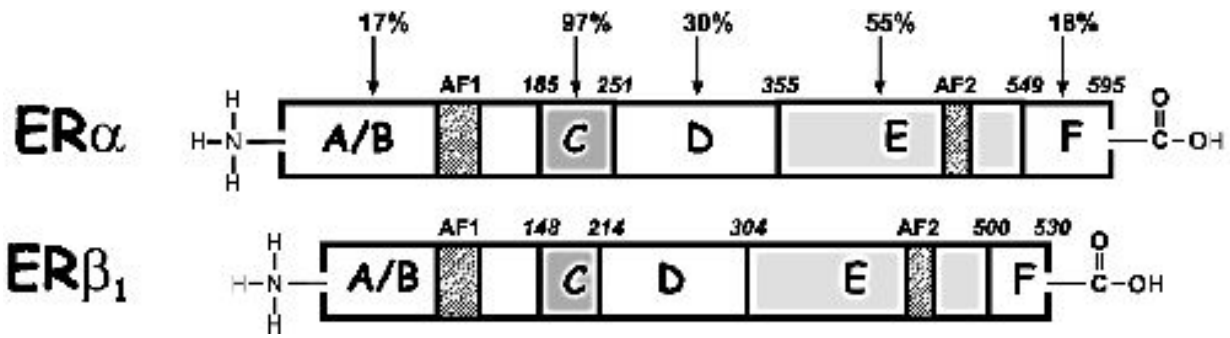
Эстрогены действуют через эстрогеновые рецепторы (ER, estrogen receptor). На настоящий момент известно два эстрогеновых рецептора, называемых ERα и ERβ. Оба эти рецептора принадлежат суперсемейству ядерных рецепторов.

Эстроген проникает в клетку

Связывается с эстрогеновым рецептором, **ER**

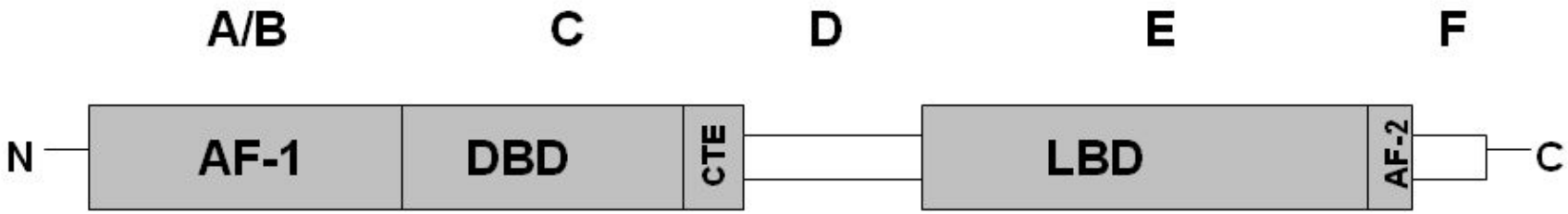
Рецептор приобретает активный статус, запускает различные геномные и негеномные процессы

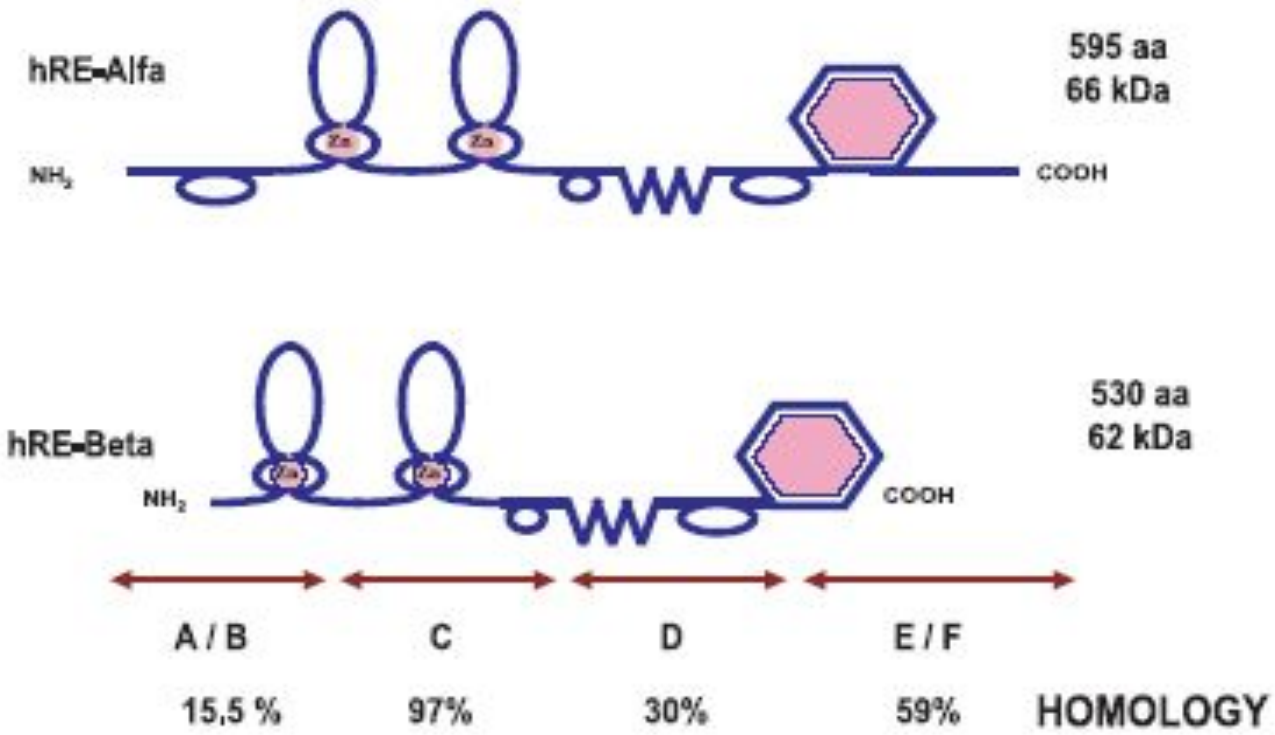
Доменная структура эстрогеновых рецепторов



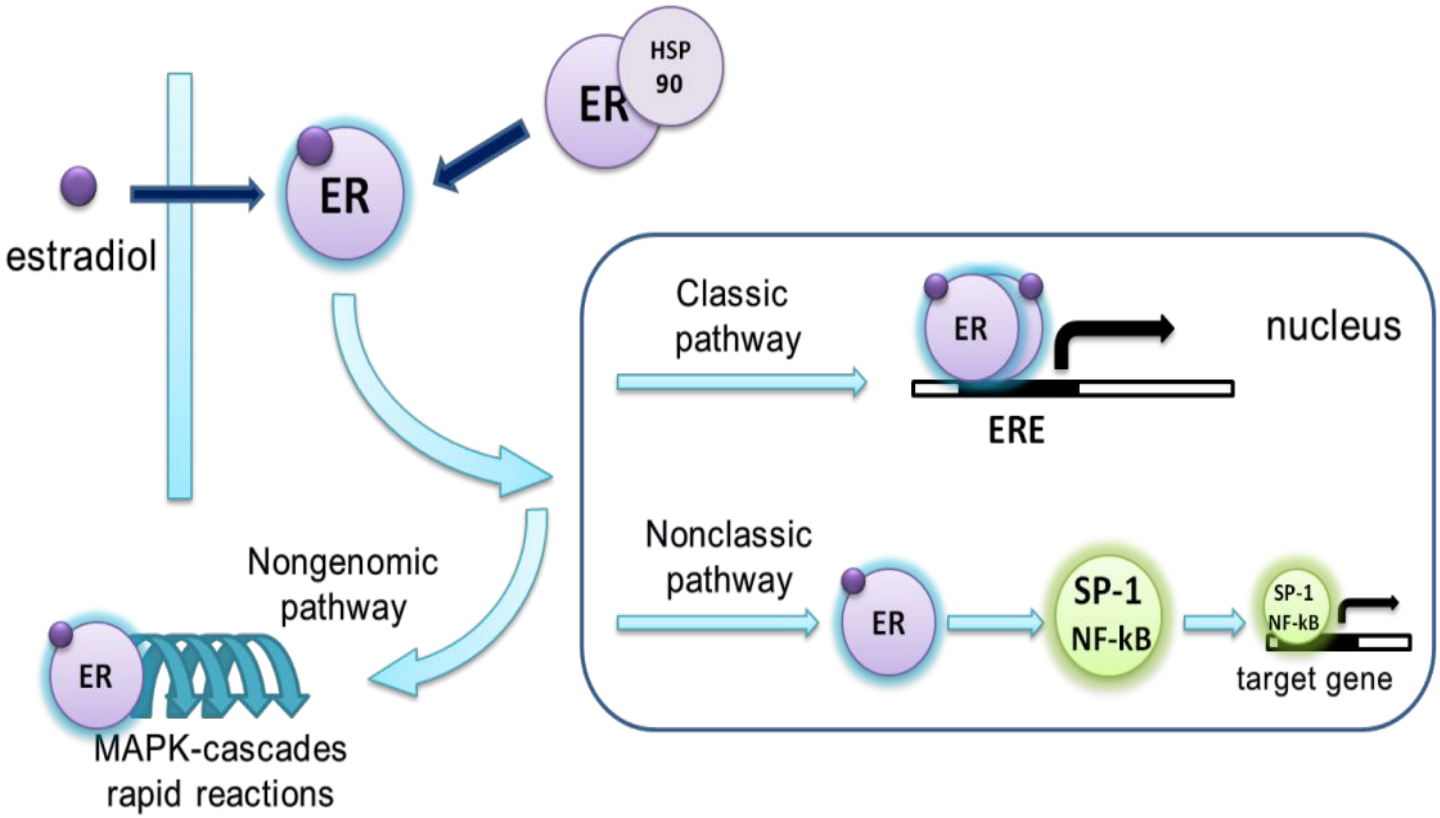
A/B – N-(амино) терминальный домен
C – ДНК-связывающий домен
D – соединяющий домен
E – лиганд-связывающий домен
F – C-терминальный домен

