

УДК 571.27; 578.224

# Толл-подобные рецепторы (TLR) и их значение в опухолевой прогрессии

Д. В. Щебляков, Д. Ю. Логунов\*, А. И. Тухватулин, М. М. Шмаров, Б. С. Народицкий, А. Л. Гинцбург

ФБГУ Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздравсоцразвития РФ, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

\*E-mail: ldenisy@yahoo.com

Поступила в редакцию 28.08.2010 г.

**РЕФЕРАТ** Толл-подобные рецепторы (TLR) являются главными компонентами системы врожденного иммунитета, которые опосредуют специфическое распознавание эволюционно консервативных молекулярных структур патогенов (PAMP – pathogen associated molecular patterns). Толл-подобные рецепторы представлены на клетках разного типа – от эпителиальных до иммунокомпетентных. Как известно, при связывании TLR с собственными лигандами происходит активация ряда адаптерных белков и киназ, которые участвуют в индукции ключевых провоспалительных факторов. Итогом такой индукции является развитие как врожденного иммунного ответа в результате усиления экспрессии ряда антиапоптотических белков, провоспалительных цитокинов, антибактериальных белков, так и приобретенного иммунного ответа через созревание дендритных клеток, презентации антигена и т.д. Благодаря своей способности усиливать специфические и неспецифические иммунные реакции организма агонисты Толл-подобных рецепторов нашли применение не только в терапии инфекционных заболеваний, но также в качестве адъювантов в химиотерапии различных злокачественных новообразований. Однако к настоящему моменту описаны принципиально различные эффекты TLR на опухоли. С одной стороны, показано, что TLR (и их лиганды) могут выступать в роли супрессоров опухолевого роста, с другой стороны, TLR могут стимулировать опухолевую прогрессию и влиять на устойчивость опухолей к химиотерапии. В представленном обзоре обобщены данные о влиянии TLR и их агонистов на рост опухоли, а также проанализированы основные механизмы, лежащие в основе таких различий.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** Толл-подобные рецепторы, агонисты рецепторов врожденного иммунитета, опухоль, врожденный иммунный ответ, воспаление.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** TLR – Толл-подобные рецепторы; ЛПС – липополисахарид; NF-kB – ядерный фактор транскрипции kB; PRR – паттерн-распознающие рецепторы; PAMP – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны; DAMP – молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением; IRF – интерферонрегулирующий фактор, оц- и дцРНК – одно- и двухцепочечная рибонуклеиновая кислота; TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли  $\alpha$ ; IL – интерлейкин; IFN – интерферон; НК-клетки – естественные киллеры; миРНК – малые интерферирующие РНК; TGF – трансформирующий фактор роста.

## ВВЕДЕНИЕ

По современным представлениям воспаление является одной из главных причин возникновения и прогрессии опухолевых заболеваний [1, 2]. Механизм этой взаимосвязи изучен недостаточно полно, но уже сегодня понятен ряд ключевых событий, происходящих в очаге воспаления и необходимых для возникновения и прогрессии опухоли.

1) В клетках, находящихся в очаге воспаления, поддерживается стабильно высокая активность транскрипционного фактора NF-kB [3], ответственного за экспрессию провоспалительных цитокинов, многие из которых (GRO $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , IL-8, MIP-3 $\alpha$ ) обладают опухолестимулирующим действием [4, 5]. Более того, NF-kB считается основным антиапопто-

тическим фактором, активирующим экспрессию генов ряда антиапоптотических белков, таких, как IAP, Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub> и др. Присутствие этих белков увеличивает устойчивость клеток к различным стрессовым воздействиям, возникающим в ходе развития воспаления [6, 7].

2) Процесс воспаления сопровождается индукцией окислительного стресса – причине появления и накопления мутаций, а также генетических перестроек в клетках [8].

