

Микробиота, иммунная система и колоректальный рак

Е.П. Харченко¹, И.А. Соловьев²

¹ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» РАН;
Россия, 194223 Санкт-Петербург, проспект Тореца, 44;

²ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова» Минобороны России;
Россия, 194044 Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6

Контакты: Евгений Петрович Харченко neuro.children@mail.ru

В статье кратко рассматриваются физиологические аспекты микробиоты кишечника человека, связь дисбиоза с колоректальным раком (КРР), нарушения иммунной системы при развитии КРР, механизмы избегания опухолью иммунного надзора, варианты генетической нестабильности при КРР, коллизии и перспективы иммунотерапии при КРР.

Ключевые слова: микробиота, генетическая нестабильность, иммунная система, колоректальный рак

DOI: 10.17650/2220-3478-2017-7-4-11-19

Microbiota, immune system and colorectal cancer

E.P. Kharchenko¹, I.A. Solov'ev²

¹I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences;
44 Toreza Prospekt, Saint Petersburg 194223, Russia;

²S.M. Kirov Military Medical Academy, Ministry of Defense of Russia; 6 Akademika Lebedeva St., Saint Petersburg 194044, Russia

The article briefly considers physiological aspects of the human gut microbiota, associations between dysbiosis and colorectal cancer (CRC), disturbance of immune system in CRC, mechanisms of avoidance of immune surveillance by tumors, genetic instability in CRC, collisions and perspective of immunotherapy of CRC.

Key words: microbiota, immune system, genetic instability, colorectal cancer

Введение

На протяжении более 100 лет представления об этиологии и патогенезе колоректального рака (КРР) усложнялись и расширялись. Первоначально возникновение КРР связывали с генетической предрасположенностью, однако впоследствии было доказано, что в большинстве случаев КРР возникает спорадически [1]. Сегодня критическим фактором прогрессирования рака считается воспаление, поскольку многие опухоли возникают в местах инфицирования, хронического раздражения и воспаления. Микроокружение опухоли, представленное в основном воспалительными клетками, рассматривается как обязательный участник неопластического процесса, развития пролиферации, выживания и миграции клеток опухоли. Но роль воспаления в канцерогенезе неоднозначна [2]. Так, например, в случае КРР объяснить связь между раком и воспалением сложно хотя бы потому, что у лиц с хроническим воспалением кишечника, включая болезнь Крона, отмечается лишь незначительное увеличение частоты возникновения КРР [3].

Этиологические факторы КРР, помимо генетических мутаций и воспаления, включают эпигенетические изменения, изменения питания, дисфункцию иммун-

ной системы. В последние годы к ним относят и микробиоту, под которой подразумевается популяция микроорганизмов (бактерии, археи, грибы, простейшие и вирусы), заселяющих все части нашего организма. Наметившиеся успехи в иммунотерапии некоторых типов рака путем ингибирования иммунных ключевых точек и переноса Т-клеток с химерными антигенными рецепторами [4] стимулировали поиски новых иммунотерапевтических подходов к лечению различных опухолей, в том числе и КРР.

Целью настоящей статьи является краткий анализ данных о роли микробиоты и нарушений иммунной системы в развитии КРР и перспектив его иммунотерапии.

Микробиота

Физиология микробиоты. Существование человеческого организма невозможно без взаимодействия с внешней средой и ее многочисленными обитателями, среди которых микроорганизмы занимают особое место. Человеческий организм не является самодостаточным, микробиота имеет важное значение для многих его физиологических процессов, особенно в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), где формирует

микроэкосистемы. ЖКТ представляет собой первую линию защиты от микроорганизмов, привносимых извне главным образом через пищу и напитки. Он обладает уникальной системой надзора — мукозальной иммунной системой, на которую приходится почти 50 % всех клеток иммунной системы организма. Клетки мукозальной иммунной системы осуществляют надзор за составом микробиоты ЖКТ, удаляя патогенные виды и проявляя толерантность к комменсалам и пищевым компонентам.

В кишечнике микробиота активно вовлечена в морфогенез, различные метаболические процессы и поддержание гомеостаза. Особенно показательны в этом отношении наблюдения за гнотобионтными мышами. В отсутствие микробиоты эти животные более чувствительны к инфекциям, у них отмечаются снижение васкуляризации стенки кишечника, удлинение ворсинок кишечного эпителия из-за атрофии крипт и уменьшение скорости его обновления, снижение энзиматической переваривающей активности, продукции цитокинов, уровня сывороточных иммуноглобулинов и числа внутриэпителиальных лимфоцитов, уменьшение толщины мышечного слоя и размеров Пейеровых бляшек. Заселение кишечника таких мышей микробиотой обеспечивало восстановление мукозальной иммунной системы и индуцирование экспрессии различных генов, связанных с поглощением нутриентов, метаболизмом, ангиогенезом, мукозальной барьерной функцией и развитием нервной системы кишечника. Микробиота в кишечнике контактирует со 2-м (после мозга) наиболее крупным пулом нервных клеток организма и с самым крупным пулом иммунных клеток, оказывая влияние на формирование когнитивных функций и иммунный статус организма [5–7].

Множественные эффекты кишечной микробиоты, отличающейся поразительным разнообразием состава входящих в нее микроорганизмов, не могли не привлечь внимание исследователей к изучению ее роли в патогенезе КРР. Поскольку непременным атрибутом КРР являются мутационные изменения генома клеток эпителия толстого кишечника, микробиота, возможно, связана как с формированием генотоксического стресса, способствующего генетическим и эпигенетическим изменениям кишечного эпителия, так и с поддержанием воспалительного состояния кишечника, которые вместе с окислительным и нитрозативным стрессами приводят к КРР [3].

Традиционные культуральные методы анализа микробиоты позволяют идентифицировать не более 10–25 % составляющих ее видов микроорганизмов, остальная часть, представленная анаэробами, практически не была доступна идентификации из-за невозможности их культивирования. Лишь внедрение методов секвенирования нуклеиновых кислот последнего поколения позволило оценить сложность видового состава микробиоты.