Структура эстрогенового рецептора

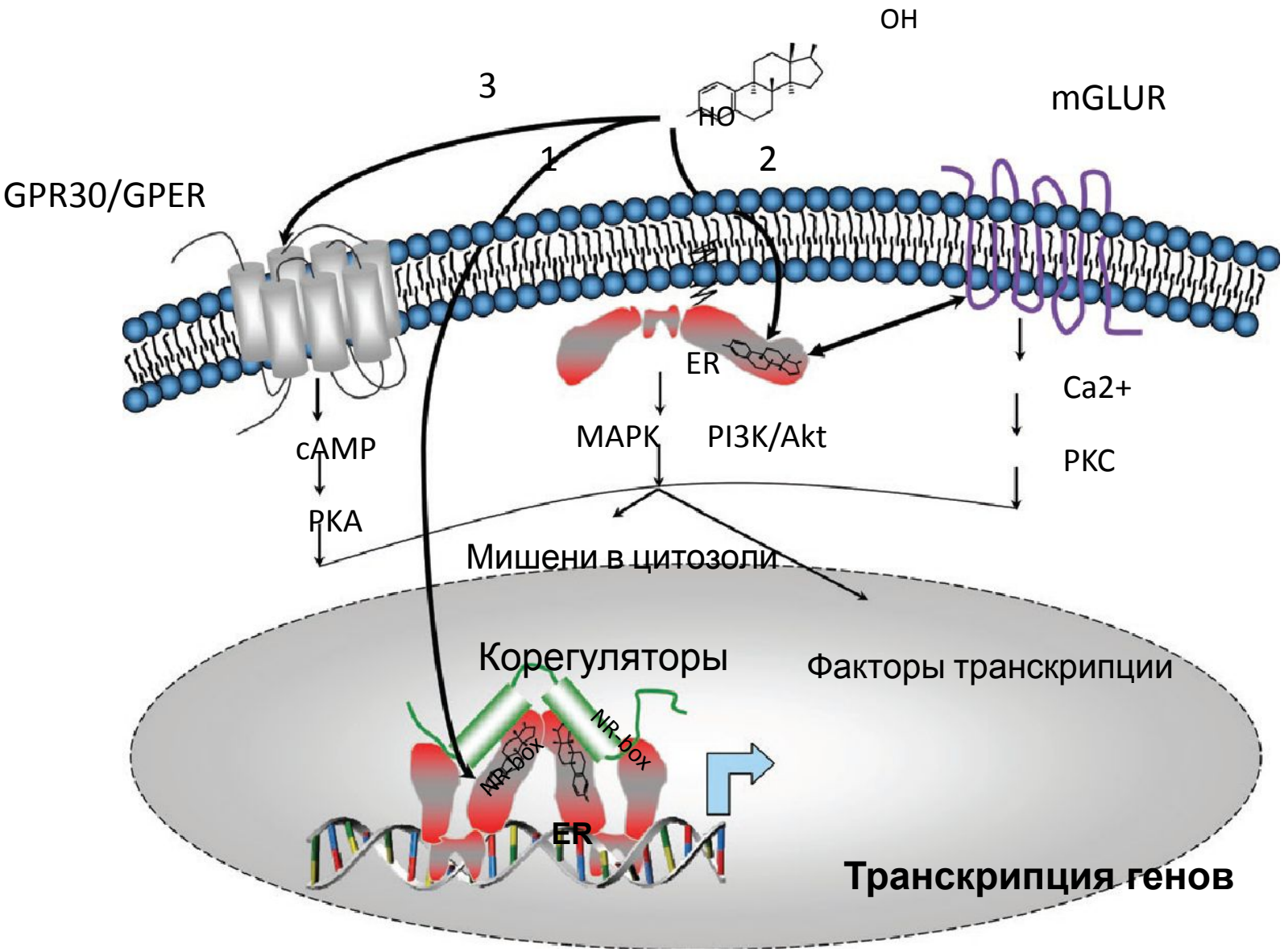


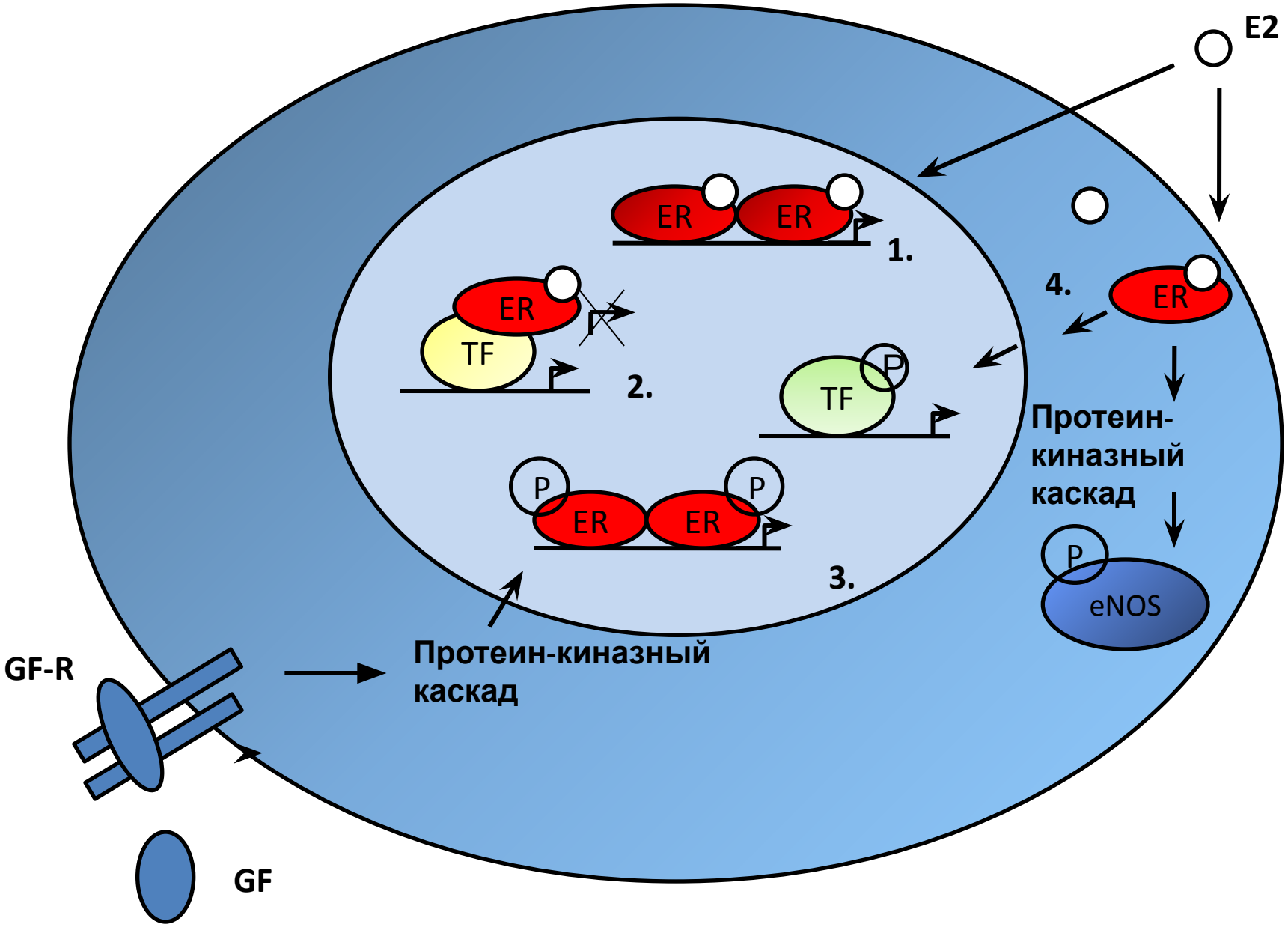


Стимуляция ER-сигнального пути эстрадиолом (E2)

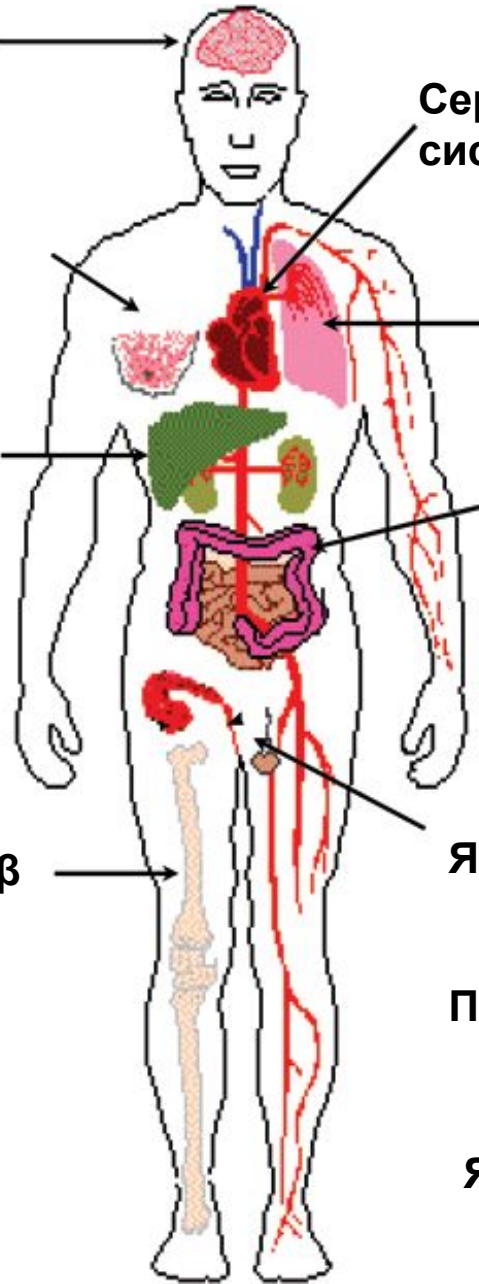


Модель действия эстрогенов




E2
ER
ER
1.
ER
TF
2.
TF
P
P
ER
ER
P
3.
4.
ER
Протеин-
киназный
каскад
P
eNOS
GF-R
Протеин-киназный
каскад
GF

Распределение эстрогеновых рецепторов в организме человека



Центральная нервная система ERα, ERβ

Сердечнососудистая система ERα, ERβ

Молочные железы ERα, ERβ

Легкие ERβ

Печень ERα

Пищеварительный тракт ERβ

Урогенитальный тракт ERα, ERβ

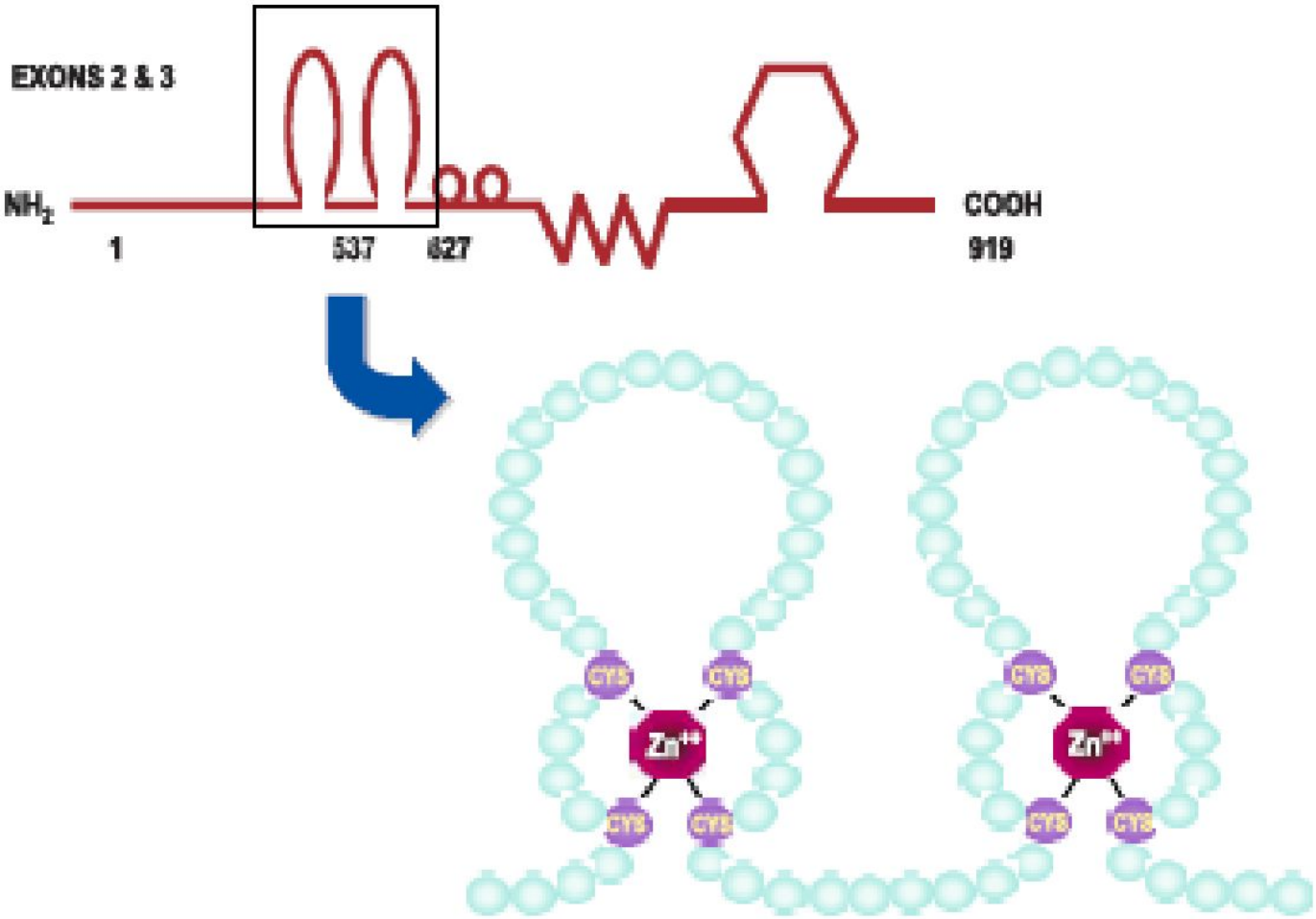
Яичники → гранулезные клетки ERβ; тека клетки ERα