3) На завершающих этапах воспаления секретируется большое количество провоспалительных цитокинов (GRO $\alpha$ /CXCL1, GRO $\beta$ /CXCL2, GRO $\gamma$ /CXCL3 и IL-8/CXCL8, MIP-3 $\alpha$ , IL-1) и факторов роста (TGF- $\beta$ 1, PDGF, bFGF, TGF- $\alpha$ , IGF-I, IGF-II), ко-

торые усиливают миграцию в очаг воспаления клеток стромы (фибробластов) и эпителиальных клеток, а также их последующую пролиферацию [9]. При хроническом воспалении процессы репарации и альтерации зачастую происходят одновременно, что заставляет клетки пролиферировать в условиях гипоксии и генотоксического стресса, повышая тем самым риск возникновения мутаций.

Наиболее частой и хорошо изученной причиной развития воспаления является микробная инвазия, в ходе которой патоген способен различными способами нарушать гомеостаз клетки хозяина.

Один из таких механизмов – взаимодействие высококонсервативных участков молекул патогена с эукариотической клеткой через паттерн-распознающие рецепторы (PRR – RIG-I-подобные рецепторы, Nod-подобные рецепторы, лектины С-типа, Толл-подобные рецепторы (TLR) и др.), расположенные на поверхности и/или внутри эукариотических клеток [10].

Связывая различные бактериальные лиганды, PRR играют ключевую роль в развитии воспаления, инициируя развитие как врожденного иммунного ответа (усиливают экспрессию ряда антиапоптотических белков, провоспалительных цитокинов, антибактериальных белков), так и приобретенного (индуцируют созревание дендритных клеток, презентацию захваченного антигена, дифференцировку наивных Т-хелперов) [11].

В связи с этим становится актуальным изучение роли PRR в индукции опухолеобразования и стимуляции опухолевой прогрессии при развитии бактериальной инфекции.

В данном обзоре мы остановим внимание на роли TLR в развитии воспалительных реакций и попытаемся оценить их взаимосвязь с опухолевой прогрессией.

Сегодня накоплены данные, свидетельствующие о том, что TLR ассоциированы с опухолевым ростом. Однако к настоящему моменту опубликованы противоречивые данные, подтверждающие как опухолестимулирующее [12, 13], так и опухолесупрессирующее действие TLR [14, 15].

В связи с этим целью нашего обзора является систематизация имеющихся данных и описание возможных механизмов, обуславливающих различия в проявляемых эффектах TLR на рост опухоли.

### ФУНКЦИЯ TLR

TLR по выполняемым в организме функциям относят к семейству PRR, которые опосредуют специфическое распознавание эволюционно консервативных структур патогенов (PAMP – pathogen associated molecular patterns). Связываясь с PAMP, TLR активируют систему врожденного иммунитета и во многом определяют развитие адаптивного иммунитета [16,

17]. Наиболее консервативная роль TLR – активация антимикробного иммунитета в коже, слизистых оболочках респираторного, гастроинтестинального и урогенитального тракта.

TLR распознают микробные молекулы, что приводит к развитию воспалительных реакций, вызванных активацией фактора NF- $\kappa$ B, который регулирует экспрессию провоспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 и др.) и хемокинов (MCP-1, MCP-3, GM-CSF и др.).

TLR вовлечены в транскрипционную и посттрансляционную регуляцию (протеолитическое расщепление и секрецию) таких антимикробных факторов, как дефензины ( $\alpha$  и  $\beta$ ), фосфолипаза A2, лизоцим и др. [18]. TLR усиливают поглощение микроорганизмов фагоцитами и оптимизируют их инактивацию, регулируя выброс перекисных радикалов и оксида азота [19, 20].

Известно, что TLR, находящиеся на поверхности эндотелиальных клеток, опосредованно обеспечивают миграцию лейкоцитов в очаг воспаления, стимулируя экспрессию молекул адгезии лейкоцитов – E-селектина и ICAM-1 [21].

Стимуляция TLR прямо ведет к увеличению продукции интерферонов (IFN)- $\alpha/\beta$  как стромальными, так и гемопоэтическими клетками, что важно для защиты организма от вирусных и некоторых бактериальных инфекций [22]. Более того, недавно было установлено, что TLR, активируя ряд молекул (FADD, каспаза 8, протеинкиназа R (PKR)) или стимулируя экспрессию IFN- $\alpha/\beta$ , могут индуцировать развитие апоптоза – важного механизма, защищающего клетки от патогенных микроорганизмов [23].