Для анализа состава микробиоты используются данные о первичной структуре генов 16S рибосомальной РНК, идентифицируемых в ДНК микроорганизмов фекалий. Выбор генов 16S рибосомальной РНК был predetermined их малым размером и консервативностью структуры, сочетающихся с наличием вариативных областей, которых оказалось достаточно для дифференциации видов [8]. Результаты оценки видового и количественного состава микробиоты человека существенно варьируют в зависимости от методов анализа, выбора контингента исследуемых субъектов, критериев идентификации и других факторов. По некоторым данным, численность микроорганизмов, составляющих микробиоту человека, примерно в 10 раз превышает число клеток в его организме, а их микробиом (совокупный геном разных видов, составляющих микробиоту) больше генома человека в 100–150 раз. Состав микробиоты колеблется в весьма широком диапазоне, и некоторые авторы оценивают его в 35 000 видов [8, 9].

Важная роль вирусов в формировании здоровья и инфекций человека, особенности их жизненного цикла и огромная численность оправдывают введение понятия вирома по аналогии с понятиями микробиоты и микробиома. Виром включает не только вирусы эукариот, но и фаги. В его состав входят возбудители разных типов инфекций и вирусы, способные интегрироваться в геном человека (например, эндогенные ретровирусы) или прокариот. Новые методы секвенирования дают основание полагать о существовании множества ранее неизвестных вирусов эукариот [10].

В норме разнообразие и динамичность состава микробиоты обеспечивают множество симбиотических связей: составляющие ее микроорганизмы участвуют в метаболизме липидных и полисахаридных комплексов, нейтрализации лекарственных препаратов и канцерогенов, модуляции подвижности кишечника и висцеральной чувствительности, созревании иммунной системы на ранних этапах жизни и поддержании гомеостаза на протяжении всей жизни человека.

В зависимости от возраста, стиля жизни, характера питания и самого генотипа субъекта видовой состав микробиоты может варьировать. Доминируют в микробиоте представители типов *Firmicutes* (30–50 %), *Bacteroidetes* (20–40 %) и *Actinobacteria* (1–10 %). Строгие анаэробы, включая *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus* и *Atopobium*, составляют основную, а факультативные анаэробы, такие как *Lactobacilli*, *Enterococci*, *Streptococci* и *Enterobacteriaceae*, — меньшую (примерно в 1000 раз) часть микробиоты толстого кишечника. В тонком кишечнике на долю *Bacteroidetes* и *Actinobacteria* приходится лишь 50 % от общего числа видов, заселяющих кишечник [11].

Колонизация кишечника микробиотой начинается непосредственно после рождения, и первыми его

заселяют факультативные анаэробы *Lactobacilli*, *Enterococci* и *Enterobacteriaceae*. *Bifidobacterium*, *Bacteroides* и *Clostridium* колонизируют кишечник постепенно, со временем снижая отношение числа факультативных анаэробов к числу строгих анаэробов. Относительно постоянный состав микробиоты, сходный с таковым у взрослых, формируется у ребенка примерно к 3 годам жизни и почти не меняется на протяжении последующих лет. Лишь при старении состав микробиоты претерпевает изменения, которые выражаются в снижении ее видового разнообразия [12].

В число метаболических функций, выполняемых микробиотой, входит анаэробная ферментация углеводов с образованием CO_2 , H_2 , CH_4 , короткоцепочечных жирных кислот и таких метаболитов, как фенольные соединения, амины, аммиак, нитрозосоединения и индолы. Они могут влиять на экспрессию генов, пролиферацию и дифференциацию кишечного эпителия, опосредовать синтез витаминов, ионную абсорбцию и образование слизи. Столь сложная метаболическая активность микробиоты влияет на получение энергии из поглощенной пищи, регулирует хранение жира, помогает абсорбированию субстратов как для хозяина, так и для самой микробиоты, и вовлечена в регуляцию ее роста [8, 12]. Множество продуцируемых микробиотой метаболитов могут быть токсичными для хозяина и самой микробиоты, являясь основой микробной интерференции, препятствующей колонизации кишечника другими видами и проявляющейся при лечении антибиотиками или при заражении патогенными видами. Механизмы интерференции остаются не вполне ясными. Возможно, они связаны с конкуренцией за адгезивные молекулы мукозального барьера и метаболиты или с образованием антимикробных факторов [3, 13, 14].

Дисбиоз и колоректальный рак. Состав микробиоты кишечника характеризуется стабильностью во времени и эластичностью (восполняемостью), т.е. способностью восстанавливаться после различных пертурбаций. Если изменения микробиоты находятся вне пределов ее эластичности, они ведут к постоянному изменению ее состава. Эти изменения, разрушающие симбиотические отношения между хозяином и микробиотой, обычно рассматриваются как дисбиоз. Дисбиоз приводит к недостаточности контроля за патогенными микроорганизмами и нерегулируемому воспалению или иммунному ответу против комменсалов и в итоге к сильному острому или хроническому тканевому поражению, наблюдаемому, например, при воспалительных заболеваниях кишечника, таких как болезнь Крона или язвенный колит. В последнее время доказана роль дисбиоза в развитии ожирения, метаболического синдрома, сахарного диабета I типа, заболеваний нервной системы, бронхиальной астмы, кожных болезней, а также КРР. Состав и стабильность микробиоты при дисбиозе в значительной степени определяются

локальными механизмами защиты хозяина и реакцией иммунной системы.

Одна из проблем в диагностике дисбиоза заключается во множественности его признаков и трудностях дифференцирования причины и следствий его возникновения [15]. Роль микробиоты в развитии КРР может прямо или косвенно реализовываться прежде всего путем развития и поддержания воспаления при дисбиозе. Последнее входит в число ключевых маркеров канцерогенеза прежде всего потому, что увеличивает генетическую нестабильность клеток кишечного эпителия, а при возникшей опухоли помогает создавать благоприятное для нее окружение. Таким образом, дисбиоз может модулировать иммунные механизмы и контролировать ответ на противоопухолевую терапию [16, 17].

