ГБОУ ВПО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России

Кафедра патологической анатомии с секционным курсом

Молекулярный онкогенез

Подготовила: студентка 3 курса
лечебного факультета
Шестакова А.Д.

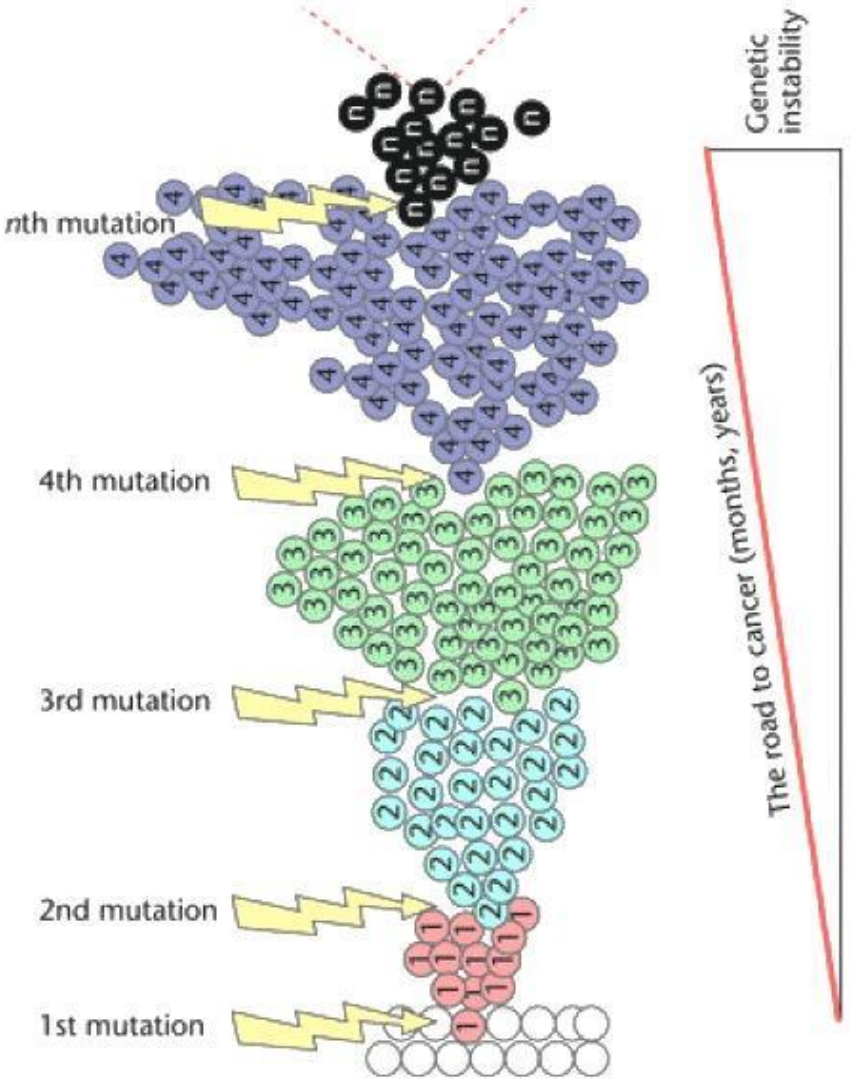
Руководитель: Маслова А.В.

Пермь, 2016 г

ВСТУПЛЕНИЕ

Опухоли

- патологический процесс, при котором изменения генетического аппарата клетки приводят к нарушению регуляции их роста и дифференцировки



КЛЮЧЕВЫЕ ПРИЗНАКИ ОПУХОЛЕВОЙ КЛЕТКИ

1 Самообеспеченность митогенными сигналами

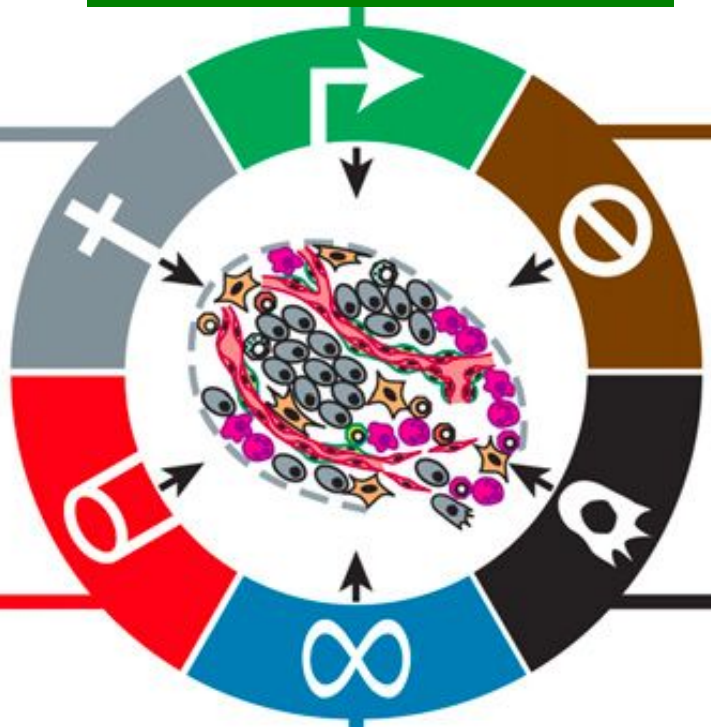
2 Избегание супрессии клеточного роста

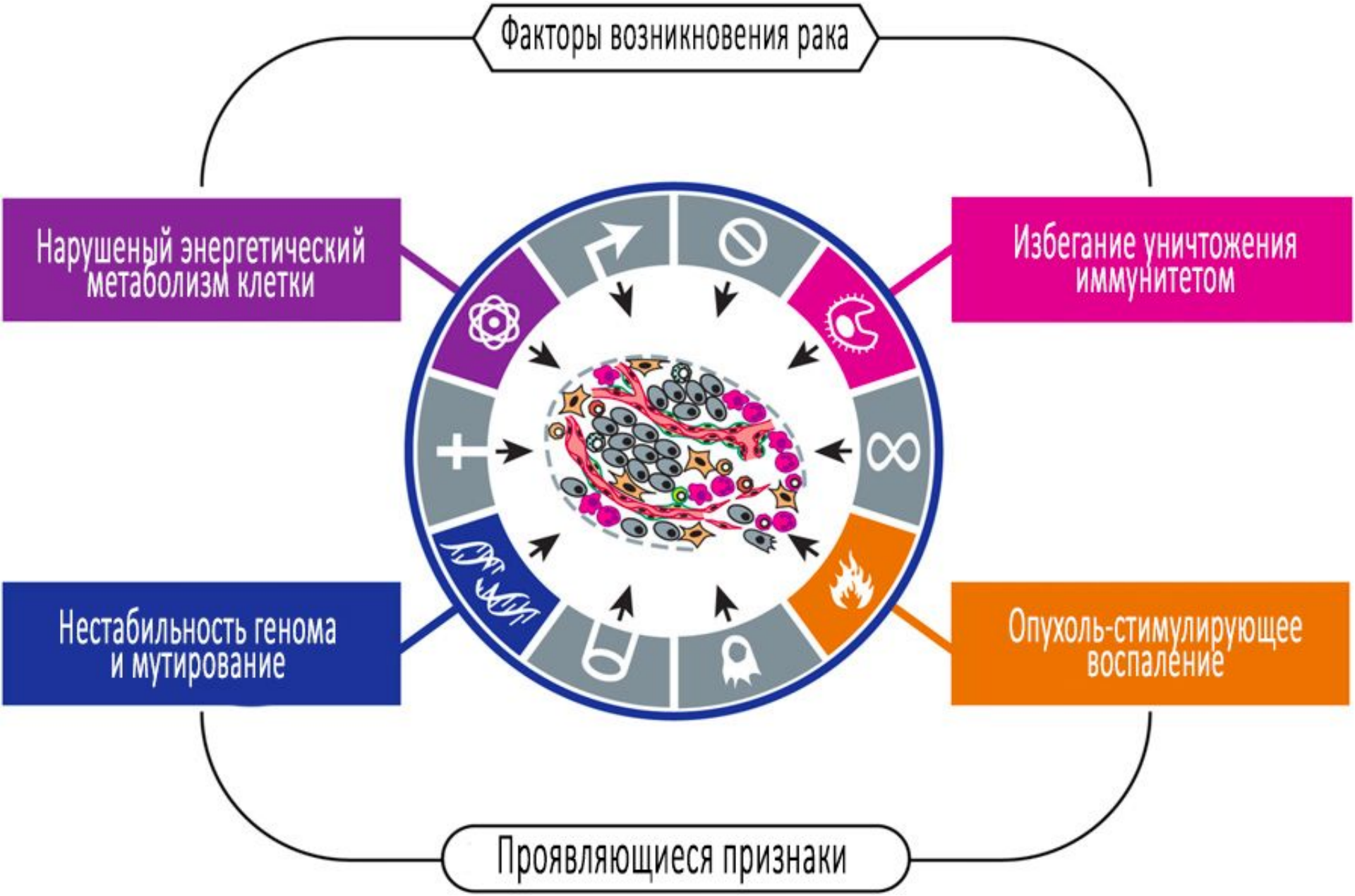
3 Неограниченное деление (иммортализация)

4 Избегание апоптоза

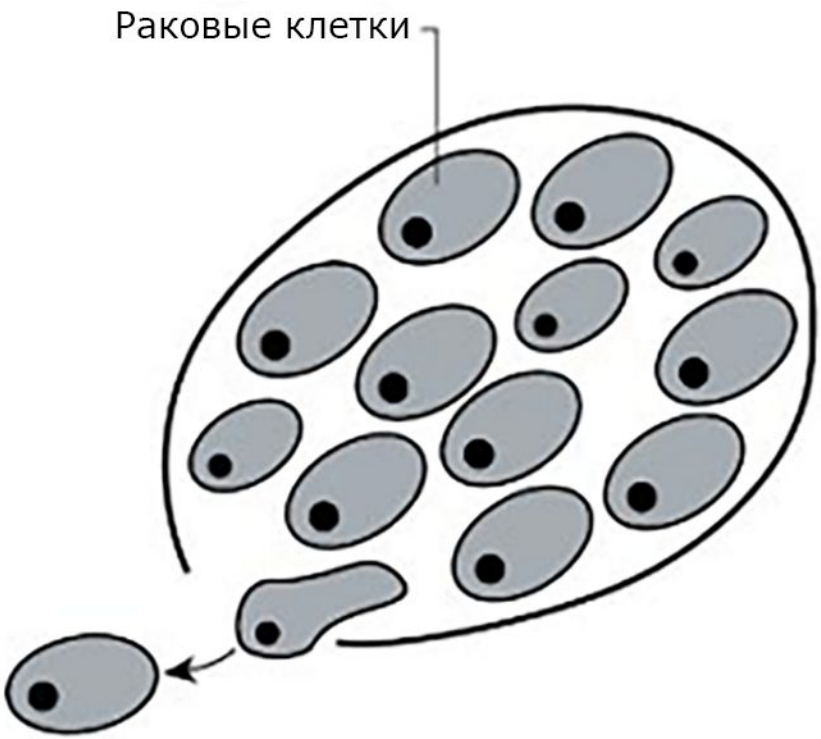
5 Индуцирование ангиогенеза

6 Активация инвазии и

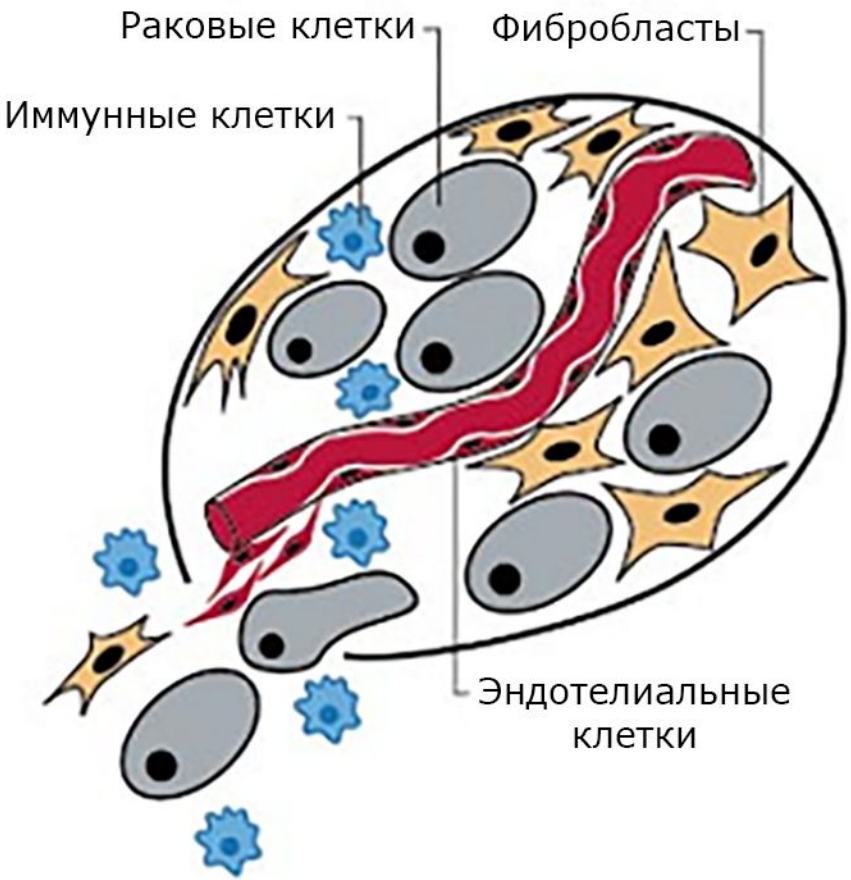



Факторы возникновения рака
Нарушеный энергетический метаболизм клетки
Избегание уничтожения иммунитетом
Нестабильность генома и мутирование
Опухоль-стимулирующее воспаление
Проявляющиеся признаки

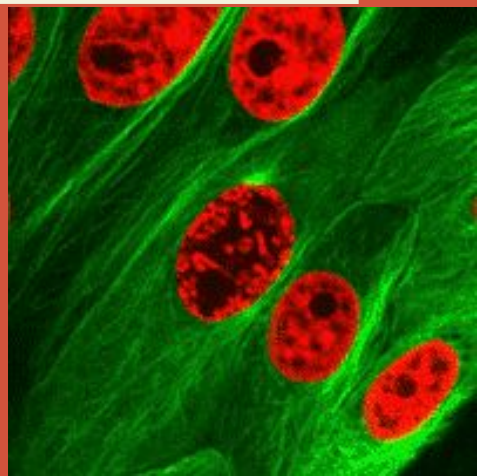
Упрощенный вид



Гетеротипическая биология



КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛ



Регуляция пролиферации в нормальных клетках

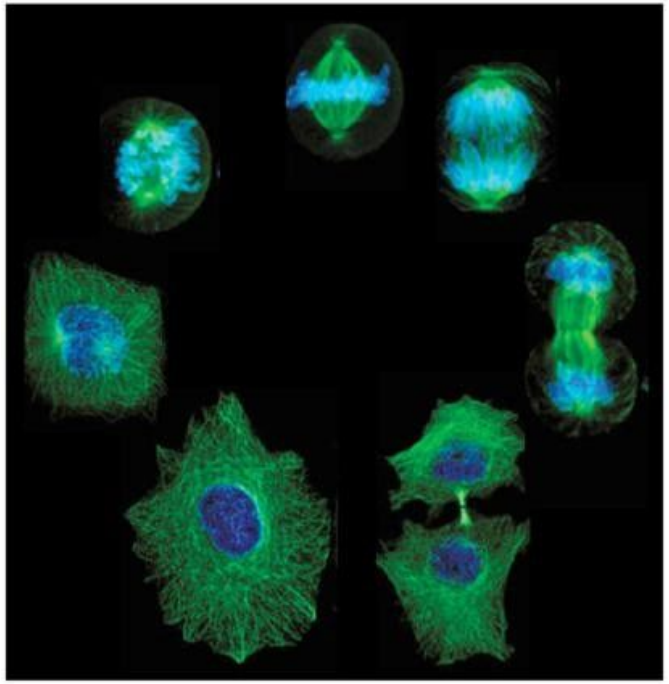
Продукция ростовых факторов

↓

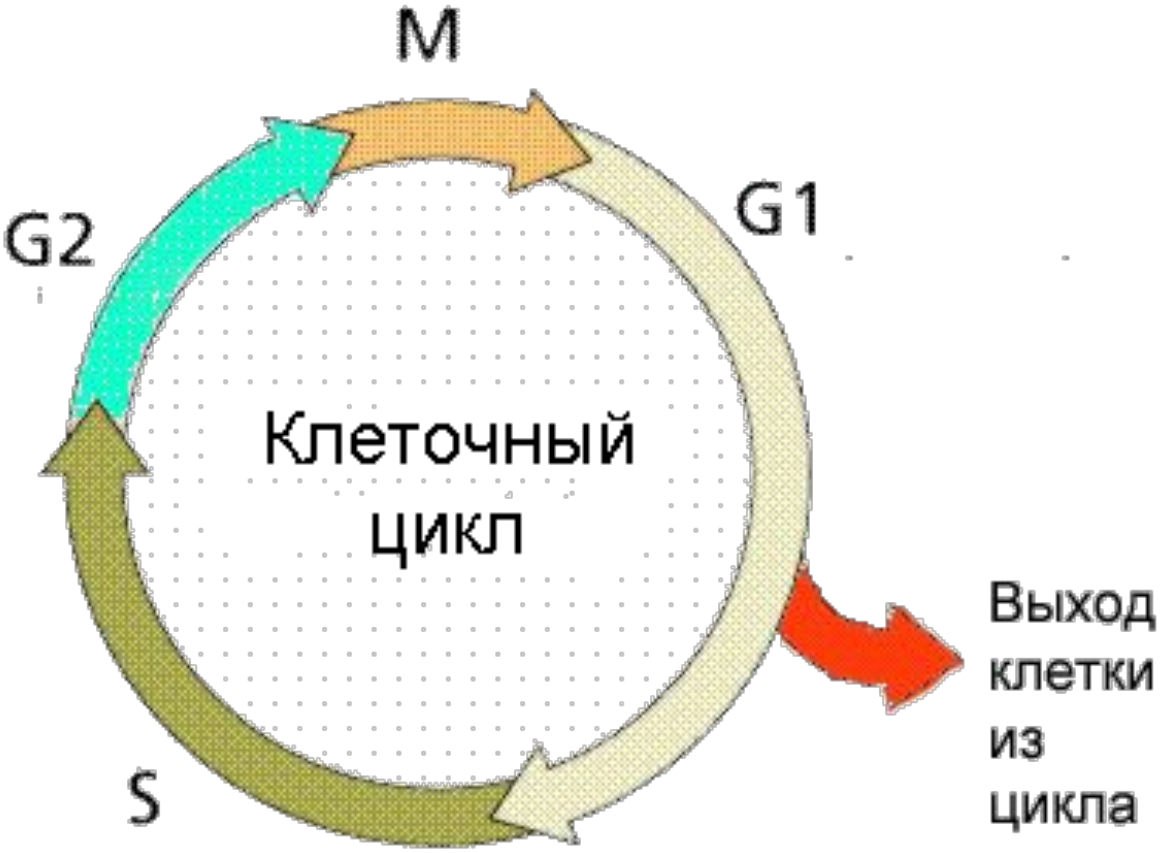
Высвобождение ростовых факторов

↓

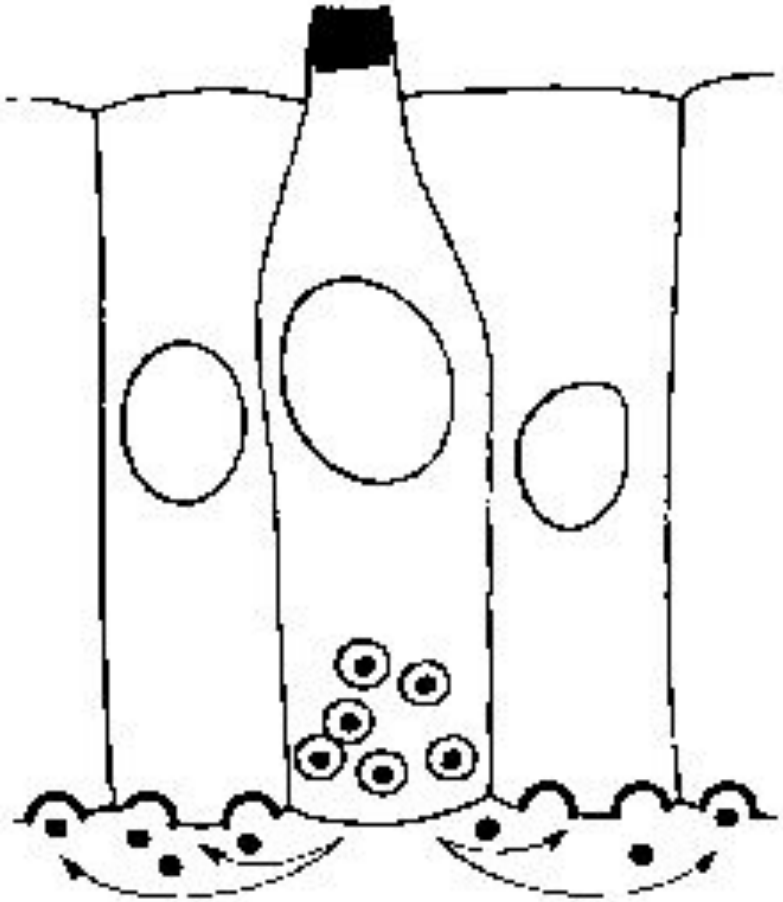
Регуляция клеточного цикла



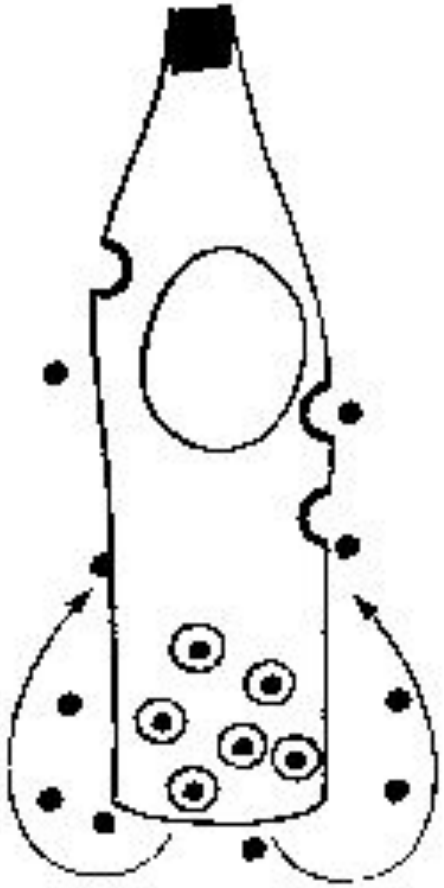
Пролиферация - это размножение клеток, т. е. увеличение числа клеток, происходящее путем митотических делений



Регуляция пролиферации в нормальных клетках

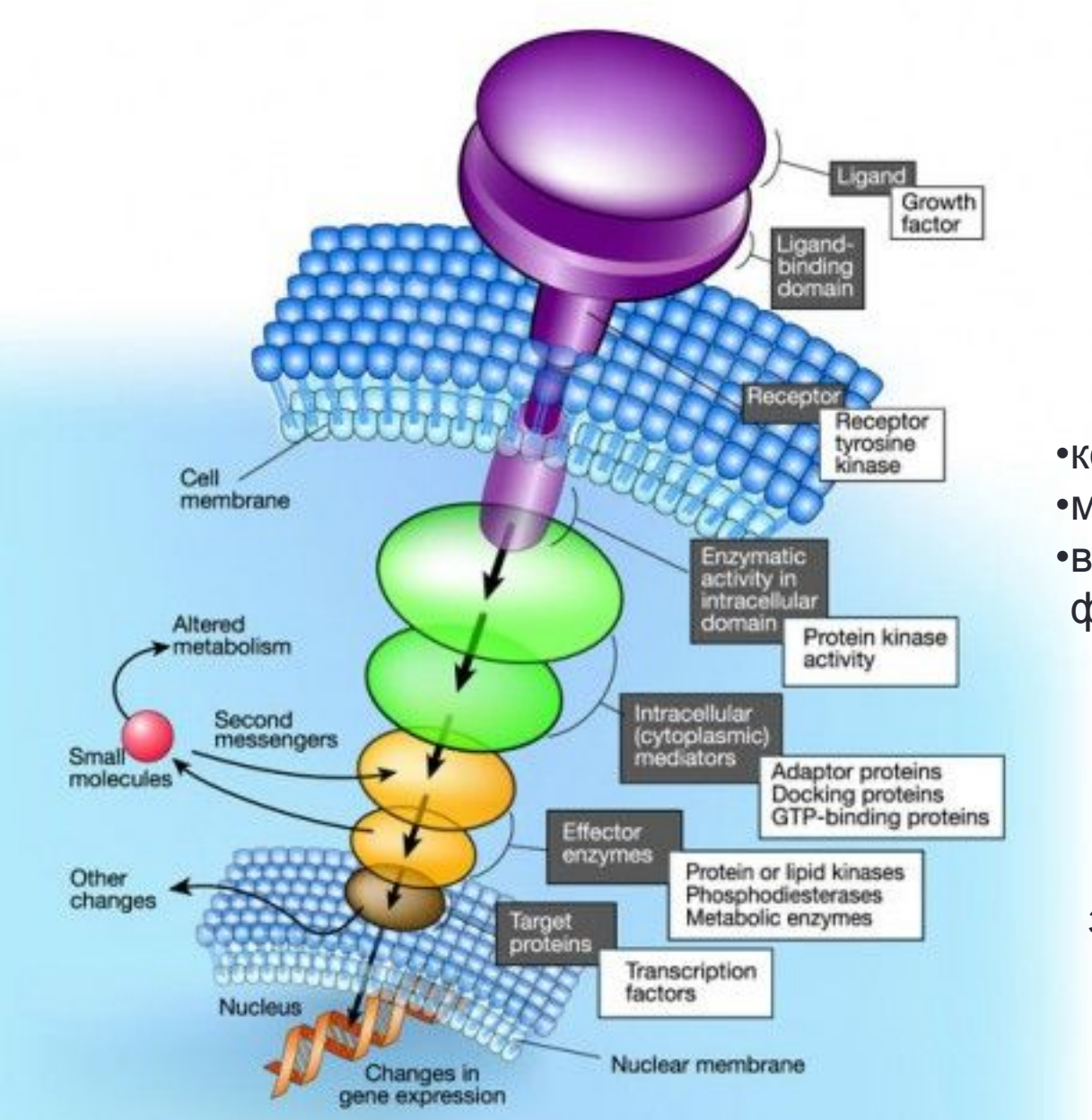


Паракринная - микроокружением
(отсутствие стимулирующих контактов с соседними клетками и матриксом, прекращение секреции и/или синтеза паракринных ростовых факторов)



Аутокринная - самой клеткой
(регуляция клеточного цикла, прекращение или замедление синтеза аутокринных ростовых факторов и их рецепторов)

Регуляция пролиферации в нормальных клетках



Пусковое звено
– **мембрана клетки**

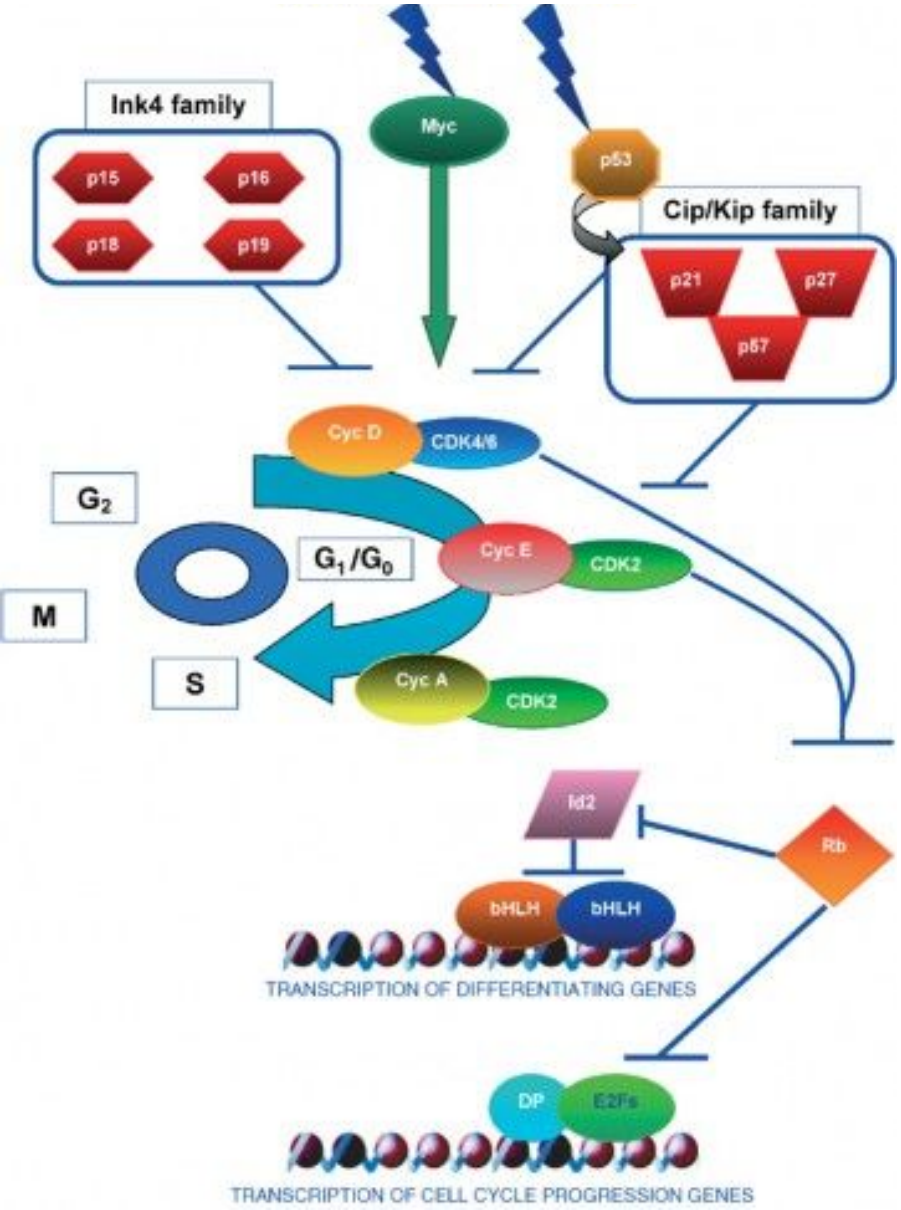
Воспринимает **митогенные сигналы**:

- контакты между клетками,
- между клеткой и матриксом,
- взаимодействие клеток с факторами роста

Клетка, получившая митогенный сигнал на пролиферацию, **запускает процесс деления**.

