

Д.М. ПАСЕВИЧ, С.А. СУШКОВ, В.М. СЕМЕНОВ

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ТОЛСТОЙ КИШКИ

УО «Витебский государственный медицинский университет»,
Республика Беларусь

На сегодняшний день колоректальный рак входит в число лидеров по онкозаболеваемости населения во всем мире. Существует множество программ скрининга рака толстого кишечника, однако уровень выявляемости данного заболевания на поздних стадиях остается достаточно высоким. Это указывает на недостатки существующих и на необходимость поиска новых методик ранней диагностики данной патологии. В статье представлен обзор современной литературы о роли молекулярно-генетических факторов в патогенезе колоректального рака. Приведены характеристика, локализация и функции ряда генов, таких как APC, MLH, MSH, PMS, KRAS, NRAS, BRAF, P53, BIRC5, принимающих участие в возникновении доброкачественных новообразований толстой кишки, а затем трансформации их в злокачественные. Представлена информация о клиническом значении, прогностической значимости, определении эффективности лечения при выборе химиотерапевтических препаратов. Описаны молекулярно-генетические методы, используемые для выявления данных генов. Определена роль молекулярной генетики в ранней диагностике малигнизации доброкачественных образований. Описаны генетические факторы, вызывающие наследственную предрасположенность (семейный аденоматозный полипоз, с-м Линча), а так же мутации в генах, приводящие к появлению ненаследственных форм колоректального рака.

Ключевые слова: программы скрининга колоректального рака, колоректальный рак, молекулярно-генетическая диагностика, семейный аденоматозный полипоз, синдром Линча, сурвивин, генетический фактор

Today colorectal cancer is widely considered to be one of the world leaders in cancer incidence. There are many Colorectal Cancer Screening Programs for the detection of colorectal cancer; however, the identification of this disease in the late stages remains high. It points the disadvantages of the existing methods and seems to testify to a need of the new methods creation for early detection of cancer. This review presents the current literature on the role of genetic factors in colorectal cancer pathogenesis at the molecular level. The characteristics, localization and functions of some genes such as APC, MLH, MSH, PMS, KRAS, NRAS, BRAF, P53, BIRC5, involved in the occurrence of benign tumors of the colon, and then the conversion of normal cells into cancerous cells are presented. The information about the clinical and prognostic value, identification of treatment effectiveness in choosing the types of chemotherapy drugs is given. Molecular and genetic techniques applied to identify these genes are described. The role of molecular genetics in the early diagnosis of malignancy of benign tumors is defined. The genetic factors, causing genetic predisposition (familial adenomatous polyposis, Lynch syndrome) are described as well as mutations in genes resulting in the appearance of non-inherited forms of colorectal cancer.

Keywords: Colorectal Cancer Screening Programs, colorectal cancer, molecular genetic diagnosis, familial adenomatous polyposis, Lynch syndrome, survivin, genetic factor

Novosti Khirurgii. 2016 Mar-Apr; Vol 24 (2): 184-192
Molecular Genetic Aspects of Malignant Colon Tumors
D.M. Pasevich, S.A. Sushkou, V.M. Semenov

Введение

Колоректальный рак занимает ведущие позиции среди структуры онкозаболеваемости и летальности во всем мире. По данным В.П. Земляного ежегодно в мире регистрируется около 800 000 пациентов с колоректальным раком и 440 000 смертей от этого заболевания [1].

Согласно данным канцер-регистра Республик Беларусь, в нашей стране отмечается постоянный рост заболеваемости колоректальным раком. Частота рака ободочной кишки в 2007 г. составила 19,2 (у мужчин) и 20,0 (у женщин) на 100 тысяч взрослого населения, а частота рака прямой кишки — 19,1 на 100 тысяч

населения [2]. Также за последние десять лет отмечается увеличение заболеваемости раком ободочной кишки в 1,4 раза (с 1693 в 2001 г. до 2430 — в 2010 г.), раком ректосигмоидного отдела в 1,5 раза (с 363 в 2001 г. до 528 — в 2010 г.) [3].

Основой многих онкологических заболеваний являются нарушения в регуляции клеточного цикла, которые приводят к безудержному росту клеток и формированию опухолей. Причины нарушений клеточного деления заключаются чаще всего в соматических мутациях — изменениях исходной генетической информации соматических клеток. Осуществлять контроль за возникновением мутаций и появлением

измененных белков в клетке возможно при применении методов молекулярной биологии.

Нарушение экспрессии генов и различные хромосомные перестройки (транслокации, делеции, инверсии и амплификации) могут возникнуть в структуре протоонкогенов, генах ростовых факторов, клеточных рецепторов и других биологически активных генах. Данные нарушения приводят к потере контроля над работой протоонкогенов в составе нормального генома и запускают процессы злокачественной трансформации. Нарушения экспрессии белков, контролирующих процессы апоптоза, пролиферации и ангиогенеза, эпигенетические изменения ДНК белков, контролирующих жизнедеятельность опухолевых клеток, влияют на клиническое течение опухолевого процесса. Доказано, что различия в экспрессии определенных белковых маркеров могут объяснить, почему сравнимые по стадии, гистологической структуре и степени злокачественности опухоли различаются по течению заболевания.

Раннюю диагностику рака толстой кишки до настоящего времени нельзя считать удовлетворительной. Выявляемость опухоли на ранних стадиях низкая. Практически у каждого третьего на момент установления диагноза отмечается генерализация опухолевого процесса [4].