При ассоциированном с колитом КРР грамположительные комменсальные бактерии *Fusobacterium nucleatum*, помимо создания провоспалительного окружения, способны также индуцировать развитие КРР путем экспрессии фактора вирулентности FadA, являющегося молекулой поверхностной адгезии и облегчающего прикрепление микроорганизмов к эпителиальным клеткам кишечника. FadA взаимодействует с мембранным E-кадгеринном, поддерживающим целостность межклеточных связей эпителиальных клеток, что приводит к потере контактов между клетками, возрастанию параклеточной проницаемости и проникновению в эпителий других бактерий, вызывающих реакцию иммунной системы. Кроме того, FadA способен активировать бета-катениновый сигналинг и экспрессию ряда генов, включая факторы транскрипции, маркеры стволовых клеток и факторы, стимулирующие пролиферацию эпителиальных клеток [18]. Поскольку *Fusobacterium nucleatum* способны прикрепляться к слизистой оболочке кишечника и аденоматозным полипам в нем, предполагается, что они способствуют как развитию КРР в нормальной слизистой оболочке, так и ускорению канцерогенеза в уже существующих аденомах. Повышенное содержание копий гена *FadA*, отмечаемое у пациентов с КРР, предложено рассматривать как маркер фактора риска КРР [19]. Токсин фрагилизин, продуцируемый представителями рода *Bacteroides*, индуцирует пролиферацию эпителия толстого кишечника путем активации онкогена *c-MYC* и запуска воспалительных реакций посредством интерлейкина-8 (interleukin-8, IL-8) [20].

Потенциально развитие спорадического КРР может происходить с участием генотоксических субстанций, выделяемых различными микроорганизмами. Так, бактерии могут содействовать образованию клетками самого хозяина NO и вторичных реактивных соединений азота (через активацию макрофагов), которые способны повреждать ДНК. К тому же сами бактерии способны генерировать NO как промежуточный субстрат азотистого цикла, в котором NO

восстанавливается до N_2 анаэробными денитрофицирующими бактериями [21]. На гнотобионтных и моноассоциированных мышах показано, что *Lactobacilli* и *Bifidobacteria* способны генерировать значительные количества NO. Однако биологическая роль NO, вырабатываемого микробиотой кишечника, полностью еще не ясна [22].

Другой мощный источник мутаций генома – реактивные соединения O_2 , которые способны генерировать как иммунные клетки при воспалении, так и представители микробиоты (например, *Enterococcus faecalis*) [23]. Эффекты реактивных соединений O_2 многогранны и включают точечные мутации, разрывы ДНК, сшивки белков с ДНК. Продуцируемые бактериями токсины также обладают способностью повреждать ДНК. Показано, что цитолетальный раздувающий токсин и колибактин, продуцируемые *Escherichia coli* и другими грамотрицательными бактериями, повреждают ДНК, вызывая нестабильность генома, и ведут к развитию КРР [24].

Все больше накапливается фактов касательно вклада нормального микробного метаболизма нутриентов в развитие патологии кишечника. Пища человека богата гетероциклическими аминами, особенно много их образуется в рыбе и красном мясе при кулинарной обработке. Содержащиеся в этих продуктах производные хинолина являются проканцерогенами, способными метаболизироваться анаэробными кишечными бактериями рода *Eubacterium* в мощные мутагены [25]. А бактерии вида *Bacteroides* сами генерируют эфироподобные жирные кислоты (например, фекапентаены), способные индуцировать окислительные повреждения ДНК [26]. Известен и другой пример, связанный с метаболизмом бактерий: так, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* и *Pseudomonas aeruginosa* посредством алкогольдегидрогеназы ферментируют выпитый человеком и поступивший в кишечник из циркулирующей крови алкоголь в ацетальдегид, обладающий канцерогенными свойствами. Сам же алкоголь способен изменять метаболизм фолата и косвенно содействовать мутагенезу, поскольку фолат играет ключевую роль в синтезе ДНК, являясь источником углеродной группы при синтезе нуклеотидов [27, 28].

Помимо влияния на ДНК, другие продукты нормального метаболизма комменсальных бактерий также могут влиять на развитие КРР. Так, например, сульфат-редуцирующие бактерии *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfobacter* и *Desulfococcus* при восстановлении SO_4^{-2} за счет энергии лактата, пирувата или ацетата выделяют H_2S , который хотя и не повреждает ДНК, но модулирует процессы пролиферации, апоптоза и дифференциации эпителиальных клеток толстого кишечника через RAS-МЕК-ERK-путь и выступает как потенциально способствующий канцерогенезу агент [29, 30].

Компоненты пищи могут по-разному метаболизироваться микробиотой, влияя на развитие КРР. В случае красного мяса метаболизм его белков приводит к образованию нитрозамина и гетероциклических аминов, которые рассматриваются как факторы риска развития КРР [31]. Пища, богатая волокнами, напротив, рассматривается как препятствующая развитию КРР, поскольку переваривание микробиотой сложных углеводов приводит к накоплению короткоцепочечных жирных кислот, в частности бутирата, который служит главным источником энергии для эпителиальных клеток толстого кишечника и в зависимости от дозы модулирует экспрессию различных генов, оказывая антипролиферативное действие на большинство клеточных линий КРР и ускоряя апоптоз и дифференциацию [32]. Однако данные по бутирату противоречивы, поскольку эффекты микробной ферментации волокон и образования бутирата сложны и зависят от генотипа хозяина, состава микробиоты и присутствия других метаболитов [33].

Иммунная система и колоректальный рак

В настоящее время в рамках клинических исследований и в экспериментальных моделях получено множество доказательств того, что микробиота, оказывая влияние на иммунную систему, играет важную роль в индукции и прогрессировании КРР и его ответе на терапию. Влияние микробиоты на рак может быть локальным, проявляющимся на уровне самого кишечника, или системным, реализующимся первоначально через интактный барьер, а затем при его нарушении. В свою очередь, иммунные и воспалительные ответы на КРР очень сложны и адаптированы к стадии рака, контексту его микроокружения и особенно к составу микробиоты.