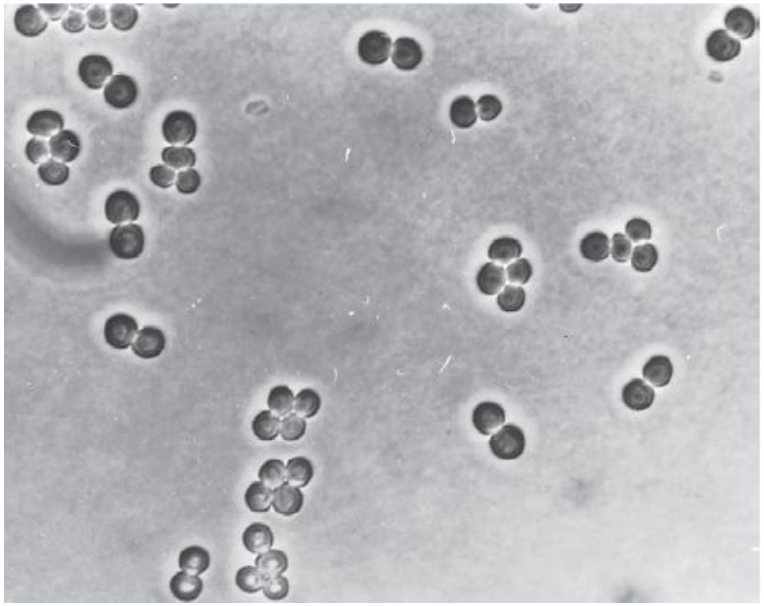
Регуляция пролиферации в нормальных клетках

Внеклеточные сигналы



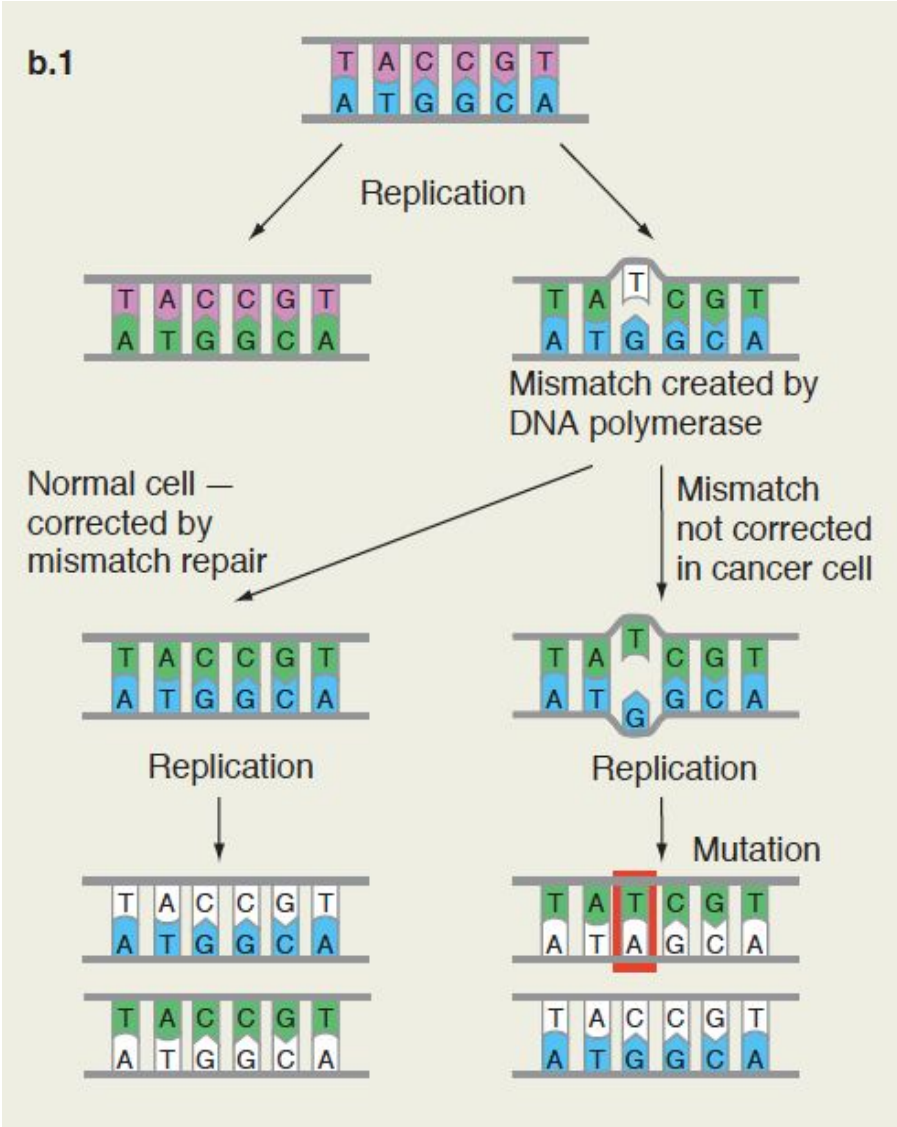
Цель регуляции:
обеспечение **безошибочного распределения** наследственного материала в процессе репродукции клеток.

В основе регуляции размножения клеток лежит смена состояний **активной пролиферации** и пролиферативного **покоя**.

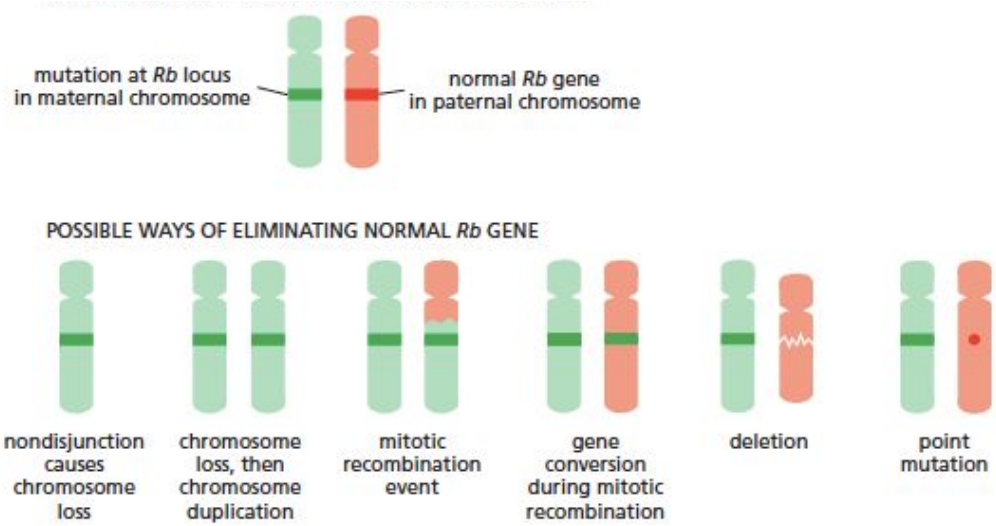


Мутации

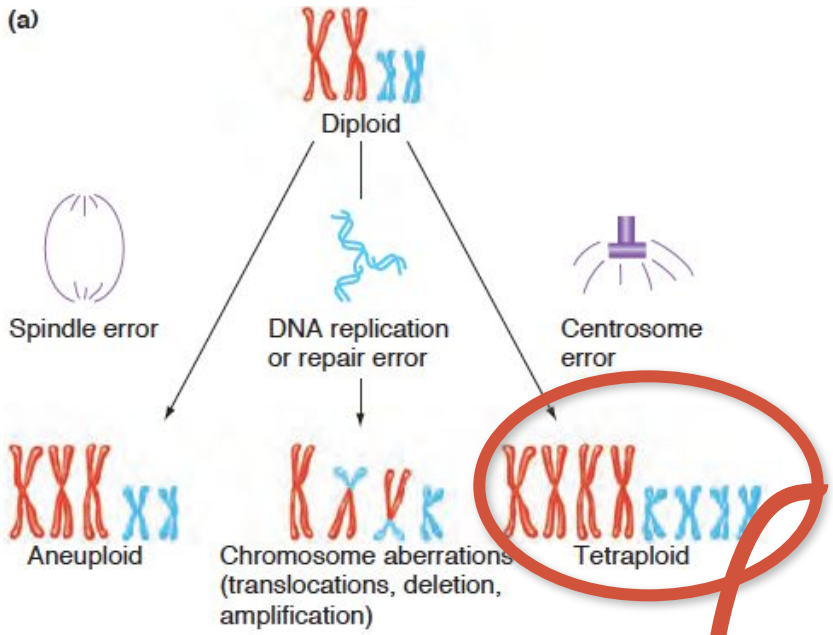
- стойкое преобразование генотипа, происходящее под влиянием внешней или внутренней среды



Спонтанные	Индуцированные
Самопроизвольно на протяжении жизни	Под влиянием мутантных воздействий
репликация ДНК, нарушения репарации ДНК, транскрипции и генетическая рекомбинация	



Мутации



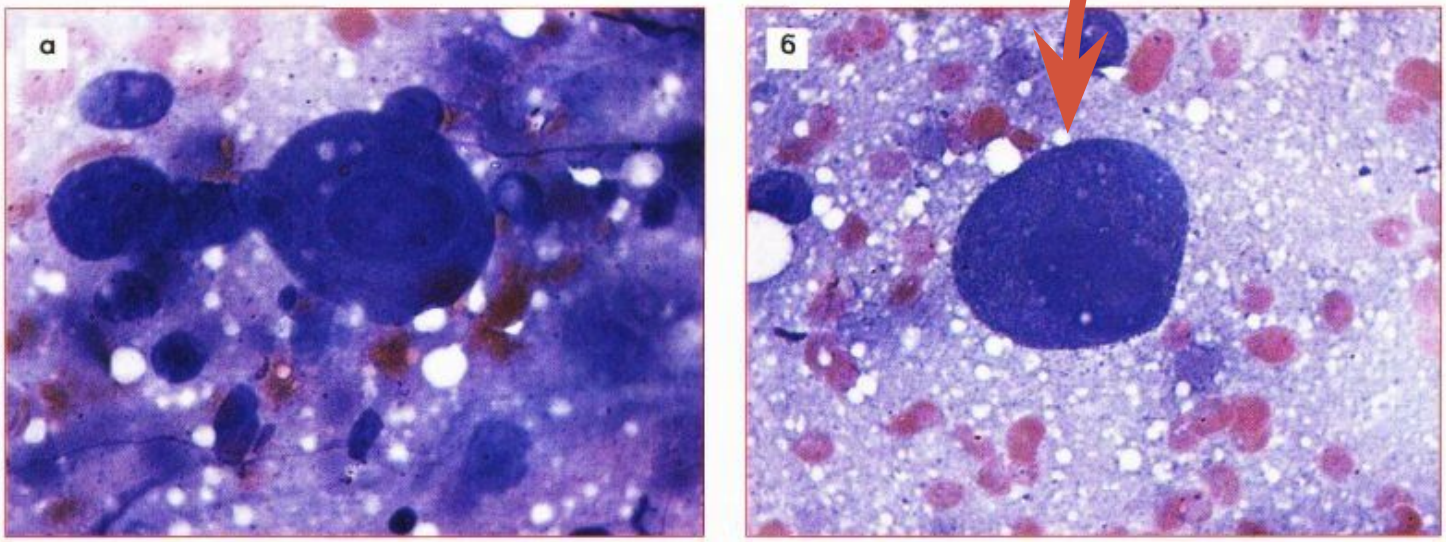
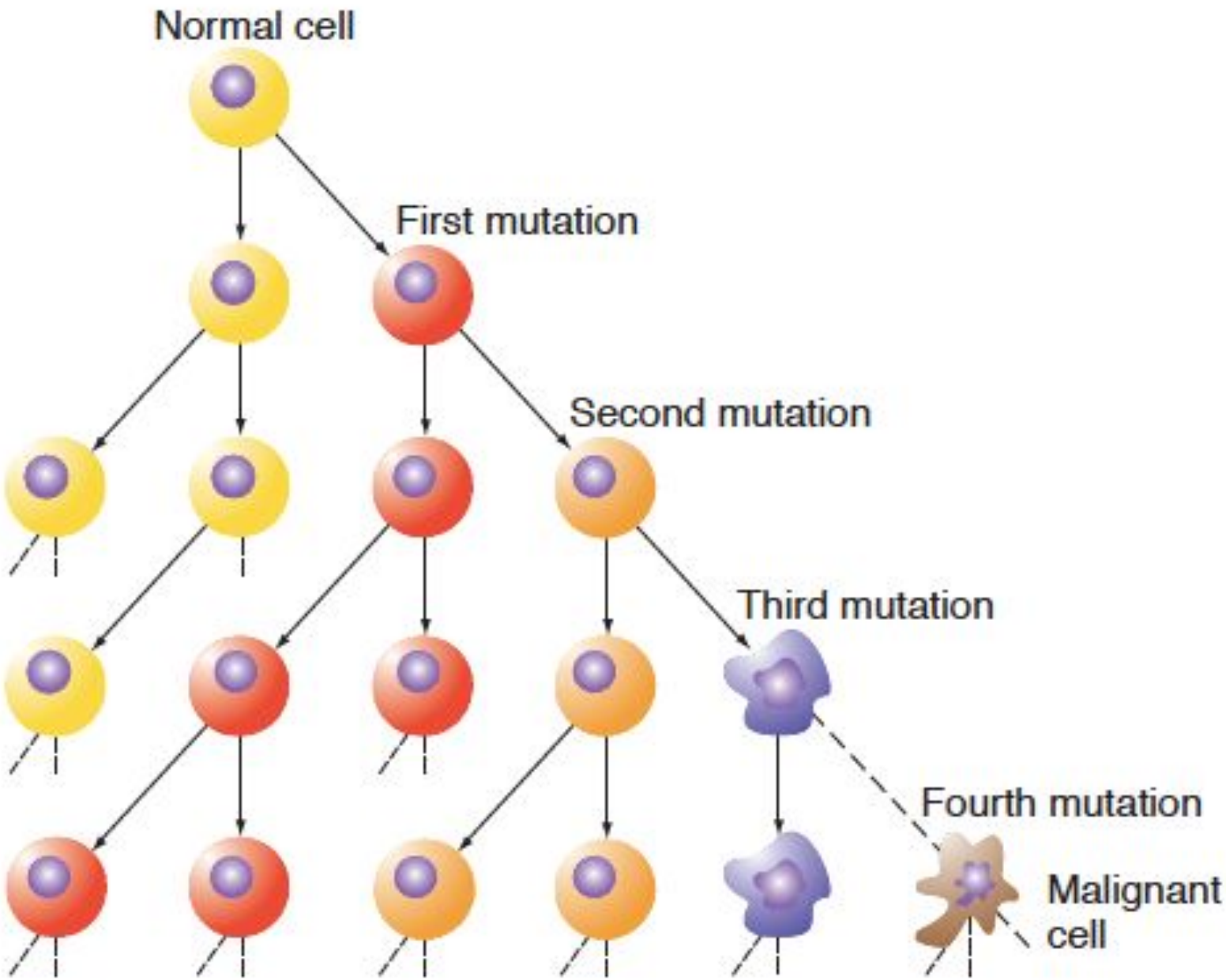
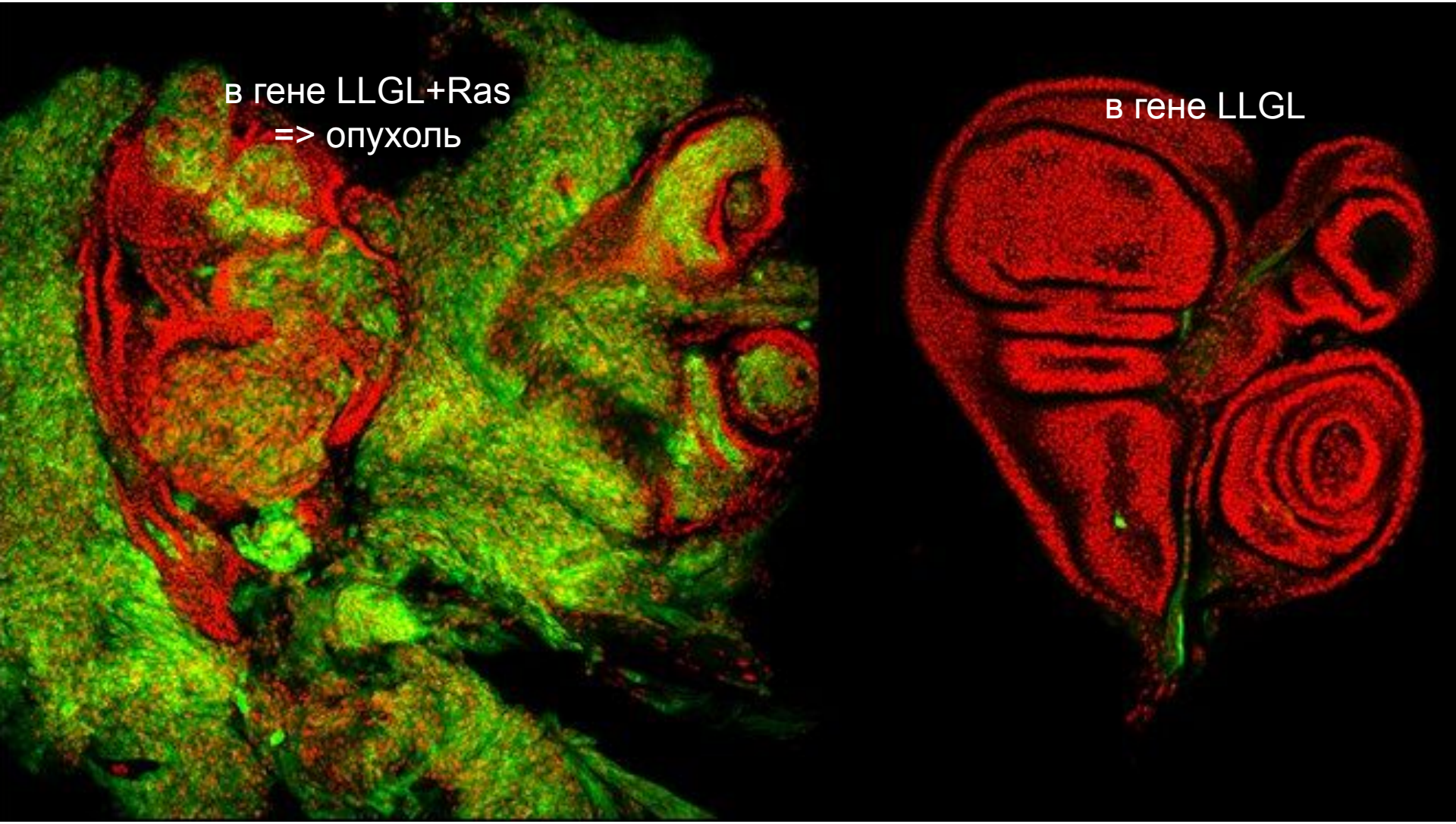


Рис. 71. «Голые» ядра огромных размеров, с крупными ядрышками. Окрашивание по Лейшману. ×1000

Мутации


Normal cell
First mutation
Second mutation
Third mutation
Fourth mutation
Malignant cell

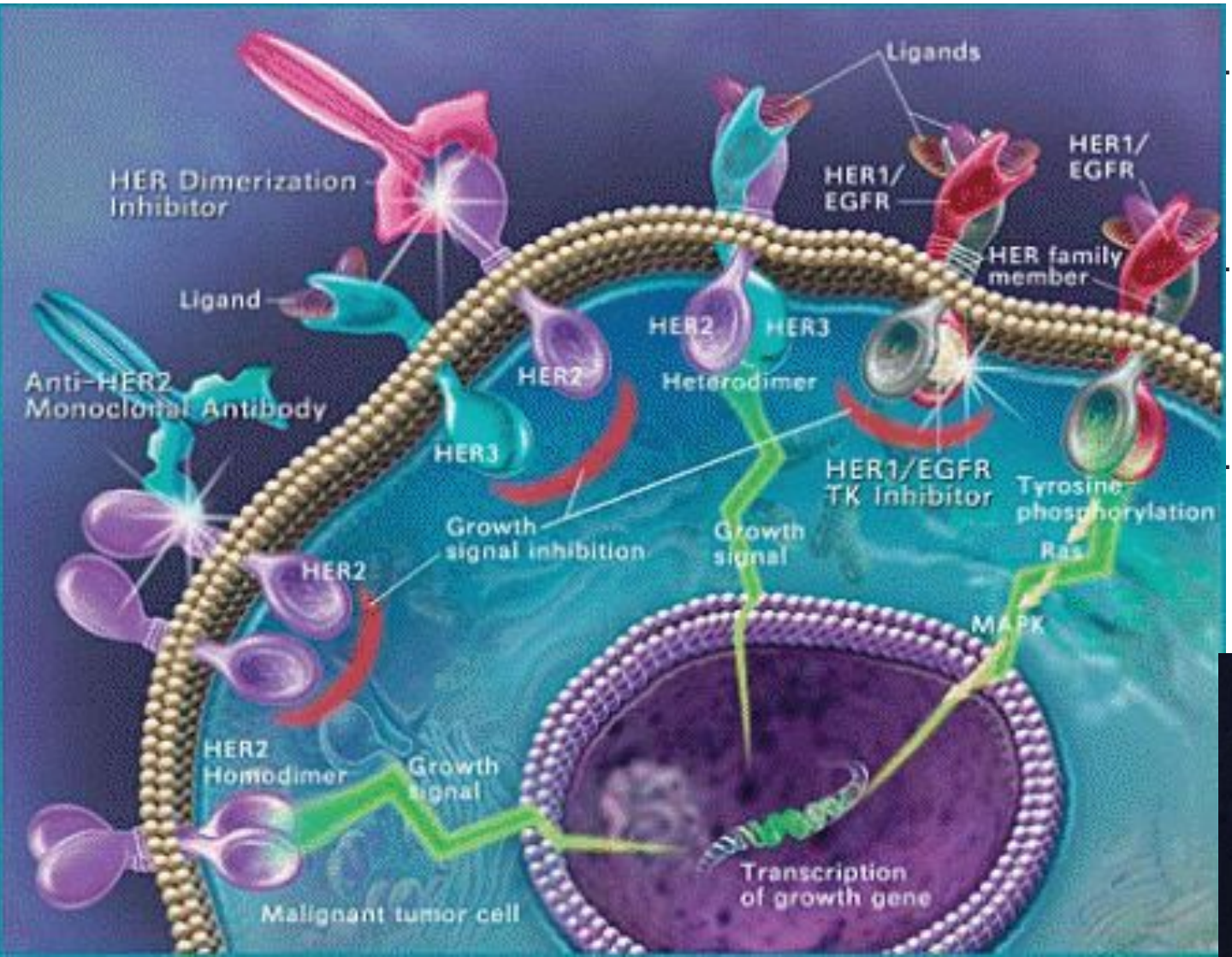
Мутации



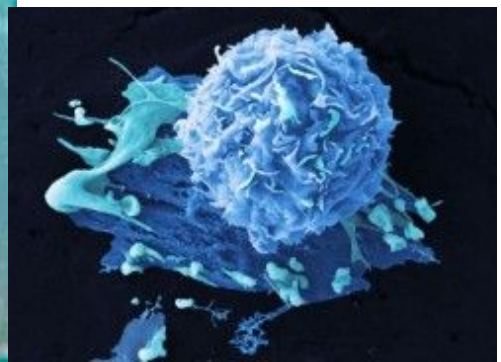
Изображение: эпителиальная ткань дрозофилы (крыло, балансирующий орган и диск лапки), зафиксированная с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Zeiss LSM 510. Мутантные клетки экспрессируют GFP (зеленые); окраска ядер с помощью красителя DAPI (красные).