В последнее десятилетие открытия в молекулярной генетике, создание новых методов молекулярно-генетического исследования помогают решить ряд вопросов этиологии, патогенеза, ранней диагностики и профилактики рака толстой кишки. Отдельный ген или короткие сегменты ДНК не могут визуализироваться при микроскопическом исследовании, поэтому для идентификации мутаций применяются методы молекулярно-генетической диагностики. В настоящее время применяют два основных подхода к анализу экспрессии рецепторов на поверхности опухолевых клеток: иммуногистохимический и FISH-анализы (fluorescent in-situ hybridization).

В первом случае используются специфические к рецепторам антитела, с помощью которых оценивают количество рецепторов на поверхности клетки. Во втором случае проводится анализ копийности гена, поскольку известно, что именно увеличение дозы гена приводит к повышенной экспрессии рецепторов. Новой методикой, используемой для анализа экспрессии рецепторов в опухолевых клетках, стала полимеразная цепная реакция в реальном времени — Real Time PCR.

Применение вышеуказанных методов позволило не только решать диагностические вопросы: представилась возможность обнаружения в ткани

опухоли факторов роста, что в последующем привело к созданию лекарственных средств на основе моноклональных антител. Это открыло новый раздел в современном лечении злокачественных опухолей — направленную биотерапию, которая позволяет прицельно уничтожать только опухолевые клетки (таргетная терапия).

В течение долгого времени под большим вопросом находилось существование наследственных, генетически детерминированных форм онкопатологии, хотя имелись известные случаи семейных форм рака. Благодаря развитию молекулярной генетики в 90-х годах двадцатого столетия были выявлены и полностью охарактеризованы гены, дефекты в которых из поколения в поколение обуславливали развитие рака толстой кишки. Установлено, что причиной возникновения семейной формы онкопатологии определенного типа являются дефекты конкретного гена или группы генов [5, 6].

В диагностике рака толстой кишки большое значение имеет выявление лиц повышенного риска, которые имеют предрасположенность к развитию опухолей этой локализации. Это пациенты с семейными формами аденоматозного полипоза, наследственными формами неполипозного рака толстой кишки, лица с синдромами Гарднера, Пейтца-Егерса, Банайан-Рувалкаба, Блюма, ювенильным полипозом толстой кишки.

Ген APC

Семейный аденоматозный полипоз — это заболевание толстого кишечника, которое характеризуется образованием на поверхности внутренней стенки кишки аденоматозных полипов, которые сопряжены с высокой степенью развития полипозного рака толстой кишки. При выявлении таких полипов нужен генетический анализ с целью определения риска злокачественного перерождения полипа в инвазивный рак у пациента и риска болезни у его родственников.

Таким генетическим маркером является ген APC (adenomatous polyposis coli). APC-ген имеется у всех людей. Располагается он в длинном плече 5-й хромосомы в локусе 5q21. APC-ген содержит 15 экзонов (8535 нуклеотидных пар) и кодирует белок с молекулярной массой 310 кДа, состоящий из 2843 аминокислотных остатков.

APC-белок является опухолевым супрессором. Его основная задача — регуляция клеточного деления эпителия толстой кишки и других тканей, обеспечение нормальной пролиферации клеток слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта. Синтезируемый белок регулирует

стабильность и активность β -катенина (фактор транскрипции), аксина, тубулина. Белок APC способен связываться с бета-катенином, что приводит к деградации последнего в ядре. При отсутствии белка APC возникает избыток бета-катенина в ядре, и он образует комплекс с другим белком. Данный комплекс имеет свойство связываться с ДНК и активировать транскрипцию нескольких генов (циклина D и протоонкогена MYC (с-Мус)). Протоонкоген с-Мус сам по себе является фактором транскрипции для нескольких генов, которые контролируют клеточный рост и деление [7, 8, 9].

Известно, что мутации в APC-гене приводят к развитию семейного аденоматозного полипоза. Риск возникновения рака толстой кишки при данной патологии близок к 100%. Опухоли других органов (желудка, тела матки, щитовидной железы, молочной железы, центральной нервной системы, а также первично-множественные образования) наблюдаются у 75% пациентов-носителей. Основными формами генетических нарушений являются делеции и/или точечные мутации. Основная часть как наследуемых, так и соматических мутаций ассоциирована с 15 экзоном, составляющим 75% кодирующей последовательности ДНК гена APC.

Также отмечено, что каждому клиническому варианту течения семейного аденоматозного полипоза соответствуют мутации, расположенные в определенных интервалах гена APC. В APC-гене 2843 кодона. Мутации в интервалах между кодонами 437-1249 и 1465-1596 приводят к развитию классического варианта течения болезни. Для тяжелой формы характерна мутация в интервале между кодонами 1250-1464. Мутации в кодоне 1309 приводят к наиболее тяжелому фенотипическому проявлению заболевания. Ослабленной форме соответствуют интервалы между кодонами 0-436 и 1597-2843. Мутации по обоим концам APC-гена приводят к более доброкачественному течению семейного аденоматоза. Мутации, приводящие к изменениям аминокислотной последовательности в положении 1020-1160 и 1324-2075, связаны с работой катенина. Мутации, локализованные между аминокислотными последовательностями 1324-2075, связаны с работой аксина [10, 11].

Мутации в APC-гене приводят к нарушениям в синтезе белка, что проявляется потерей его функций. Результатом является высокая скорость пролиферации эпителия и образование аденом. В последующем это приводит к нарастающей дисплазии и трансформации в рак.