Кость ERα, ERβ

Простата → эпителий ERβ; строма ERα

Яички → Клетки Лейдига ERα

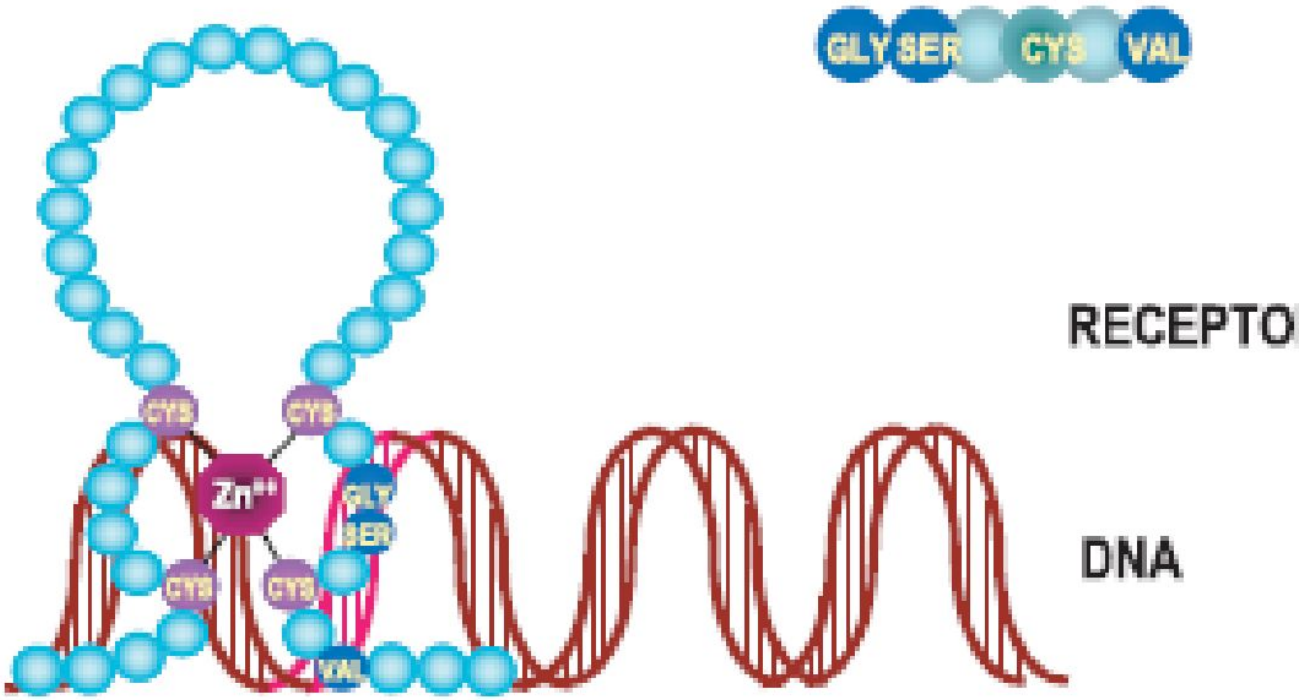
Строение ДНК-связывающего домена



Взаимодействие рецептора с ERE

5’-AGAACAnnnTGTTCT-3’ развернутые повторы

5’-AGGTCAnnnAGGTCA-3’ прямые повторы



Гены мишени эстрогеновых рецепторов

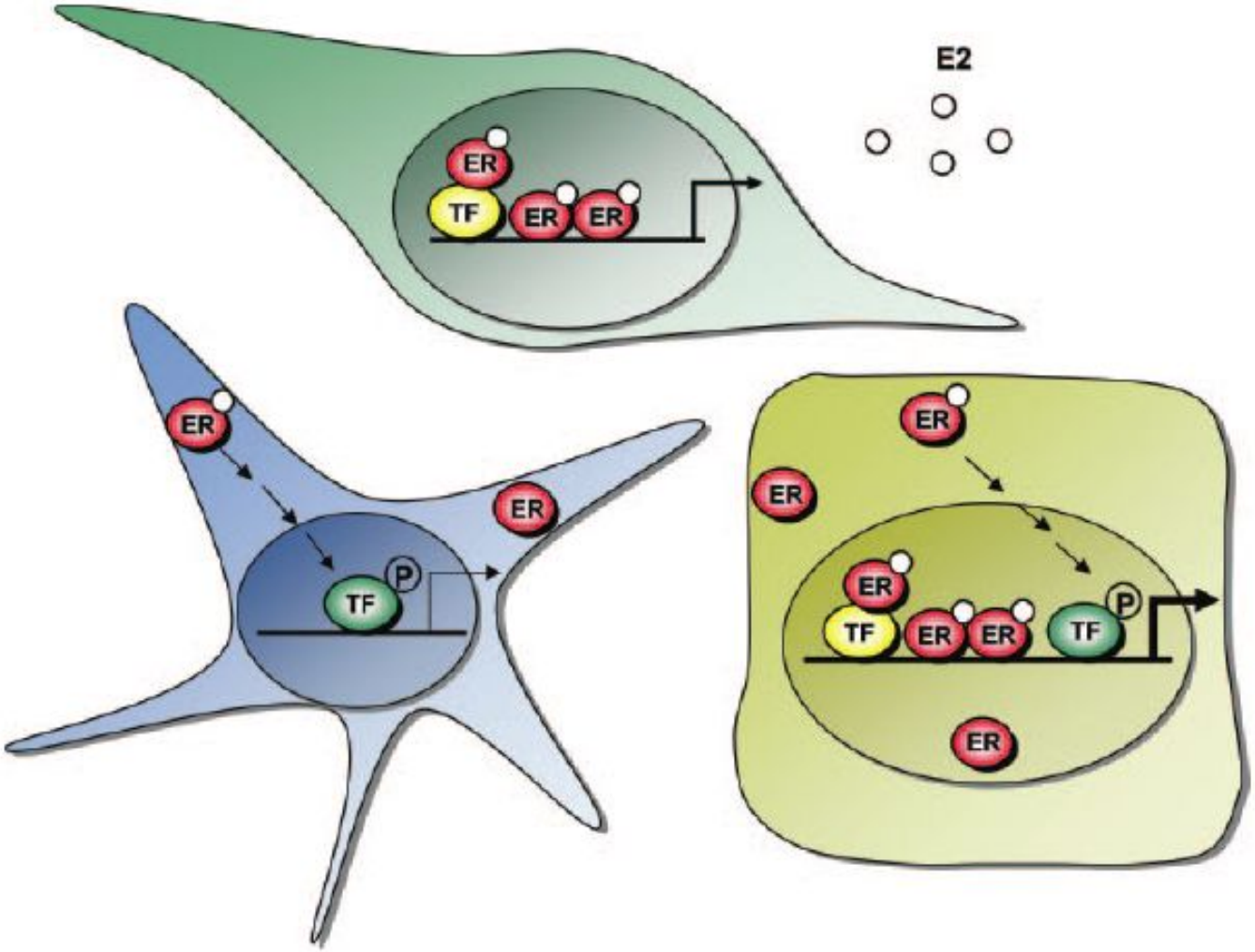
Активация

1. **Коллагеназа**
2. **Человеческий инсулиновый фактор роста 1**
3. **Ген кальцитонина**

Супрессия

1. Ген холин-ацетилтрансферазы
2. Липопротеин липазный ген
3. Ген фолликулостимулирующего гормона
4. Ген хинолон редуктазы (окисляя хинолоны снижает генерацию свободных радикалов и, тем самым, принимает участие в защитных антиоксидантных реакциях)

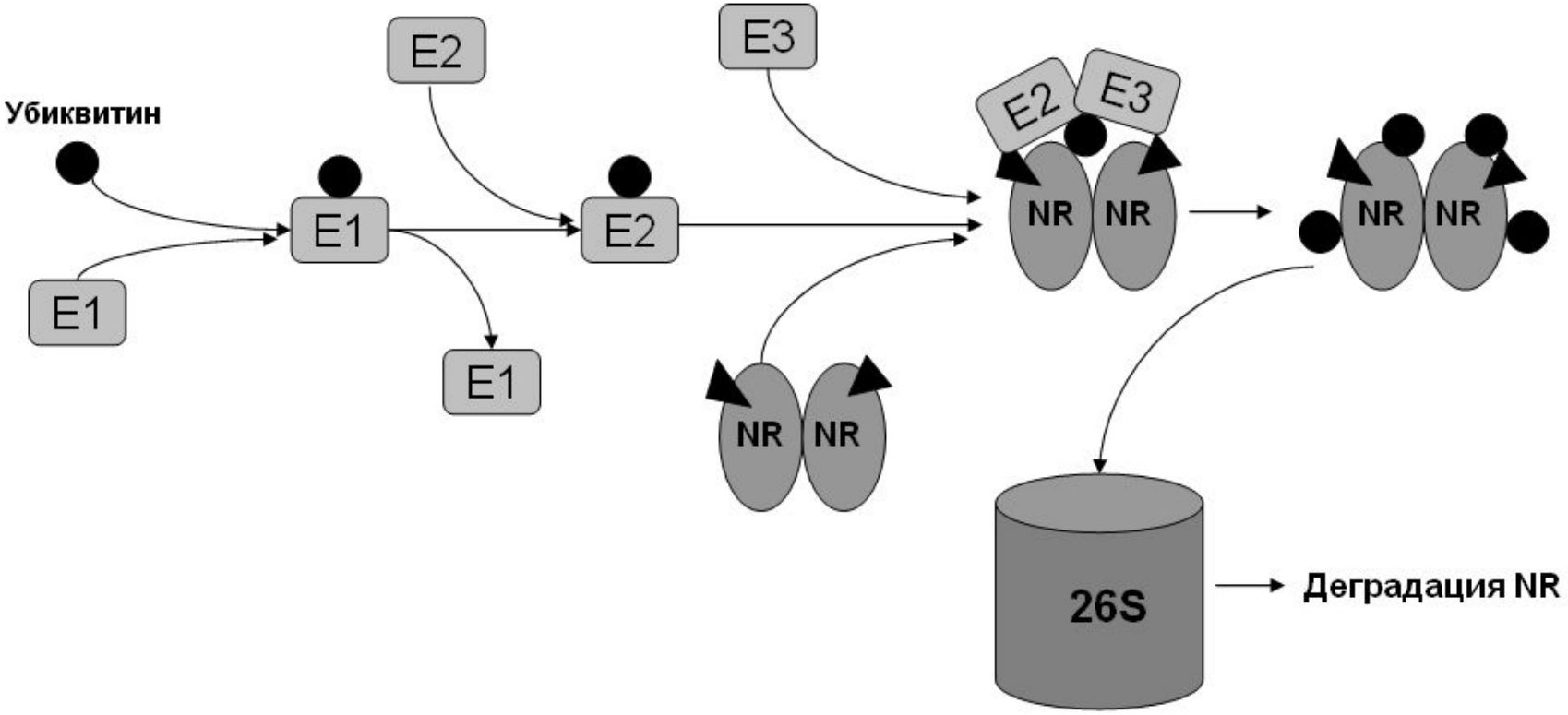
Схематическая иллюстрация регуляции транскрипции ERs в различных клетках



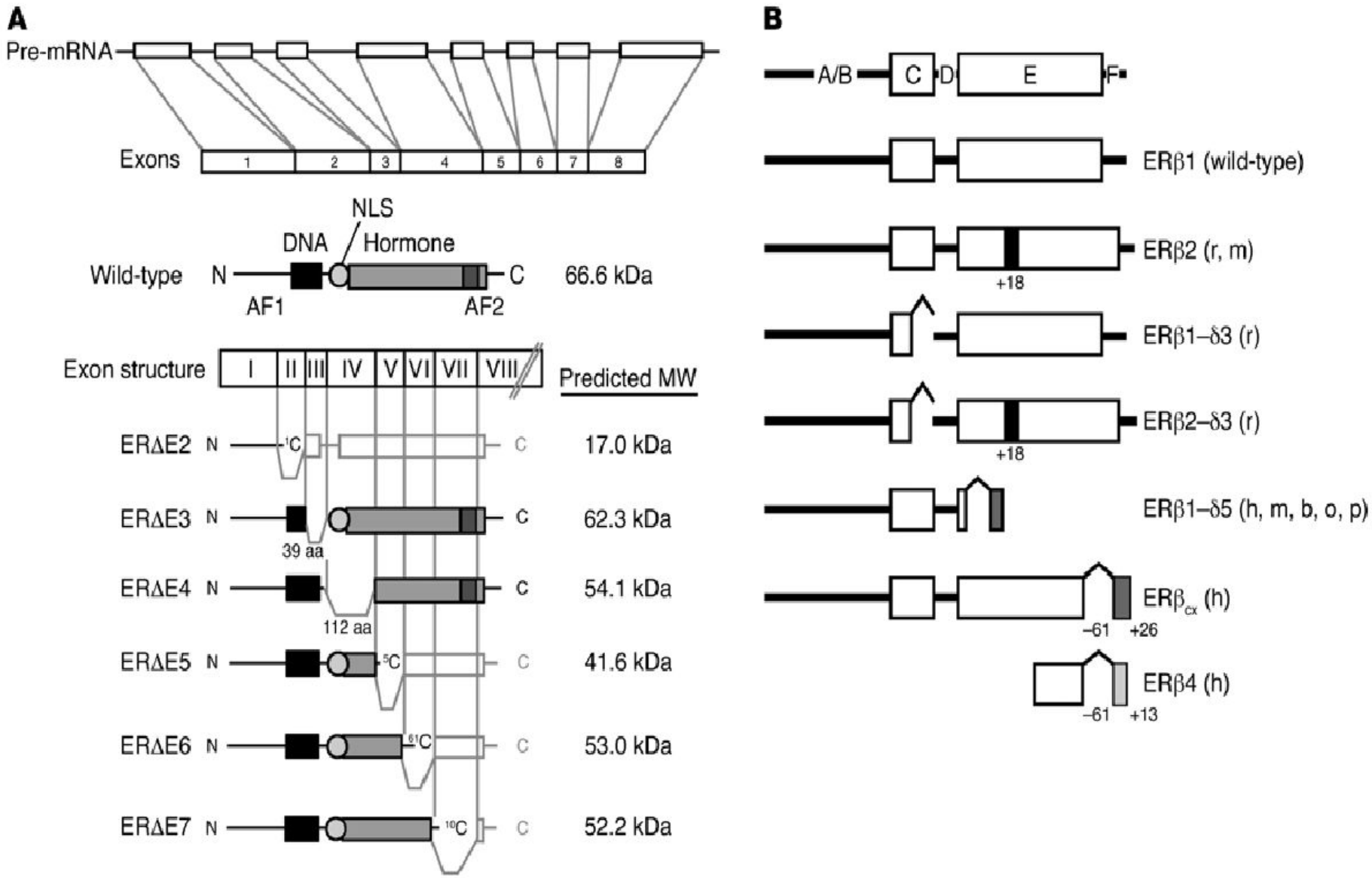
Научная проблема:

- Почему повышается количество ERальфа?
- Почему повышается его транскрипционная активность?
- **<u>Возможные причины:</u>**
- 1. Увеличение количества лиганда (эстрадиола и ксеноэстрогенов)
- 2. Амплификация гена (показано для РМЖ)
- 3. Нарушение регуляции, роль коактиваторов, роль miRs

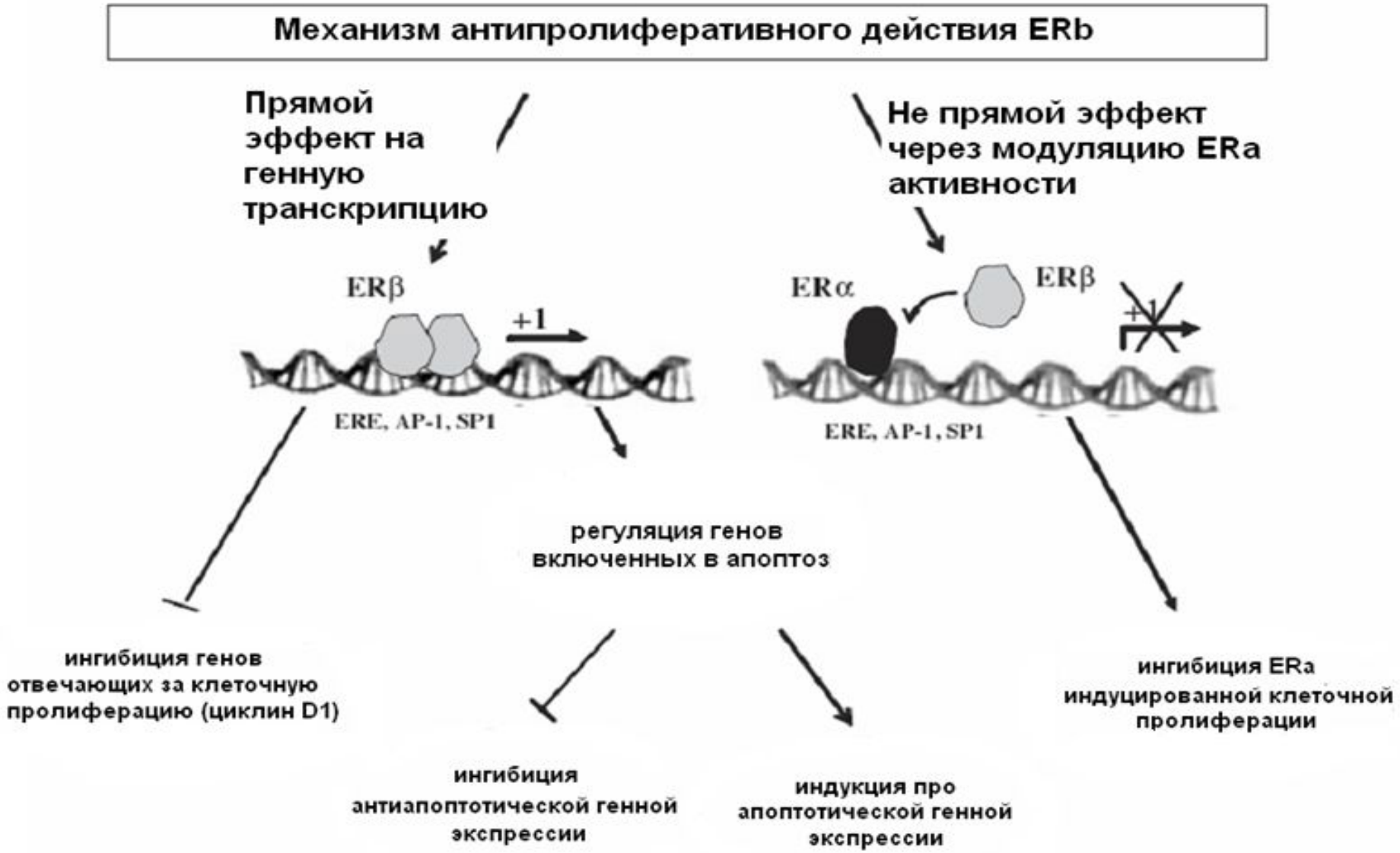
ВЫКЛЮЧЕНИЕ ЯДЕРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ



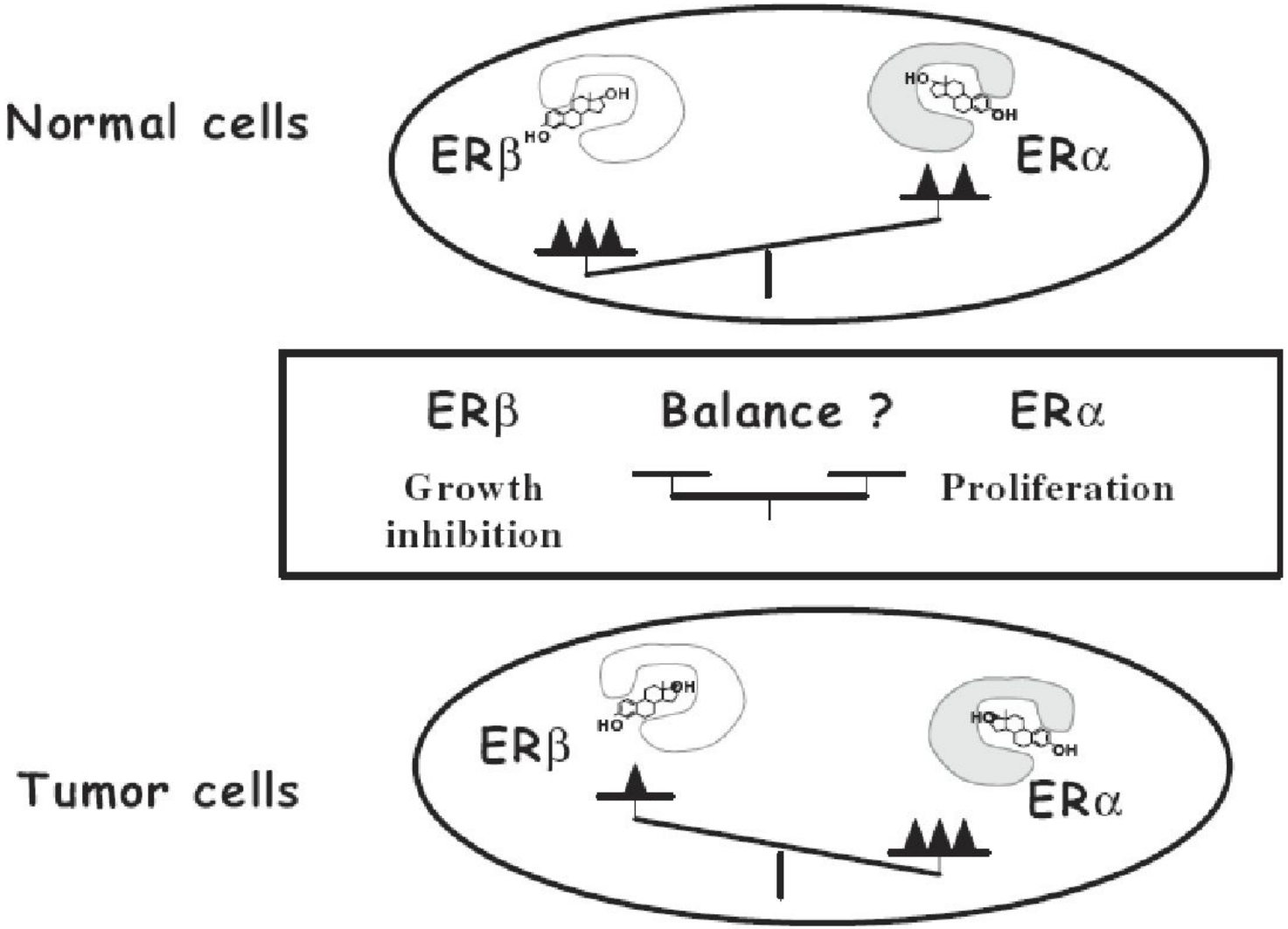
Загадки ГК: Сплайсированные варианты эстрогеновых рецепторов



Гипотетическая модель действия ERb на пути клеточной пролиферации



Схематическое изображение нарушения равновесия ERa и ERb при гормональном канцерогенезе



Аффинность лигандов к ERs (мкМ)

Лиганды	**ERα**	**ERβ**
эстрадиол	100	100
4-OH-Тамоксифен	257	232
диэтилстилбестрол	236	221
Genistein	4	87
Liquiritigenin	ND	ND
DPN	0.25	18
ERB-041	0.27	67

Генотоксический тип канцерогенеза

Деградация эстрогенов в общих чертах представляет из себя деградацию ксенобиотиков – ключевую роль играют цитохромы P450, проводящие окислительное гидроксилирование. Продукты гидроксилирования могут быть очень реакционноспособными. Потом наступает стадия коньюгации, к гидроксилированному стероиду присоединяется специальная группа (например, PAPS), резко увеличивающая его гидрофильность и способствующая выводу продукта из организма.

Схема деградации эстрогенов

Причины нарушения баланса E2

Переэкспрессия (увеличение количества и активности) цитохромов **P450**

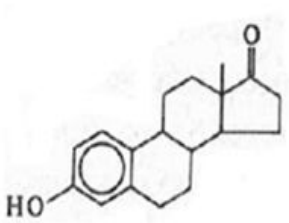
Высокая концентрация эстрогенов в крови

Нарушения во 2-й стадии метаболизма, утилизации высокореакционн ых соединений

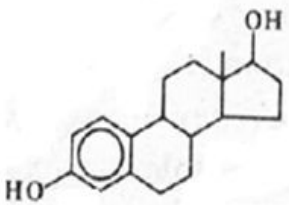
Образование большого числа продуктов 1-й стадии метаболизма, высокореакционных и способных образовывать аддукты с ДНК

- Ксеноэстрогены и рецептор-опосредованный механизм

DDT – потенциальный ксеноэстроген

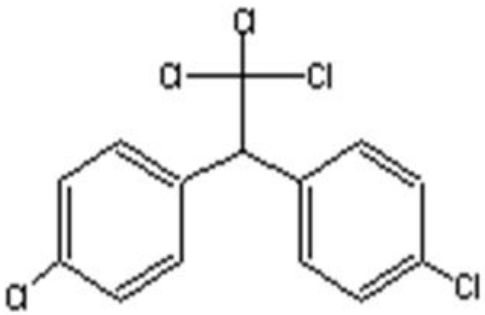


Estron

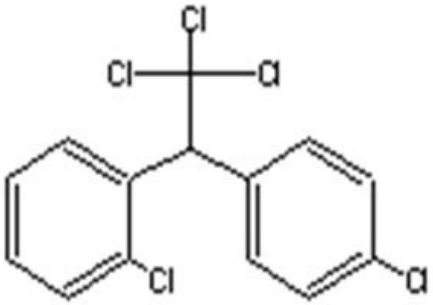


Эстрадиол

Estradiol



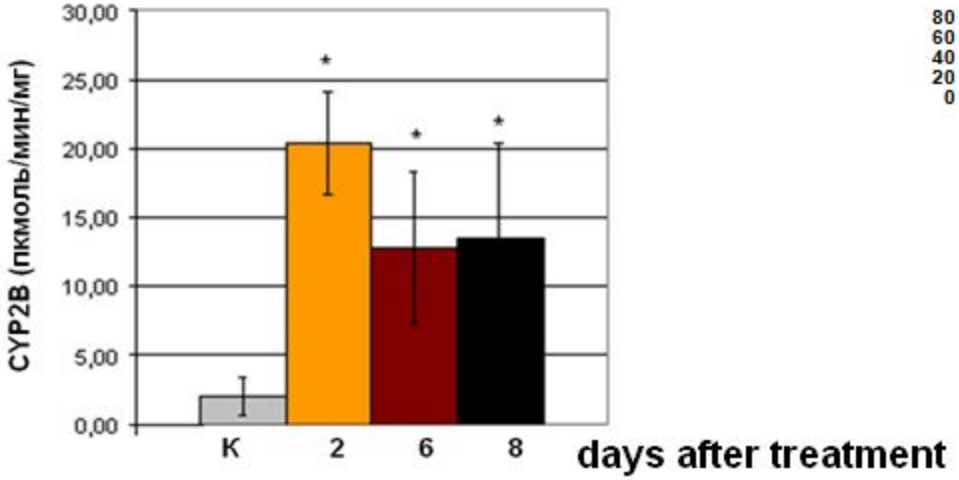
p,p'-DDT

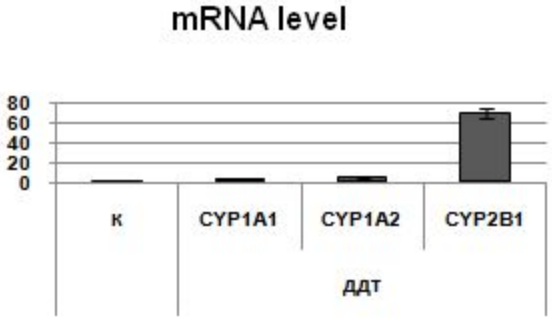


o,p-DDT

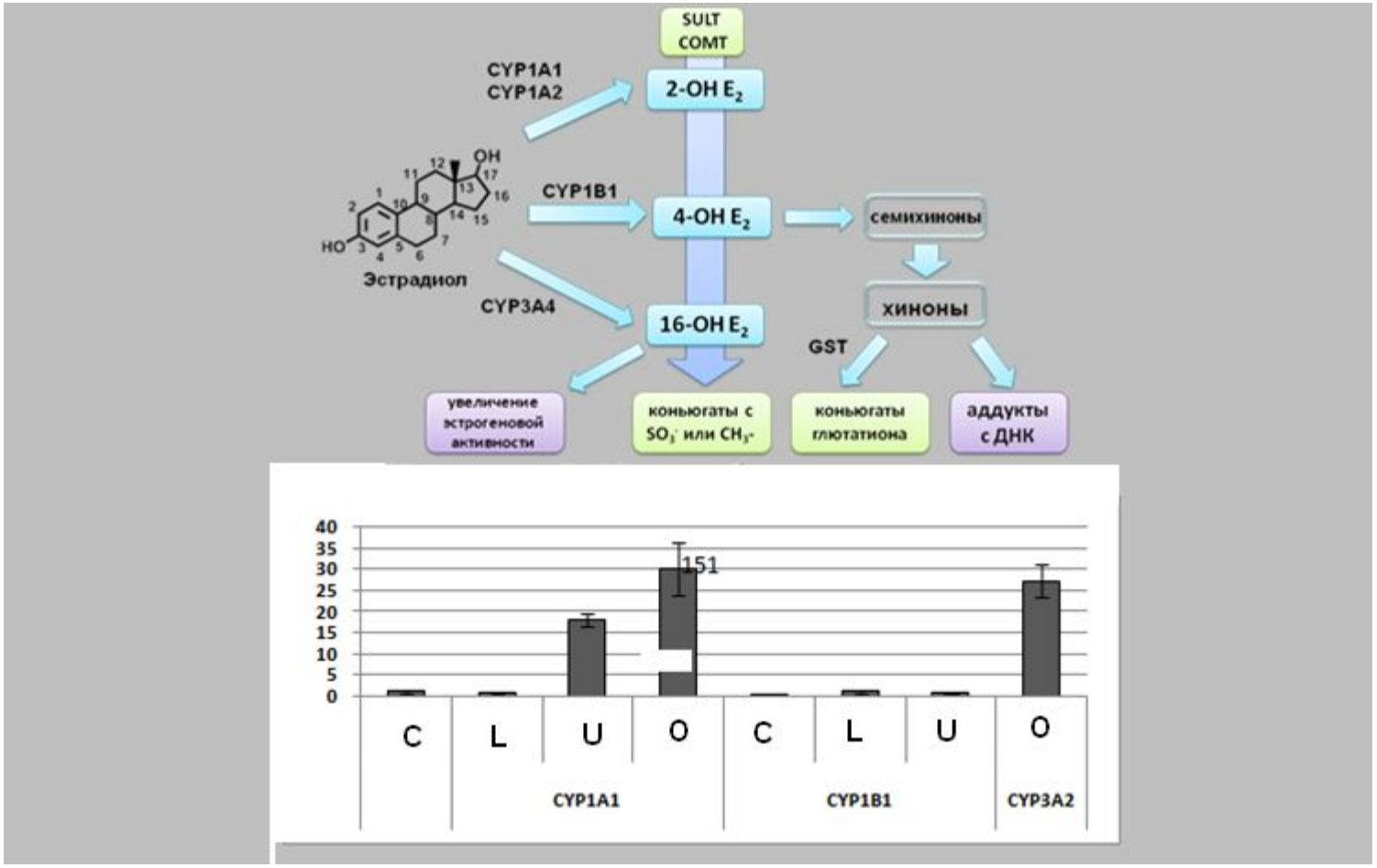
p,p′–DDT и *o,p′*-DDT *in vitro* *связываются с*AR. *o,p′*-DDT *in vitro* *связываются с* ER крыс.