Регуляция пролиферации опухолевых клеток

На молекулярном уровне можно выделить **три основных способа** обеспечения пролиферативной **независимости** опухолевых клеток:



- изменение внеклеточных сигналов роста,
- трансмембранных проводников этих сигналов
- внутриклеточных путей, которые приводят сигналы в действие.



Регуляция пролиферации опухолевых клеток

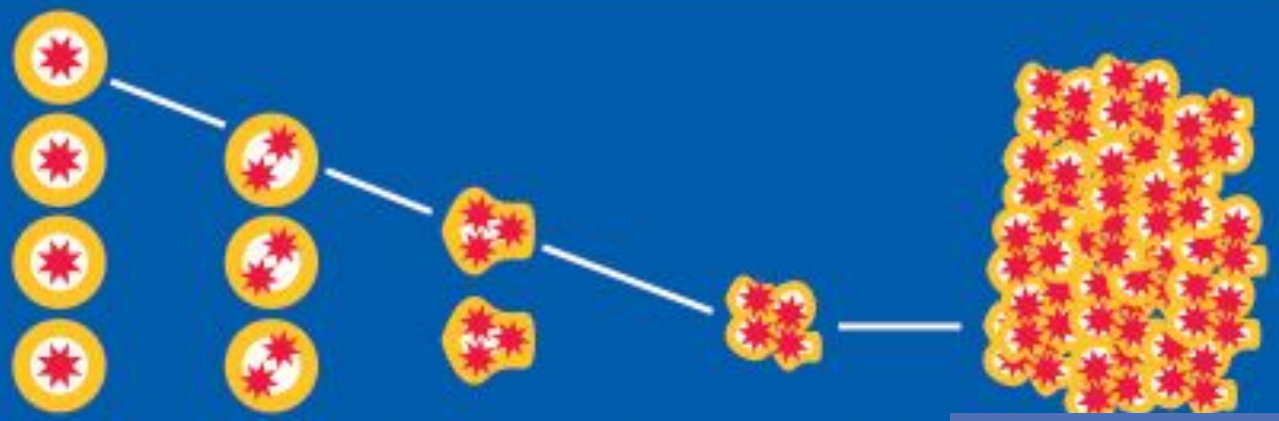
Потеря нормального контроля роста

Деление нормальных клеток

Апоптоз

Повреждение клетки – Нет репарации

Деление опухолевых клеток



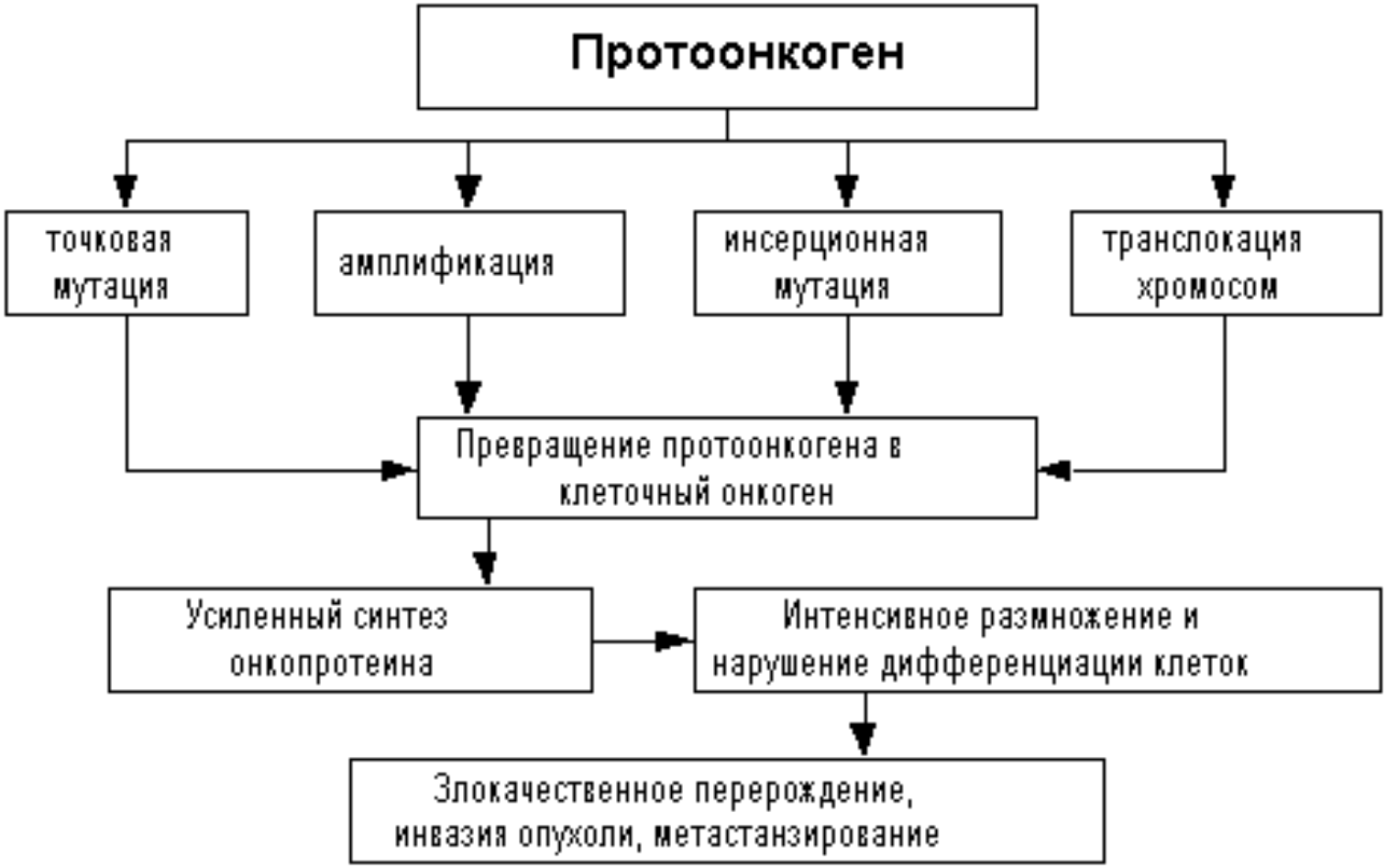
Мутации

Неконтролируемый рост

Самообеспеченность в пролиферативных сигналах

Протоонкоген — это обычный ген, который может стать онкогеном из-за мутаций или повышения экспрессии.

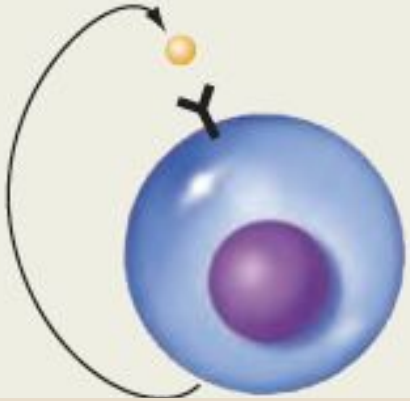
В норме: кодируют белки, которые регулируют клеточный рост и дифференцировку, вовлечены в пути передачи сигнала и в регуляцию митоза



Самообеспеченность в пролиферативных сигналах

Способность постоянно генерировать внутри себя сигналы к размножению:

В нормальных клетках нет

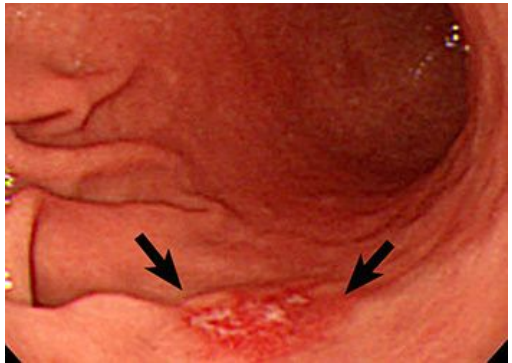


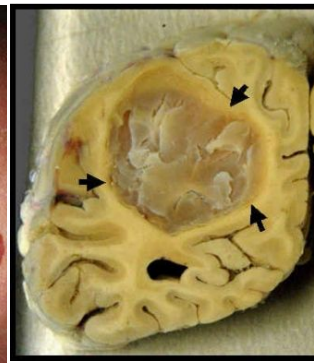
В опухолевых клетках есть

Продукты онкогенов	
Лиганды	*sis, int-2*
Рецепторы	*trk, ros*
GTP-связывающие белки	*Ha-ras, N-ras*
Ядерные рецепторы гормонов	*erbA*
Ядерные онко-супрессоры	*p53, Rb*
ДНК-связывающие белки	*myc, fos*
Протеинкиназы	*raf, src*

Самообеспеченность в пролиферативных сигналах

Онкогены – участники системы передачи сигналов			
Название онкогена	Связь с опухолью	Механизм активации	Продукт онокогена
hst	Карцинома желудка	Реаранжировка (перегруппировка)	Фактор роста
erb-B	Рак молочной железы, глиобластома	Амплификация (увеличение)	Рецептор к фактору роста
trk	Рак щитовидной железы	Реаранжировка	Рецептор к фактору роста
Ha-ras	Рак мочевого пузыря	Точечная мутация	Сигнальные белки
myc	Лимфомы, карциномы	Амплификация, транслокация	Ядерный фактор транскрипции



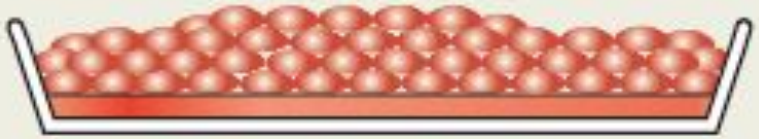


Избегание супрессии клеточного роста

Нечувствительность к ингибирующим сигналам:

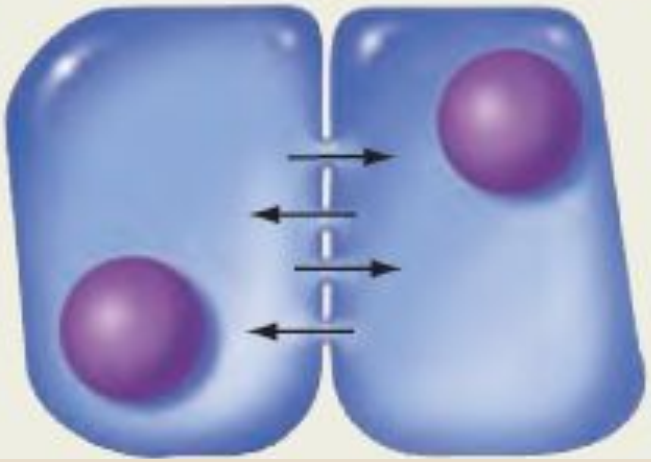
Контактное торможение

В нормальных клетках есть

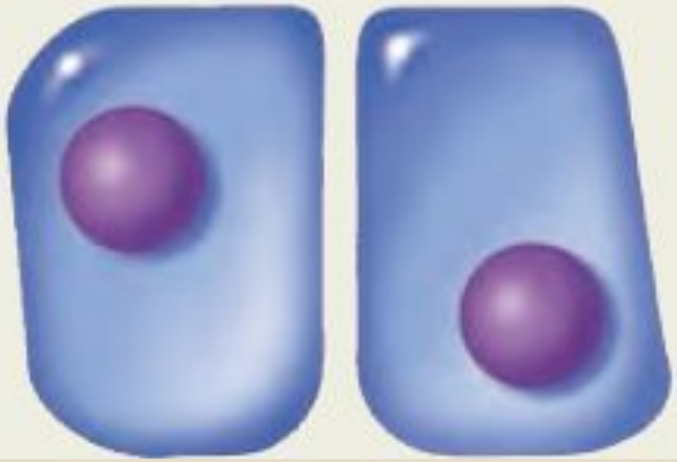


В опухолевых клетках нет

Щелевидные контакты между клетками



В нормальных клетках есть

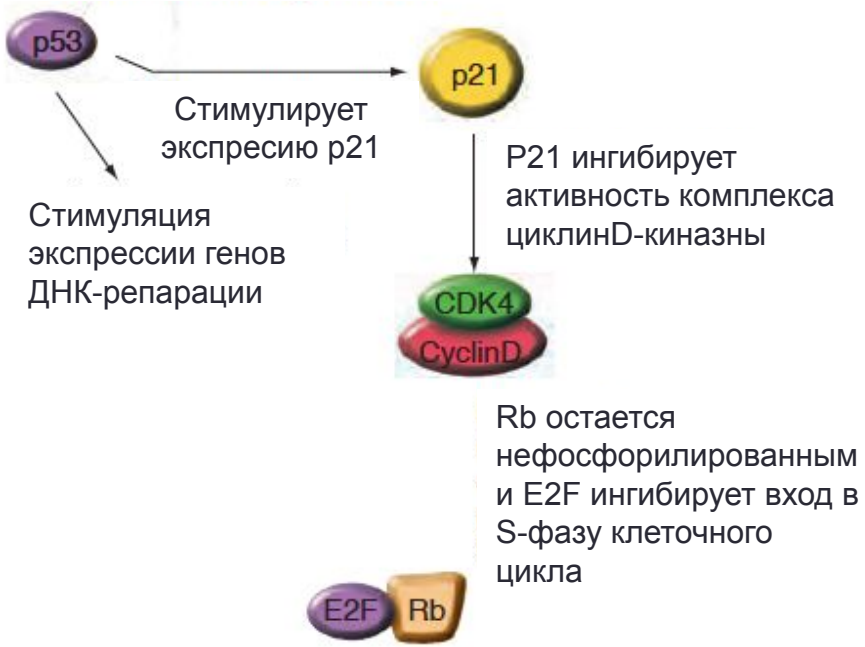


В опухолевых клетках нет

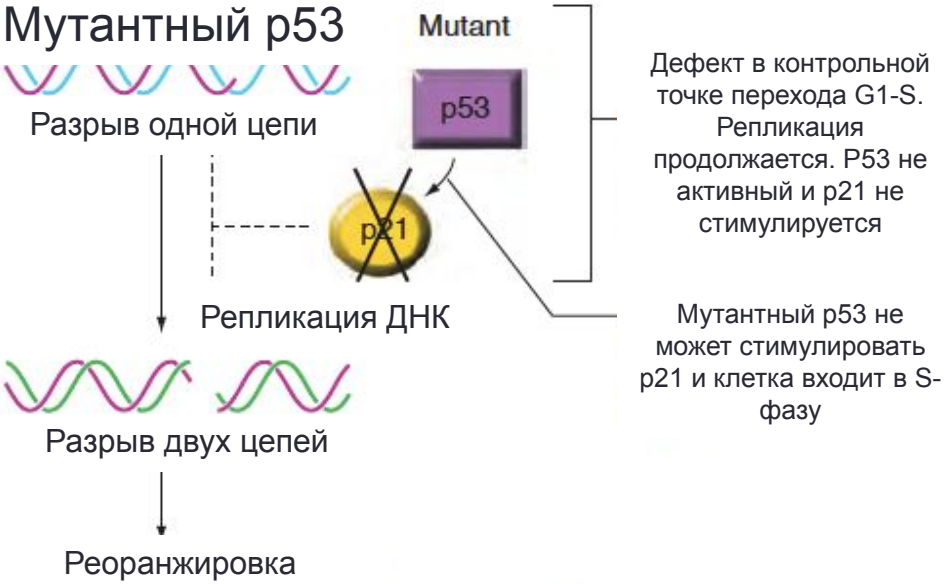
Избегание супрессии клеточного роста

Дисфункция опухолевых супрессоров

Нормальный p53

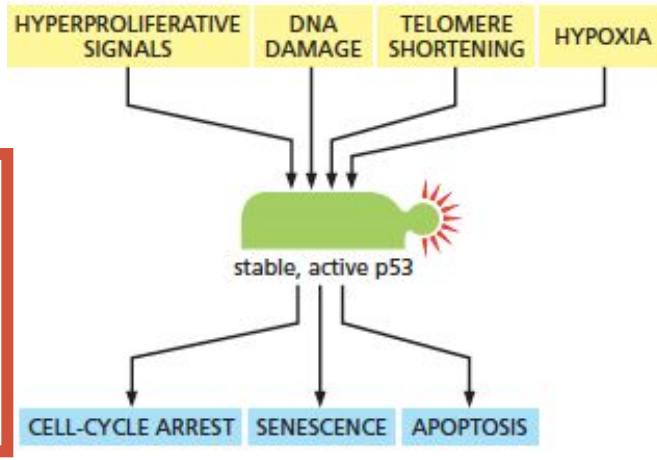


Мутантный p53



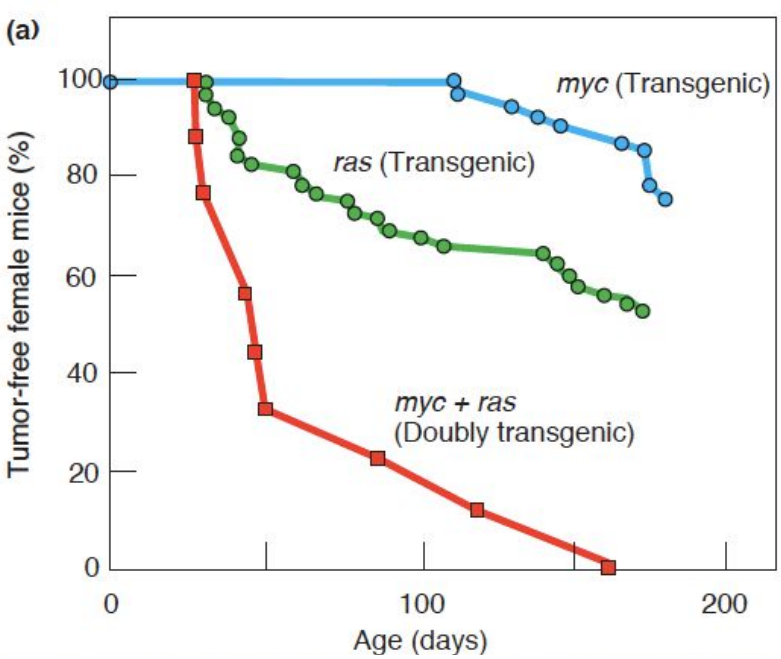
В **норме** под влиянием неблагоприятных факторов белок **p53 активируется и направляет** клетку по одному из трех путей:

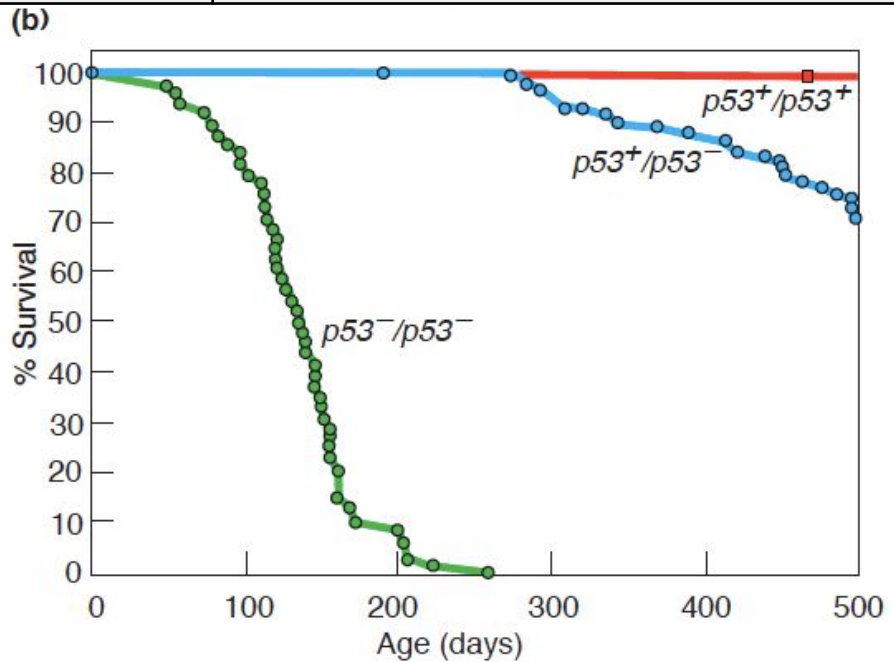
- Остановка клеточного цикла
- Старение
- Апоптоз



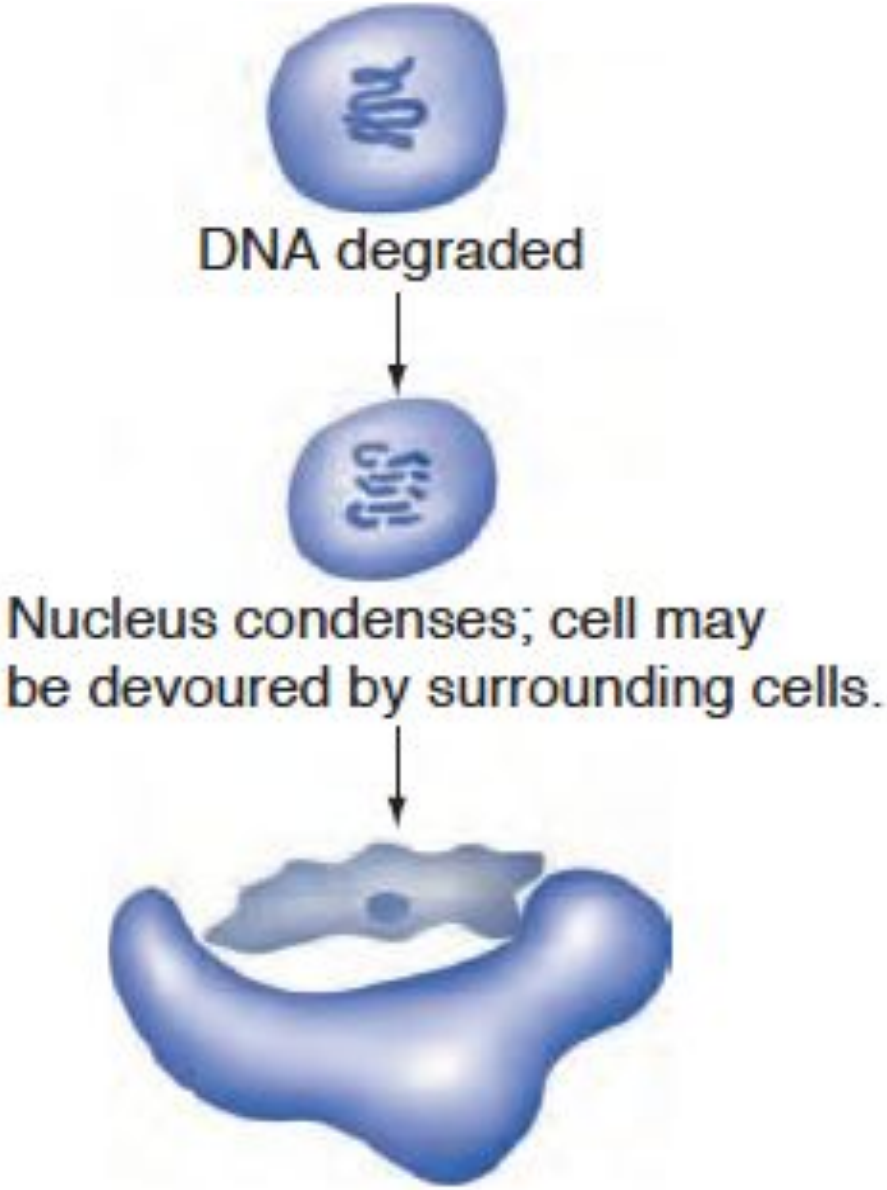
Избегание супрессии клеточного роста

Ген	Нормальная функция гена	Функция нормального белкового продукта
p53	Контрольная точка перехода G1-S	Транскрипционный фактор
RB	Контроль смены G1-S	Ингибитор транскрипционного фактора
XP	Вырезание поврежденного участка ДНК	Ферменты
BS	Рекомбинантная репарация поврежденной ДНК	ДНК/РНК лигазы