Нарушения иммунной системы при колоректальном раке. Предложено множество гипотез о влиянии дисбиоза на возникновение КРР, основанных преимущественно на данных экспериментальных моделей. В частности, есть мнение, что дисбиоз, возникший в результате инфламмосомной недостаточности, может способствовать канцерогенезу по причине недостаточности IL-18, необходимого для восстановления тканей, защиты против опухоли и поддержания равновесия в микробиоте. Микробиота при дисбиозе может вести к хроническому воспалению, возрастанию бактериальной транслокации из-за нарушения барьерной функции кишечного эпителия, усилению IL-6 сигнала. Ассоциированные с патогенами молекулы, распознаваемые Toll-подобными рецепторами на поверхности эпителиальных клеток, макрофагов и миофибробластов, запускают различные пути развития КРР. Например, эфирегулин и амфирегулин являются лигандами рецептора эпидермального фактора роста и индуцируют пролиферацию через активацию MAPK/ERK-пути. Воспаление ведет к активации различных сигнальных путей, вызывая с помощью

цитокинов дисрегуляцию генов и канцерогенез. Цитокины Th17 клеток характерны для ранних стадий КРР и индуцируются посредством молекул сигнального пути трансдукции STAT3. Некоторые из них активируют факторы транскрипции, контролирующие выживание клеток и их пролиферацию, а также ангиогенез. С IL-6 и IL-1b ассоциированы индукция ДНК-метилтрансфераз и образование малых некодирующих РНК, которые блокируют гены, оказывающие супрессорное действие на опухоль [3].

Об ассоциации КРР и микробиоты свидетельствует тот факт, что КРР не развивался у гнотобионтных, дефицитных по IL-10 и у дважды (TCR β /p53) нокаутированных мышей. При спорадическом КРР и ассоциированном с колитом КРР у мышей значительно снижается разнообразие микробиоты. У гнотобионтных мышей, колонизированных фекалиями мышей со спорадическим КРР или ассоциированным с колитом КРР, отмечалось увеличение частоты и числа опухолей по сравнению с мышами, колонизированными фекалиями здоровых животных. У грызунов ассоциированный с колитом КРР можно индуцировать путем химического мутагенеза, при этом у них отмечается изменение состава микробиоты, выражающееся в преобладании представителей родов *Bacteroides*, *Odoribacter* и *Allobaculum*. Однако у мышей, обработанных химическими мутагенами, опухоли не развивались, если животные получали антибиотики. У мышей, колонизированных фекалиями мышей с опухолями, рак также не развивался, если животных не обрабатывали мутагенами, что свидетельствует о ключевой роли кишечной микробиоты в иницировании развития КРР, ассоциированного с колитом.

Развитие ассоциированного с колитом КРР является результатом сложного взаимодействия между хроническим воспалением и дисбиозом, приводящего к необратимым изменениям в клетках кишечного эпителия. Микробиота дефицитных по IL-10 мышей со спонтанно развивающимся острым колитом характеризовалась снижением разнообразия состава и преобладанием представителей семейства *Enterobacteriaceae*. У дефицитных по IL-10 мышей, колонизированных *Escherichia coli* или *Enterococcus faecalis*, развивалось воспаление кишечника, но лишь у животных, колонизированных *Escherichia coli*, формировались опухоли. Колибактин, продукт гена *pks Escherichia coli* NC101, расщепляет двуспиральную ДНК в клетках эпителия кишечника и способствует развитию инвазивной карциномы у дефицитных по IL-10 мышей, обработанных азоксиметаном.

Токсин, образуемый *Bacteroides fragilis*, как отмечалось выше, запускает развитие КРР посредством связывания с эпителиальными клетками и стимулирования расщепления молекулы клеточной адгезии E-кадгерина. Поскольку уровень экспрессии гена этого токсина *Bacteroides fragilis* и гена *pks Escherichia*

coli NC101 выше у пациентов с КРР по сравнению со здоровыми индивидуумами, предполагается, что аберрантная пролиферация этих бактерий, вызванная дисбиозом кишечника, индуцирует нарушение барьерной функции эпителия и способствует развитию ассоциированного с колитом КРР. Однако существует некоторая неопределенность, поскольку в мышинной модели химического мутагенеза при колонизации фекалиями пациентов с КРР у животных развивалось меньше опухолей, чем при колонизации фекалиями здоровых индивидуумов. Кроме того, выявлена роль кишечной микробиоты при раке, подвергнутом лечению: микробиота влияла не только на эффективность химиотерапии, но и на ее побочные эффекты. И гнотобионтные, и обработанные антибиотиками мыши демонстрировали резистентность к циклофосамиду и снижение числа патогенных Th17 клеток. У людей вызванное дисбиозом хроническое воспаление кишечника предрасполагает к развитию ассоциированного с колитом КРР: в течение 30 лет от момента развития язвенного колита у 20 % пациентов отмечается ассоциированный с колитом КРР со смертельным исходом у половины из них. Показано, что он не связан с развитием карциномы из аденомы, но тесно связан с дисбиозом [34].

Отмечено, что в реакции иммунной системы на первичный КРР, циркулирующие его клетки и метастазы в печени вовлечены в основном CD8⁺-лимфоциты, NK-, NKT- и T_{рег}-клетки, супрессорные клетки миелоидного происхождения, ассоциированные с опухолью макрофаги, нейтрофилы. Для стадии выхода раковых клеток в циркуляцию характерны явления связывания их с тромбоцитами и появление растворимых форм антигенов человеческих лейкоцитов sHLA-E и sHLA-G, а также экзосом. Избегание клетками КРР надзора иммунной системы достигается путем подавления экспрессии главных комплексов гистосовместимости и индукции T_{рег}-клеток, а также активации молекул CTLA-4 и PD-1, ингибирующих активность T-лимфоцитов и входящих в систему «контрольных точек» иммунной системы. Подавление активности T-лимфоцитов наступает, когда экспрессированная ими молекула CTLA-4 взаимодействует с молекулой B7 на антигенпрезентирующей клетке. Другой способ дезактивации T-лимфоцитов осуществляется при взаимодействии экспрессированных ими молекул PD-1 с их лигандами PD-L1 или PD-L2 на антигенпрезентирующих клетках [35–37].