Показано, что TLR играют центральную роль в регуляции адаптивного иммунного ответа. Так, TLR-зависимая активация профессиональных антигенпредставляющих дендритных клеток является определяющим моментом в нескольких принципиальных для развития адаптивного иммунитета процессах: активации зрелых Т-клеток; процессинга и презентации микробных антигенов; повышении экспрессии костимуляторных молекул (CD80, CD86), необходимых для активации наивных CD4<sup>+</sup>-Т-клеток; подавлении регуляторных Т-клеток посредством продукции IL-6 [24]. Также известно, что TLR-зависимая активация важна для пролиферации и созревания В-клеток во время инфекции [25].

Таким образом, TLR выполняют в организме важную роль, которая заключается в развитии воспалительных реакций (активации врожденного иммунитета) в ответ на попадание в организм самых различных патогенов (простейших, грибов, бактерий, вирусов). Более того, по современным представлениям распознавание патогенов посредством TLR является ключевым моментом в формировании второй

линии защиты – адаптивного иммунитета [11]. Также показано, что TLR принимают участие в нормальном функционировании кишечника, они вовлечены в развитие аутоиммунных заболеваний (системная волчанка), артритов, атеросклероза и др. [26, 27]. В последнее время получены данные, которые показывают, что TLR способны активировать противоопухолевый иммунитет [28, 29] или, наоборот, стимулировать опухолевую прогрессию [30, 31].

**СТРУКТУРА TLR, ИХ ЭКСПРЕССИЯ РАЗЛИЧНЫМИ ТИПАМИ КЛЕТОК, СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПО ОТНОШЕНИЮ К РАЗЛИЧНЫМ МОЛЕКУЛЯРНЫМ СТРУКТУРАМ (PAMP И DAMP)**

По своей структурной организации TLR относятся к семейству рецепторов IL-1 (IL-1R). TLR – это трансмембранные белки, которые экспрессируются на поверхности клетки и в субклеточных компартментах (таких, как эндосомы). Локализация TLR связана с типом распознаваемого им лиганда. Так, TLR 1, 2, 4, 5, 6, связывающие структурные бактериальные компоненты, локализуются на поверхности клеток, тогда как TLR 3, 7, 8, 9, распознающие преимущественно вирус-ассоциированные структуры – нуклеиновые кислоты (дцРНК, оцРНК, ДНК), находятся в эндосомах, где взаимодействуют с лигандами после депротенизации вирионов [16].

В структуре TLR выделяют N-концевой лейцин-богатый (LRR) домен, ответственный за связывание лигандов, трансмембранный домен и C-концевой внутриклеточный сигнальный домен (гомологичный внутриклеточному домену IL-1R) [32].

TLR экспрессируются в большинстве типов клеток организма человека, включая негемопоэтические эпителиальные и эндотелиальные клетки. Количество одновременно экспрессируемых TLR и их сочетание специфичны для каждого типа клеток,

а больше всего TLR в клетках гемопоэтического происхождения, таких, как макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки (табл. 1) [33].

В настоящий момент у млекопитающих идентифицировано 13 различных TLR, у человека – 10 и 12 у мышей. TLR с 1-го по 9-й консервативны у человека и мыши. Однако существуют и различия. Ген, кодирующий TLR10, обнаружен только у человека, а TLR11 – у обоих видов, но функционален только у мышей [34].