Избегание апоптоза

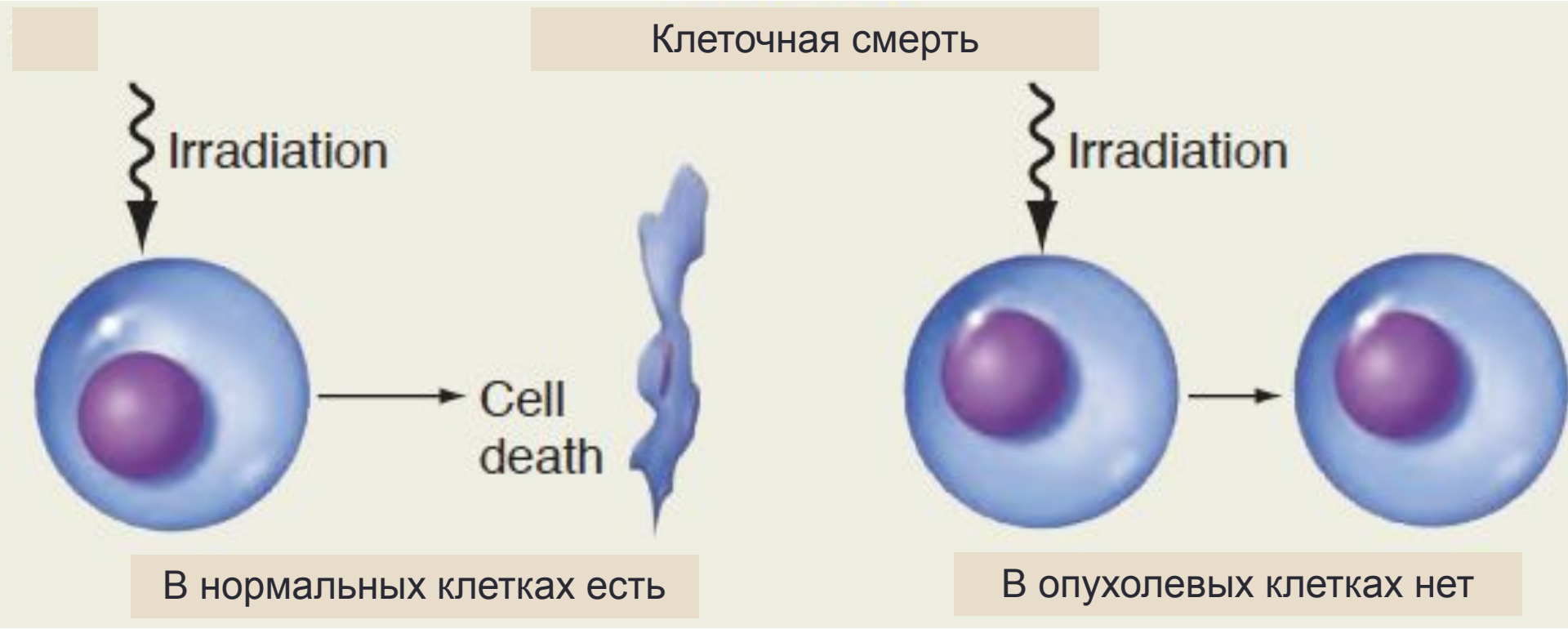


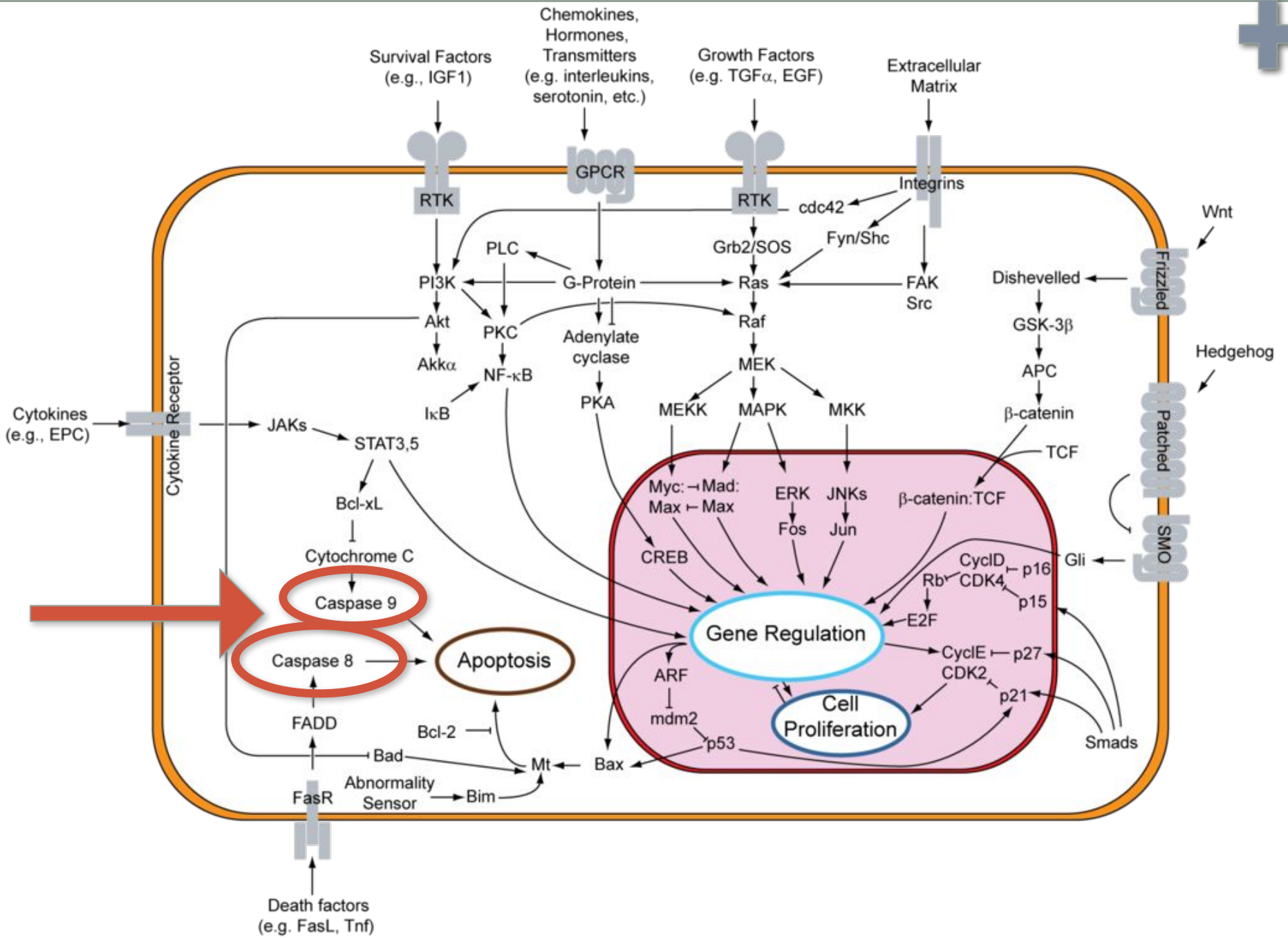
Апоптоз

- Экспрессия киллерных цитокинов
- Изменение гормонального статуса
- Нехватка факторов роста
- Повреждения ДНК
- Гипоксия

Избегание апоптоза

На поверхности опухолевой клетки **перестает экспрессироваться рецептор** клеточной смерти Fas




Survival Factors
(e.g., IGF1)
Chemokines,
Hormones,
Transmitters
(e.g. interleukins,
serotonin, etc.)
Growth Factors
(e.g. TGFα, EGF)
Extracellular
Matrix
RTK
GPCR
RTK
Integrins
cdc42
Fyn/Shc
Grb2/SOS
PLC
PI3K
G-Protein
Ras
FAK
Src
Akt
PKC
Adenylate
cyclase
Raf
Akkα
NF-κB
MEK
IκB
PKA
MEKK
MAPK
MKK
Cytokine Receptor
Cytokines
(e.g., EPC)
JAKs
STAT3,5
Bcl-xL
Cytochrome C
Caspase 9
Caspase 8
Apoptosis
FADD
Bcl-2
Bad
Mt
Bax
Abnormality
Sensor
Bim
FasR
Death factors
(e.g. FasL, Tnf)
Wnt
Frizzled
Dishevelled
GSK-3β
APC
β-catenin
Hedgehog
Patched
SMO
TCF
Gli
Myc: ⊣ Mad:
Max ⊢ Max
ERK
JNKs
Fos
Jun
β-catenin:TCF
CREB
CyclD
CDK4
p16
Rb
p15
E2F
Gene Regulation
CyclE
p27
CDK2
p21
ARF
mdm2
p53
Cell
Proliferation
Smads

Избегание апоптоза

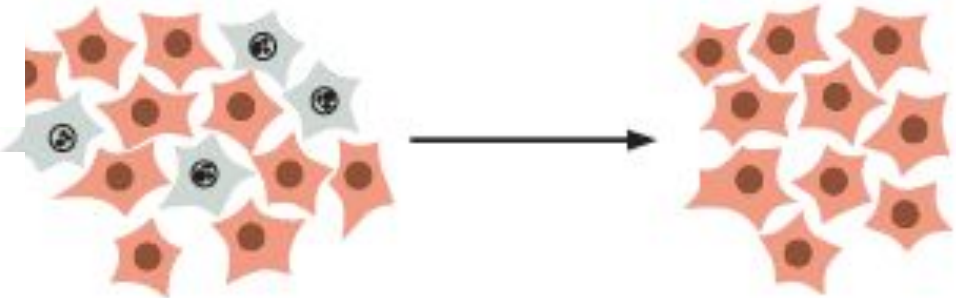
Нормальное деление клеток

Нормальный апоптоз

Гомеостаз

Увеличенное деление клеток

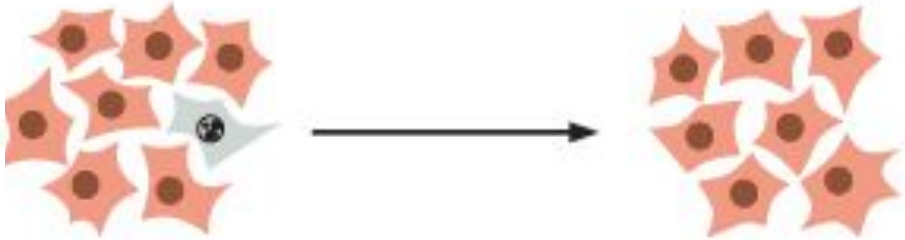
Нормальный апоптоз



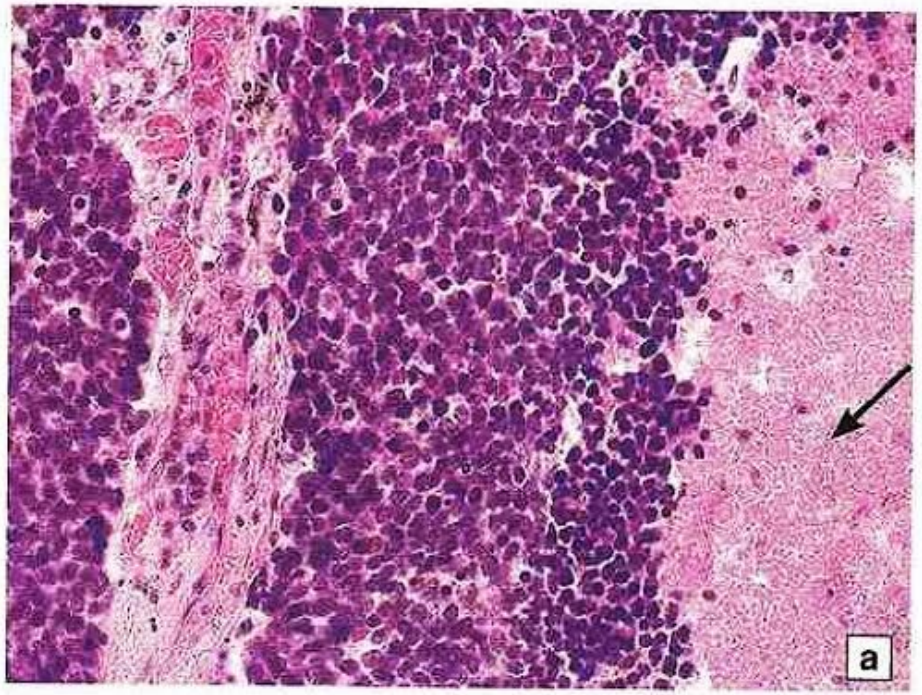
Опухоль

Нормальное деление клеток

Уменьшенный апоптоз



Опухоль



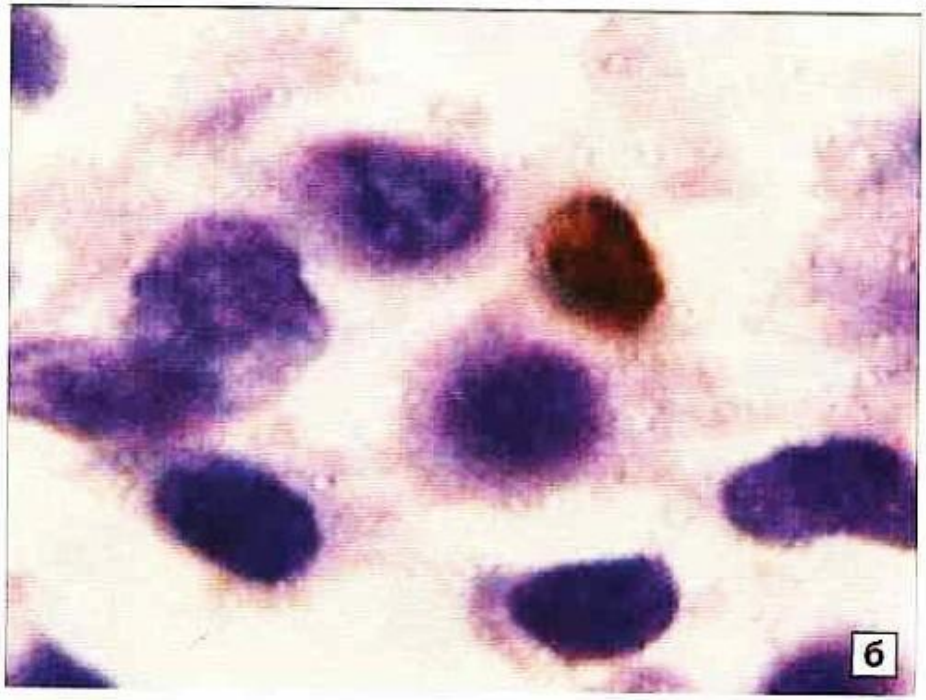
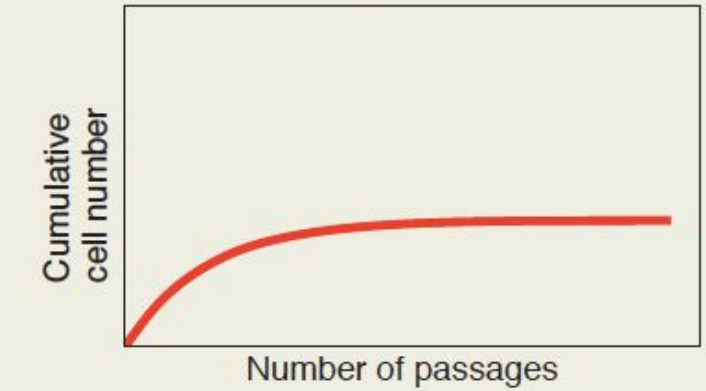


Рис. 1–43. Микропрепараты (а, б). Некроз и апоптоз опухолевых клеток мелкоклеточного рака легкого: а — очаг некроза и апоптоза опухолевых клеток (*стрелка*) в центре комплекса, образованного мелкими умеренно полиморфными опухолевыми клетками со скудной цитоплазмой и маленькими плотными ядрами, виден также апоптоз отдельных клеток; б — опухолевая клетка в стадии апоптоза, ее ядро окрашено в коричневый цвет иммуногистохимическим методом; TUNEL-test; а — × 200; б — × 600

Неограниченное деление

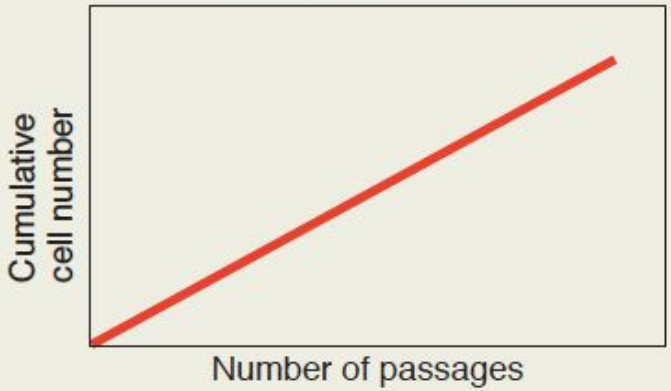
Рост культур клеток

Нормальные клетки

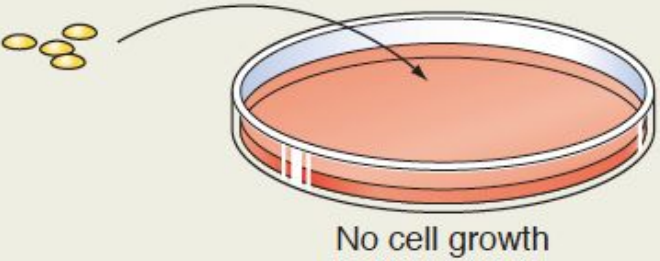


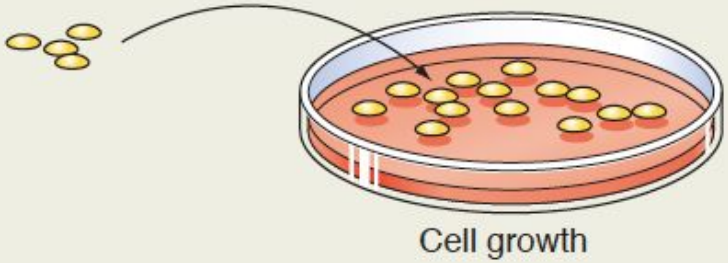
Immortality

Опухолевые клетки



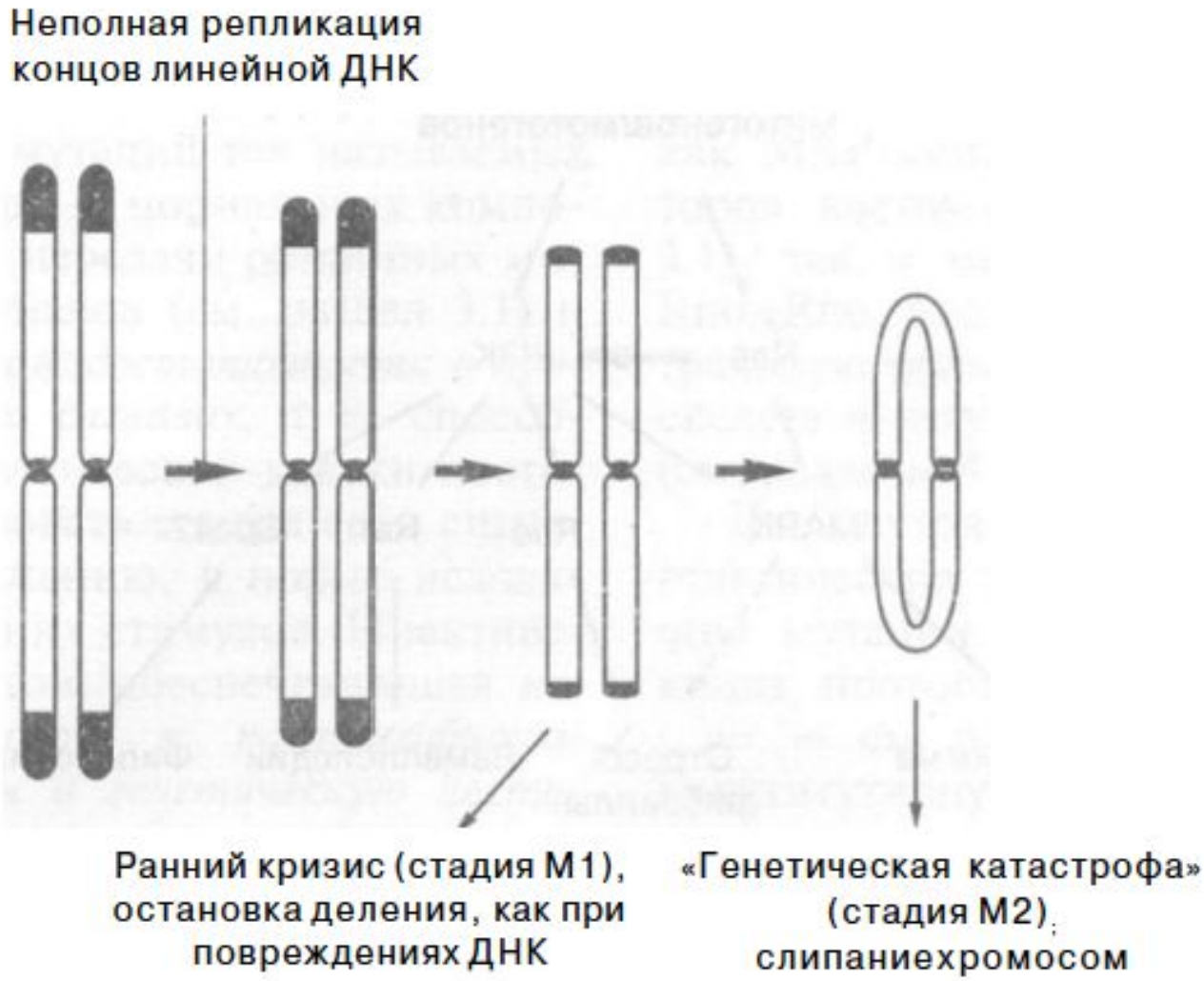
Growth in soft agar



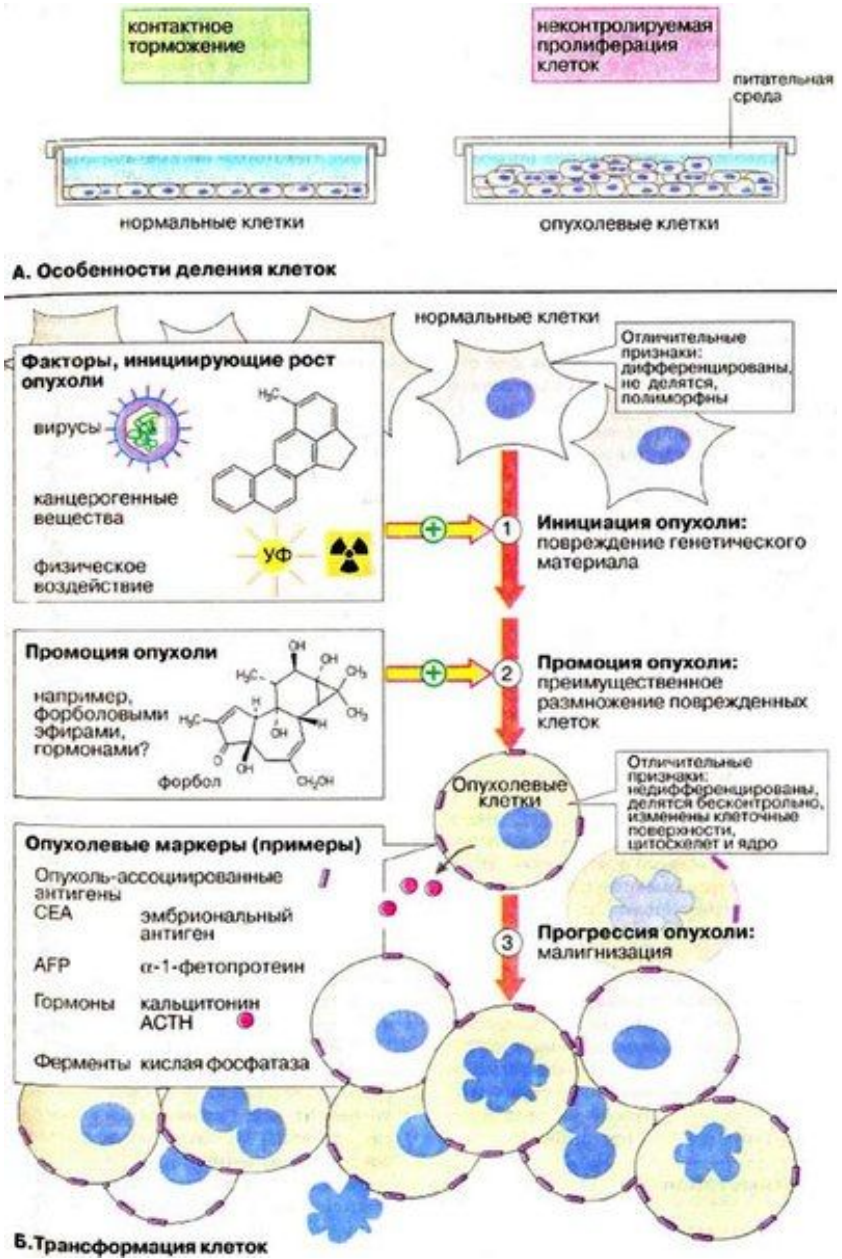


Неограниченное деление

Схема 2.7. Теломерный механизм репликативного старения клеток человека



Неограниченное деление



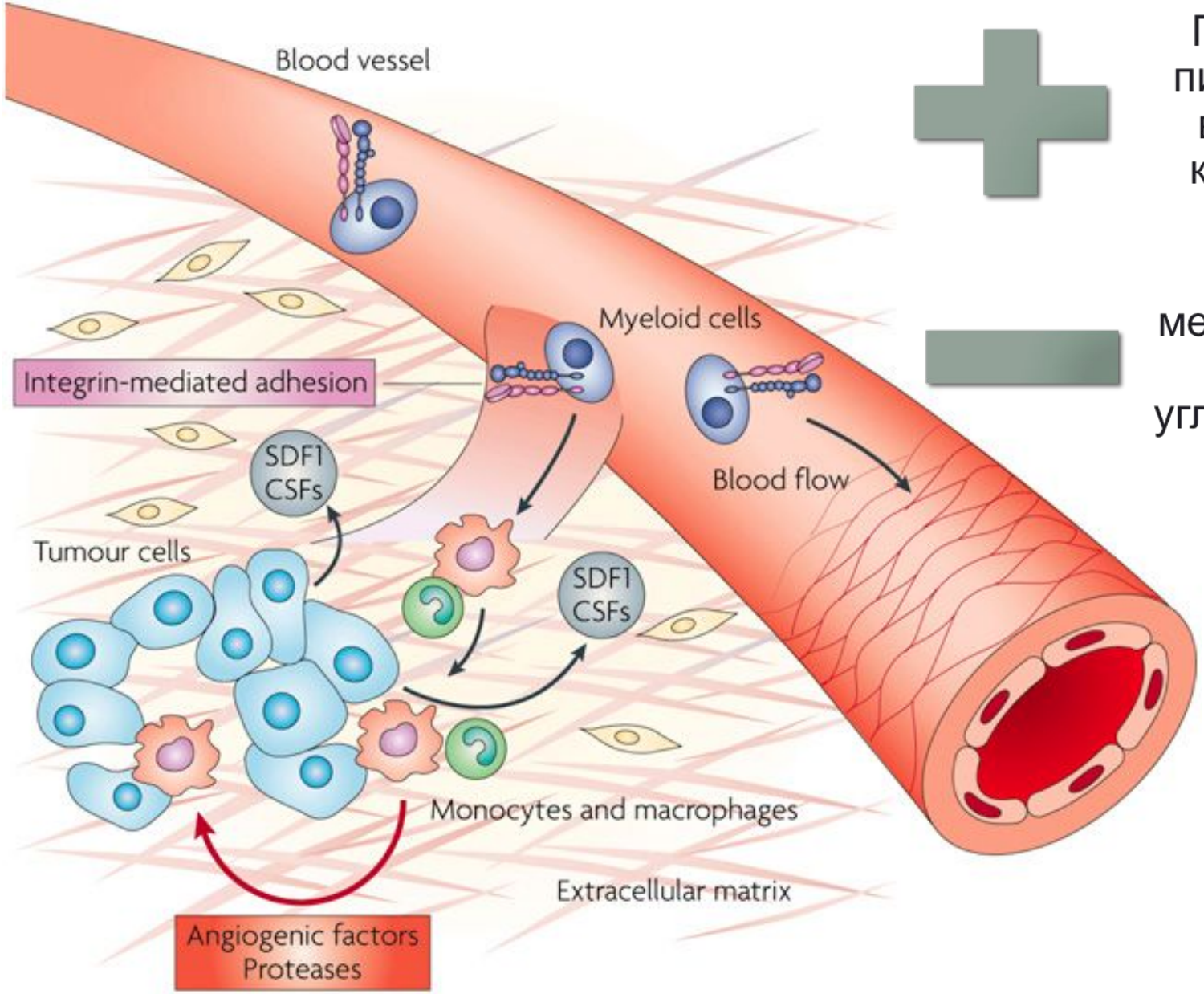
Активация онкогена myc и инактивация опухолевого супрессора p53

Включение теломеразы

Достраивание теломер и поддержание их постоянной длины

Отсутствие репликативного старения (иммортализация)