Были произведены исследования, в которых наблюдалось снижение роста опухолевых

клеток при добавлении нормального белка APC к клеткам рака толстой кишки, не имеющих его. Данное явление обусловлено способностью APC-белка увеличивать апоптоз и контролировать баланс между клеточным ростом и клеточной гибелью [12].

Гены MLH, MSH, PMS

Наследственный неполипозный колоректальный рак (ННКРР) (син. синдром Линча) — наследственная форма рака толстой кишки, наследуемая по аутосомно-доминантному типу, характеризующаяся развитием рака в нескольких поколениях. Заболевание характеризуется относительно ранним возникновением (до 45 лет). Преимущественно поражаются правые отделы толстой кишки (в 70% — проксимальный отдел и селезеночный угол). Также могут возникать злокачественные новообразования других локализаций: тела матки, яичников, молочной железы, поджелудочной железы, желудка, головного мозга, гепатобилиарной системы [13].

Впервые данные, касающиеся этого заболевания, были опубликованы в 1966 году доктором Н. Lynch [14]. Он описал семью, в которой родственники четырех поколений страдали раком толстой кишки, желудка, молочной железы, матки, яичников. Встречаемость ННКРР в популяции составляет 1:500–1:1000, что делает этот синдром одним из самых частых наследственных заболеваний [15].

Первые молекулярные исследования при ННКРР проводились в начале 90-х годов двадцатого века. Тогда была выявлена генетическая связь и идентификация локусов на 2p и 3p хромосомах, ассоциированных с генами предрасположенности к раку толстой кишки. В настоящее время распознано 7 основных генов, связанных с развитием синдрома Линча: hMLH1, hMSH2, hMSH6, hPMS1, hPMS2, hMSH3 и EXO1. Перечисленные гены ответственны за устранение ошибок репарации неправильно спаренных нуклеотидов в цепочке ДНК (mismatch repair — MMR).

При возникновении ошибок в системе репарации неспаренных оснований теряется комплементарность нитей ДНК и возникают петли, которые распознаются комплексами белков MSH2/MSH6 или MSH2/MSH3 (они отличаются по способности узнавать разные типы петель). Данные комплексы вовлекают в процесс сочетания белков MLH1/PMS2 или MLH1/MLH3, которые, в свою очередь, привлекают экзо- и эндонуклеазы, осуществляющие эксцизию поврежденного фрагмента ДНК. Далее к процессу присоединяются факторы репликации

(PCNA, ДНК-полимеразы), производящие восстановление нормальной структуры ДНК.

Достоверно известно, что причиной развития ННКРР является соматическая мутация аллеля дикого типа, инактивирующая систему MMR и повышающая уровень микросателлитной нестабильности, которая играет ведущую роль в инициации и прогрессии опухолевого роста. Нарушаются процессы репарации, возникают ошибки репликации и происходит накопление мутаций [16].

В международной базе данных зарегистрировано 126 вариантов мутаций генов hMLH1 и hMSH2, это около 90% от всех мутаций в системе MMR при синдроме Линча. Мутации в генах hMSH6 и PMS затрагиваются реже и имеют меньшую связь с семейным анамнезом.

Ген MLH1 представлен 19 экзонами, 757 кодонами (57358 нуклеотидных пар), кодирует белок из 756 аминокислот. Ген MSH2 включает 16 экзонов, 935 кодонов (171925 нуклеотидных пар) и кодирует белок, состоящий из 934 аминокислотных остатков.

Ген MSH2 — ген-супрессор, относится к группе «общего контроля». Согласно концепции Кинзлера и Фогельштайна, гены-супрессоры опухолевого роста можно подразделить на две большие группы: гены первой группы получили название «хранителей клеточного цикла» (ХКЦ, gatekeepers), а гены второй — «общего контроля» (ОК, caretakers) [17].

Инактивация генов «общего контроля» (ОК) повышает вероятность мутации генов ХКЦ. Дефект последних приводит к появлению опухоли. На фоне поврежденного гена ОК в клетке происходит накопление мутаций, которые угнетают работу других супрессоров первой или второй группы. Все это приводит к быстрому росту опухоли. При семейных случаях развития некоторых видов рака мутация в одном из аллелей соответствующего гена ОК может быть унаследована от родителей. Для инициации опухолевого процесса требуется соматическая мутация второго аллеля, а также инактивация обоих аллелей какого-либо гена ХКЦ. Примерами генов ОК служат гены MSH-2 и MLH-1. MSH6-ген кодирует белок, регулирующий замену поврежденных оснований ДНК.

Известно, что мутации гена MLH1 обнаруживаются не только у пациентов с наследственным неполипозным раком толстой кишки, но и у лиц со спорадической формой рака данной локализации. Инактивация этого гена ведет к накоплению мутаций в коротких микросателлитных последовательностях и их нестабильности. И у пациентов с ННКРР, и у пациентов со спорадической формой рака толстой кишки,

выявлено, что потеря функциональной активности этого гена может быть вызвана метилированием его CpG-островка [18].

В семьях, где помимо рака толстой кишки прослеживается накопление рака иной локализации, в 10% случаев выявляются терминальные мутации гена MSH6. Предполагают, что MSH6-ассоциированная предрасположенность может проявляться в атипичном течении и доброкачественных формах синдрома Линча. Следует отметить, что только при отсутствии мутаций в генах MLH1 и MSH2 проводят исследование других генов. Известно 5 мутаций генов PMS1 и PMS2. Одними из самых частых мутаций являются делеции. Мутации, которые вызывают стоп-кодон или ведут к сдвигу рамки считывания, могут вызывать изменения сплайсинга и замену одной аминокислоты на другую, что обуславливает патологический процесс. Из всех идентифицированных мутаций 29% MLH1 и 16% MSH2 являются миссенс вариантами [19].