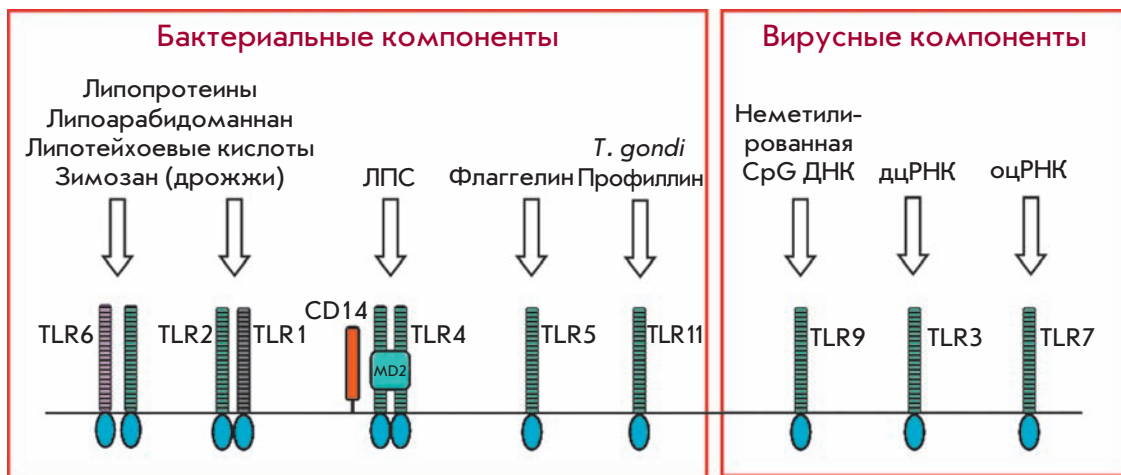
Главная особенность TLR, отличающая их от рецепторов приобретенного иммунитета (Т- и В-клеточные рецепторы), состоит в их способности распознавать не уникальные эпитопы, а эволюционно консервативные патоген-ассоциированные молекулярные структуры (PAMP), широко представленные у всех классов микроорганизмов и вирусов независимо от их патогенности.

Специфичность распознавания PAMP достаточно хорошо изучена у большинства TLR, сегодня известны лиганды TLR 1–9 и 11 (рис. 1). Биологическая роль и специфичность TLR10 (человек), 12 и 13 (мышь) остаются неизвестными [16].

Наиболее известные микробные лиганды TLR:

- бактериальные липопептиды, липотейхоевая кислота и пептидогликаны; липоарабидоманнан микобактерий; компонент клеточной стенки грибов зимозан, которые связываются с TLR2, образующим гетеродимеры с TLR1, TLR6 и CD14;
- ЛПС грамотрицательных бактерий, лиганд TLR4;
- компонент жгутиков бактерий – флагеллин, активирующий TLR5;
- профиллин-подобные структуры простейших, связывающиеся с TLR11;
- ДНК (неметилированные CpG-последовательности), распознаваемая TLR9;
- дцРНК – лиганд TLR3;
- оцРНК – лиганды TLR7 и TLR8.

Рис. 1. Толл-подобные рецепторы и их лиганды.



Недавно было показано, что TLR могут активироваться многими эндогенными молекулами – алларминами (гиалуроновая кислота, белки теплового шока и др.), которые появляются при разрушении тканей. Эти гетерогенные по своей природе и структуре соединения (PAMP и аллармины), распознаваемые TLR, в настоящее время объединяют в одно семейство, именуемое DAMP (damage associated molecular patterns) [35].

**КАСКАД СИГНАЛОВ, АКТИВИРУЮЩИЙСЯ ПОСЛЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ TLR С СОБСТВЕННЫМИ ЛИГАНДАМИ**

Теперь от описания структуры и функций TLR перейдем к событиям, разворачивающимся после их связывания с собственными лигандами.

Связывание лиганда с TLR инициирует каскад сигналов, берущих начало от цитоплазматических TIR-доменов TLR. Сигнал от TIR-домена через адаптерные молекулы MyD88 (myeloid differentiation factor 88), TIRAP (TIR-доменсодержащие адаптеры), TICAM1 (TRIF), TICAM2 (TIR-containing adapter molecule) передается на соответствующие киназы (TAK, IKK, TBK, MAPK, JNKs, p38, ERK, Akt и др.), которые дифференциально активируют факторы транскрипции (NF-κB, AP-1 и IRF), ответственные за экспрессию различных провоспалительных и антимикробных факторов. При этом все TLR, кроме TLR3, передают сигнал на киназы, используя MyD88. TLR3 передает сигнал через TICAM1, а TLR4 и через MyD88, и через TICAM1 (рис. 2).