С усовершенствованием методов иммунологии стало ясно, что многие опухоли, включая и КРР, ранее казавшиеся «молчаливыми», вызывают активные реакции иммунной системы. КРР, как известно, развивается постепенно, по мере обретения клетками кишечного эпителия все большего числа мутаций и эпигенетических изменений, которые обуславливают появление в клетках КРР новых белков. Иммунная

система способна распознавать их и, соответственно, элиминировать из организма. Но при образовании опухоли новых вариантов белков, не узнаваемых иммунной системой, опухоль может избежать ее надзора [37].

Множественность типов колоректального рака. Рассмотрение перспектив иммунотерапии КРР целесообразно предварить рассмотрением природы его множественности и источников его иммуногенности. Гетерогенность КРР проявляется как на клиническом и гистопатологическом, так и на молекулярном и генетическом уровнях [38, 39]. Патогенез КРР варьирует в соответствии с происходящими в опухолевых клетках генетическими и эпигенетическими изменениями, которые тесно обуславливают друг друга, определяя многоэтапность генеза КРР. Различные пути канцерогенеза характеризуются существованием нескольких паттернов генетической нестабильности, проявляющихся клиническими и патологическими признаками.

В клетках КРР источником генетической нестабильности могут быть несколько механизмов. Первый связан с микросателлитной нестабильностью, обусловленной соматическими мутациями (вставками и делециями) в повторяющихся коротких блоках ДНК, рассеянных в кодирующих и не кодирующих белки последовательностях генома. Микросателлитная нестабильность связана с нарушением репарационной системы ДНК, включающей ферменты MLH1, MLH2, MLH6 и PMS2, и ведет к геномной нестабильности и, соответственно, к повышению чувствительности клеток к малигнизации. В зависимости от числа мутировавших сателлитных ДНК различают низкую и высокую микросателлитную нестабильность.

Вторым источником генетической нестабильности клеток при КРР является хромосомная нестабильность (изменение кариотипа клетки за счет изменения числа и/или структуры хромосом), определяющая большую часть случаев КРР, развивающегося по схеме «аденома–карцинома». Хромосомная нестабильность характеризуется накоплением мутаций в специфических онкогенах (*BRAF*, *KRAS*, *PI3K*) и генах, оказывающих супрессорное действие на опухоль (*APC*, *TP53*).

Третий источник генетической нестабильности – изменения фенотипа метилирования дуплетов CpG в ДНК. Гиперметилирование областей промотора репрессирует транскрипцию ряда генов, оказывающих супрессорное действие на опухоль. Гипометилированными при КРР нередко оказываются длинные LINE-1 либо короткие Alu нуклеотидные повторы, что также ведет к хромосомной нестабильности и глобальной потере импринтинга [38, 40, 41]. Перечисленные механизмы генетической нестабильности не исключают возможности их совместного проявления в различных комбинациях, что обуславливает множественность клинических форм КРР.

Последствиями генетической нестабильности являются изменения в регуляции экспрессии белков (например, наблюдается aberrантная экспрессия тех белков, которые дестабилизируют нормальный цикл клеток) и появление белков с измененной аминокислотной последовательностью, на которые реагирует иммунная система. При КРР иммунореактивными обычно оказываются раковый эмбриональный антиген, молекула адгезии эпителиальных клеток, муцин I, рецептор эпидермального фактора роста, белок p53 и др. Повышенная частота мутаций белков при КРР с микросателлитной нестабильностью ассоциировалась с большей иммуногенностью этих белков, выраженной инфильтрацией опухолей цитотоксическими CD8⁺-лимфоцитами, сниженной частотой метастазов и более высокой выживаемостью больных по сравнению с больными КРР с хромосомной нестабильностью [37]. Вместе с тем у больных КРР с микросателлитной нестабильностью нередко наблюдалась недостаточность экспрессии главного комплекса гистосовместимости класса I, что способствовало избеганию опухолями надзора иммунной системы [35, 36].

Соматические мутации, в том числе и онкогенные, происходят на протяжении всей жизни организма и на всех этапах развития опухоли, порождая в ней множество клеточных клонов, наделенных различными изменениями генома и динамикой роста [42]. Резкие различия разных типов опухолей, как и пациентов с одним и тем же типом опухоли, по числу выявляемых в них изменений генома затрудняют дифференциацию определяющих канцерогенез мутаций-драйверов от сопутствующих. Следовательно, при каждом типе опухоли и в пределах составляющих ее клонов реализуются множество программ канцерогенеза, что исключает проявление чувствительности всех пациентов с тем или иным типом опухоли к любой монотерапии: лучевой, химио- или иммунотерапии. Из-за большой протяженности кишечника содержит множество локусов с разным набором мутаций генома. Хирургическое удаление злокачественной опухоли с прилегающими с обеих сторон и кажущимися здоровыми отрезками кишечника примерно в 25 % случаев не избавляет пациента от повторного возникновения КРР. При этом новые очаги КРР возникают, согласно гипотезе полевого канцерогенеза [43], рассматривающей кишечник как протяженное поле локусов со множеством туморогенных мутаций, за счет пополнения опухолевых клеток новыми мутациями.

Коллизии и перспективы иммунотерапии колоректального рака. Иммунной системе отводят главную роль в уничтожении раковых клеток, но на определенной стадии развития опухоли уходят из-под ее контроля, используя различные механизмы, что затрудняет использование иммунотерапии. Клинические испытания ингибирования иммунных ключевых точек оказались успешными у части пациентов

с раком (меланома, немелкоклеточный рак легких, почечно-клеточный рак, рак мочевого пузыря и др.), но были неэффективны при КРП с микросателлитной стабильностью, раке яичников, раке предстательной железы и протоковой аденокарциноме поджелудочной железы [44]. И даже для тех типов рака, применительно к которым была показана успешность блокирования иммунных ключевых точек, эффект терапии проявлялся лишь у части пациентов и не в полной мере.