Опухоли, ассоциированные с MSH и MLH патологией, характеризуются низкой степенью дифференцировки, слизистым и перстневидноклеточным компонентом, наличием лимфоцитарного инфильтрата вокруг опухоли, редким отдаленным метастазированием, лучшим ответом на лечение и более благоприятным прогнозом [20].

Гены KRAS, NRAS, BRAF

Также причиной появления злокачественных образований толстой кишки могут быть мутации в генах, кодирующих синтез белков семейства RAS, которые включают в себя H-Ras, K-Ras, N-Ras, R-Ras и другие гомологичные белки. Белки семейства RAS принимают участие в активации сигнальных путей тирозинкиназы, что приводит к мутации генов. Например, при активации рецепторов EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor — рецептор эпидермального фактора роста) сигналы передаются по многокомпонентному каскаду RAS/MAPK (Ras-Raf-MAP-киназный путь). Этот процесс определяет пролиферативную активность, способность к дифференцировке, метастазирование, уход от апоптоза, индукцию ангиогенеза. Постоянная активация Ras ведет к злокачественному перерождению клеток.

С применением молекулярно-генетических методов исследований в 80-х годах XX века практически у половины пациентов с раком толстой кишки были обнаружены мутации в гене K-ras. В 1990 году E. Fearon и B. Vogelstein предложили генетическую модель образования аденокарциномы, которая в наше время являет-

ся наиболее приемлемой. Согласно этой теории, мутация в гене *K-ras* запускает постоянное деление клеток и приводит к трансформации аденомы в аденому с выраженной дисплазией и далее в аденокарциному. Продуктом гена *K-ras* является белок p21ras – регуляторный трансмембранный G-белок. Воздействие на рецептор EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) приводит к активации белка *gas* – GTP (гуанозин-5-трифосфат). После «передачи сигнала» активированная форма гидролизуется до неактивной формы *gas* – GDP (гуанозин-5'-дифосфат). Таким образом, белок *gas* принимает непосредственное участие в серии реакций, с помощью которых информация передается в ядро клетки. Этот путь известен как Raf-MEK-MAPK путь [21]. При мутации гена *K-ras* p21ras утрачивает способность дезактивироваться, нарушается его переход в неактивную *gas*-GDP форму. Он остается в постоянно «включенном» состоянии. Все это приводит к непрерывной передаче сигнала в ядро клетки и, следовательно, к нарастанию клеточной пролиферации. Наиболее известными онкогенными мутациями являются мутации в генах KRAS и NRAS в 12, 13 кодонах (2 экзон), 59, 61 кодонах (3 экзон), 117, 146 кодонах (4 экзон). Мутации KRAS обнаружены у 30-40% пациентов с метастатическим КРР, у 15-30% пациентов с раком легкого, у 59-90% пациентов с раком поджелудочной железы, у 18% пациентов с раком яичников, у 15% пациентов с раком щитовидной железы. Мутации в гене NRAS при КРР составляют до 5%. Мутации в генах HRAS и RRAS при аденокарциноме толстой кишки не описаны. [22, 23].

Существуют два типа генов KRAS: первый (дикий тип) кодирует «нормальный», немутированный белок KRAS, и второй (мутантный KRAS) – патологический, мутированный белок. Эта характеристика может предсказать реакцию опухоли на некоторые препараты и предположить прогноз заболевания. В опухолях с диким типом KRAS белок активируется временно в ответ на некоторые стимулы, например на сигнал от EGFR. В такой ситуации можно регулировать нисходящий эффект. В опухолях с мутированным типом гена KRAS белок KRAS постоянно находится в активированном состоянии даже без стимуляции сигналом от EGFR. Результат такой непрекращающейся стимуляции приводит к росту и распространению опухоли. Примерно у 65% пациентов с колоректальным раком выявляют дикий тип гена KRAS; остальные 35% пациентов имеют мутантную версию гена. В настоящее время для лечения метастатического КРР применяют таргетные препараты на основе моноклональных антител – ингибиторы

EGFR. Связываясь с EGFR, данные препараты блокируют передачу сигналов от этих рецепторов в ядро клетки. Результатом их действия является угнетение инвазии опухолевых клеток и препятствие распространения опухоли в другие органы. У пациентов с диким типом гена KRAS анти-EGFR препараты оказывают положительный результат. Напротив, пациенты с мутантным геном KRAS химиотерапии поддаются плохо, у них определяется агрессивное течение опухоли и быстрое метастазирование. Поэтому было рекомендовано определять мутации в гене KRAS у всех пациентов с метастатическим колоректальным раком для решения вопроса об анти-EGFR терапии [24, 25].

Ген BRAF является членом семейства киназ RAF, которое представлено несколькими генами – ARAF, BRAF и CRAF. BRAF представляет собой RAS-регулируемую серин/треонин киназу. Основной задачей данного белка является передача пролиферативного сигнала с мембранных тирозинкиназных рецепторов к ядру. Он, также как и KRAS, участвует в сигнальном пути RasRaf-MAPK, который контролирует митоз, дифференцировку и клеточную гибель. В норме BRAF активируется при передаче импульса от белка семейства RAS. Генетические повреждения BRAF приводят к его постоянной стимуляции, и BRAF не переставая передает стимулы по Raf-MEK-MAPK пути, запуская процессы клеточного деления [22, 26].