DDT индуктор CYP2B в печени крыс

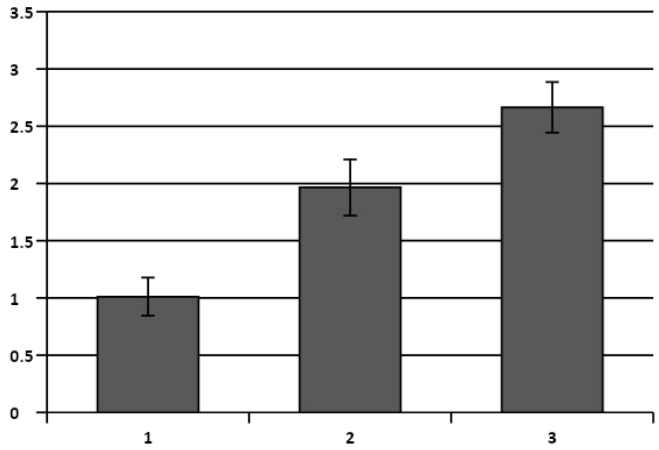




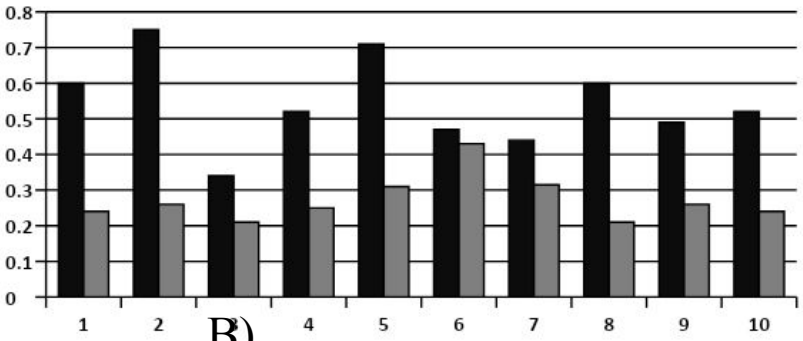
CYP1A1/2, CYP1B1 и CYP3A в метаболизме эстрогенов. Эффект ДДТ



Экспрессия CYP19 (Aromatase)



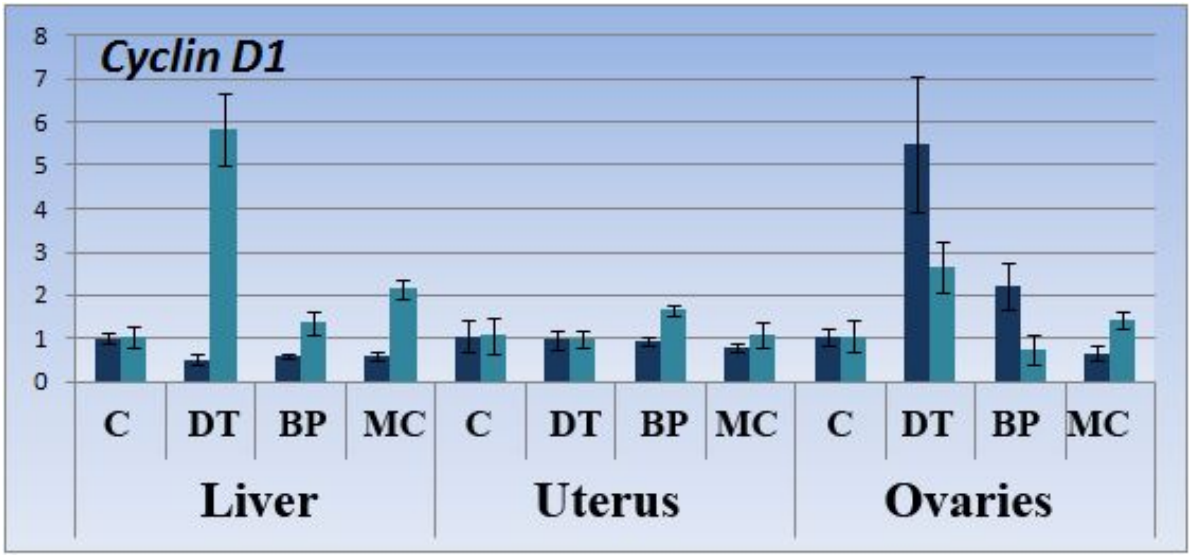
A).

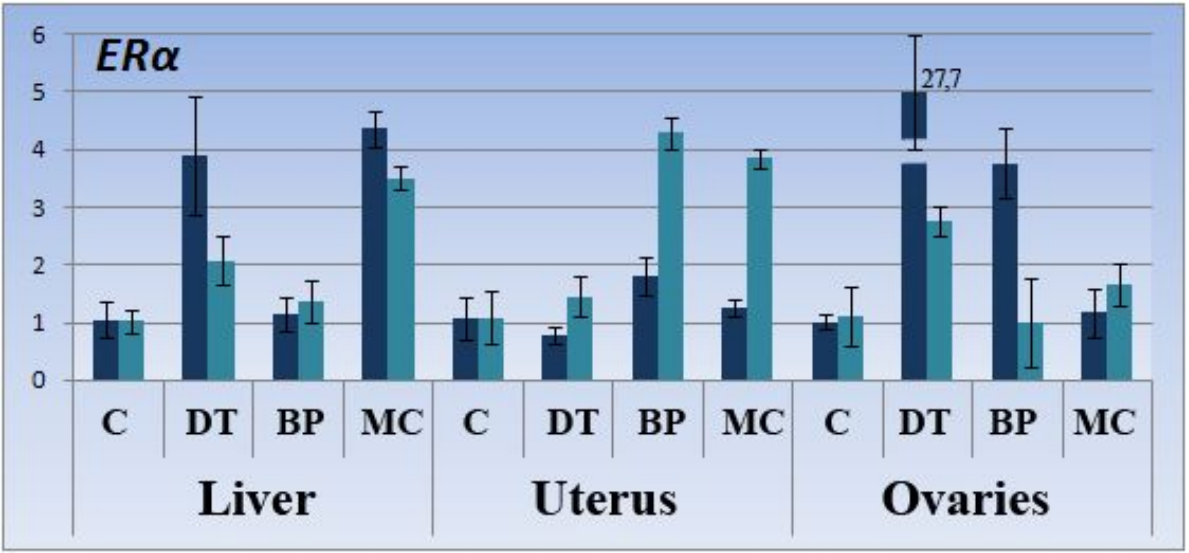


B).

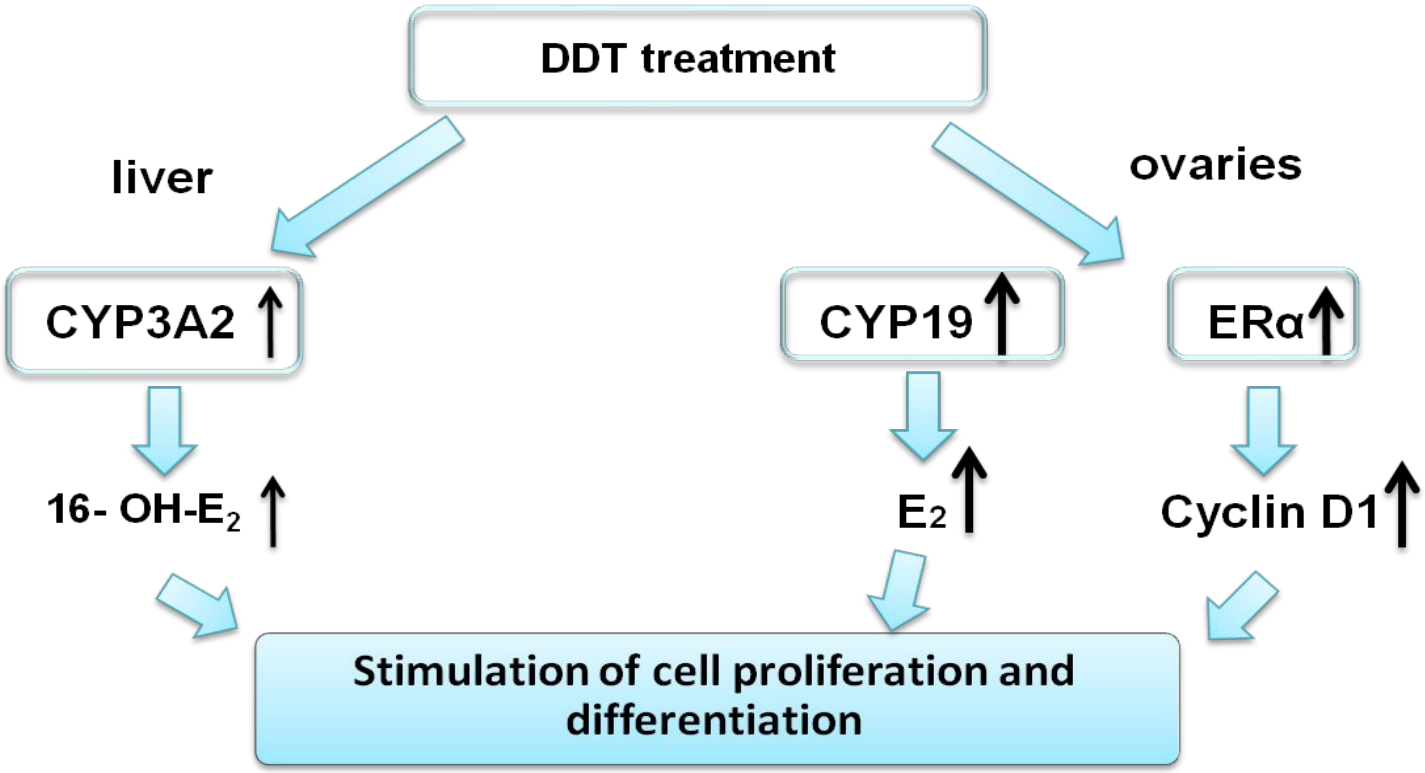
A). Экспрессия *CYP19* в матке и яичниках крыс, обработанных ДДТ В*)* Экспрессия *CYP19* в образцах РМЖ (черный цвет) в сравнении с контролем (серый цвет).