В число средств иммунотерапии входят также вакцины на основе антигенов опухоли, моноклональные антитела, методы адоптивной клеточной терапии, терапии дендритными клетками, загруженными антигенами опухоли, терапии онколитическими вирусами. Однако даже это множество подходов не покрывает многообразия механизмов, с помощью которых опухоли формируют свою иммунную привилегию. Участники иммуносупрессивных стратегий и способы избегания опухолями надзора иммунной системы удивительно разнообразны и включают: изменение молекул сигнальной трансдукции в эффекторных клетках; нарушение механизма презентации антигена (например, утрату экспрессии молекул HLA класса I или подавление экспрессии молекул, участвующих в процессинге и презентации антигена молекулами HLA класса I); активацию негативных костимулирующих сигналов в опухолевом микроокружении; развитие иммуносупрессивных и активацию проапоптозных путей; ингибирование дифференциации и созревания дендритных клеток; разные популяции T-регуляторных клеток; индуцибельные T_H1-регуляторные клетки; IL-13-продуцирующие NKT-клетки; различные подмножества миелоидных и плазматоцитидных дендритных клеток, ориентированных на иммуносупрессивные, а не на иммуностимулирующие эффекты; избегание цитолитических лимфоцитов путем синтеза ингибитора гранзим-В-перфоринового пути; синтез как опухолями, так и ассоциированными с ними миелоидными клетками избыточных количеств нитроксида или проявление в них повышенной активности аргиназы-1; распад триптофана индоламин-2,3-диоксигеназой, способствующий блокированию T-клеток CD8⁺ и апоптозу T-клеток CD4⁺; abortивную стимуляцию T-клеток толерогенными антигенпрезентирующими клетками, нагруженными опухолевыми антигенами [2, 45, 46].

Каждый орган с физиологической иммунной привилегией (мозг, глаза, печень, кишечник и др.), как и каждый тип опухоли и каждый клон ее клеток, наделен своей комбинацией механизмов, определяющей «высоту барьера» его защищенности от иммунной системы. Из множественности механизмов, обеспечивающих естественную иммунную привилегию органов и патологическую иммунную привилегию опухолей, следует невозможность и ненадежность поддержания иммунной привилегии за счет какого-либо одного

из этих механизмов. Распространенность иммунной привилегии в организме свидетельствует о том, что механизмы самосохранения и защиты организма не ограничены лишь рамками иммунной системы и ассоциированы со структурными особенностями органов.

Суть иммунной привилегии в ее физиологическом или же патологическом проявлении (при раке) состоит в локальном избегании надзора иммунной системы, причем для каждого органа или патологического состояния иммунная привилегия обеспечивается своим набором стратегий [47]. В кишечнике специфичность иммунной привилегии проявляется в поддержании отсутствия иммунного ответа на компоненты пищи, их метаболиты и кишечную микробиоту. Иммуносупрессивное окружение опухоли обеспечивается взаимодействием в ней разных типов клеток [44]. Опухоли лишь используют, а не создают или разрабатывают стратегии избегания надзора иммунной системы. Разнообразие иммуносупрессивных свойств разных опухолей возникает не за счет новых механизмов (что не исключено в случае вирус-индуцированных опухолей), а из-за несбалансированности в них экспрессии генов, охватывающей и те гены, что ответственны за физиологическую иммунную привилегию. Последние в норме используются разными органами для устранения избыточной активности иммунной системы [47].

Из многообразия путей избегания и супрессии иммунной системы при раке следует невозможность надежно противостоять ему моноиммунотерапией. В аспекте вырожденности механизмов канцерогенеза иммунотерапия должна быть синергичной с другими видами терапии и нацеленной на снятие разных механизмов иммуносупрессии.

В последние годы предметом внимания стали интегрированные в геном человека эндогенные ретровирусы, контролирующие экспрессию генов путем работы в качестве энхансеров и промоторов и изменения метилирования ДНК [48]. Кроме того, их белки env вызывают сильную иммуносупрессию. Экспрессия генов эндогенных ретровирусов показана при многих типах рака, включая и КРП. В частности при КРП показана экспрессия генов эндогенных ретровирусов HERV-E и HERV-H, причем экспрессия генов HERV-H отмечалась в период прогрессирования заболевания и коррелировала с микросателлитной нестабильностью генома опухолевых клеток и инвазией ими лимфатических узлов вне зависимости от возраста пациентов, локализации и градации опухоли и мутаций в ее геноме. Это послужило основанием рассматривать экспрессию генов HERV-H в качестве нового маркера КРП [49].

В связи с этиологической ролью эндогенных ретровирусов при КРП нельзя не упомянуть о результатах анализа связи между экспрессией их генов и химиорезистентностью культивированных клеток КРП от нелеченых пациентов. Во-первых, в этих клетках были

выявлены экспрессия генов HERV и повышение их экспрессии после обработки клеток цитостатиками, что предполагает тесную связь этих эндогенных ретровирусов с резистентностью к химиотерапии. Во-вторых, некоторые противовирусные препараты обладали цитотоксической активностью и способностью подавлять экспрессию эндогенных ретровирусов *in vitro*. Показано также, что различные противовирусные соединения в монорежиме либо в сочетании с противоопухолевыми препаратами приводили к антипролиферативному эффекту и подавлению экспрессии различных элементов эндогенных ретровирусов в высокорезистентных к химиотерапии клетках КРР. Это послужило основанием рекомендовать для улучшения результатов терапии КРР и химиотерапию с противовирусными препаратами [50]. Новые ожидания в терапии рака порождены технологиями редактирования геномов клеток опухоли и иммунной системы пациента (например, посредством защитной системы CRISPR/Cas бактерий и архей), испытания которых развернуты уже в нескольких странах [51].