Мутации в гене BRAF часто обнаруживаются в злокачественных опухолях человека, таких как метастатический колоректальный рак, немелкоклеточный рак легких, меланомы и пиллярный рак щитовидной железы. Мутации в гене KRAS обнаруживаются у 30-40% пациентов с неэффективным ответом на терапию таргетными препаратами. Однако мутации в гене BRAF ответственны за дополнительные 12-15% пациентов, которые не отвечают на анти-EGFR терапию. Можно сказать, что исследование гена BRAF дополняет анализ на KRAS-мутации, и помогает сделать выбор противоопухолевой терапии. Также BRAF влияет на клиническое течение и прогноз болезни. Пациенты с колоректальным раком и мутацией BRAF делятся на 2 группы. Первую группу составляют пожилые пациенты (75 лет и старше), опухоль которых содержит признаки гиперметилирования ДНК и характеризуется т.н. микросателлитной нестабильностью (MSI, microsatellite instability). MSI-позитивные опухоли толстой кишки практически в 50% случаев имеют мутацию в BRAF-гене, но течение таких опухолей более благоприятное, с редким метастазированием. В другой группе пациентов с колоректальным ра-

ком и с мутацией BRAF опухоли имеют крайне агрессивное течение и устойчивость к химио- и лучевой терапии [22, 27].

Ген P53

Ген P53 относится к генам-супрессорам. Его задача – регуляция транскрипции генов, отвечающих за клеточный цикл и апоптоз. Также он предотвращает ангиогенез в опухолевых тканях. P53 отвечает за распознавание повреждений ДНК, остановку клеточного цикла, репарацию дефектов ДНК или апоптоз клетки.

P53 мутирован более чем у 50% пациентов с раком толстой кишки, мутации его располагаются в 5-8 и в коротком плече 17 хромосомы.

До недавнего времени считалось, что в нормальных клетках вне каких-либо стрессов активность p53 практически отсутствует. Затем было доказано, что экспрессия гена p53 происходит с постоянной скоростью и приводит к образованию белка p53. Однако этот белок имеет короткую продолжительность жизни.

Белок p53 имеет молекулярную массу 53кДа и состоит из 392 аминокислотных остатков. Строение белковой молекулы p53 отражает сложность выполняемых ею функций. Дополнительный уровень сложности связан с недавно обнаруженным существованием множественных альтернативно-сплайсированных форм p53, а также укороченной с N-конца формой белка, образующейся за счет внутренней инициации трансляции [28].

Активная молекула p53 представляет собой тетрамер. Мономер p53 имеет выраженную доменную организацию. В N-концевой области (1-73 а.к.) находится многокомпонентный трансактивационный (ТА) домен и примыкающий к нему (63-97 а.к.), богатый пролином SH3 домен. Центральную треть белковой молекулы (94-312 а.к.) занимает участок, ответственный за узнавание и связывание специфических элементов ДНК. На эту область приходится большинство точечных мутаций гена p53. Ближе к C-концу располагаются олигомеризационный домен (325-355 а.к.) и неструктурированный щелочной C-концевой домен (360-393), играющий важную роль в регуляции активности белка [29].

Действуя независимо от своей транскрипционной функции, p53 может вызывать апоптоз за счет прямого взаимодействия с белками BAX, Bcl-XL, BNIP3L и Scotin. Способность белка p53 взаимодействовать и образовывать комплексы с другими белками зависит от разнообразных условий. Белок p53 активируется при наличии в клетке поврежденных участков ДНК, а также в ответ на введение в клетки «рваной» ДНК.

Существует множество механизмов индукции белка p53, связанных как с повреждением ДНК, так и не влияющих на ее структуру, но в конечном итоге способных повлиять на целостность генома [28, 30].

К факторам, способным активировать белок p53, относятся истощение запасов нуклеотидов, нарушения цитоскелета (нарушения полимеризации актиновых волокон, деполимеризация микротрубочек), нарушения биогенеза рибосом, состояние гипоксии и ишемии, состояние гипероксии, отсутствие или избыток некоторых ростовых факторов или цитокинов, нарушения клеточной адгезии и фокальных контактов, дефектные интегрины, нарушение прикрепления клеток к субстрату. Это сопровождается p53-зависимым аноикисом, т.е. гибелью неприкрепленных клеток, появлением полиплоидных клеток, образованием микроядер, разрушением хромосомного веретена, гипер- и гипотермией, действием окиси азота (NO). Все эти состояния вызывают соответствующие изменения белка p53 и систем, регулирующих его. А это влияет на дальнейшие процессы и конечные результаты в измененной клетке [28, 31].

Белок p53 выполняет разнообразные функции, но наиболее функционально значимой является его способность регулировать транскрипцию генов, выступая в качестве транскрипционного фактора. Чаще всего повреждения белка p53 представлены миссенс мутациями (точечными мутациями, сопровождающимися заменой аминокислот). Такие генетические изменения p53 встречаются почти у половины пациентов с раком. На сегодняшний день описано около 2000 типов миссенс мутаций p53, которые определяют уровень его функциональной активности и подвергаются селекции в клетках опухолей [32].

Присутствие мутантного гена p53 в клетках опухолей приводит к видоизменениям активности таких белков как p73 и p63, это способствует приобретению новых функций мутантного p53. Эти функции направлены на повышение злокачественности клеток и на приобретение устойчивости к противораковой терапии [33].