Экспрессия генов *Erα* и *CyclinD1*

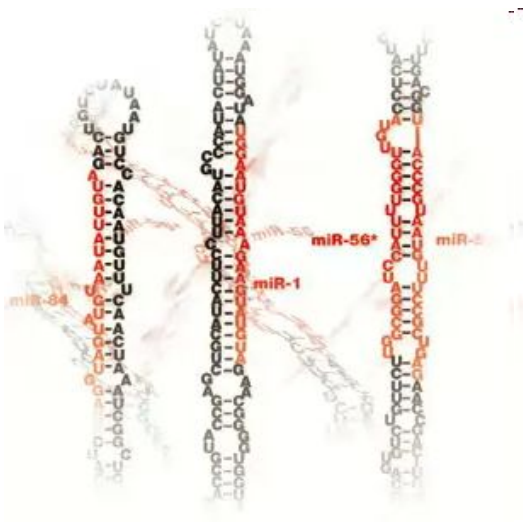


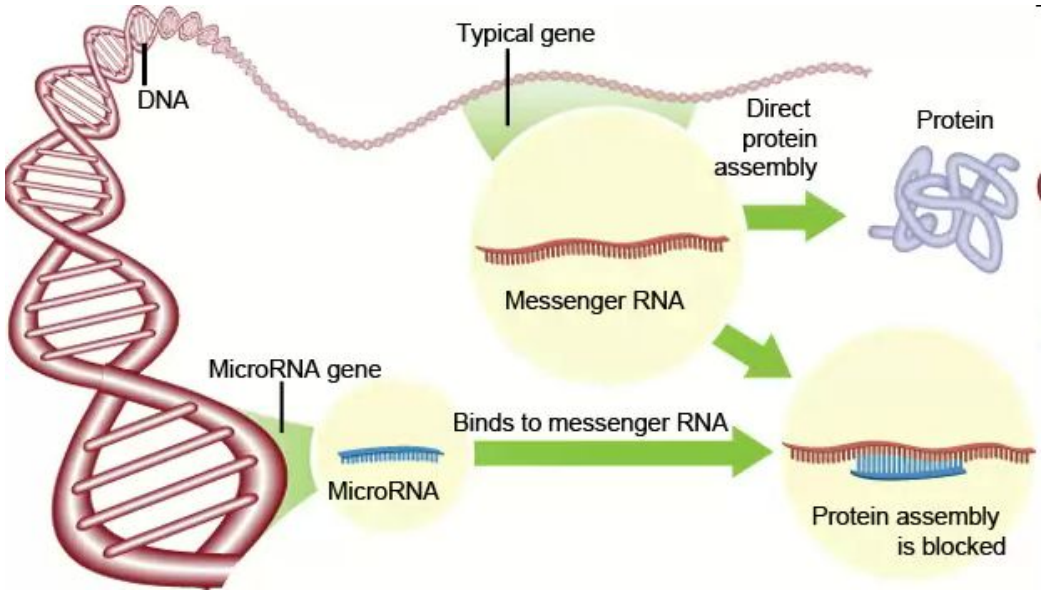


Предполагаемый механизм действия DDT



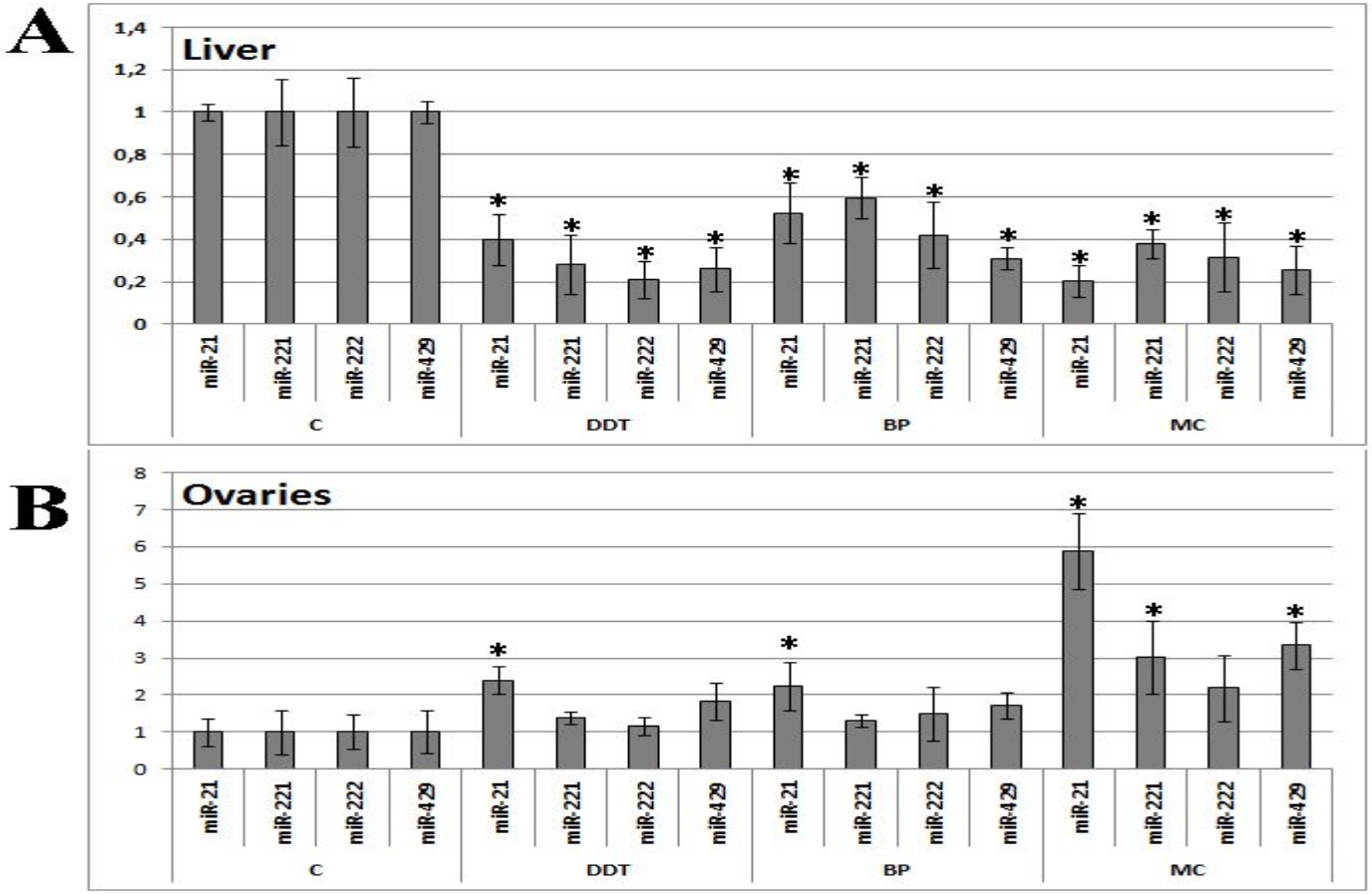
МикроРНК в гормональном канцерогенезе





- **МикроРНК- малые некодирующие РНК длиной 19-23 нуклеотида.**
- **Регулируют экспрессию более, чем 1/3 генов человека.**
- **Для каждого типа опухоли своя специфичная картина экспрессии микроРНК.**

Эффекты DDT, BP, and MC на экспрессию miR-21/221/222/429 в печени(A) и яичников (B) самок крыс Вистар



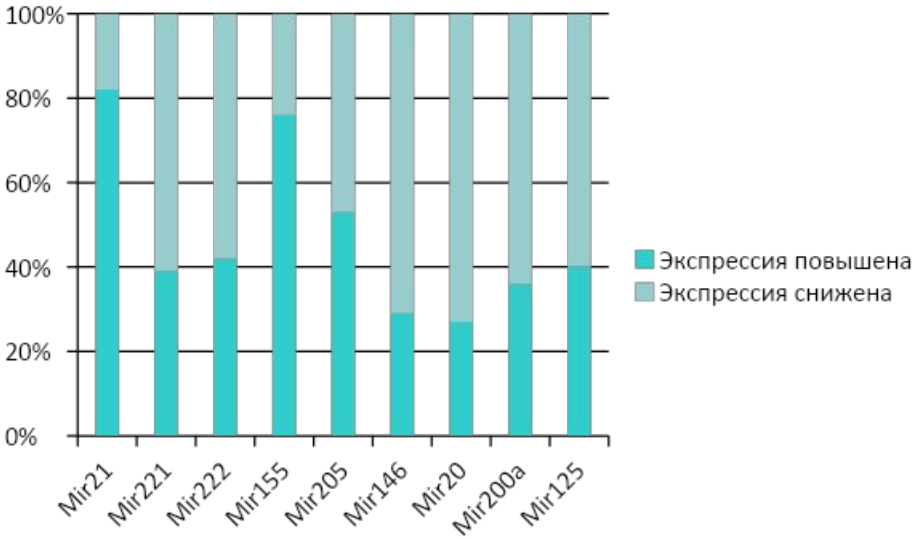
Chanyshev MD, Kosorotikov NI, Titov SE, Kolesnikov NN, Gulyaeva LF.
Life Sci. 2014 May 17;103(2):95-100. doi: 10.1016/j.lfs.2014.03.031. Epub 2014 Apr 12.
Expression of microRNAs, CYP1A1 and CYP2B1 in the livers and ovaries of female rats treated with DDT and PAHs.

Экспрессия miR в фиброаденоме МЖ и РМЖ

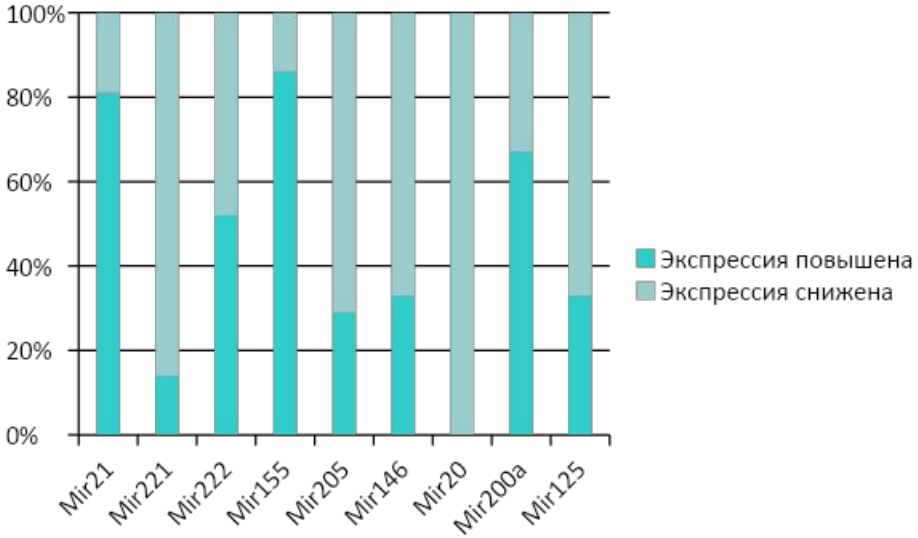
Patients	n	Increased/decreased levels (folds)				
		miR-21	miR-155	miR-221	miR-222	miR-205
BC	18	↑10*	↑20	↑15	↑15	↓15-20
FAMG	8	↑↓	↑↓	↑↓	↑↓	↑10

Профиль экспрессии МикроРНК в образцах РМЖ

Без НАТ



После НАТ



- Таргетная гормональная терапия опухолей

Маркеры рака молочной железы

Маркер	Нарушения	Встречаемость (%)
Рецепторы ER и PR	Увеличение содержания (амплификация гена и др.)	До 70
Рецептор ERBB2/HER2	Амплификация гена	20-30
Ki-67 антиген	Показатель пролиферации	34,9% (колебания от 1 до 90%.)
p53	Повреждение гена*TP53* или Пост-трансляционные нарушения	До 50
BRCA1 или BRCA2	Делеции в гене	До 10
Кандидатные маркеры:		
Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), caveolin, Growth Factors: EGF, HGF, IGF, VEGF, and TGF-β		

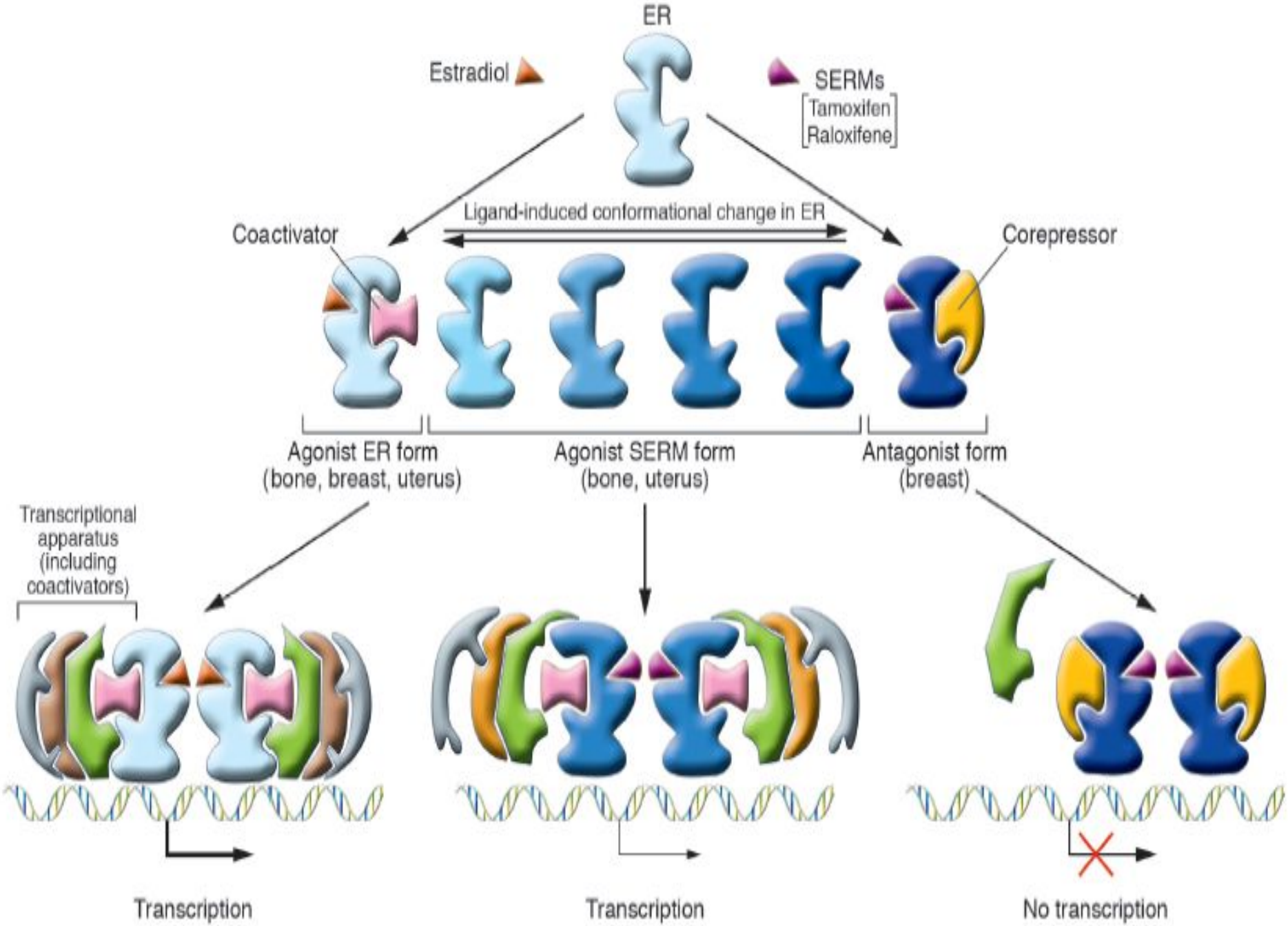
Маркеры рака эндометрия

Характеристика	Type I (EEC)	Type II (NEEC)
Зависимость от эстрогенов	Да	Нет
Состояние эндометрия	Гиперплазия	Атрофия
Морфология	Эндометриодная клетки	Серозная светлоклеточная карцинома
Микросателлитная нестабильность	20–40%	0–5%
Мутации в гене p53	10–20%	90%
Мутации в β-катенине	31–47%	0–3%
Мутации в K-ras	15–30%	0–5%
Инактивация PTEN	35–50%	10%
Активация HER2/neu	Нет информации	18–80%

Стратегия в лечении РМЖ

Гормональная терапия РМЖ

- Проблема: Поиск эффективных ингибиторов ERα (SERM)


ER
Estradiol
SERMs
[Tamoxifen
Raloxifene]
Ligand-induced conformational change in ER
Coactivator
Corepressor
Agonist ER form
(bone, breast, uterus)
Agonist SERM form
(bone, uterus)
Antagonist form
(breast)
Transcriptional
apparatus
(including
coactivators)
Transcription
Transcription
No transcription

- **Моделирование взаимодействия лигандов с ERs в экспериментах *in vivo***

Эксперименты *in vivo* с самками здоровых крыс

Инъекции в течение 10 суток:
3 крысы – подсолнечное масло
3 крысы – эстрадиол
3 крысы - тамоксифен

Извлечение тканей

36 образцов тканей (печень, яичники, матка, молочные железы)