Заключение

Развитие КРР в организме происходит в условиях сложного взаимодействия микробиоты и регулярно поступающих пищевых компонентов и их метаболитов. Оба фактора могут играть активную роль в патогенезе КРР, но сама их сложность и множественность путей их взаимодействия затрудняют идентификацию ведущих механизмов канцерогенеза при различных типах КРР. Иммунная система при КРР не безмолвствует, и, по-видимому, именно ее противодействие канцерогенезу объясняет столь длительную во многих случаях отсрочку клинического проявления КРР. Гетерогенность КРР предполагает существование множества программ супрессии иммунной системы у разных пациентов и невозможность использования только иммунотерапии у больных КРР. При наличии в опухоли множества клонов клеток с разными наборами генетических и эпигенетических аберраций, динамикой роста и чувствительностью к терапевтическим воздействиям терапия КРР должна быть многоцелевой и затрагивать различные системы организма.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. De Rosa M., Rega D., Costabile V. et al. The biological complexity of colorectal cancer: insights into biomarkers for early detection and personalized care. *Ther Adv Gastroenterol* 2016;9(6):861–86. DOI: 10.1177/1756283X16659790.
2. Харченко Е.П. Канцерогенез: иммунная система и иммунотерапия. *Иммунология* 2011;32(1):50–6. [Kharchenko E.P. Carcinogenesis: the immune system and immunotherapy. *Immunologiya = Immunology* 2011;32(1):50–6. (In Russ.)].
3. Irrazábal T., Belcheva A., Girardin S.E. et al. The multifaceted role of the intestinal microbiota in colon cancer. *Molecular Cell* 2014;54(2):309–20. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.03.039.
4. Makkouk A., Weiner G.J. Cancer immunotherapy and breaking immune tolerance: new approaches to an old challenge. *Cancer Res* 2014;75(1):5–10. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2538.
5. Ha C., Lam Y.Y., Holmes A.J. Mechanistic links between gut microbial community dynamics, microbial functions and metabolic health. *World J Gastroenterol* 2014;20(44):16498–517. DOI: 10.3748/wjg.v20.i44.16498.
6. Pflughoeft K.J., Versalovic J. Human microbiome in health and disease. *Annu Rev Pathol* 2012;7:99–122. DOI: 10.1146/annurev-pathol-011811-132421.
7. McDermott A.J., Huffnagle G.B. The microbiome and regulation of mucosal immunity. *Immunology* 2013;142(1):24–31. DOI: 10.1111/imm.12231.
8. Jandhyala S.M., Talukdar R., Subramanyam C. et al. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol* 2015;21(29):8787–803. DOI: 10.3748/wjg.v21.i29.8787.
9. Dzutsev A., Goldszmid R.S., Viaud S. et al. The role of the microbiota in inflammation, carcinogenesis, and cancer therapy. *Eur J Immunol* 2015;45(1):17–31. DOI: 10.1002/eji.201444972.
10. Cadwell K. The virome in host health and disease. *Immunity* 2015;42(5):805–13. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.05.003.
11. Gagnière J., Raisch J., Véziant J. et al. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2016;22(2):501–18. DOI: 10.3748/wjg.v22.i2.501.
12. Tojo R., Suárez A., Clemente M.G. et al. Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World J Gastroenterol* 2014;20(41):15163–76. DOI: 10.3748/wjg.v20.i41.15163.
13. Bäuml A.J., Sperandio V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature* 2016;535(7610):85–93. DOI: 10.1038/nature18849.
14. Eloe-Fadrosh E.A., Rasko D.A. The human microbiome: from symbiosis to pathogenesis. *Annu Rev Med* 2013;64:145–63. DOI: 10.1146/annurev-med-010312-133513.
15. Forbes J.D., Van Domselaar G., Bernstein C.N. The gut microbiota in immune-mediated inflammatory diseases. *Front Microbiol* 2016;7:1081. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01081.
16. Peterson C.T., Sharma V., Elmén L., Peterson S.N. Immune homeostasis, dysbiosis and therapeutic modulation of the gut microbiota. *Clin Exp Immunol* 2014;179(3):363–77. DOI: 10.1111/cei.12474.
17. Muszer M., Noszczyńska M., Kasperkiewicz K. et al. Human microbiome: when a friend becomes an enemy. *Arch Immunol Ther Exp* 2015;63(4):287–98. DOI: 10.1007/s00005-015-0332-3.
18. Fardini Y., Wang X., Temoin S. et al. *Fusobacterium nucleatum* adheres to FcγR2b and alters endothelial integrity. *Mol Microbiol* 2011;82(6):1468–80. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07905.x.