Белок p53 непосредственно участвует в процессах апоптоза как за счет своей транскрипционной функции, так и за счет участия в индукции митохондриального пути клеточной смерти. После своей активации часть p53 под действием определенных факторов поступает в митохондрии, где происходит взаимодействие с анти- и проапоптозными белками. Эти взаимодействия приводят к нарушению проницаемости наружной митохондриальной мембраны, что вызывает утечку цитохрома C и индукцию апоптоза [28, 34]. Вторая по значимости функ-

ция p53 — обеспечение репрессии транскрипции другой части генов, то есть участие в репарации (ДНК-экзонуклеаза) и способность связываться с большим числом других белков (ферментов, транскрипционных факторов, адапторных белков) и тем самым влиять на множество внутриклеточных процессов.

Несмотря на разнообразие функций белка p53, единой целью является поддержание генетической стабильности клеток организма.

Ген BIRC5

Ген BIRC5 расположен в длинном плече 17-й хромосомы (17q25) человека. Данный ген кодирует структуру белка сурвивина. Сурвивин был первоначально идентифицирован при изучении В-клеточных лимфом человека как структурный аналог семейства белков-ингибиторов апоптоза (IAP). Члены этого семейства характеризуются содержанием ключевого домена из 70 аминокислотных последовательностей, названным бакуловирусным IAP повтором (BIR) [35].

Белок сурвивин — самый маленький член семейства IAP: состоит из 142 аминокислот, молекулярная масса составляет 16,5 кДа. С помощью метода ПЦР в реальном времени были обнаружены следующие изоформы сурвивина: survivin-Ex3, survivin-2B, survivin-3B и survivin-2 [36].

Сурвивин — уникальный представитель семейства IAP, не обнаруживающийся в большинстве нормальных зрелых тканей, но экспрессирующийся на высоком уровне в опухолях. Сурвивин, являясь регулятором клеточного цикла, вовлечен в контроль как запрограммированной смерти (апоптоза), так и регуляции клеточного деления. Молекулярные механизмы, с помощью которых сурвивин противостоит апоптозу и способствует клеточному делению, широко изучены в раковых клетках [37]. Более поздние исследования показали, что экспрессия сурвивина также происходит на очень ранних стадиях рака и существует прямая корреляция экспрессии сурвивина со стадией рака и другими параметрами малигнизации [38].

Функция сурвивина заключается в предотвращении гибели клетки (апоптоза), в участии в контроле деления клеток (митозе) и стимулировании ангиогенеза.

Как известно, апоптоз имеет два пути реализации: внешний и внутренний. Белок сурвивин может принимать участие в каждом из них. Внешний путь инициируется путем активации рецепторов гибели клеток, например, фактор некроза опухоли альфа (TNF-alpha) внутренний

может инициироваться воздействием ионизирующего излучения или под действием химиотерапии [39]. Оба пути приводят к ряду сложных взаимодействий и реакций, результатом которых является активация каспаз, которые в свою очередь вызывают апоптоз путем расщепления основных субстратов для выживания клеток, таких как белков цитоскелета, белков репарации ДНК, тормозных субъединиц эндонуклеаз. Антиапоптотическая функция заключается в прямом или опосредованном ингибировании протеолитической активности каспаз. Сурвивин в качестве ингибитора апоптоза непосредственно ингибирует активность каспазы-3, -7 и -9 [40, 41].

Исследования показывают, что экспрессия сурвивина не только ингибирует апоптоз, но и ассоциируется с клеточной пролиферацией путем регулирования клеточного цикла в G2/M фазе. Сурвивин играет центральную роль в клеточном делении. Он связывается с микротрубочками, расположенными в митотическом аппарате, обеспечивая их стабилизацию, точное разделение сестринских хроматид, правильное расхождение хромосом и цитокинез [42, 43].

В дополнение к своей непосредственной роли в канцерогенезе и делении клетки, сурвивин может также играть ключевую роль в ангиогенезе опухоли. Наиболее сильно это выражено в эндотелиальных клетках во время пролиферативной фазы ангиогенеза [44].

Ряд авторов отмечают, что одни вирусы, такие как вирус папилломы человека E6/E7, могут повышать экспрессию сурвивина. Другие, например аденовирус второго типа, повышают активность сурвивина путем связывания и блокирования p53, который является репрессором транскрипции данного белка [45, 46, 47].

Исследования Kawasaki et al. [48, 49] и Lin et al. [50] показали роль сурвивина в канцерогенезе колоректального рака. По данным авторов, экспрессия сурвивина уменьшает апоптотический индекс как в BCL-2-положительных, так и в BCL-2-отрицательных колоректальных карцином. Пациенты с низким апоптотическим индексом в опухолях имеют значительно худшие показатели выживаемости. Авторы сообщают, что иммунореактивность сурвивина (но не Bcl-2) значительно возрастает в процессе перехода от аденомы с низкой дисплазией к аденоме с высокой дисплазией и карциноме. Это наблюдение позволяет предположить, что сурвивин является независимым прогностическим фактором при колоректальном раке.

Один из механизмов колоректального онкогенеза состоит в том, что в результате мутации в гене APC повышается транскрипция сурвивина

через активацию β -catenin/TCF-4 сигнального пути. Повышение содержания сурвивина приводит к ингибированию апоптоза, увеличению выживаемости, разрастанию количества клеток и, как следствие, к туморогенезу. Однако в нормальной кишечной ткани с немутированным APC геном транскрипция сурвивина инактивируется путем подавления β -catenin/TCF-4 сигнального пути, что приводит к повышению апоптоза, снижению клеточной популяции и к блокировке онкогенеза [51, 52, 53].