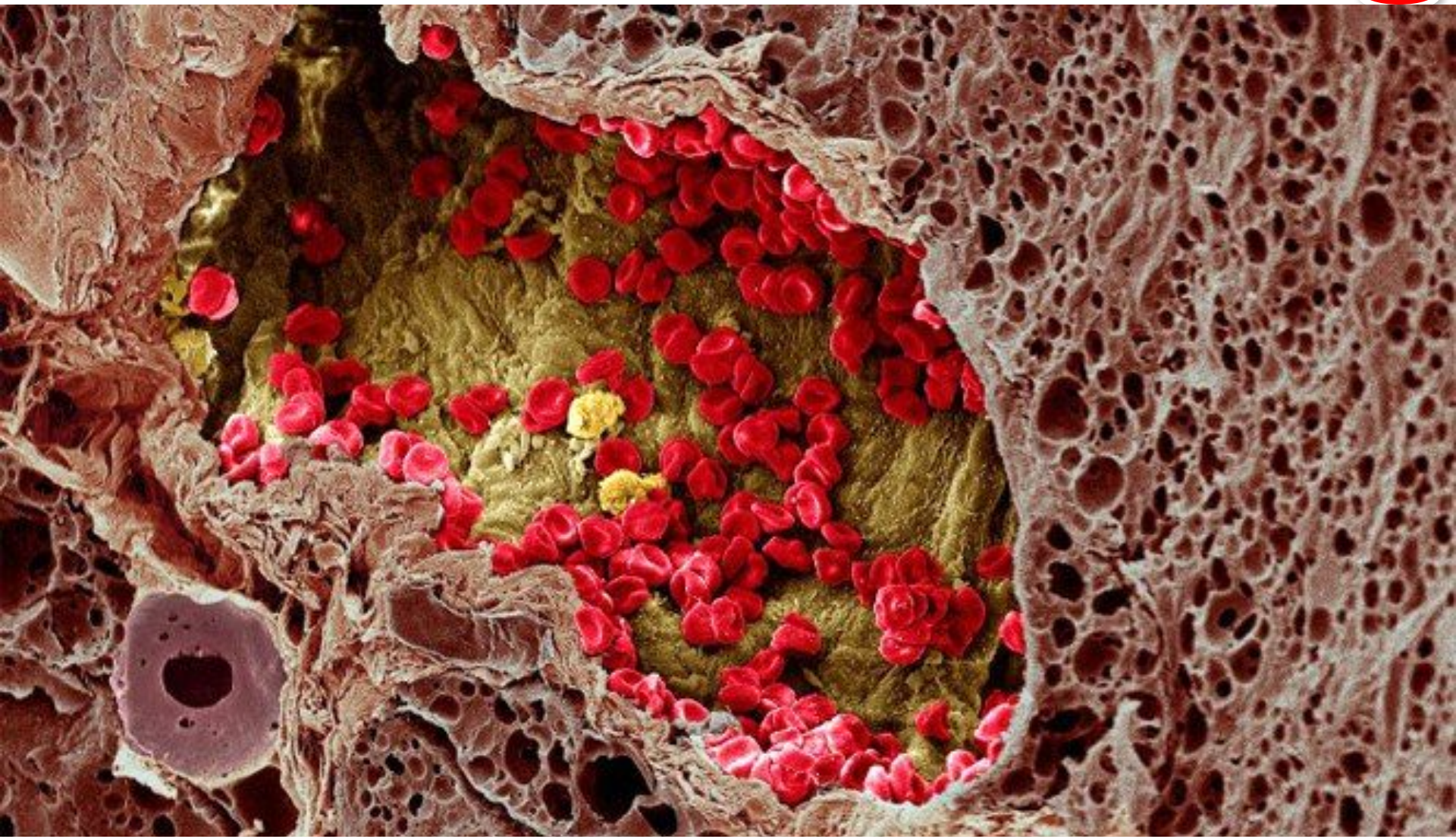
Индуцирование ангиогенеза



Получение питательных веществ и кислорода,

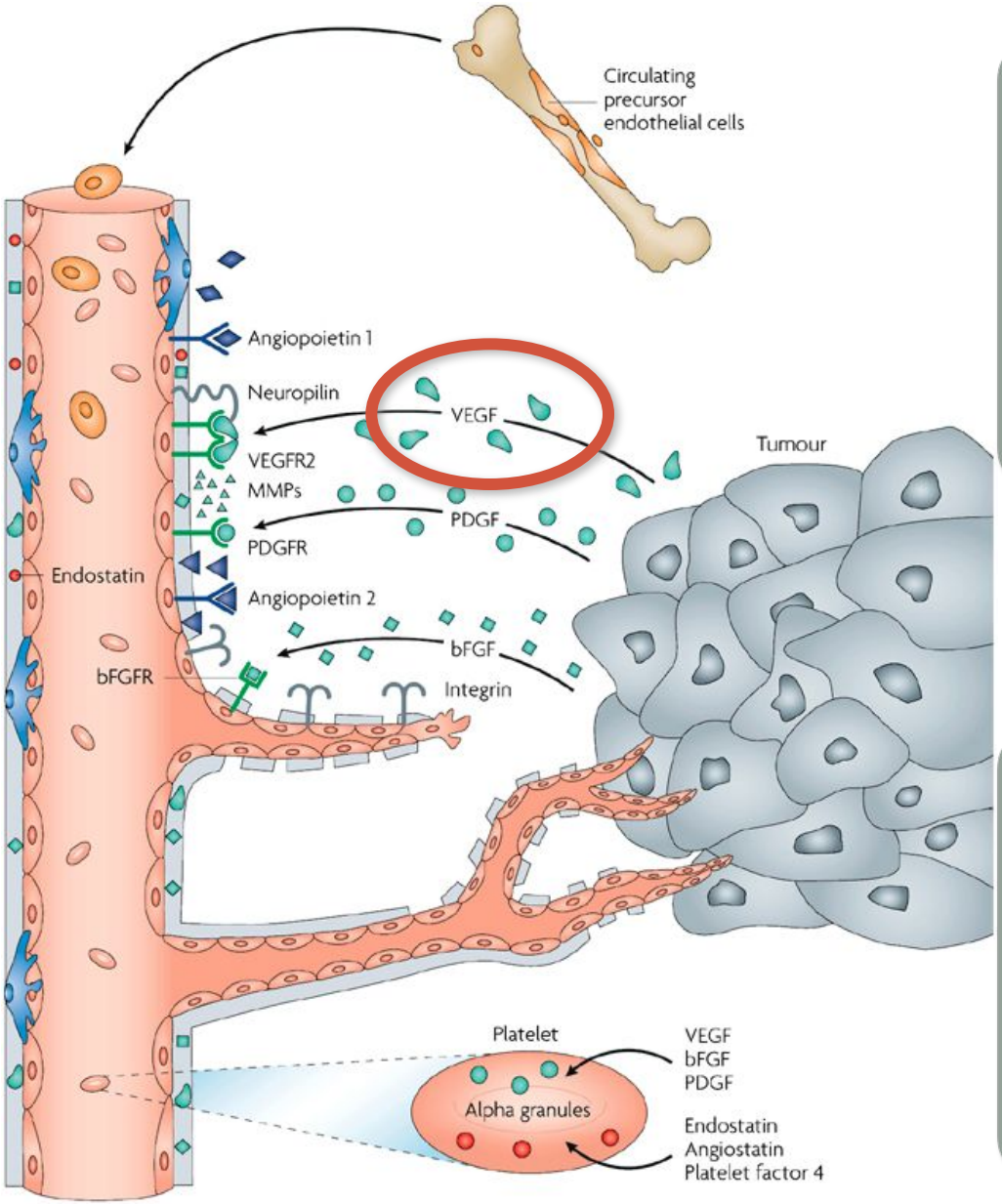
Выведение метаболических отходов и углекислого газа

Индуцирование ангиогенеза



Изображение: Крио-электронная микроскопия кровеносного сосуда, вросшего в меланому и поставляющего для нее питательные вещества. Многочисленные красные кровяные клетки видны внутри сосуда.

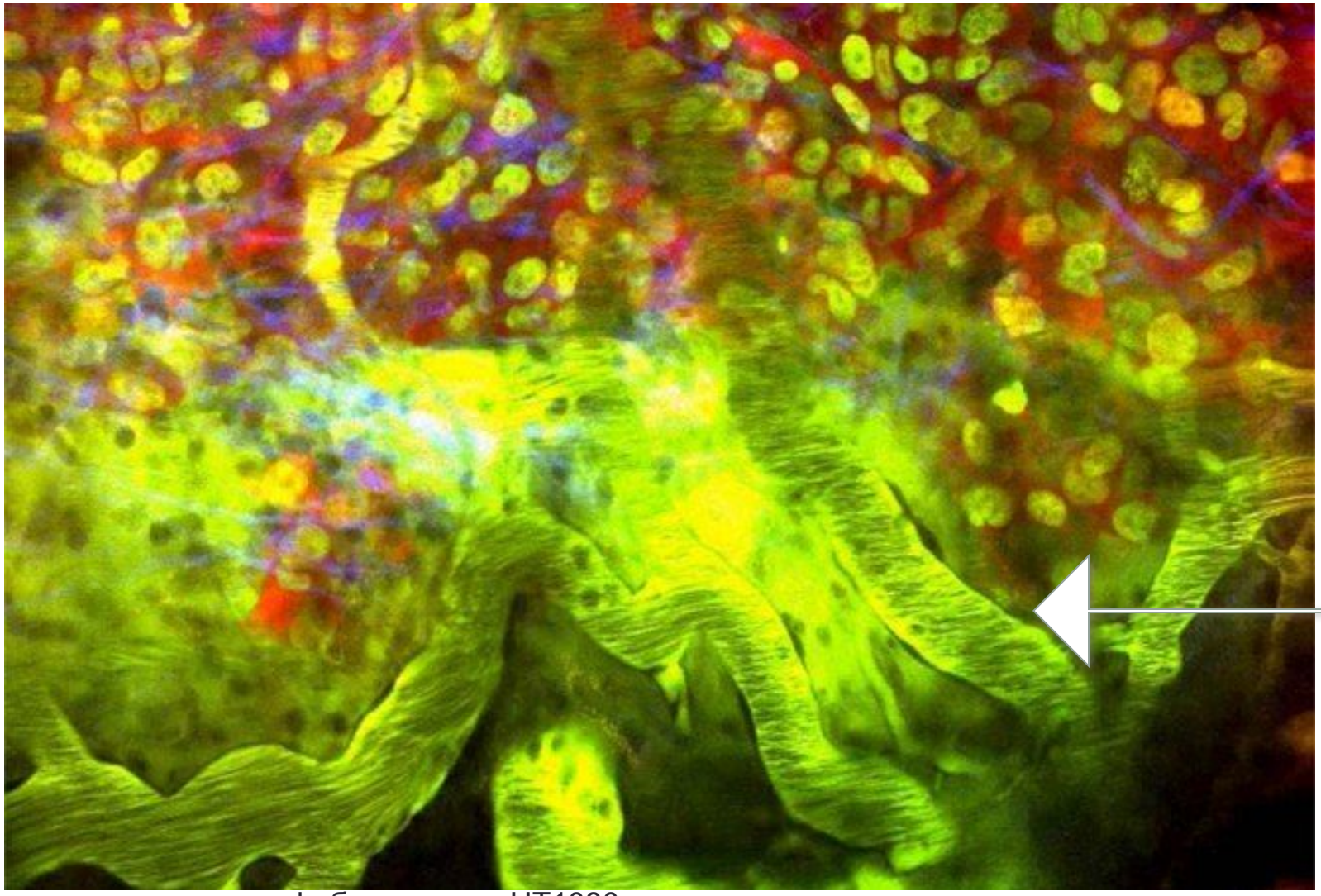
Индуцирование ангиогенеза



Продукция фактора роста эндотелия сосудов (VEGF)

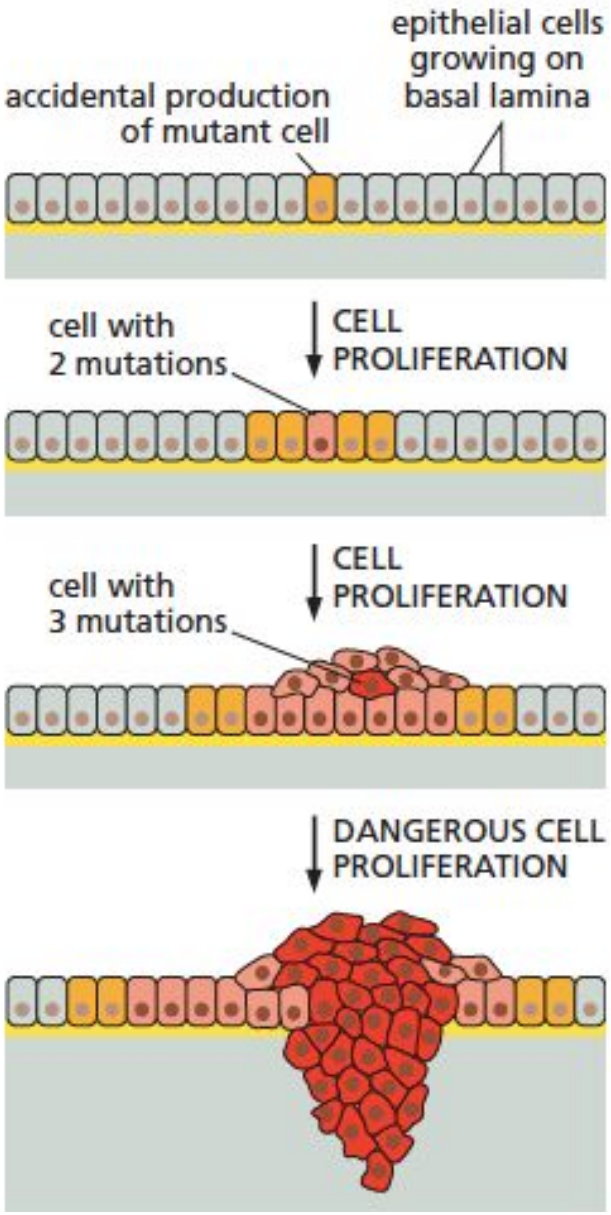
Размножение и направленная миграция эндотелиоцитов

Индуцирование ангиогенеза



Изображение: растущая фибросаркома HT1080 в дерме мыши вызывает неоангиогенез, часто в виде сосудов странной, неправильной формы с неполноценной проницаемостью. Кровеносные сосуды и внесосудистый отек мечены зелено-желтым красителем FITC-меченным декстраном; ядра и тела клеток опухоли окрашены в желтый и красный соответственно. Коллагеновые нити окрашены в синий.

Активация инвазии и метастазирования



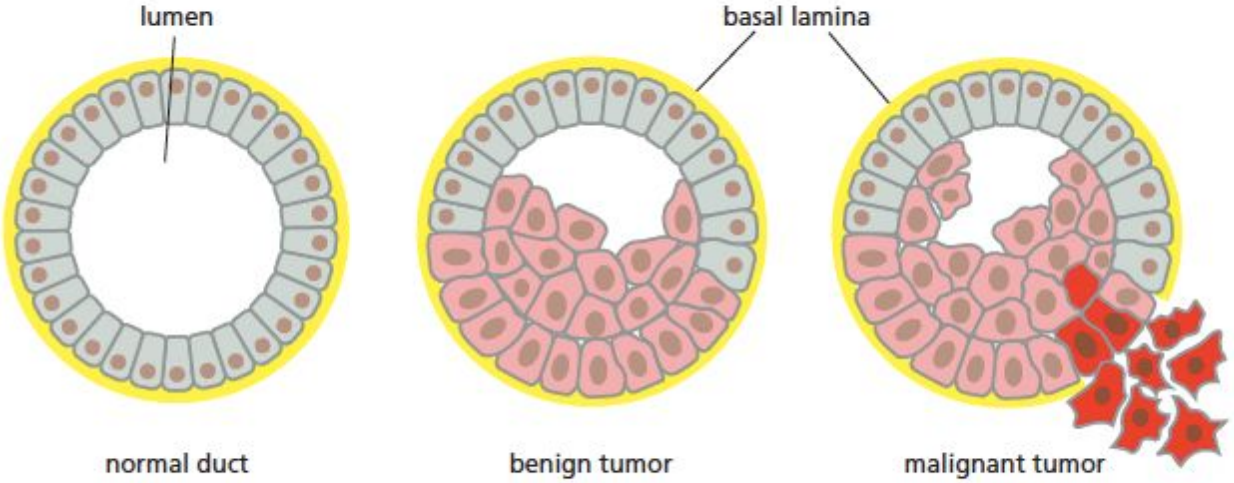
Активация G-белков семейства Ras

Повышение активности МАР-киназ

Повышение активности ГТФ-аз семейства Rho

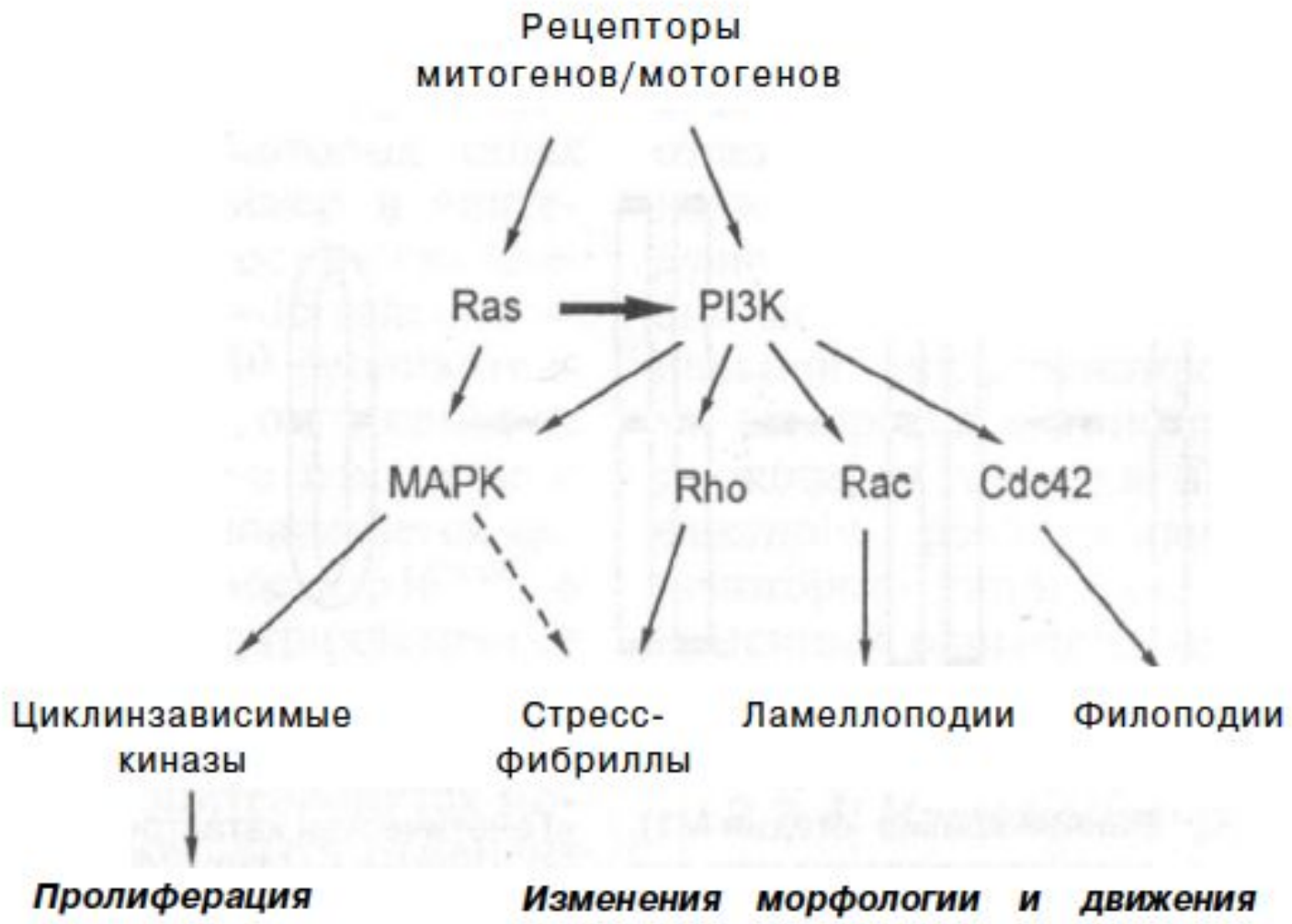
Регуляция клеточного цикла

Реорганизация цитоскелета и регуляция движения клеток

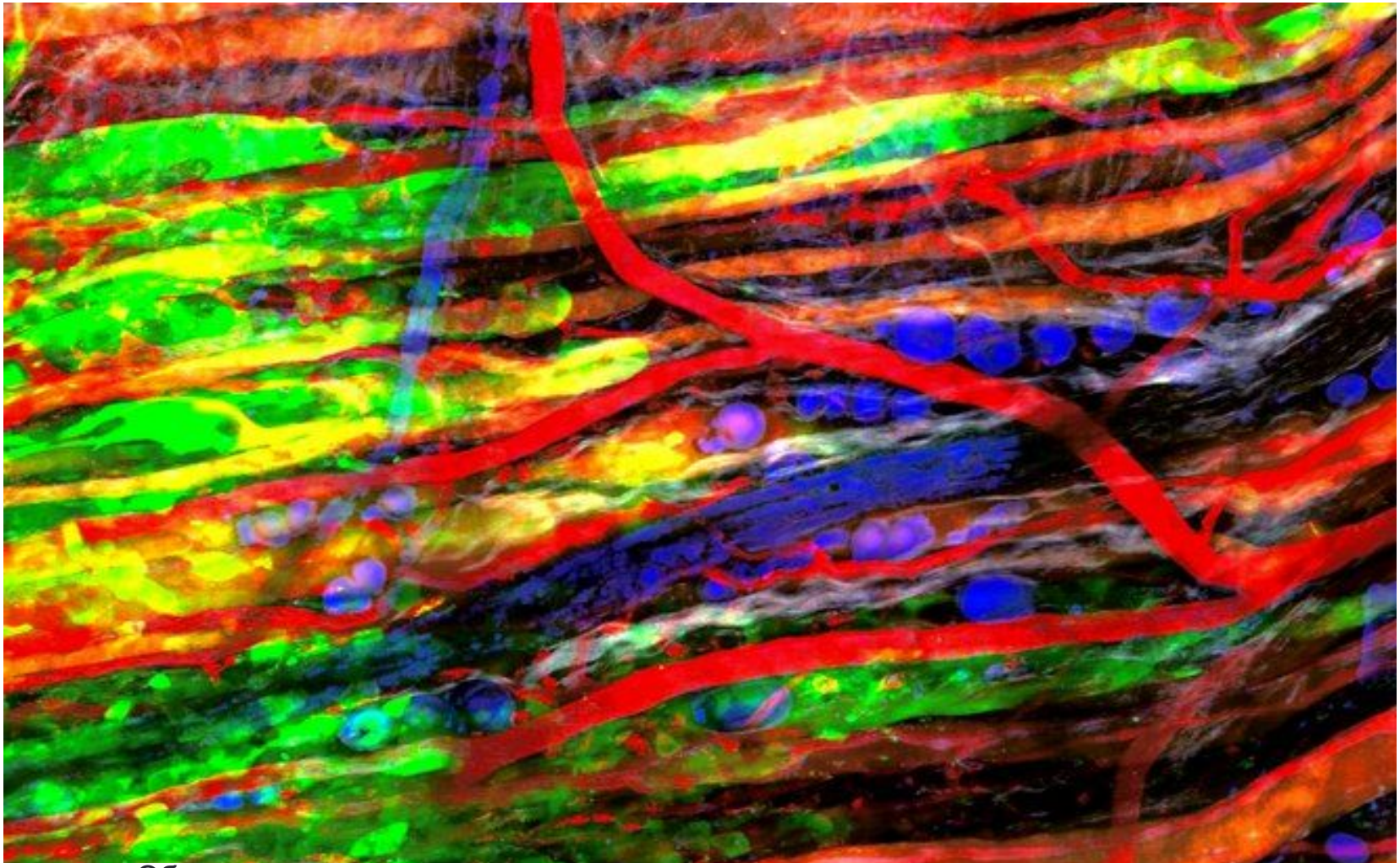


Активация инвазии и метастазирования

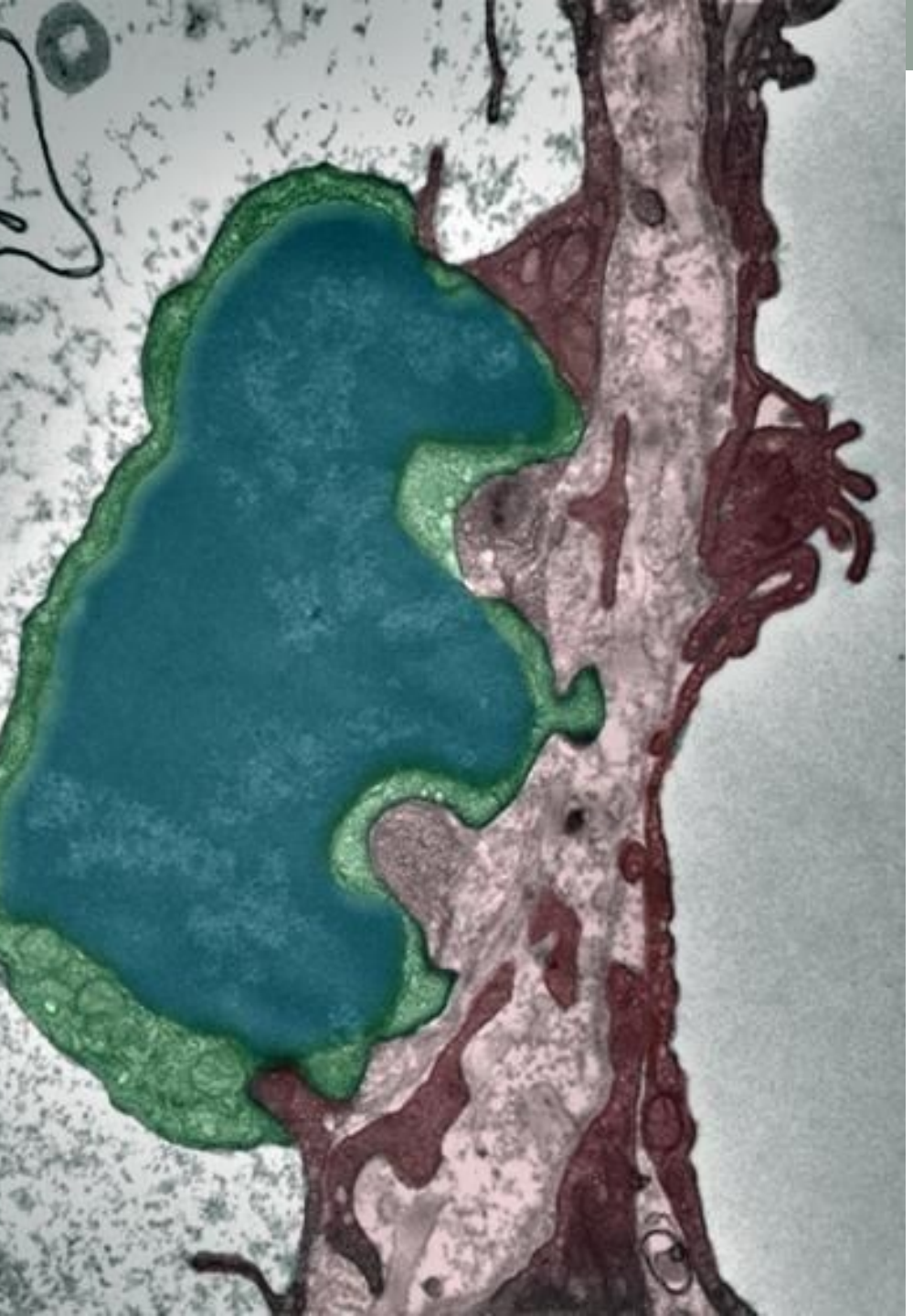
Схема 2.6. Верхние этажи сигнальных путей, активируемых рецепторами ростовых факторов. Контролируют размножение и движение клеток