19. Rubinstein M.R., Wang X., Liu W. et al. *Fusobacterium nucleatum* promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/b-catenin signaling via its FadA adhesin. *Cell Host Microbe* 2013;14(2):195–206. DOI: 10.1016/j.chom.2013.07.012.
20. Wu S., Morin P.J., Maouyo D. et al. *Bacteroides fragilis* enterotoxin induces c-Myc expression and cellular proliferation. *Gastroenterology* 2003;124(2):392–400. DOI: 10.1053/gast.2003.50047.
21. Lundberg J.O., Weitzberg E., Cole J.A. et al. Nitrate, bacteria and human health. *Nat Rev Microbiol* 2004;2(7):593–602. DOI: 10.1038/nrmicro929.
22. Sobko T., Huang L., Midtvedt T. et al. Generation of NO by probiotic bacteria in the gastrointestinal tract. *Free Radic Biol Med* 2006;41(6):985–91. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.06.020.
23. Huycke M.M., Moore D.R. *In vivo* production of hydroxyl radical by *Enterococcus faecalis* colonizing the intestinal tract using aromatic hydroxylation. *Free Radic Biol Med* 2002;33(6):818–26.
24. Arthur J.C., Perez-Chanona E., Muhlbauer M. et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota. *Science* 2012;338(6103):120–3. DOI: 10.1126/science.1224820.
25. Carman R.J., van Tassel R.L., Kingston D.G. et al. Conversion of IQ, a dietary pyrolysis carcinogen to a direct-acting mutagen by normal intestinal bacteria of humans. *Mutat Res* 1988;206(3):335–42.
26. De Kok T.M., van Maanen J.M., Lankelma J. et al. Electron spin resonance spectroscopy of oxygen radicals generated by synthetic fecapentaene-12 and reduction of fecapentaene mutagenicity to *Salmonella typhimurium* by hydroxyl radical scavenging. *Carcinogenesis* 1992;13(7):1249–55. PMID: 1322251.
27. Salaspuro M. Bacteriocolonial pathway for ethanol oxidation: characteristics and implications. *Ann Med* 1996;28(3):195–200. PMID: 8811162.
28. Choi S.W., Mason J.B. Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis. *J Nutr* 2002;132(8 suppl):2413S–8S. PMID: 12163703.
29. Deplancke B., Finster K., Graham W.V. et al. Gastrointestinal and microbial responses to sulfate supplemented drinking water in mice. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003;228(4):424–33. PMID: 12671187.
30. Christl S.U., Scheppach W., Kasper H. Hydrogen metabolism in the large intestine – physiology and clinical implications. *Z Gastroenterol* 1995;33(7):408–13. PMID: 7571760.
31. Gill C.I., Rowland I.R. Diet and cancer: assessing the risk. *Br J Nutr* 2002;88(suppl 1):S73–87. DOI: 10.1079/BJN2002632.
32. Hague A., Manning A.M., Hanlon K.A. et al. Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumour cell lines in a p53-independent pathway: implications for the possible role of dietary fibre in the prevention of large-bowel cancer. *Int J Cancer* 1993;55(3):498–505. PMID: 8397167.
33. Caderni G., De Filippo C., Luceri et al. Effects of black tea, green tea and wine extracts on intestinal carcinogenesis induced by azoxymethane in F344 rats. *Carcinogenesis* 2000;21(11):1965–9. PMID: 11062155.
34. Yamamoto M., Matsumoto S. Gut microbiota and colorectal cancer. *Genes Environ* 2016;38:11. DOI: 10.1186/s41021-016-0038-8.
35. Formica V., Cereda V., Nardecchia A. et al. Immune reaction and colorectal cancer: friends or foes? *World J Gastroenterol* 2014;20(35):12407–19. DOI: 10.3748/wjg.v20.i35.12407.
36. Pernot S., Terme M., Voron T. et al. Colorectal cancer and immunity: what we know and perspectives. *World J Gastroenterol* 2014;20(14):3738–50. DOI: 10.3748/wjg.v20.i14.3738.
37. De Vries N.L., Swets M., Vahrmeijer A.L. et al. The immunogenicity of colorectal cancer in relation to tumor development and treatment. *Int J Mol Sci* 2016;17(7):1030. DOI:10.3390/ijms17071030.
38. Mármol I., Sánchez-de-Diego C., Pradilla Dieste A. et al. Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer. *Int J Mol Sci* 2017;18(1):E197. DOI: 10.3390/ijms18010197.
39. Ballester V., Rashtak S., Boardman L. Clinical and molecular features of young-onset colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2016;22(5):1736–44. DOI: 10.3748/wjg.v22.i5.1736.
40. Rodriguez-Salasa N., Dominguez G., Barderas R. et al. Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes. *Crit Rev Oncol Hematol* 2017;109:9–19. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2016.11.007.
41. Aghagolzadeh P., Radpour R. New trends in molecular and cellular biomarker discovery for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2016;22(25):5678–93. DOI: 10.3748/wjg.v22.i25.5678.
42. Patel A., Tripathi G., Gopalakrishnan K. Field cancerisation in colorectal cancer: a new frontier or pastures past? *World J Gastroenterol* 2015;21(13):3763–72. DOI: 10.3748/wjg.v21.i13.3763.
43. Podlaha O., Riester M., De S., Michor F. Evolution of the cancer genome. *Trends Genet* 2012;28(4):155–63. DOI: 10.1016/j.tig.2012.01.003.
44. Joyce J.A., Fearon D.T. T-cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science* 2015;348(6230):74–80. DOI: 10.1126/science.aaa6204.
45. Palucka A.K., Coussens L.M. The basis of oncoimmunology. *Cell* 2016;164(6):1233–47. DOI: 10.1016/j.cell.2016.01.049.
46. Харченко Е.П. Иммунное узнавание и иммунная привилегия. *Иммунология* 2008;29(2):118–24. [Kharchenko E.P. Immune recognition and immune privilege. *Immunologiya = Immunology* 2008;29(2):118–24. (In Russ.)].
47. Харченко Е.П. Иммунная привилегия: патологический аспект. *Иммунология* 2009;30(4):249–55. [Kharchenko E.P. Immune privilege: a pathological aspect. *Immunologiya = Immunology* 2009;30(4):249–55. (In Russ.)].
48. Sunstova M., Garazha A., Ivanova A. et al. Molecular functions of human endogenous retroviruses in health and disease. *Cell Mol Life Sci* 2015;72(19):3653–75. DOI: 10.1007/s00018-015-1947-6.
49. Philippe P., Mullins C.S., Naville M. et al. Expression of young HERV-H loci in the course of colorectal carcinoma and correlation with molecular subtypes. *Oncotarget* 2015;6(37):40095–50111. DOI: 10.18632/oncotarget.5539.
50. Diaz-Carballo D., Acikelli A.H., Klein J. et al. Therapeutic potential of antiviral drugs targeting chemorefractory colorectal adenocarcinoma cells overexpressing endogenous retroviral elements. *J Exp Clin Cancer Res* 2015;34:81. DOI 10.1186/s13046-015-0199-5.
51. Harrison M.M., Jenkins B.V., O'Connor-Giles K.M. et al. A CRISPR view of development. *Genes Dev* 2016;28(17):1859–72. DOI: 10.1101/gad.248252.114.