Ген BIRC5 экспрессируется практически во всех опухолях независимо от их гистологической структуры. Это позволяет рассматривать сурвивин в роли универсального маркера канцерогенеза для любого типа рака и создавать диагностические тест-системы, основанные на определении данного белка в биологических образцах.

Заключение

Проведенный анализ литературы показывает, что пусковым механизмом онкогенеза большинства новообразований толстой кишки являются нарушения генетического аппарата клетки. В то же время существует значительный разрыв между научно-обоснованными данными в области молекулярной генетики канцерогенеза и практическим применением их в работе врачей. В связи с этим создание новых методов ранней диагностики малигнизации доброкачественных новообразований на основе молекулярно-генетических исследований и их широкая апробация позволяют не только более глубоко изучить этиологические и патогенетические механизмы канцерогенеза, но и оптимизировать лечение пациентов с данной патологией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Земляной ВП, Трофимова ТН, Непомнящая СЛ, Дементьева ТВ. *Практ Онкология*. 2005;6(2):71-81.
2. Кохнюк ВТ. Колоректальный рак. Минск, РБ: Харвест; 2005. 384 с.
3. Суконко ОГ, Красный СА. Алгоритмы диагностики и лечения злокачественных новообразований. Минск, РБ; 2012. 584 с.
4. Старинский ВВ, Петрова ГВ, Чиссов ВИ. Заболеваемость населения России злокачественными новообразованиями в 2000 г. *Рос Онкол Журн*. 2002;(3):39-44.
5. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, et al. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology*. 1993 May;104(5):1535-49.
6. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary non-

- polyposis colon cancer. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):1027-38.
7. Iwamoto M, Ahnen DJ, Franklin WA, Maltzman TH. Expression of beta-catenin and full-length APC protein in normal and neoplastic colonic tissues. *Carcinogenesis*. 2000 Nov;21(11):1935-40.
8. Fultz KE, Gerner EW. APC-dependent regulation of ornithine decarboxylase in human colon tumor cells. *Mol Carcinog*. 2002 May;34(1):10-8.
9. Kawasaki Y, Sato R, Akiyama T. Mutated APC and Asef are involved in the migration of colorectal tumour cells. *Nat Cell Biol*. 2003 Mar;5(3):211-5.
10. Bunyan DJ, Shea-Simonds J, Reck AC, Finnis D, Eccles DM. Genotype-phenotype correlations of new causative APC gene mutations in patients with familial adenomatous polyposis. *J Med Genet*. 1995 Sep; 32(9): 728-31.
11. Caspari R, Olschwang S, Friedl W, Mandl M, Boisson C, Böker T, et al. Familial adenomatous polyposis: desmoid tumours and lack of ophthalmic lesions (CHRPE) associated with APC mutations beyond codon 1444. *Hum Mol Genet*. 1995 Mar;4(3):337-40.
12. Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jul 23;93(15):7950-5.
13. Lynch HT, de la Chapelle A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet*. 1999 Nov;36(11):801-18.
14. Lynch HT, Shaw MW, Magnuson CW, Larsen AL, Krush AJ. Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. *Arch Intern Med*. 1966 Feb;117(2):206-12.
15. Rahner N, Steinke V, Schlegelberger B, Eisinger F, Hutter P, Olschwang S. Clinical utility gene card for: Lynch syndrome (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM) - update 2012. *Eur J Hum Genet*. 2013 Jan;21(1). doi: 10.1038/ejhg.2012.164.
16. Baglioni S, Genuardi M. Simple and complex genetics of colorectal cancer susceptibility. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2004 Aug 15;129C(1):35-43.
17. Баранова АВ, Янковский НК. Гены-супрессоры опухолевого роста. *Молекуляр Биология*. 1998;32(2):206-18.
18. Herman JG. Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Semin Cancer Biol*. 1999 Oct;9(5):359-67.
19. Любченко ЛН. Клинико-генотипические варианты семейного рака толстой кишки. *Практ Онкология*. 2005;6(2):132-36.
20. Watson P, Lynch HT. The tumor spectrum in HNPCC. *Anticancer Res*. 1994 Jul-Aug;14(4B):1635-39.
21. Orton RJ, Sturm OE, Vyshemirsky V, Calder M, Gilbert DR, Kolch W. Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. *Biochem J*. 2005 Dec 1;392(Pt 2):249-61.
22. Имянитов ЕН. Стандартные и потенциальные маркеры при опухолях желудочно-кишечного тракта. *Практ Онкология*. 2012;13(4):219-28.
23. Виноградов АВ, Резайкин АВ, Сергеев АГ. Детекция точечных мутаций генов KRAS и NRAS при острых миелоидных лейкозах с использованием технологии прямого автоматического секвенирования. *Вестн Башкир Ун-та*. 2014;19(3):845-47.
24. Cerottini JP, Caplin S, Saraga E, Givel JC, Benhattar J. The type of K-ras mutation determines prognosis in colorectal cancer. *Am J Surg*. 1998 Mar;175(3):198-202.
25. Vladimirova LY, Kit OI, Niki pelova EA, Abramova NA. Results of monoclonal antibodies against EGFR-receptors application in patients with