Активация инвазии и метастазирования

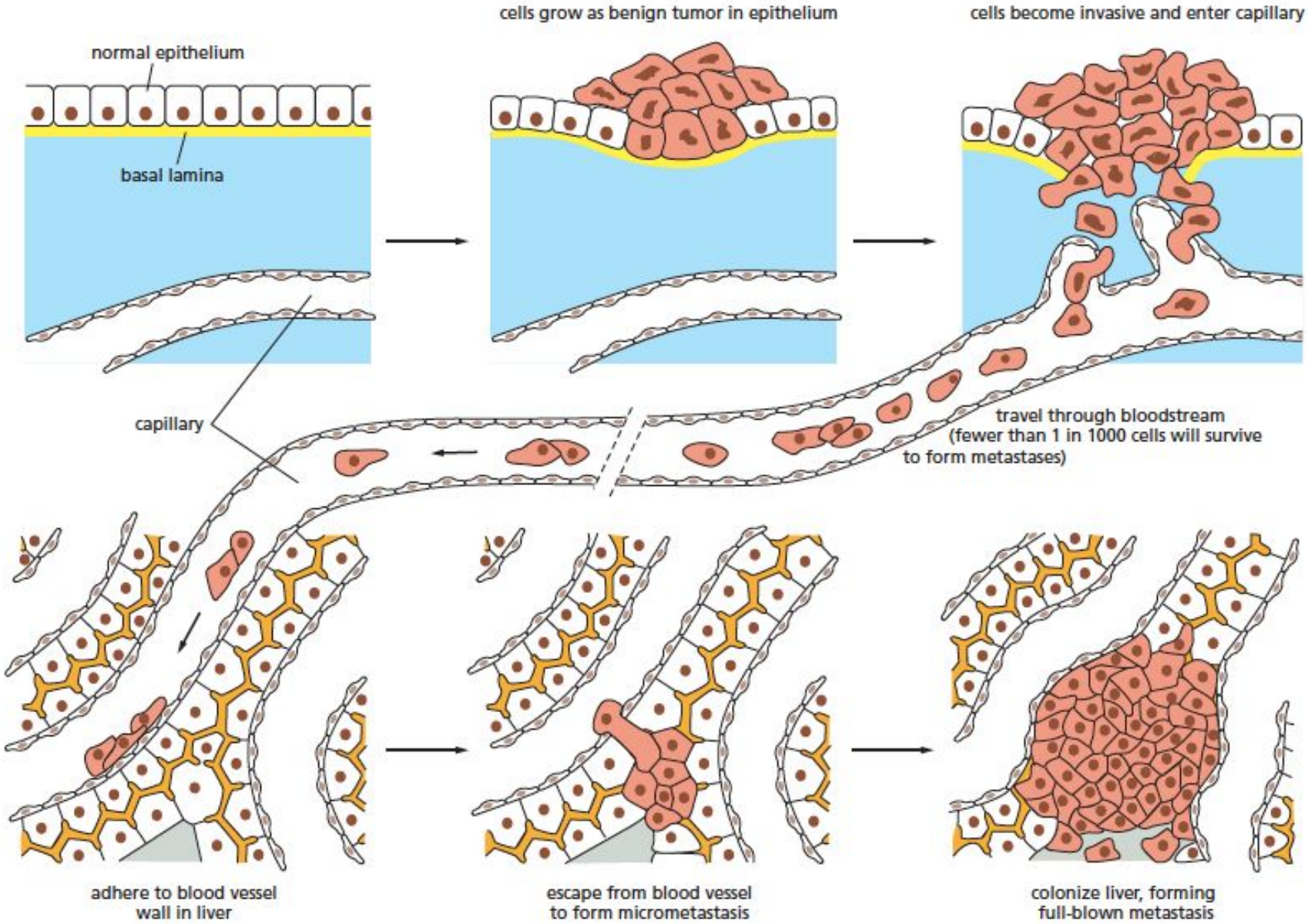


Изображение: Обзор клеток меланомы, распространяющихся в дерму мыши, при **этом клетки опухоли (зеленые) инвазируют в тканевые структуры как по одиночке, так и коллективно**. Клетки опухоли, экспрессирующие E2-Crimson окрашены (по ошибке) в зеленый цвет, а мышечные волокна, экспрессирующие GFP, - в оранжевый. Нервные волокна и коллаген окрашены в синий (третья гармоника) и серый (вторая гармоника) цвета соответственно. AlexaFluor660-декстран окрашен в красный цвет.



клетка рака легких,
прорастающая в
кровеносный сосуд

Активация инвазии и метастазирования



Активация инвазии и метастазирования

каскад инвазии и метастазирования

местная инвазия

↓

интравазация опухолевых клеток (проникновение в прилегающие кровеносные или лимфатические сосуды)

↓

передвижение опухолевых клеток через лимфатическую и гематогенную системы,

↓

переход клеток из просвета таких сосудов в паренхиму отдалённых тканей (экстравазация),

↓

формирование небольших узелков опухолевых клеток (микрометастазы)

↓

рост очагов микрометастатических поражений в макроскопические опухоли - «колонизацией».

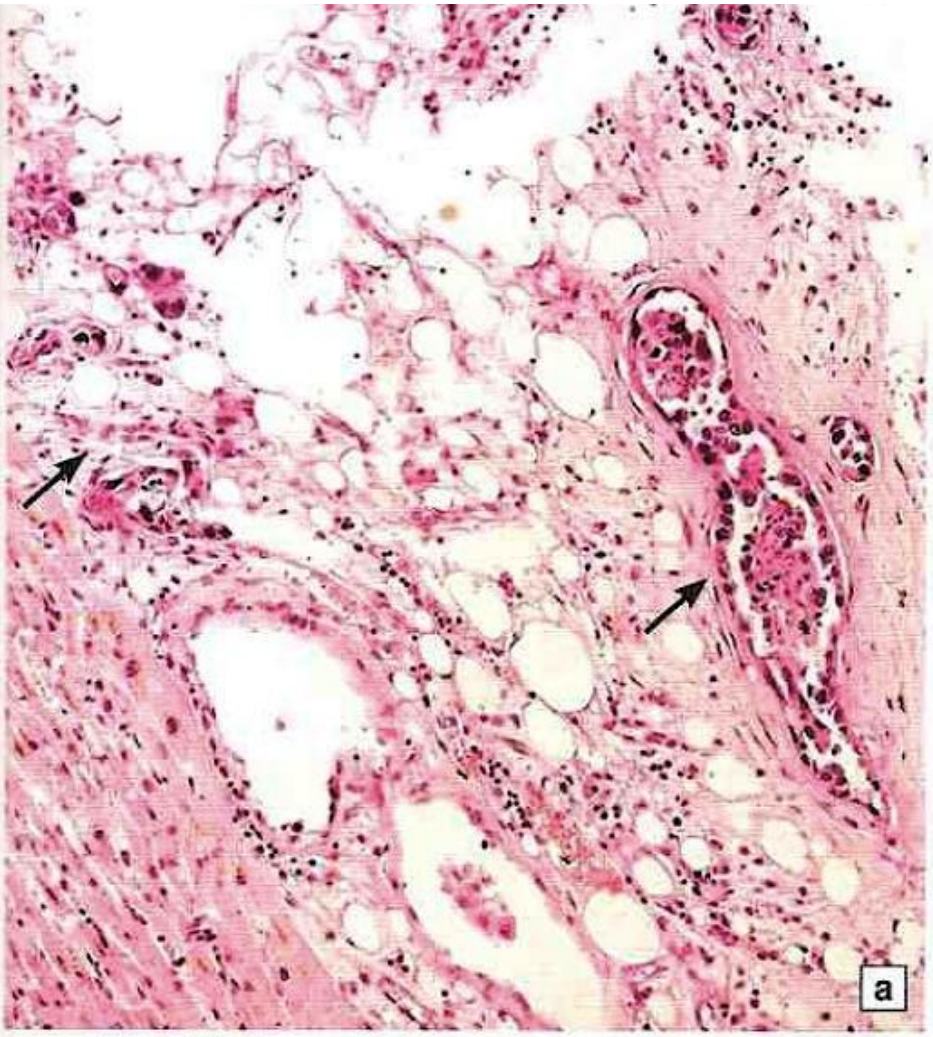
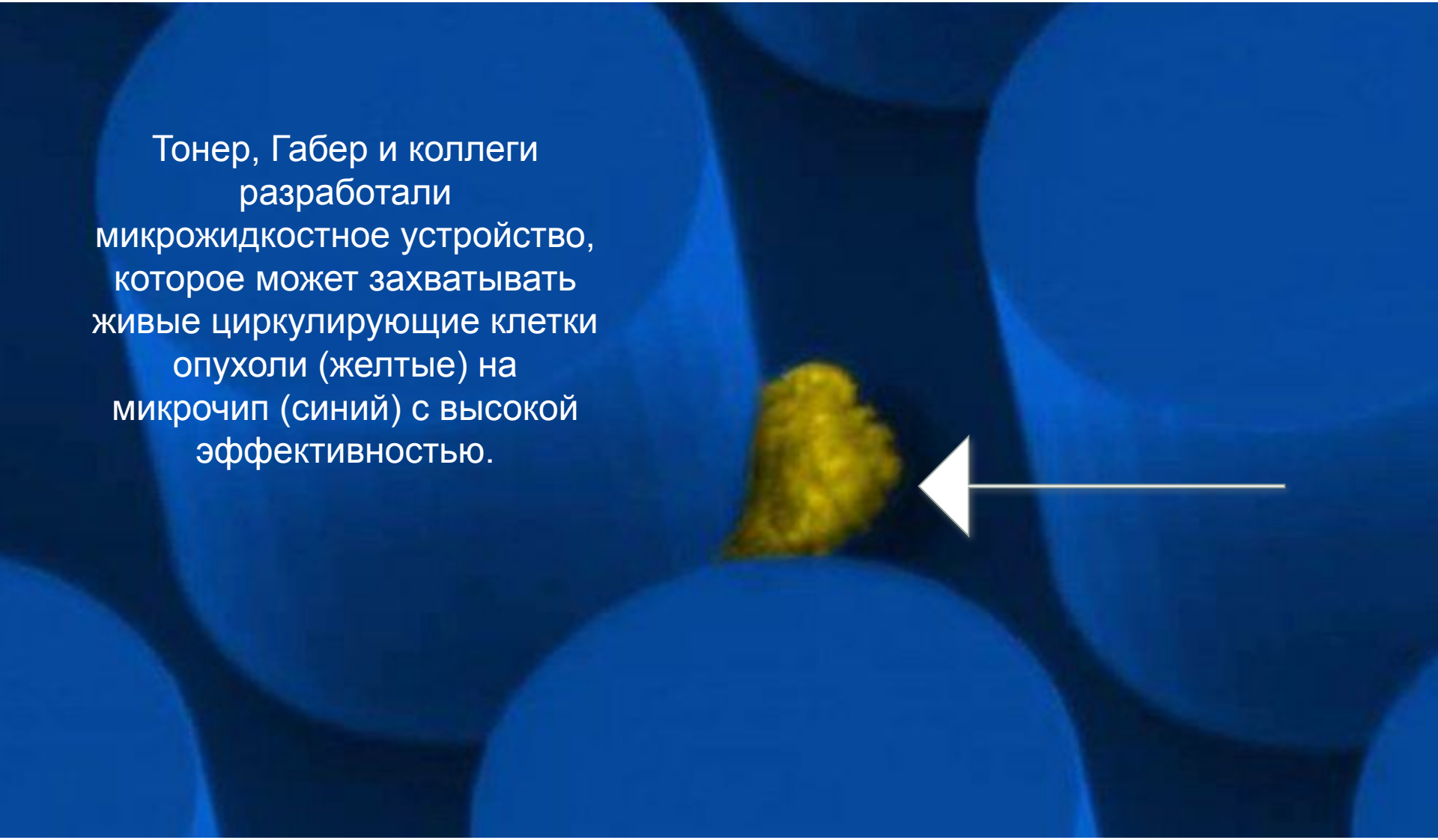
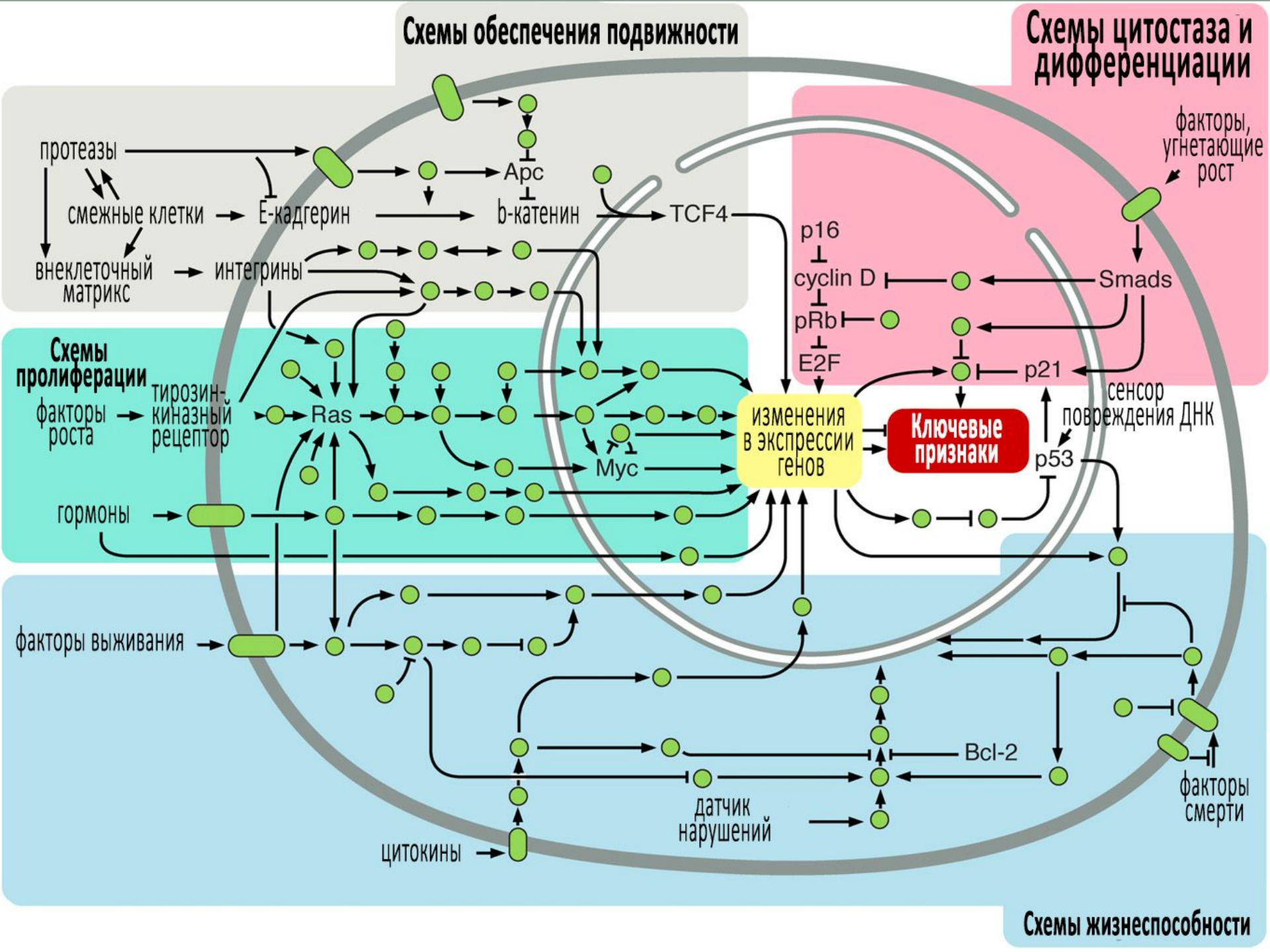


Рис. 10–25. Микропрепараты (а, б). Опухолевые эмболы плоскоклеточного рака легкого в кровеносных и лимфатических сосудах эпикарда и миокарда. Группы опухолевых клеток (*стрелки*) в просвете мелких кровеносных и лимфатических сосудов эпикарда и миокарда; а — × 100; б — × 200. См. также рис. 5–40

Активация инвазии и метастазирования



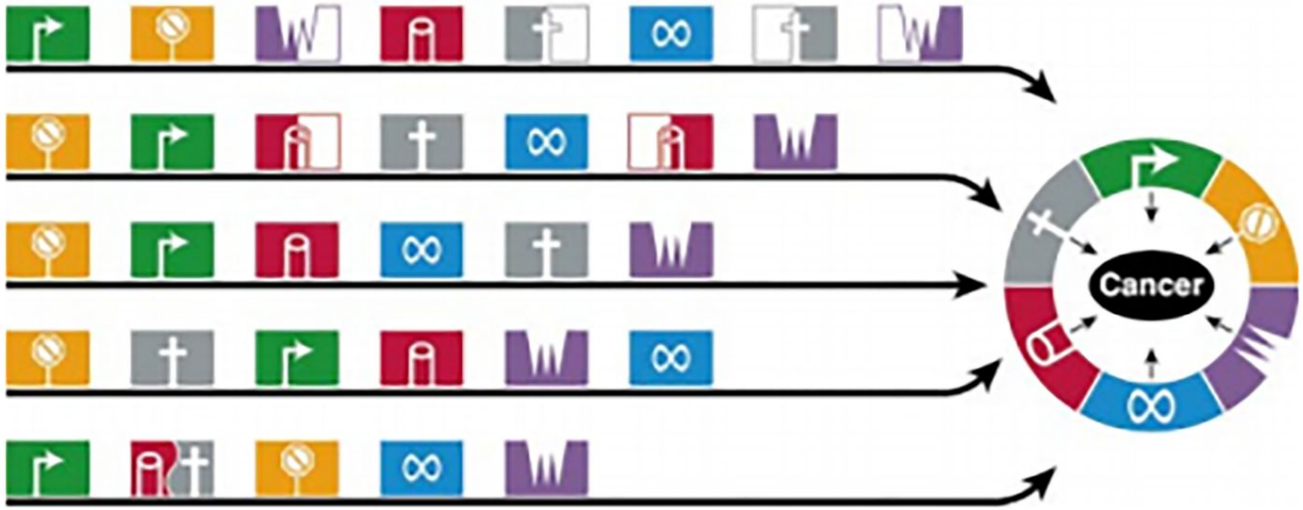
Изображение: Сканирующий электронный микроскоп. Циркулирующая клетка опухоли, захваченная на микрочип, увеличение 430x, мощность 10 кВ.


Схемы обеспечения подвижности
Схемы цитостаза и дифференциации
протеазы
Apc
смежные клетки
E-кадгерин
b-катенин
TCF4
внеклеточный матрикс
интегрины
факторы, угнетающие рост
p16
cyclin D
Smads
pRb
E2F
p21
Схемы пролиферации
факторы роста
тирозин-киназный рецептор
Ras
изменения в экспрессии генов
Ключевые признаки
сенсор повреждения ДНК
Myc
p53
гормоны
факторы выживания
Bcl-2
датчик нарушений
факторы смерти
цитокины
Схемы жизнеспособности

A

компонент	Приобретенные способности	Пример механизма
	Самообеспеченность митогенными сигналами	Активация H-Ras онкогена
	Нечувствительность к сигналам, подавляющим рост	Потеря супрессора ретинобластомы
	Избегание апоптоза	Производство IGF факторов выживания
	Неограниченный репликативный потенциал	Активация теломеразы
	Поддерживаемый ангиогенез	Производство VEGF
	Инвазия в ткани и метастазы	Деактивация E-кадгерина

B

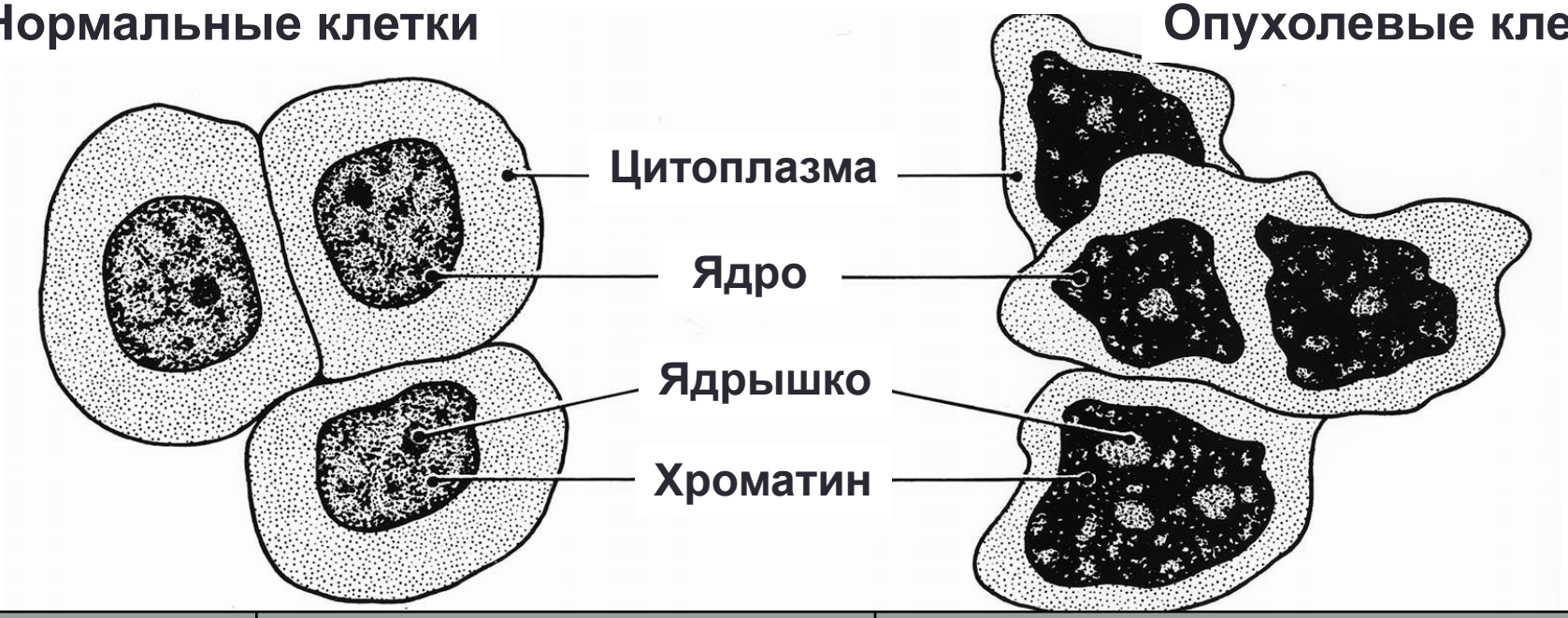


ОПУХОЛЕВОЕ МИКРООКРУЖЕНИЕ

Опухолевые клетки

- фундамент заболевания; дают начало опухолям и запускают опухолевую прогрессию, заключая в себе мутации онкогенов и опухолевых супрессоров, что определяет рак как генетическое заболевание

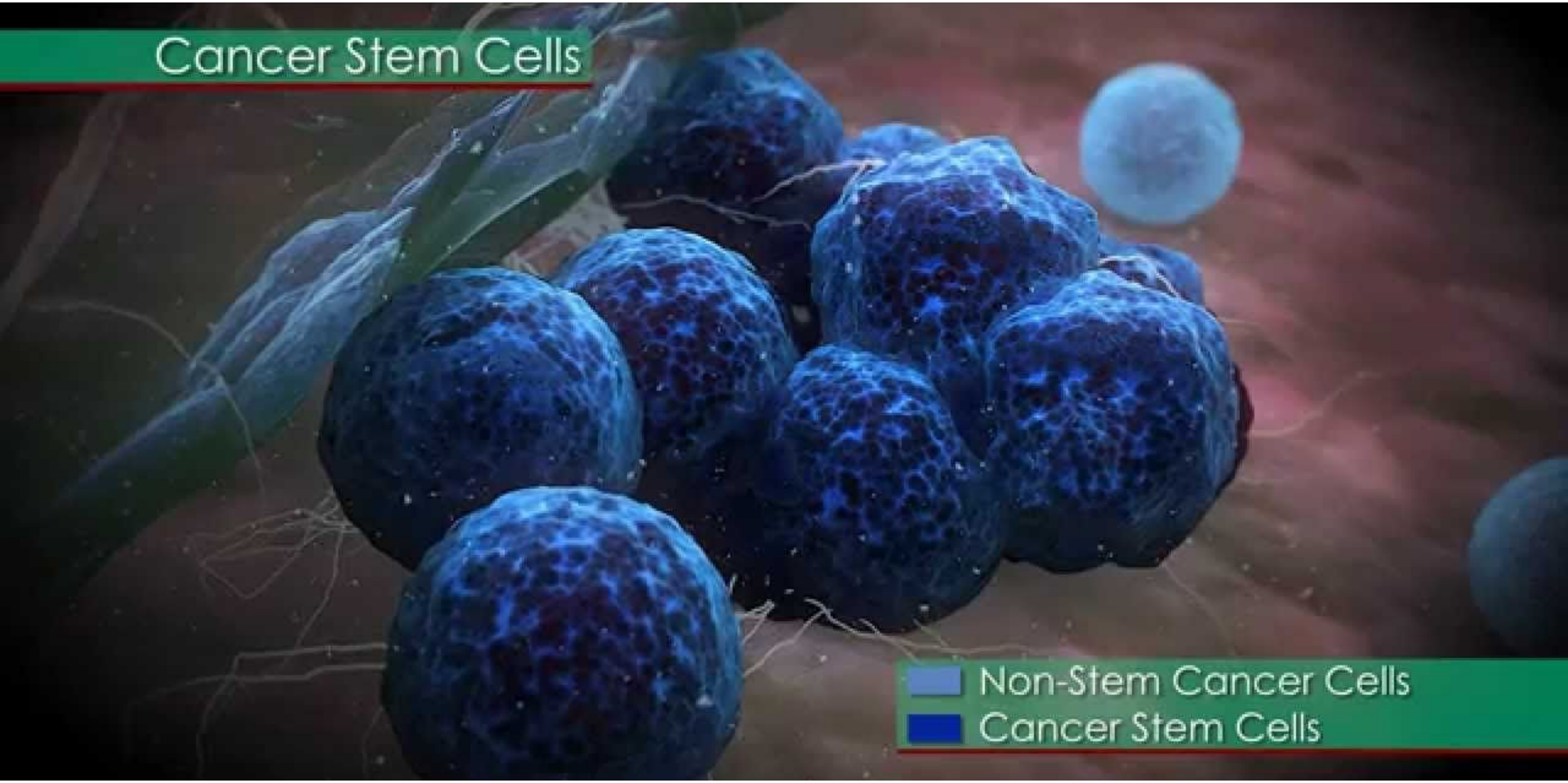
Нормальные клетки **Опухолевые клетки**



Признак	Нормальные клетки	Опухолевые клетки
Цитоплазма	Большая	Маленькая
Ядро	Одно	Несколько
Ядрышко	Одно	Несколько или увеличенное
Хроматин	Тонкий	Грубый