Гомогенизация тканей

Выделение мРНК

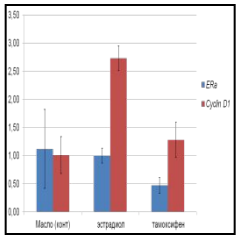
36 мРНК

Реверти-рование

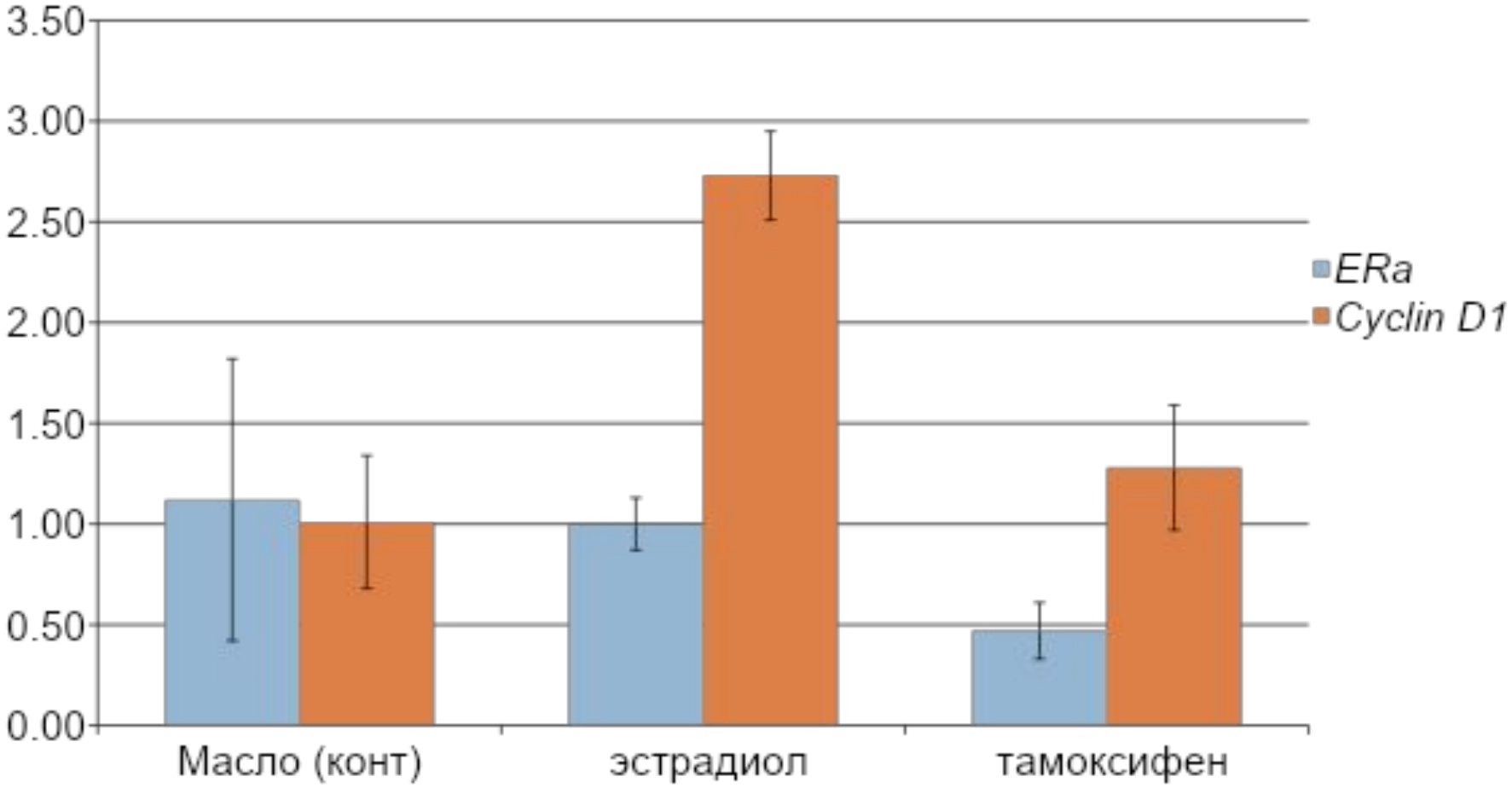
36 кДНК

ОТ-ПЦР анализ: 324 образца

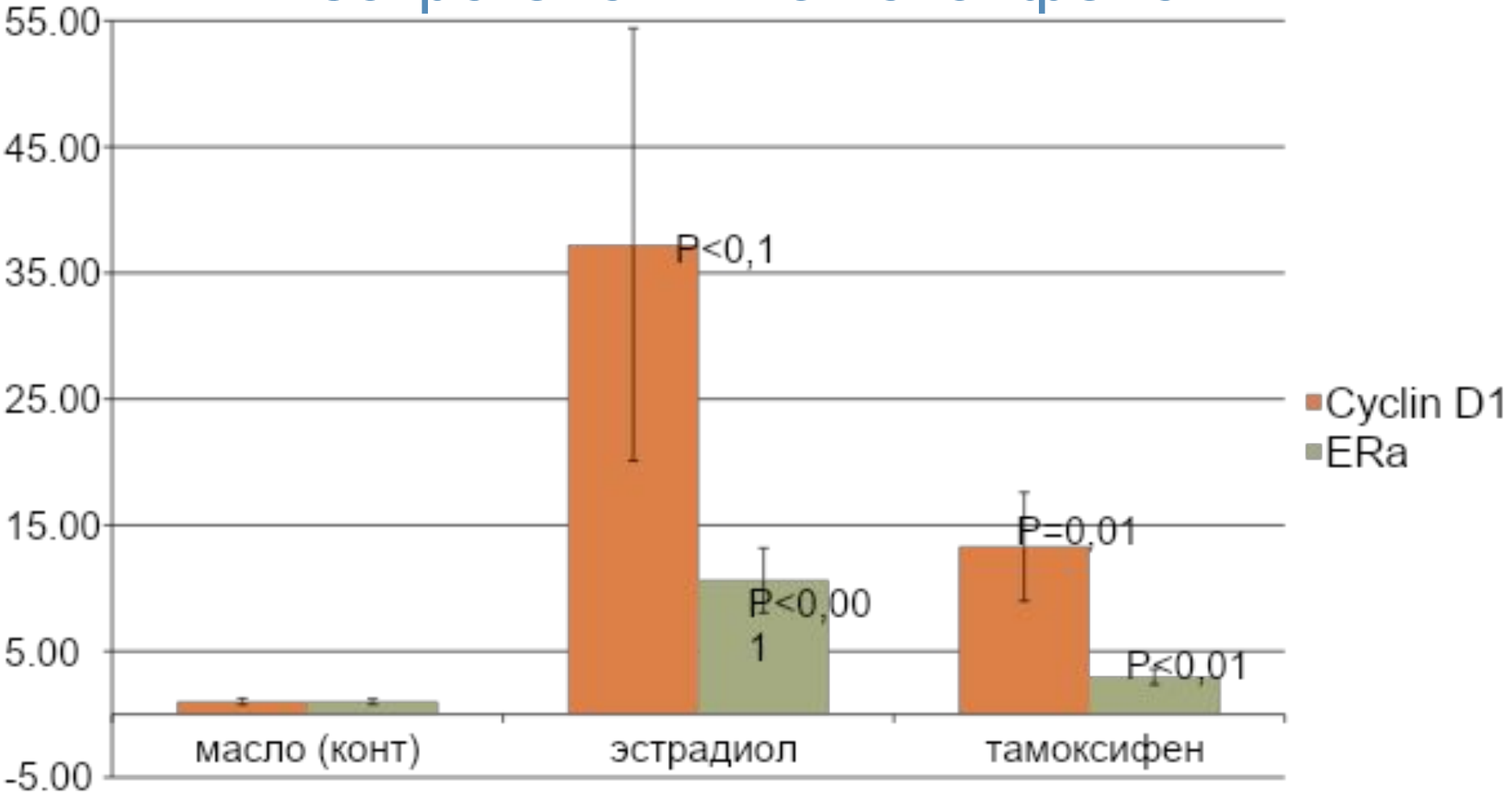
Обсчет результатов анализа



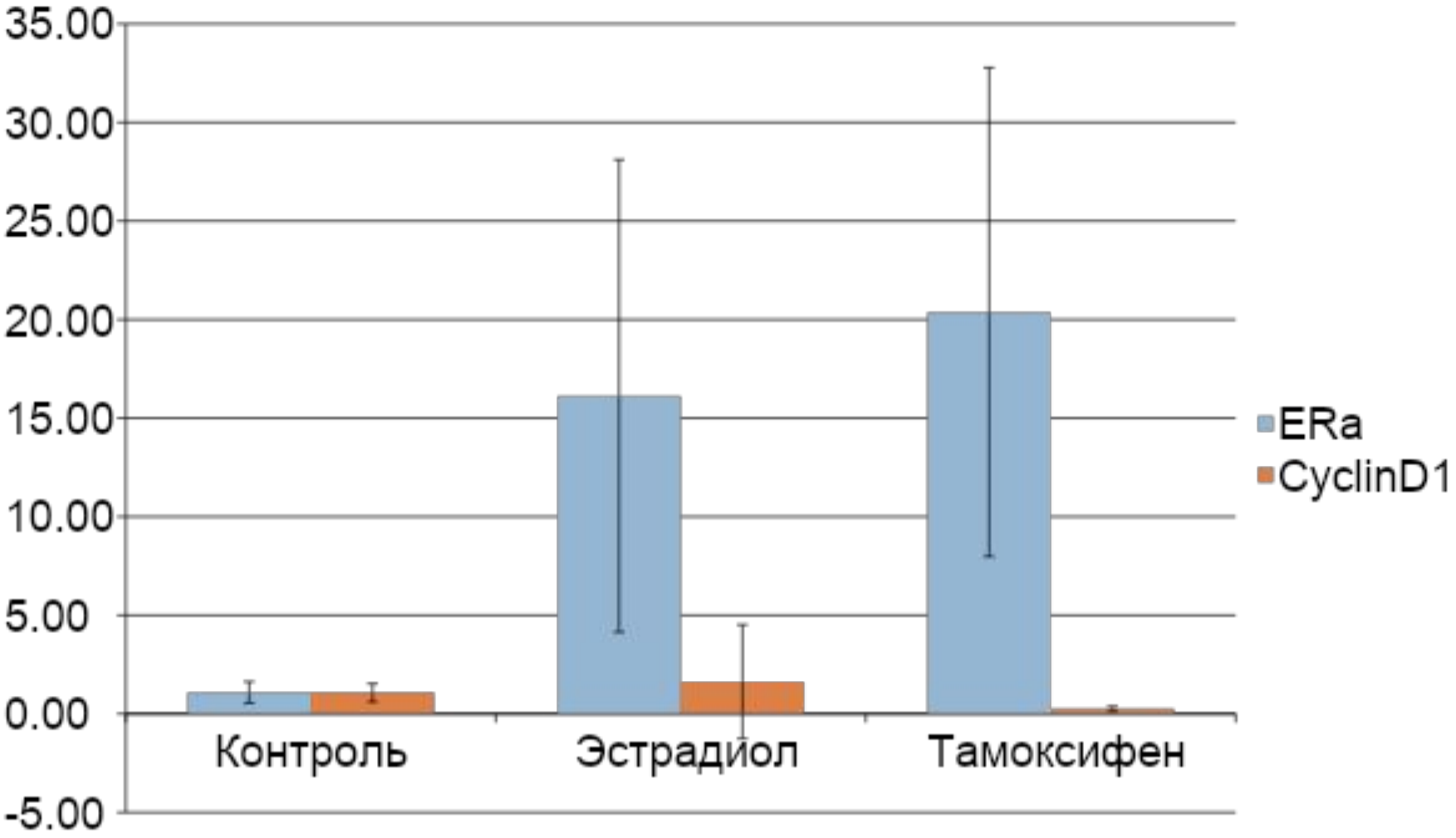
Экспрессия генов *cyclin D1* и *ER-α* в молочных железах крыс, обработанных эстрадиолом и тамоксифеном



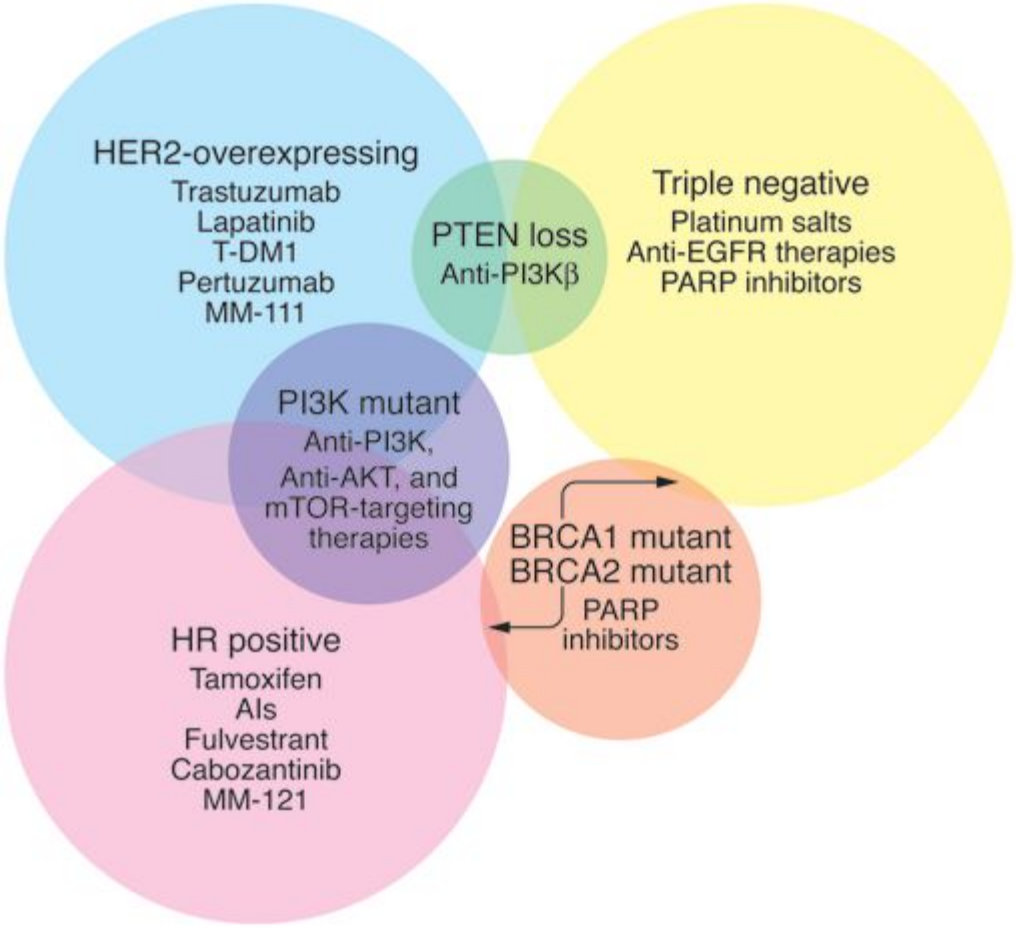
Экспрессия генов *cyclin D1* и *ER-α* в эндометрии крыс, обработанных эстрогеном и тамоксифеном