- metastatic colorectal cancer (mCRC). *J Clin Oncol*. 2013;31(suppl; abstr e14701).
26. Имянитов ЕН. Выявление мутаций в гене BRAF для выбора терапии меланомы. *Арх Патологичн*. 2012;74(5):65-71.
27. Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol*. 2011 May 20;29(15):2011-19. doi: 10.1200/JCO.2010.33.5091.
28. Чумаков ПМ. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме. *Успехи Биол Химии*. 2007;47(1):3-52.
29. Laptenko O, Prives C. Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ*. 2006 Jun;13(6):951-61.
30. Horn HF, Vousden KH. Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene*. 2007; 26:1306-16. doi:10.1038/sj.onc.1210263.
31. David-Pfeuty T, Nouvian-Dooghe Y, Sirri V, Roussel P, Hernandez-Verdun D. Common and reversible regulation of wild-type p53 function and of ribosomal biogenesis by protein kinases in human cells. *Oncogene*. 2001 Sep 20;20(42):5951-63.
32. Hamroun D, Kato S, Ishioka C, Claustres M, Bérout C, Soussi T. The UMD TP53 database and website: update and revisions. *Hum Mutat*. 2006 Jan;27(1):14-20.
33. Pugacheva EN, Ivanov AV, Kravchenko JE, Kopnin BP, Levine AJ, Chumakov PM. Novel gain of function activity of p53 mutants: activation of the dUT-Pase gene expression leading to resistance to 5-fluorouracil. *Oncogene*. 2002 Jul 11;21(30):4595-600.
34. Moll UM, Wolff S, Speidel D, Deppert W. Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol*. 2005 Dec;17(6):631-36.
35. Pavlidou A, Dalamaga M, Kroupis C, Konstantoudakis G, Belimezi M, Athanasas G, et al. Survivin isoforms and clinicopathological characteristics in colorectal adenocarcinomas using real-time qPCR. *World J Gastroenterol*. 2011 Mar 28;17(12):1614-21. doi: 10.3748/wjg.v17.i12. 1614.
36. Ge QX, Li YY, Nie YQ, Zuo WG, Du YL. Expression of survivin and its four splice variants in colorectal cancer and its clinical significances. *Med Oncol*. 2013 Jun;30(2):535. doi: 10.1007/s12032-013-0535-6.
37. Li F. Survivin study: what is the next wave? *J Cell Physiol*. 2003 Oct;197(1):8-29.
38. Li F. Role of survivin and its splice variants in tumorigenesis. *Br J Cancer*. 2005 Jan 31;92(2):212-16.
39. Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I, et al. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *EMBO J*. 2003 Jun 2;22(11):2729-40.
40. Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep*. 2006 Oct;7(10):988-94.
41. Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nat Rev Cancer*. 2008 Jan;8:61-70. doi:10.1038/nrc2293.
42. Altieri DC. The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. *Curr Opin Cell Biol*. 2006 Dec;18(6):609-15.
43. Lens SM, Vader G, Medema RH. The case for Survivin as mitotic regulator. *Curr Opin Cell Biol*. 2006 Dec;18(6):616-22.
44. Harfouche R, Hasséssian HM, Guo Y, Faivre V, Srikant CB, Yancopoulos GD, et al. Mechanisms which mediate the antiapoptotic effects of angiopoietin-1 on endothelial cells. *Microvasc Res*. 2002 Jul;64(1):135-47.
45. Nees M, Geoghegan JM, Munson P, Prabhu V, Liu Y, Androphy E, et al. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins inhibit differentiation-dependent expression of transforming growth factor-beta2 in cervical keratinocytes. *Cancer Res*. 2000 Aug 1;60(15):4289-98.
46. Zhao H, Granberg F, Elfineh L, Pettersson U, Svensson C. Strategic attack on host cell gene expression during adenovirus infection. *J Virol*. 2003 Oct;77(20):11006-15.
47. Punga T, Akusjärvi G. Adenovirus 2 E1B-55K protein relieves p53-mediated transcriptional repression of the survivin and MAP4 promoters. *FEBS Lett*. 2003 Sep 25;552(2-3):214-18.
48. Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998 Nov 15;58(22):5071-74.
49. Kawasaki H, Toyoda M, Shinohara H, Okuda J, Watanabe I, Yamamoto T, et al. Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis. *Cancer*. 2001 Jun 1;91(11):2026-32.
50. Lin LJ, Zheng CQ, Jin Y, Ma Y, Jiang WG, Ma T. Expression of survivin protein in human colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2003 May;9(5):974-77.
51. Kim PJ, Plescia J, Clevers H, Fearon ER, Altieri DC. Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Lancet*. 2003 Jul 19;362(9379):205-9.
52. Zhang T, Otevrel T, Gao Z, Gao Z, Ehrlich SM, Fields JZ, et al. Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res*. 2001 Dec 15;61(24):8664-67.
53. Zhang T, Fields JZ, Ehrlich SM, Boman BM. The chemopreventive agent sulindac attenuates expression of the antiapoptotic protein survivin in colorectal carcinoma cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 Feb;308(2):434-37.

Адрес для корреспонденции

210023, Республика Беларусь,
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,
Витебский государственный
медицинский университет,
кафедра общей хирургии,
e-mail: pasevich-dmitry@mail.ru,
Пасевич Дмитрий Михайлович

Сведения об авторах

Пасевич Д.М., ассистент кафедры общей хирургии УО «Витебский государственный медицинский университет».
Сушков С.А., к.м.н., доцент, проректор по НИР УО «Витебский государственный медицинский университет».
Семенов В.М., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой инфекционных болезней УО «Витебский государственный медицинский университет».

Поступила 12.01.2016 г.