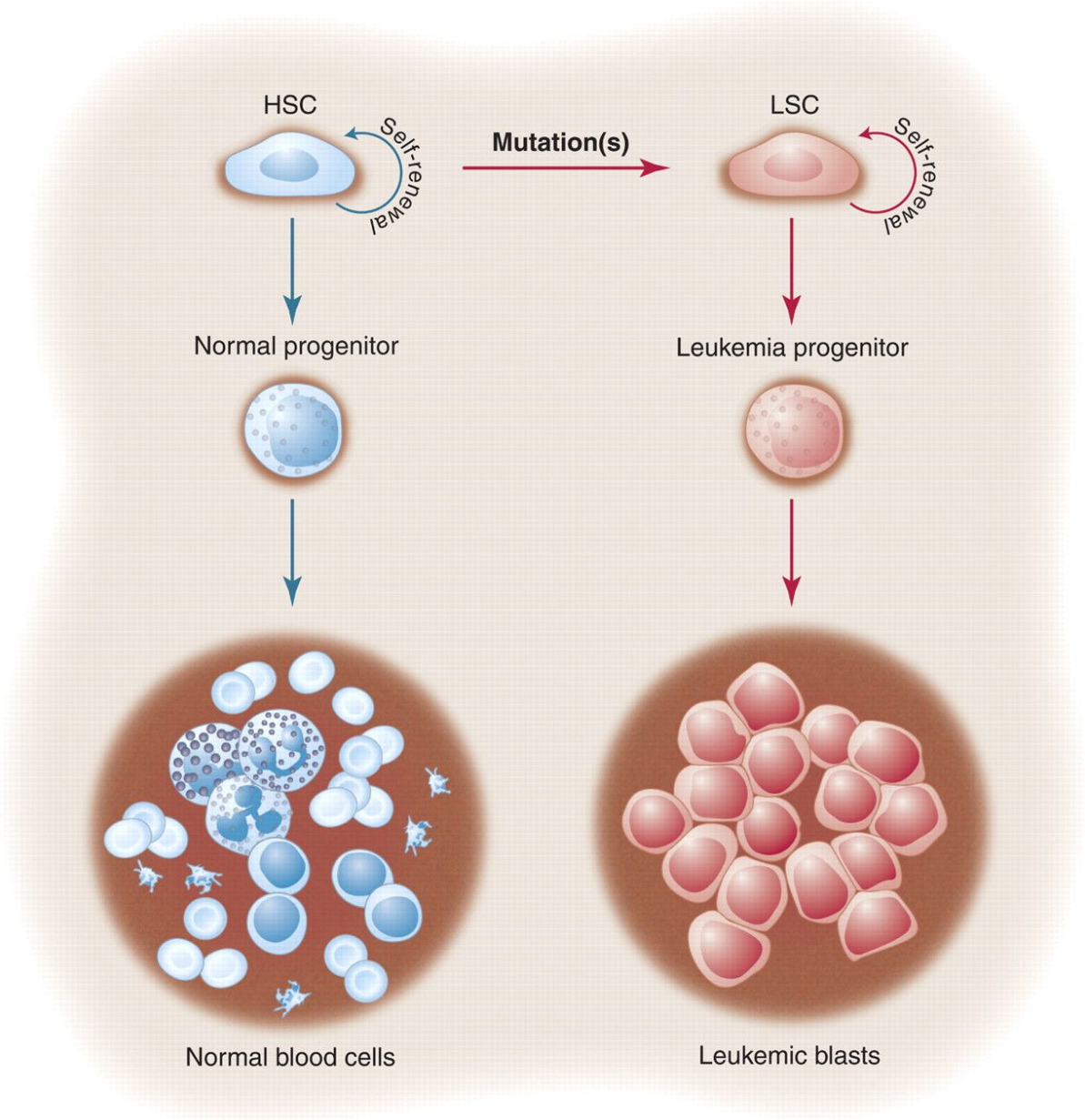
Опухолевые стволовые клетки

- субпопуляции неопластических клеток с усиленной способностью давать начало новым опухолям после имплантации в иммунодефицитных мышах

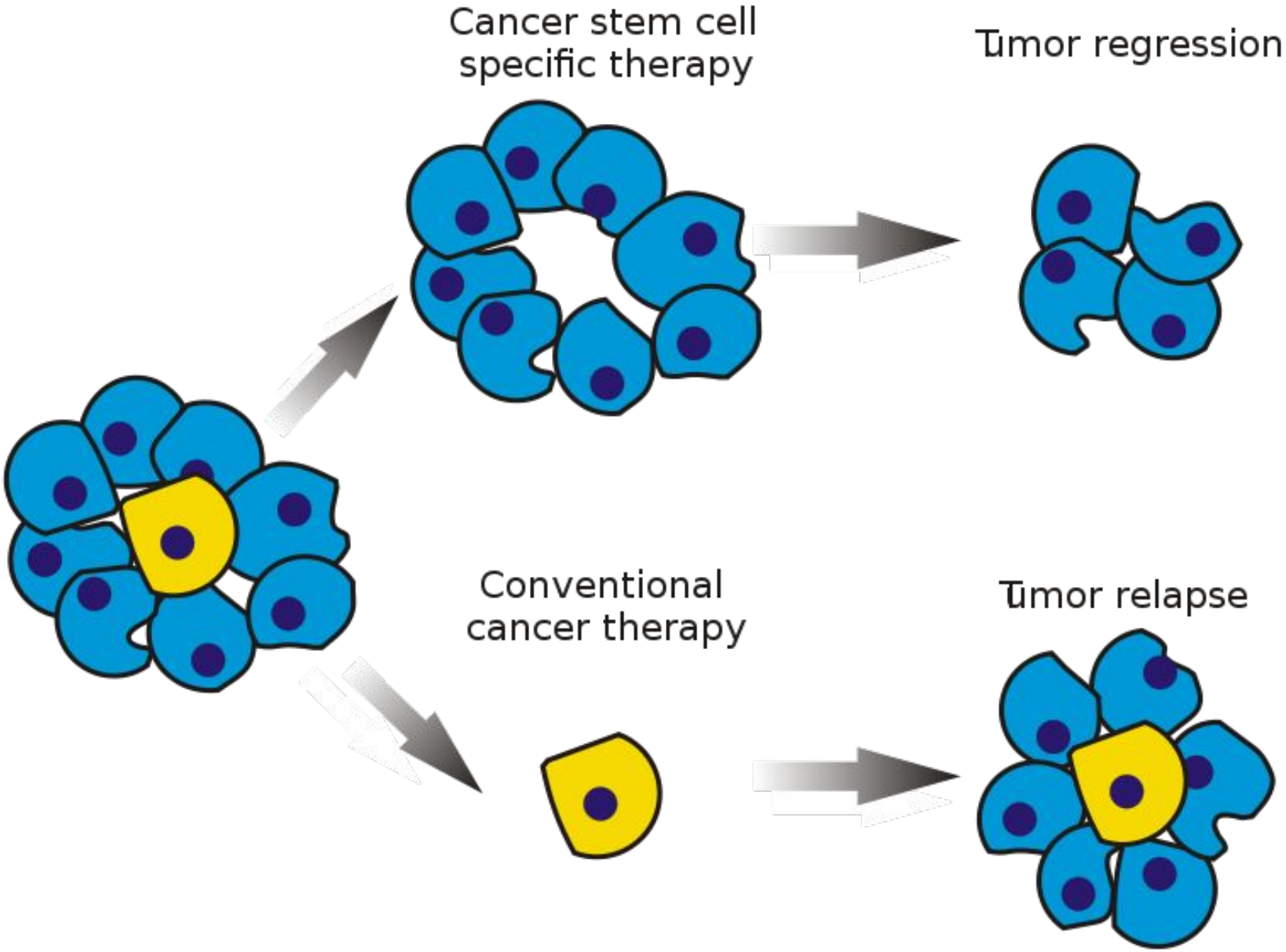


являются составной частью многих, если не большинства, опухолей, хоть и представлены в них в сильно варьирующих количествах

Опухолевые стволовые клетки

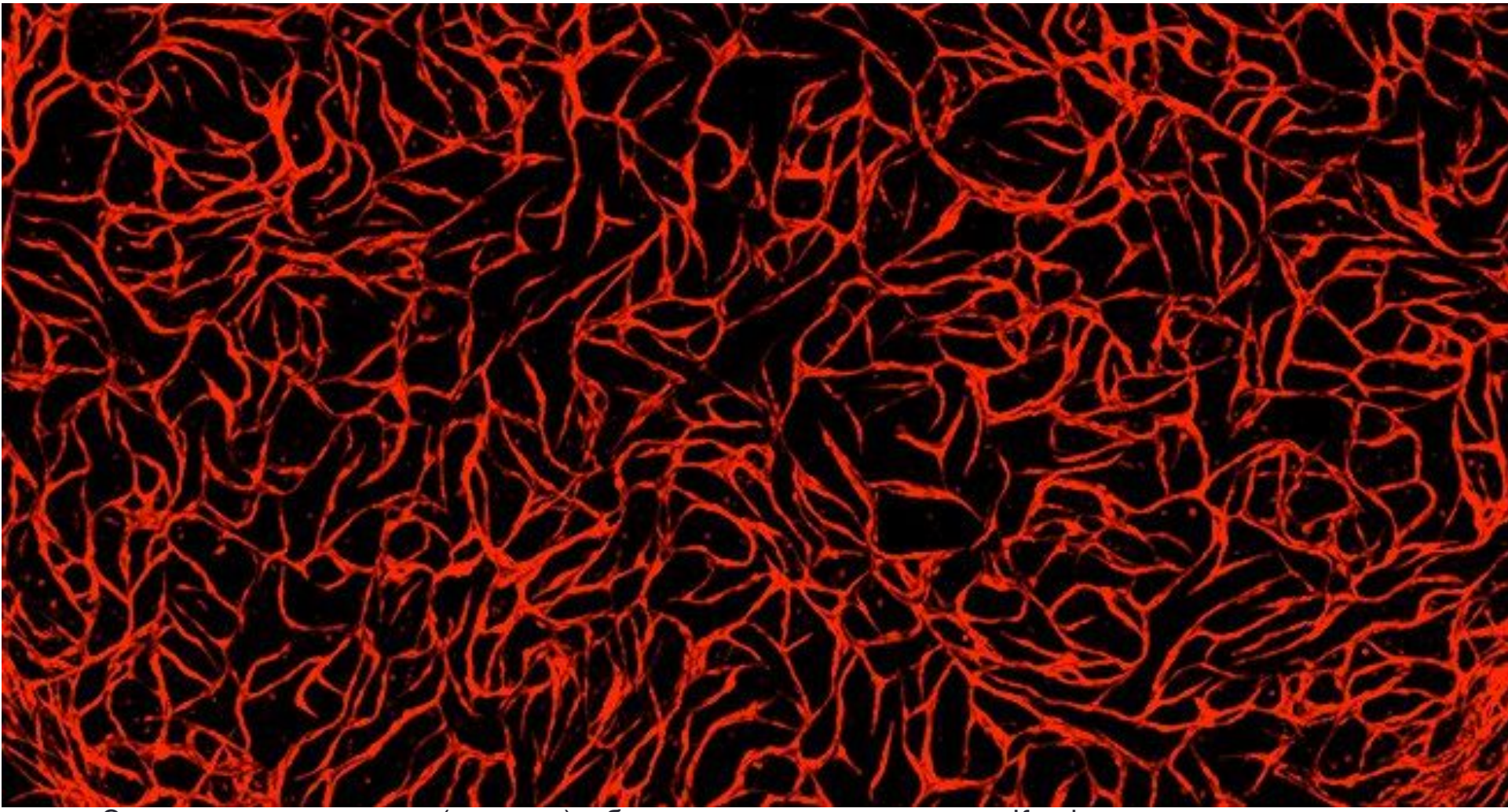


Опухолевые стволовые клетки



Эндотелиальные клетки

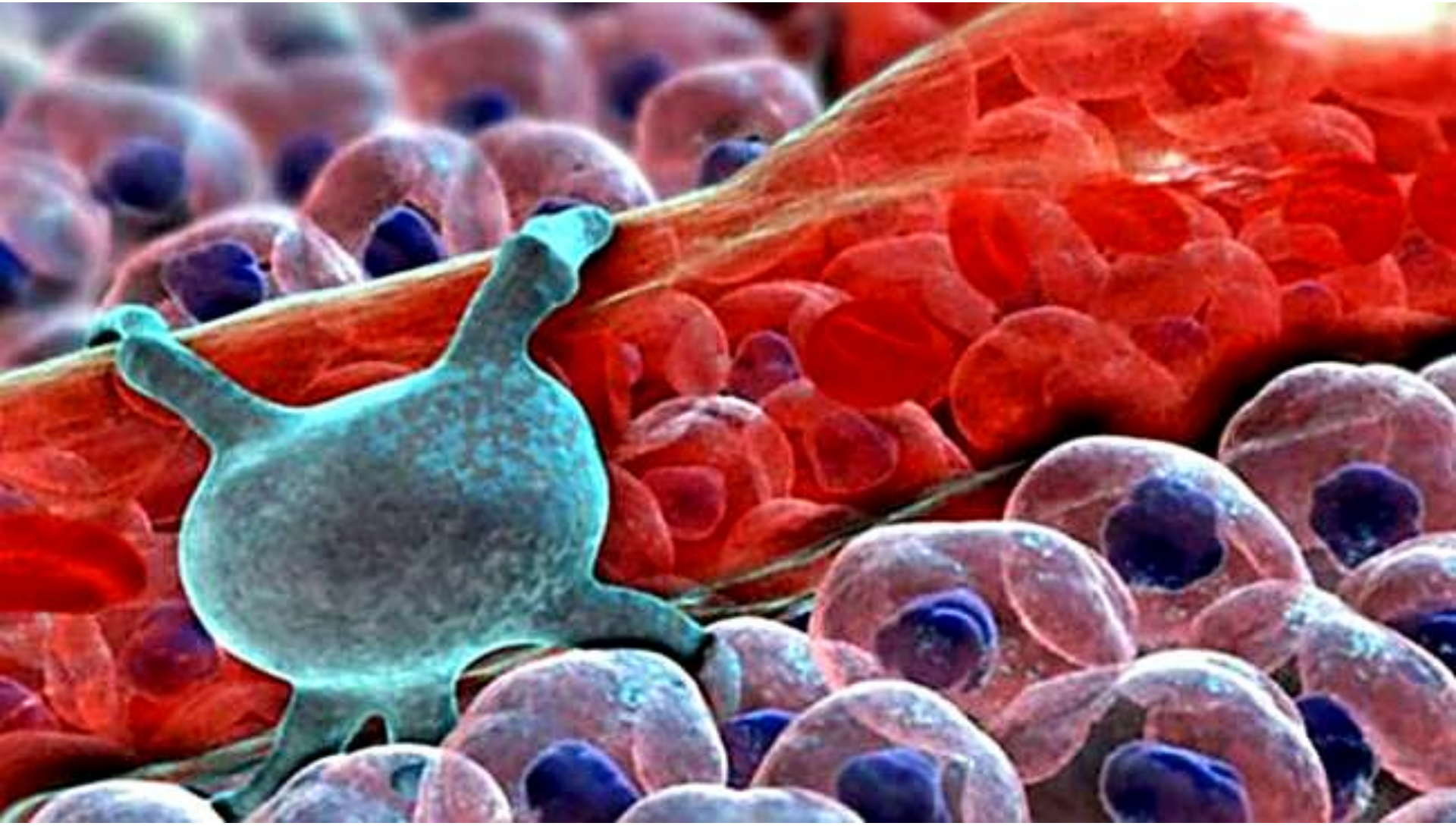
Важнейшими среди компонентов стромы являются клетки, формирующие опухолевую сосудистую сеть.



Эндотелиальные клетки (красные), образующие сеть капилляров. Конфокальная микроскопия. Автор изображения: Кир Гаджар, Фред Хатчинсон. Центр по изучению злокачественных опухолей.

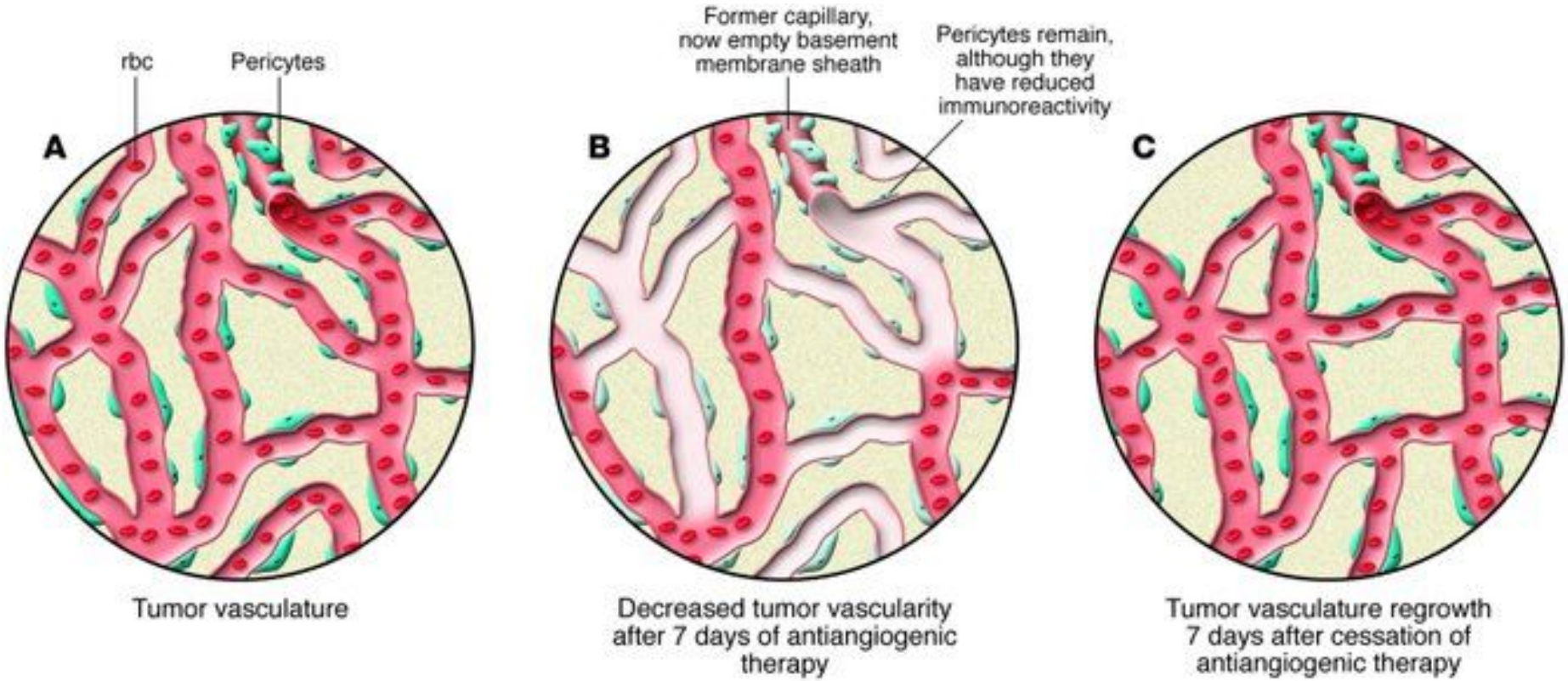
Индуцирование ангиогенеза

Перициты как важные составляющие новообразованных сосудов



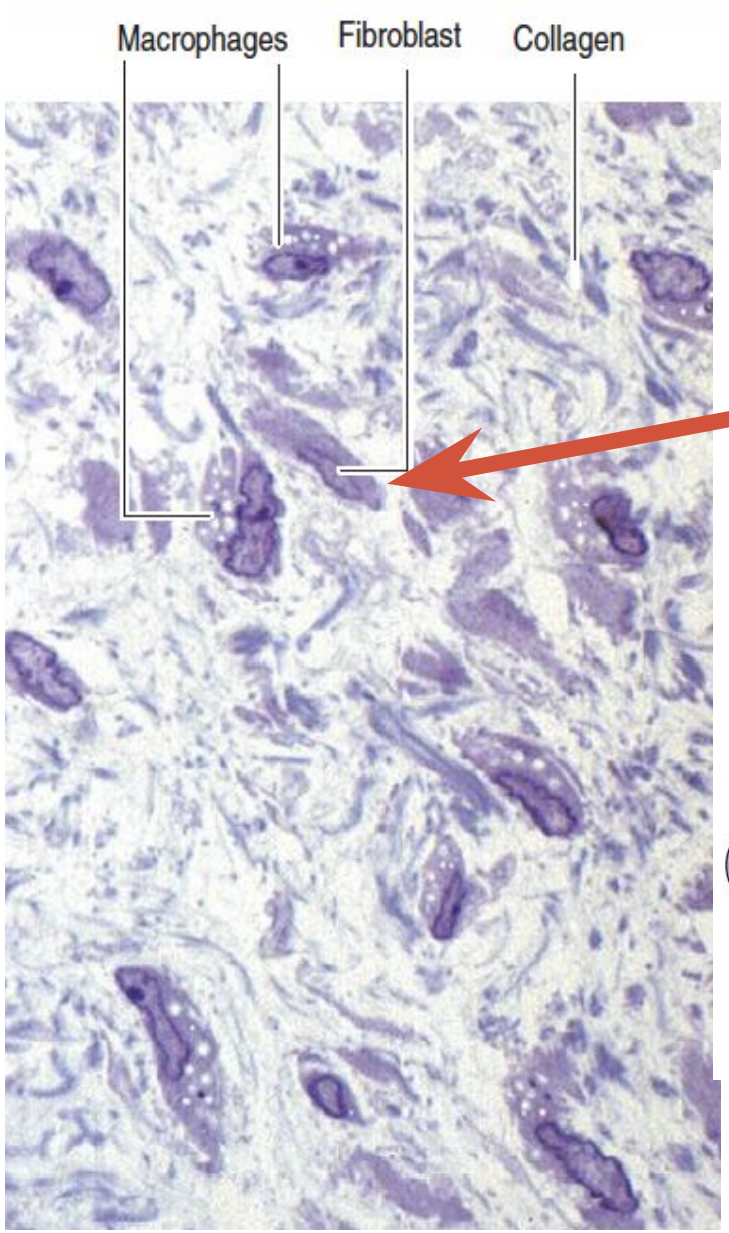
перициты ассоциированы с сосудами большинства, если не всех, опухолей

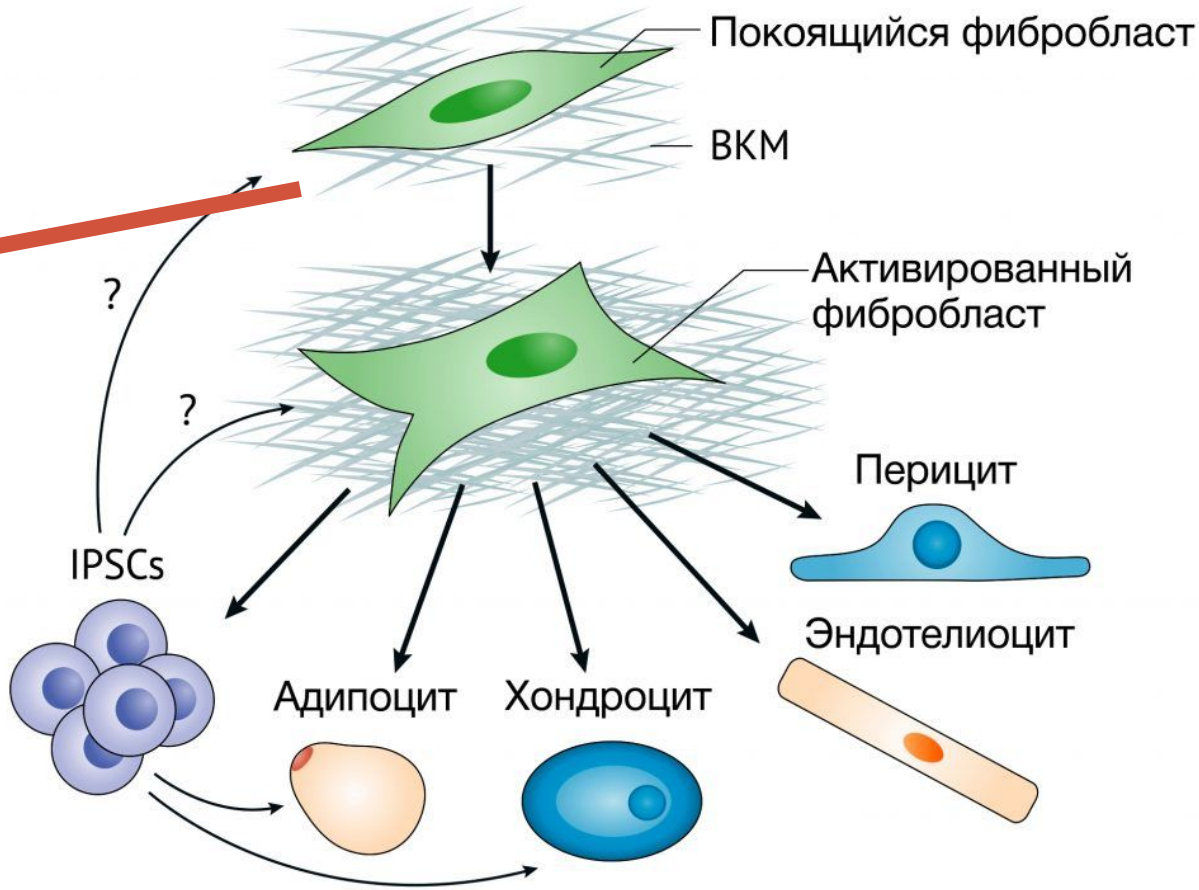
Индуцирование ангиогенеза



исследования свидетельствуют о том, что перициты необходимы для сохранения и обновления функциональной сосудистой сети опухолей (functional tumor neovasculature).