Экспрессия генов-«мишеней» в яичниках

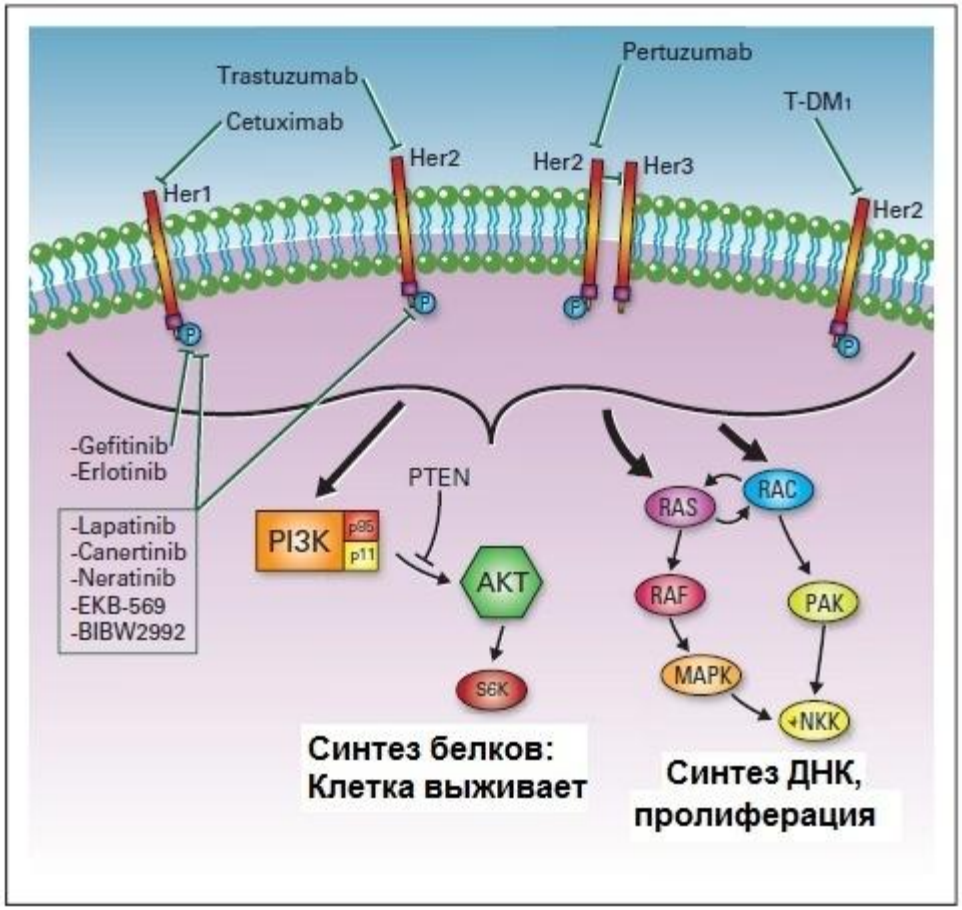


Новые маркеры РМЖ для терапии

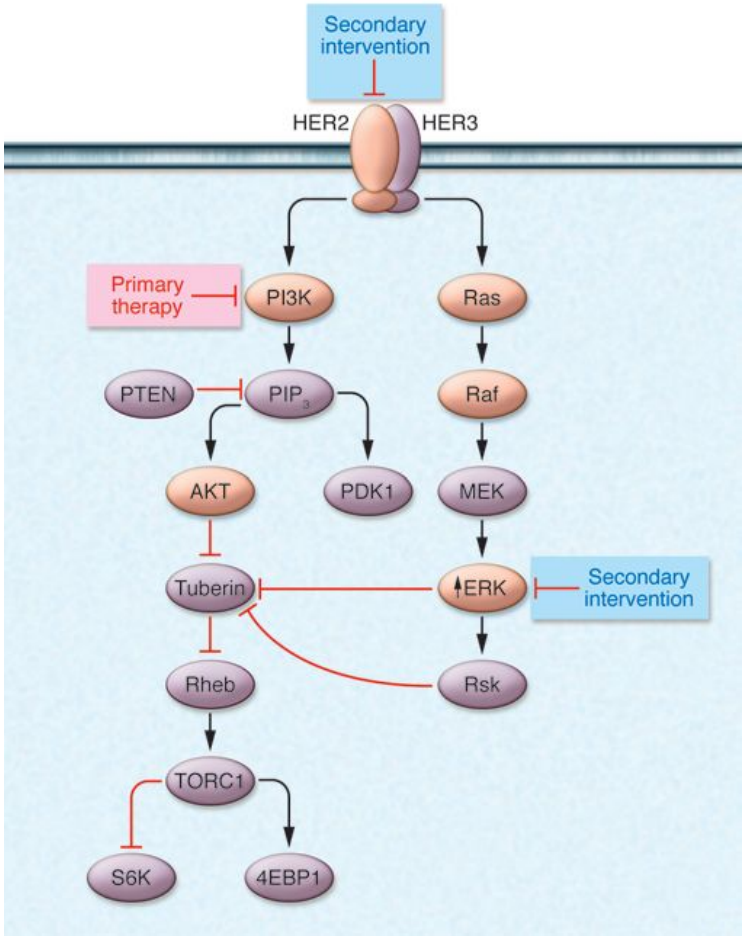


В опухолях молочной железы EGFR играет основную роль в усилении пролиферации и малигнизации

Alvarez et al. , 2010, J. CLIN. ONCOL.



Резистентность к таргетам *(Higgins and Baselga, 2011)*



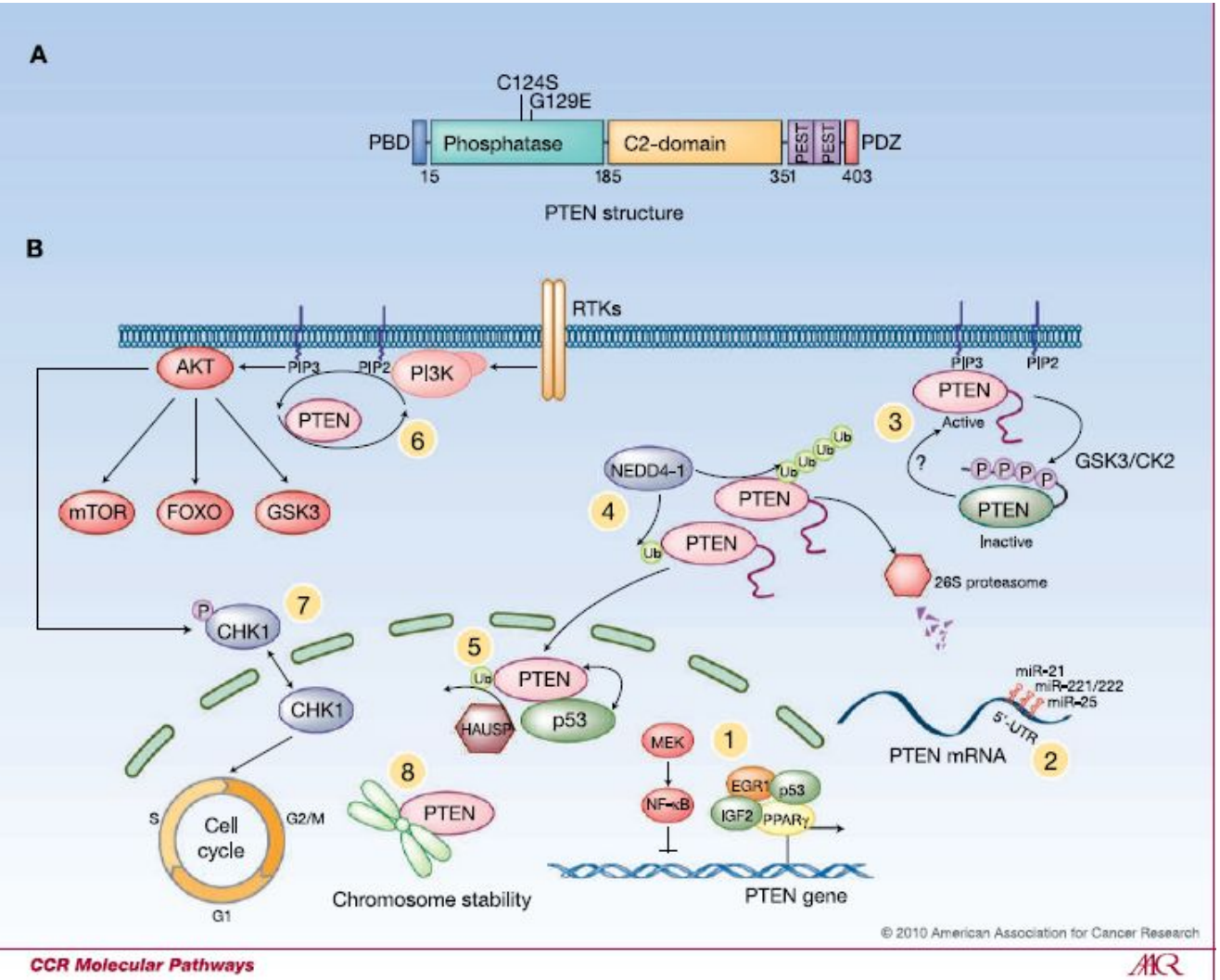
Резистентность к анти- HER2 терапии может возникнуть, как результат нарушений нижестоящих сигнальных путей (потеря функции PTEN или мутации в *PI3K* . Для преодоления этого необходима дополнительная терапия.

Роль BRCA1/2 в патогенезе РМЖ и рака яичников

Наследственные формы рака молочной железы (около 5%) и рака яичников (около 10%).

У носителей мутаций вероятность развития рака – до 70%

Онкосупрессор phosphatase and tensin homolog (PTEN)- маркер РЭ *(Zhang and Yu, 2010)*

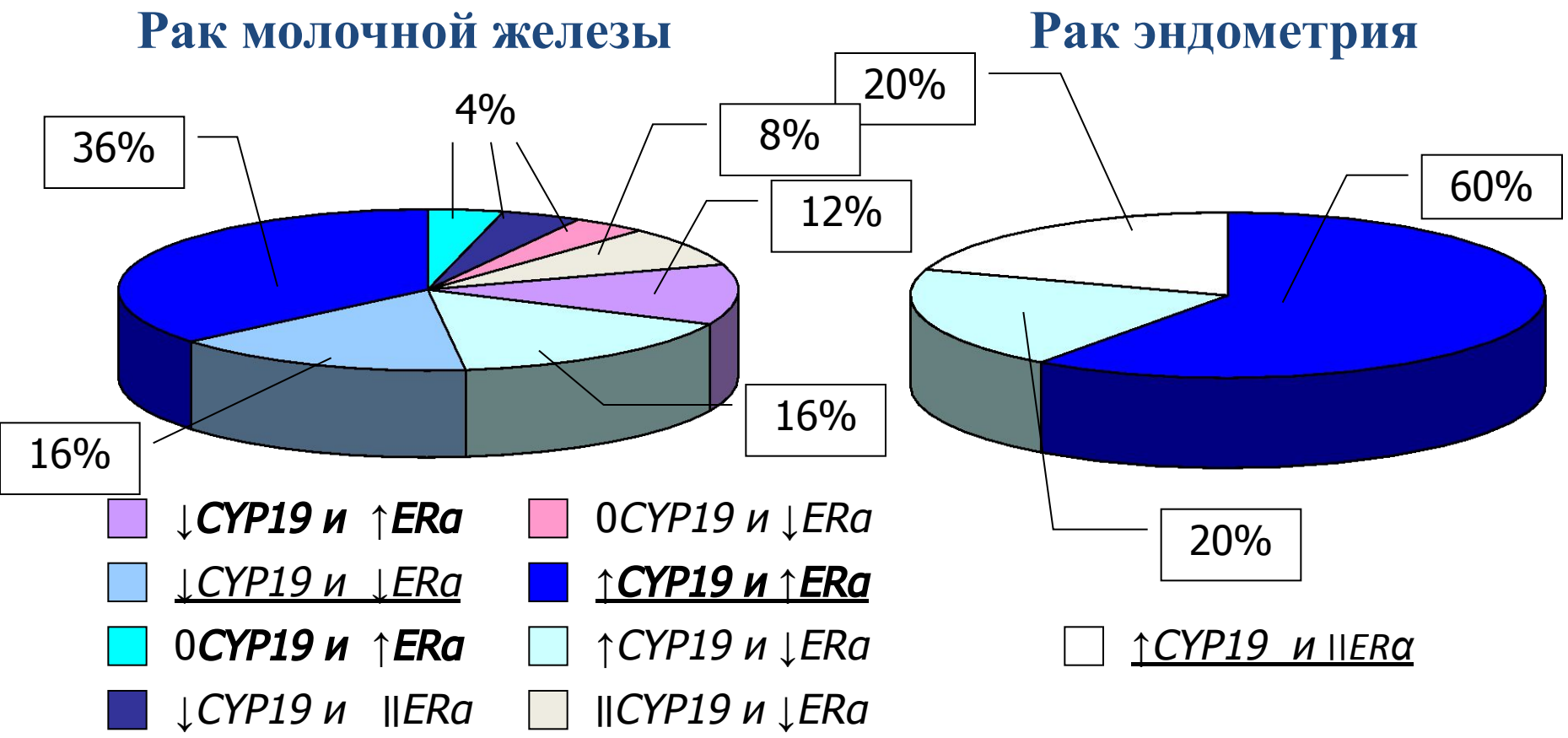


Потеря функции в 50% случаев рака эндометрия. Активирующие мутации в PI3K – 25-30 % РЭ.

Лечение РЭ ингибиторами mTOR

Drug	Patient Population	Response Rate (%)	Stable Disease Rate (%)
Temsirolimus (CCI-779)	Pretreated, all histologies	7.4	44
Temsirolimus	Chemo-naive, all histologies	26	63
Everolimus (Rad001)	Pretreated, endometrioid only	0	44
Ridaforolimus (AP23573)	Pretreated, all histologies	7.4	34

Лечение РЭ ингибиторами PI3K

PI3K inhibitors	Company
XL-147	Exelixis
BKM 120	Novartis
GDC 0941	Genentech/Piramed/Roche
PX866	Oncothyreon
AKT inhibitors	
MK2206	Merck
GSK 2,141,795	GlaxoSmithKline
GDC-0068	Genentech
Perifosine	Keryx

Сравнение профилей экспрессии генов *CYP19* и *ERα*