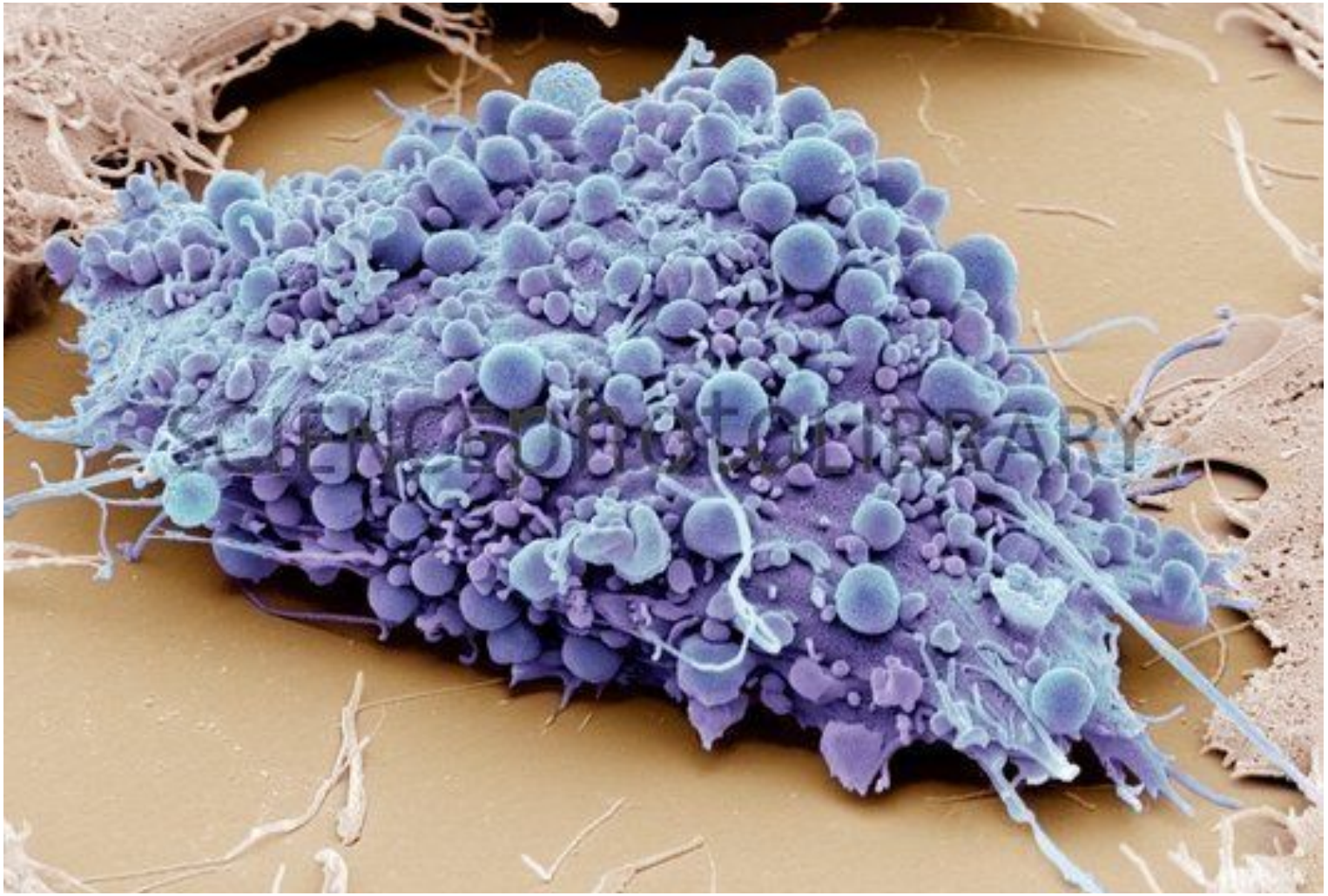
Ассоциированные с опухолью фибробласты





Стволовые и прогениторные клетки опухолевой стромы

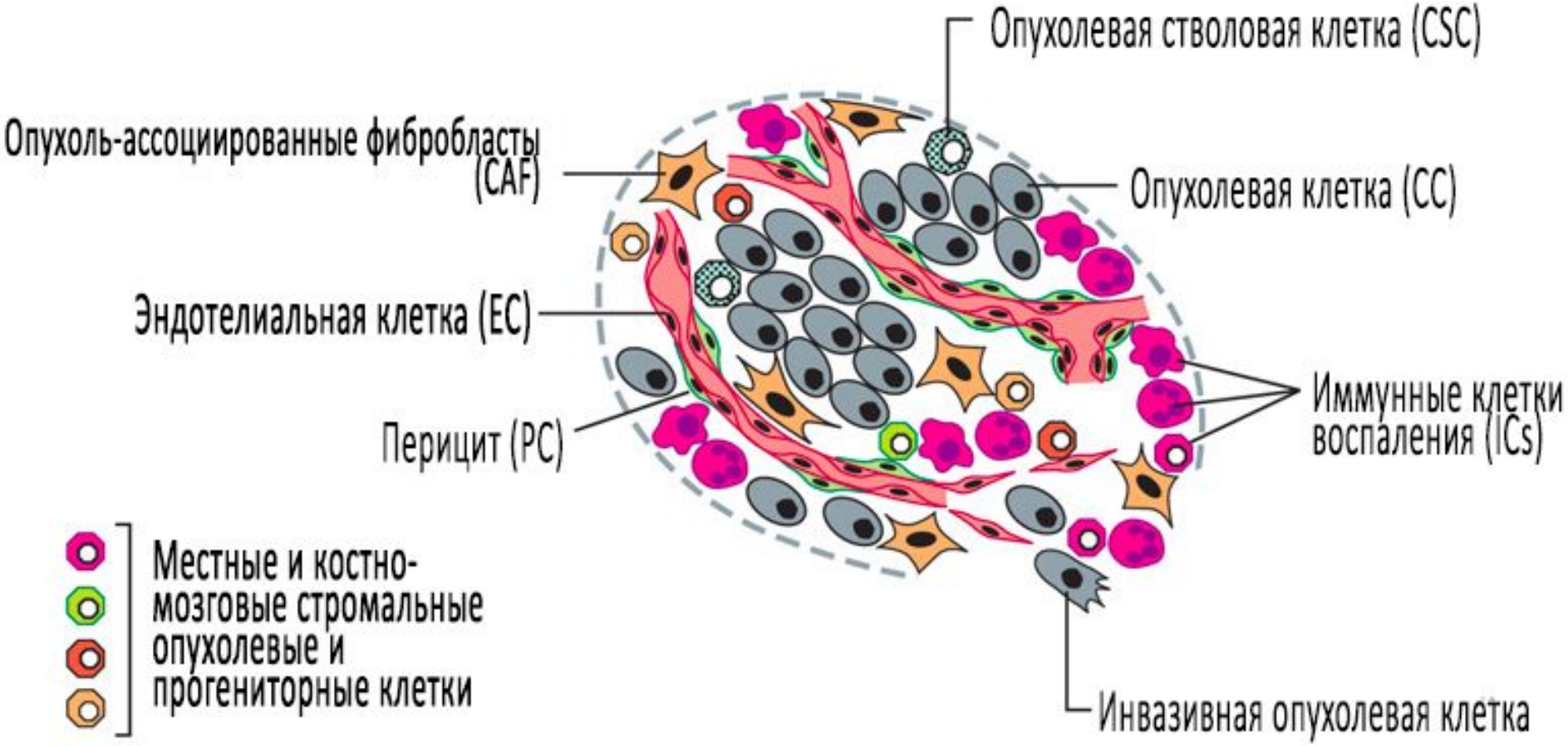
источником опухолевых стромальных клеток считается костный мозг



Мезенхимальная стволовая клетка человека

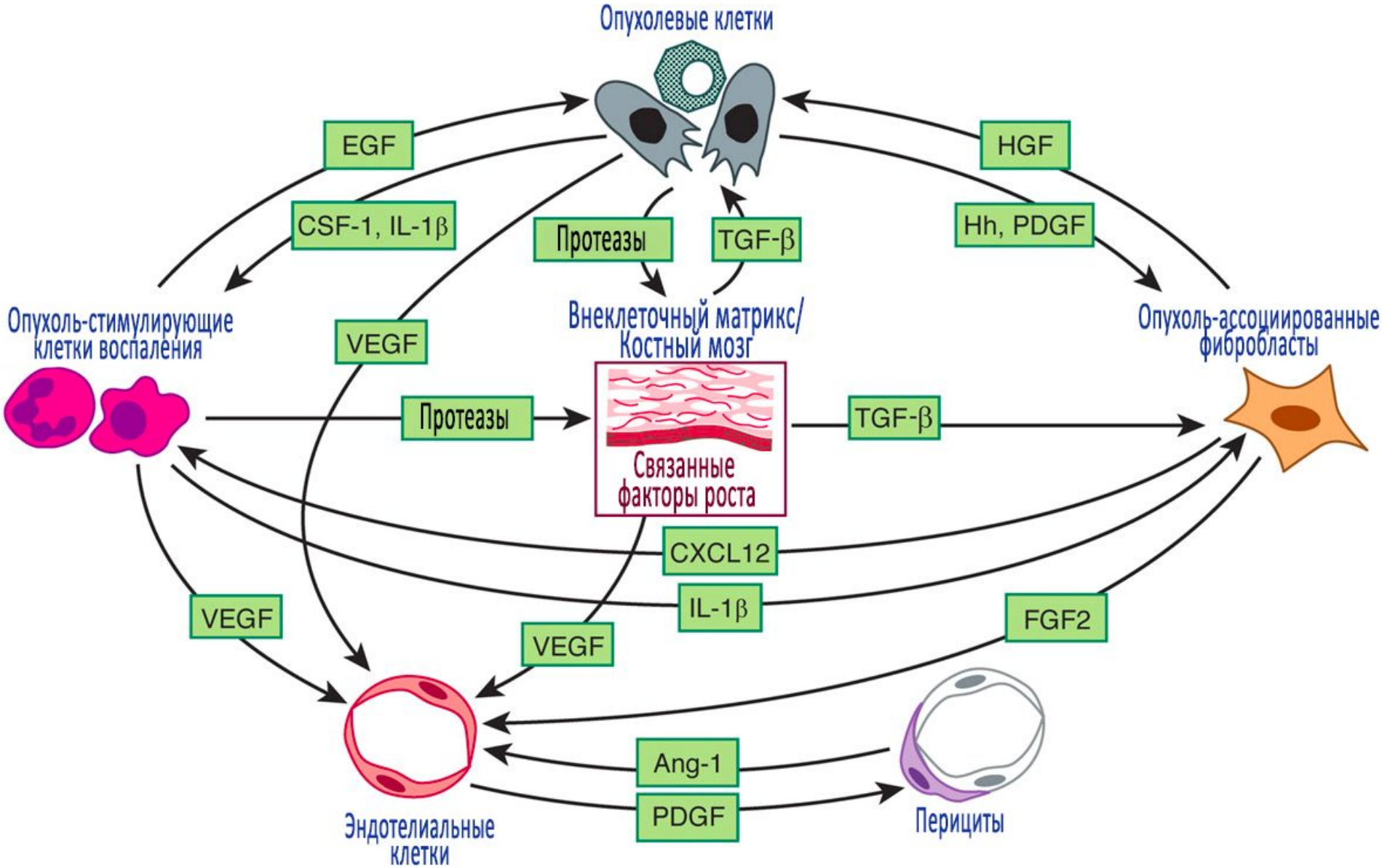
Опухолевое микроокружение

Паренхима и строма опухолей содержит разные клеточные типы и подтипы, которые вместе активируют опухолевые рост и прогрессию

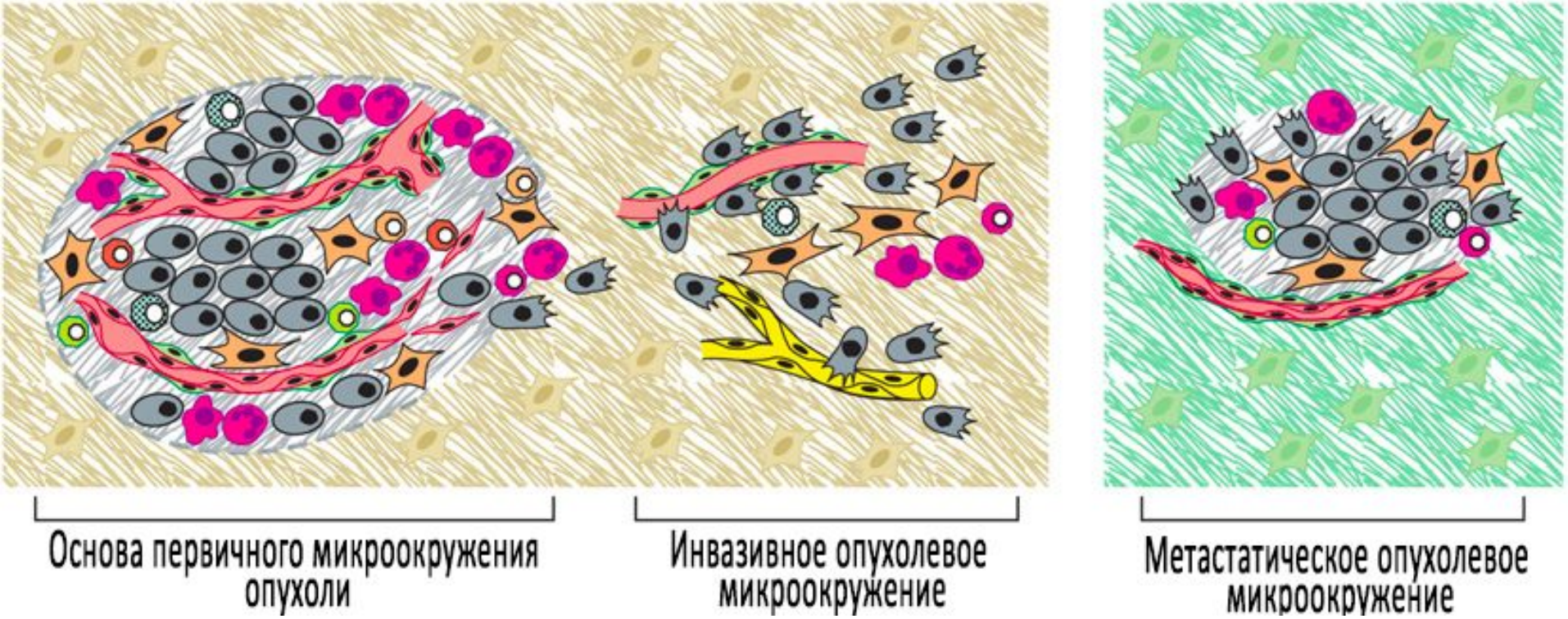


иммунные клетки воспаления, представленные в опухолях, могут включать в себя и стимулирующие, и уничтожающие опухоль подклассы

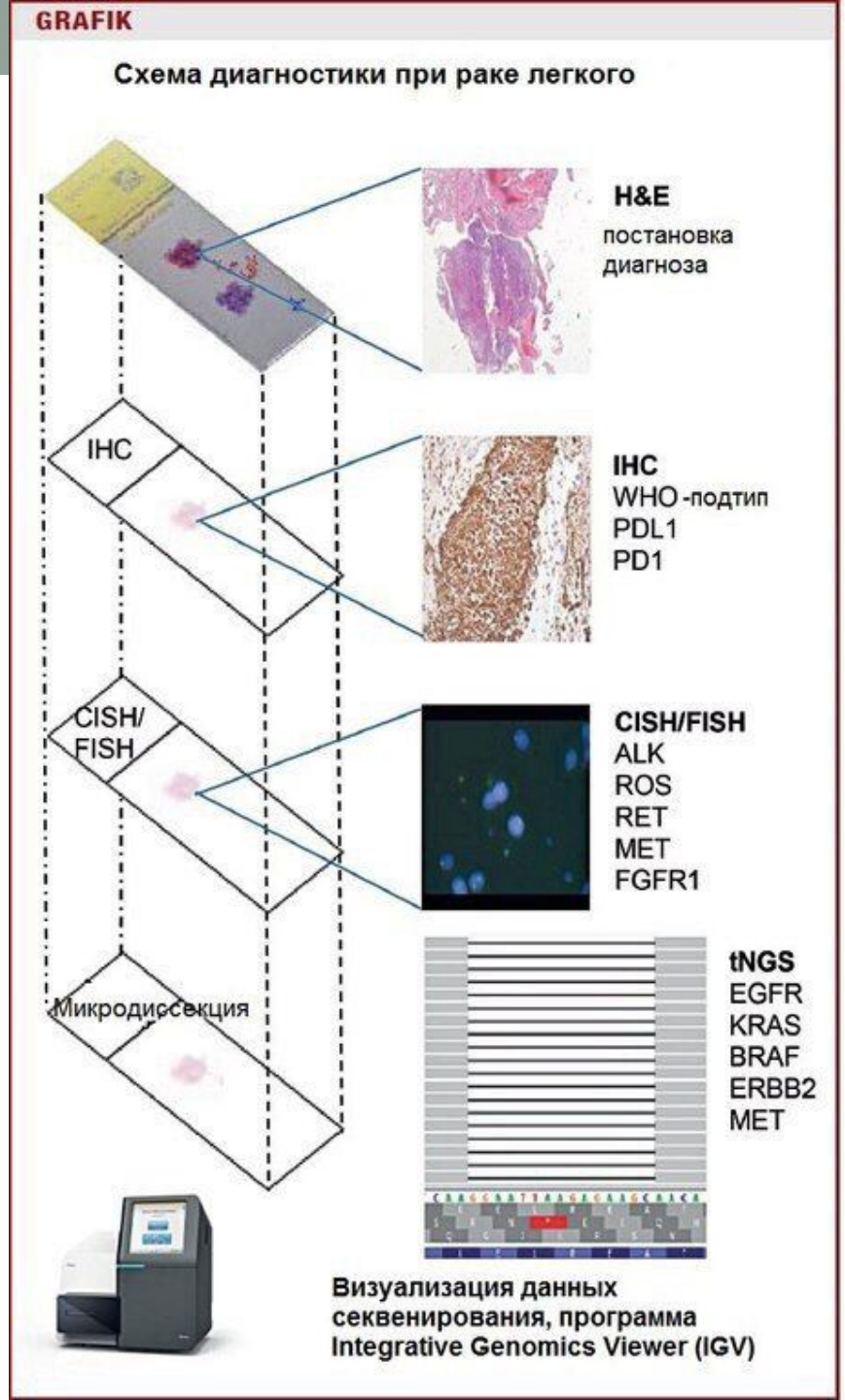
Опухолевое микроокружение



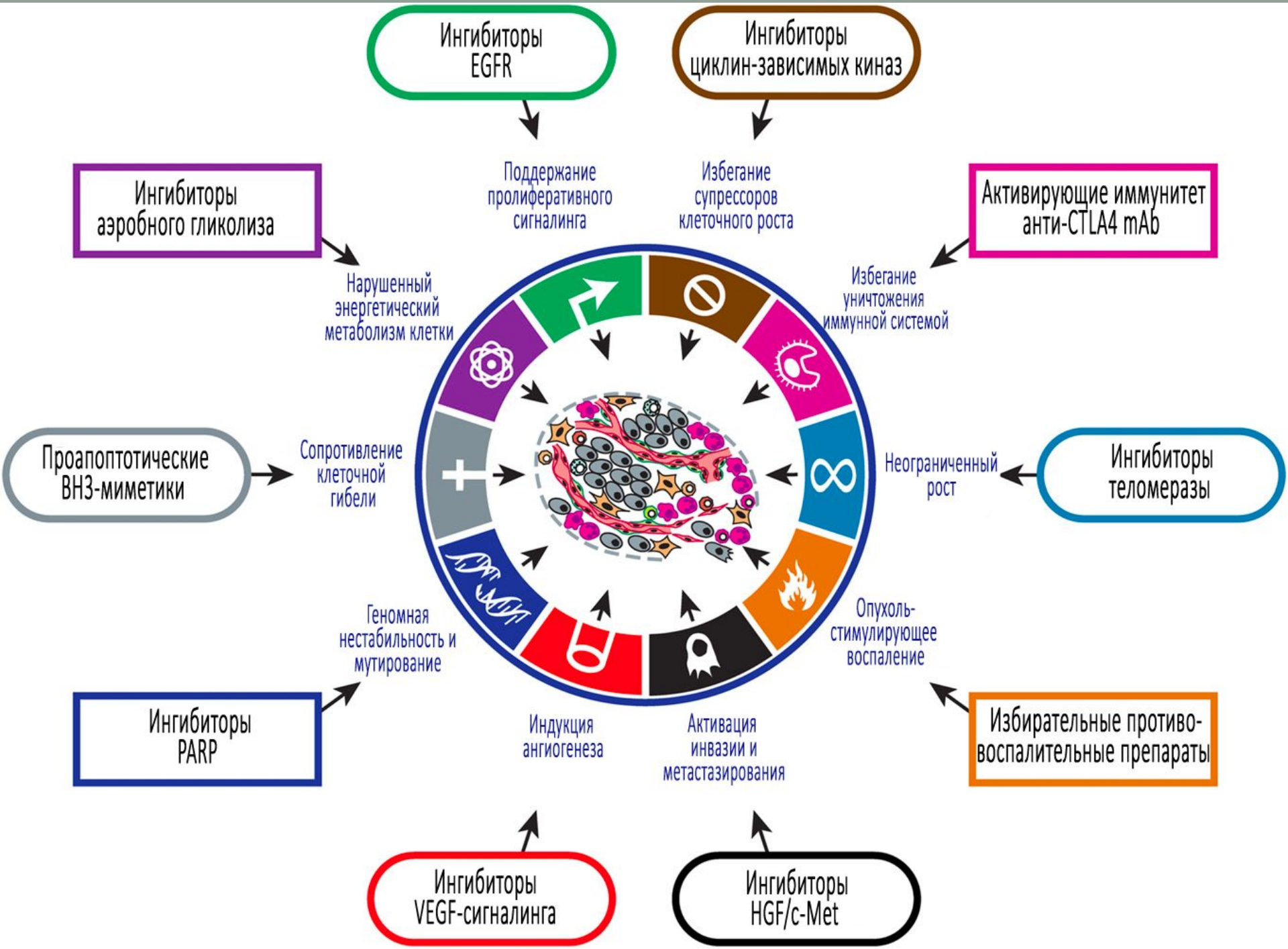
Опухолевое микроокружение

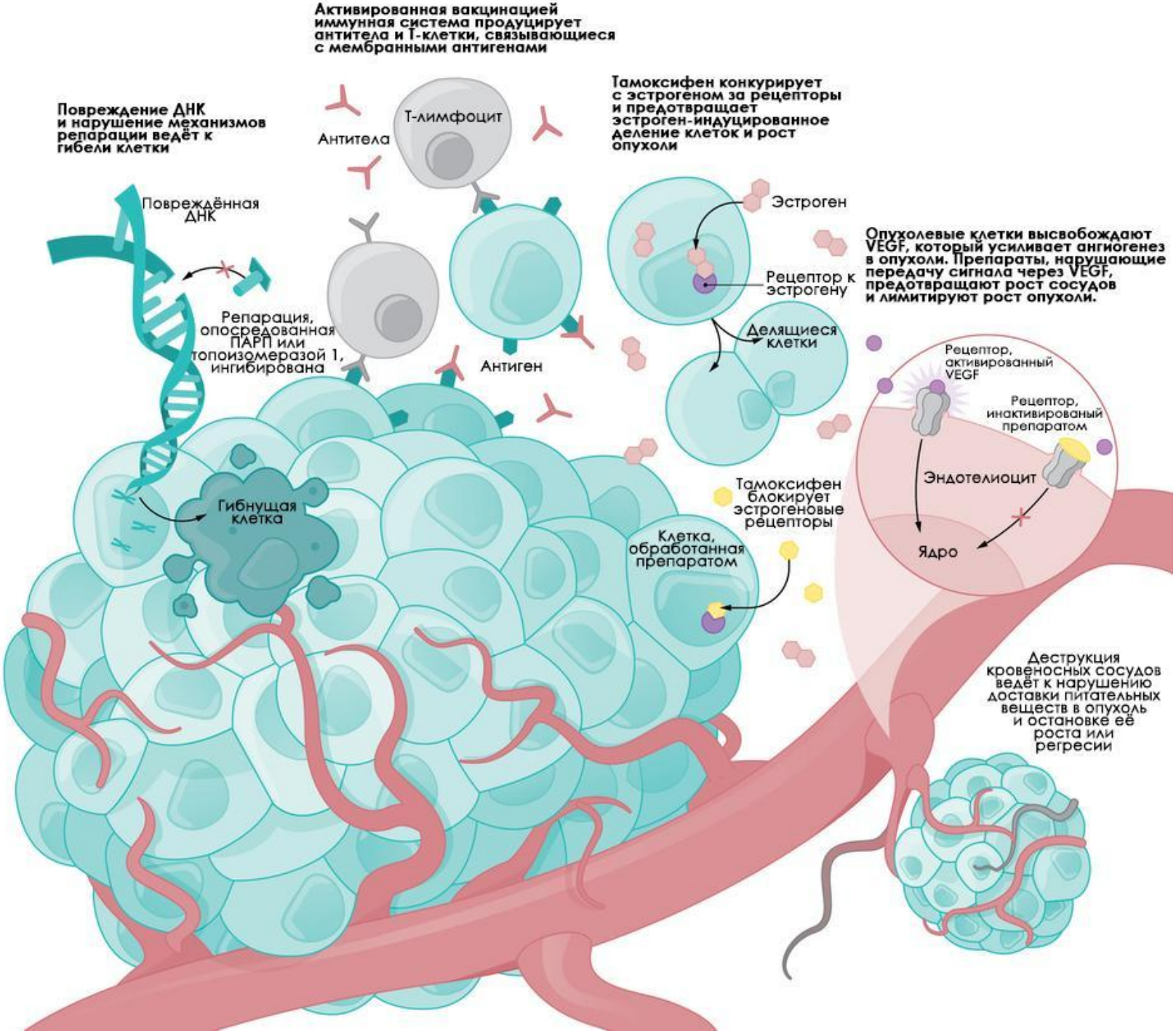


ПЕРСПЕКТИВЫ ЛЕЧЕНИЯ



Изготовление гистологического препарата: ткань фиксируется формалином, заливается парафином, после чего возможно сделать тонкие срезы. Окраска гематоксилин-эозином (H&E) необходима соответственно для гистологического анализа, иммуногистохимия (IHC) поможет определиться с гистологическим подтипом опухоли (в данном случае определена экспрессия PD-L1, PD1); метод гибридизации in situ (FISH-гибридизация) для определения транслокаций, и метод секвенирования (NGS) для анализа генной панели в целом.


Ингибиторы EGFR
Ингибиторы циклин-зависимых киназ
Ингибиторы аэробного гликолиза
Активирующие иммунитет анти-CTLA4 mAb
Поддержание пролиферативного сигналинга
Избегание супрессоров клеточного роста
Нарушенный энергетический метаболизм клетки
Избегание уничтожения иммунной системой
Проапоптотические BH3-миметики
Сопротивление клеточной гибели
Неограниченный рост
Ингибиторы теломеразы
Геномная нестабильность и мутирование
Опухоль-стимулирующее воспаление
Ингибиторы PARP
Индукция ангиогенеза
Активация инвазии и метастазирования
Избирательные противо-воспалительные препараты
Ингибиторы VEGF-сигналинга
Ингибиторы HGF/c-Met


Активированная вакцинацией иммунная система продуцирует антитела и Т-клетки, связывающиеся с мембранными антигенами
Повреждение ДНК и нарушение механизмов репарации ведёт к гибели клетки
Антитела
Т-лимфоцит
Тамоксифен конкурирует с эстрогеном за рецепторы и предотвращает эстроген-индуцированное деление клеток и рост опухоли
Повреждённая ДНК
Эстроген
Опухолевые клетки высвобождают VEGF, который усиливает ангиогенез в опухоли. Препараты, нарушающие передачу сигнала через VEGF, предотвращают рост сосудов и лимитируют рост опухоли.
Рецептор к эстрогену
Репарация, опосредованная ПАРП или топоизомеразой 1, ингибирована
Делящиеся клетки
Антиген
Рецептор, активированный VEGF
Рецептор, инактивированый препаратом
Эндотелиоцит
Тамоксифен блокирует эстрогеновые рецепторы
Гибнущая клетка
Клетка, обработанная препаратом
Ядро
Деструкция кровеносных сосудов ведёт к нарушению доставки питательных веществ в опухоль и остановке её роста или регресии

Спасибо за внимание!