Активация того или иного фактора определяется типом TLR, от которого передается сигнал. Так, практически все TLR (TLR2 и его корецепторы – TLR1 и TLR6, а также TLR4–9, TLR11), связываясь с собственными лигандами, способны активировать NF-κB – один из основных факторов, регулирующих экспрессию таких провоспалительных цитокинов, как IL-1, -6, -8 и др. К активации другого семейства провоспалительных транскрипционных факторов – IRF приводит передача сигнала через TLR3, 4, 7–9. Сигналы, передаваемые через TLR3 или TLR4, ведут к активации IRF3, который регулирует экспрессию IFN-β и считается критическим компонентом противовирусных иммунных реакций. Передача сигналов посредством TLR7–9 ведет к активации IRF5 и IRF7 и экспрессии IFN-α, который также играет жизненно важную роль в противовирусной защите. Сигнализация через TLR2 или TLR5 не ведет к активации факторов семейства IRF [36].

Таким образом, взаимодействие TLR определенно-го типа с собственным лигандом инициирует запуск сигнального каскада, который приводит к активации

**Таблица 1.** Активация транскрипционных факторов NF-κB и IRF различными TLR

Тип TLR	Активация NF-κB	Активация IRF
TLR2/1/6	+	-
TLR3	+	+ (IRF3)
TLR4	+	+ (IRF3)
TLR5	+	-
TLR7	+	+ (IRF5, 7)
TLR8	+	+ (IRF5, 7)
TLR9	+	+ (IRF5, 7)

экспрессии специфического сочетания генов (цитокинов, антимикробных молекул и т.д.).

Однако в настоящее время многое в активации TLR-зависимых сигнальных путей и в развитии последующих эффектов остается непонятным. В доступной научной литературе отсутствуют данные, характеризующие полные транскриптомные и протеомные изменения, которые происходят в ответ на активацию определенных TLR.

**TLR И ОПУХОЛИ**

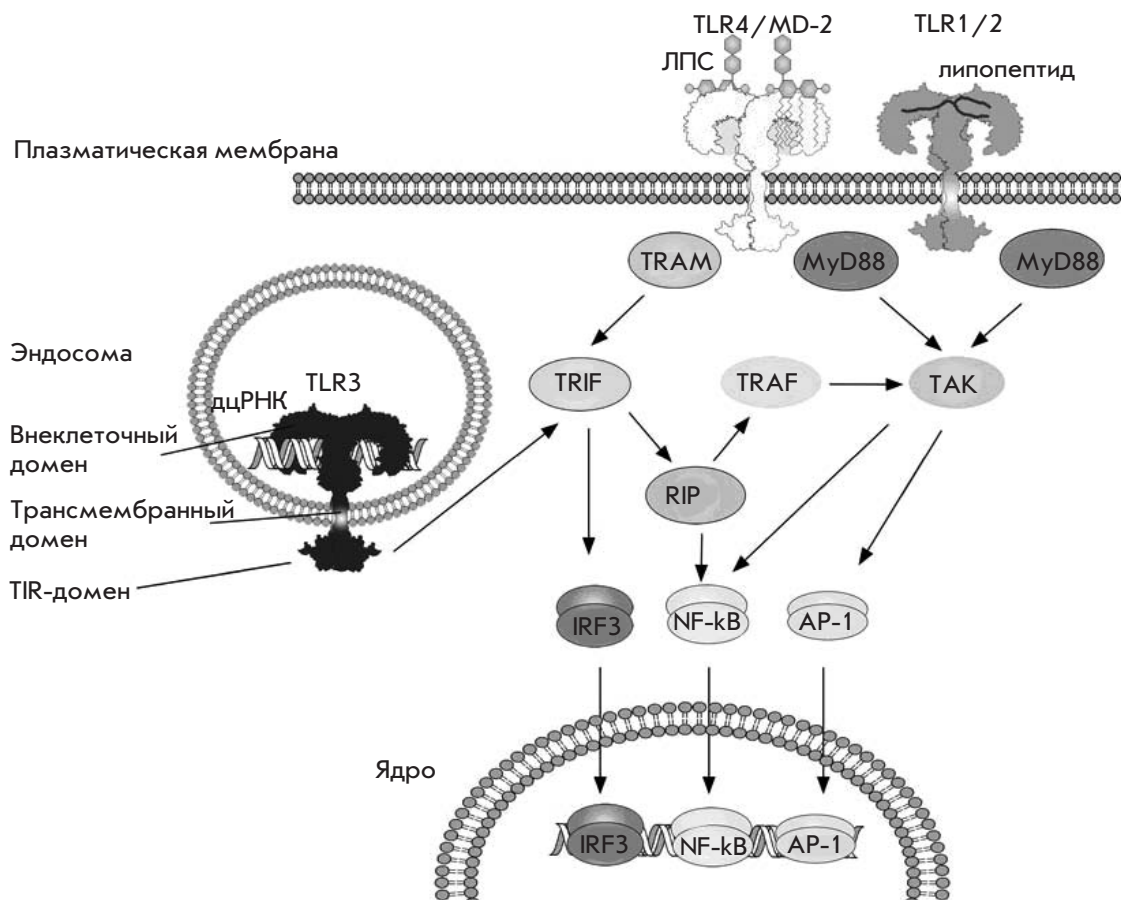
К настоящему моменту описаны принципиально различные эффекты TLR на опухоли. С одной стороны, показано, что TLR (и их лиганды) могут выступать в роли супрессоров опухолевого роста, с другой, известно, что TLR могут стимулировать опухолевую прогрессию и влиять на устойчивость опухолей к химиотерапии. Чтобы объяснить эти противоречия, рассмотрим детально каждый из случаев.

**ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ TLR**

Многие агонисты TLR в настоящее время проходят клинические испытания в качестве противоопухолевых средств (табл. 2). Так, природные (оцРНК) и синтетические (имиквимод) агонисты TLR7 и 8 показали высокую активность в отношении хронического лимфоцитарного лейкоза и опухолей кожи [37]. Лиганд TLR9 – CpG, способен подавлять рост лимфом, опухолей головного мозга, почек, кожи [28]. А лиганд TLR3 – poly(IC) обладает проапоптотическим действием не только в отношении опухолевых клеток, но и клеток окружения (например, эндотелия) [38].

Показано, что агонисты TLR4 – ЛПС грамотрицательных бактерий и ОК-432 (препарат из стрептококков группы А), обладают высокой противоопухолевой активностью при внутриопухолевом введении. Однако при системном введении оба препарата (ЛПС и ОК-432) не обладали способностью блокировать опухолевый рост [39]. В настоящее время препарат ОК-432 проходит вторую стадию клинических испытаний, в качестве средства против колоректальных опухолей

Рис. 2. Сигнальные пути, идущие от Толл-подобных рецепторов.



и рака легкого. Также показано, что ОМ-174, химический агонист TLR2/4, способен подавлять прогрессию меланомы и повышать выживаемость экспериментальных животных при совместном введении с циклофосфамидом [40]. В этих экспериментах обнаружено, что агонисты TLR2/4 индуцируют секрецию TNF- $\alpha$  и экспрессию индуцибельной NO-синтазы. Как известно, NO способен индуцировать апоптоз в опухолевых клетках, устойчивых к химиотерапии, и тем самым повышать продолжительность жизни мышей. Еще один известный противоопухолевый препарат микробного происхождения, активирующий TLR-зависимые реакции (TLR2, 4, 9), – БЦЖ. Этот препарат уже более 30 лет относительно успешно применяется в терапии опухолей мочевого пузыря [41].

В целом, необходимо отметить, что в настоящее время различные агонисты TLR проходят клинические испытания как средства против опухолей различного происхождения (табл. 2).

Один из основных механизмов противоопухолевой активности TLR состоит в их способности стимулировать развитие опухолеспецифического иммунного ответа. Так, активация TLR:

1) стимулирует (прямо или опосредованно) миграцию в опухоль NK-клеток, цитотоксических Т-клеток и Т-хелперов I-го типа, которые вызывают лизис опухолевых клеток при помощи различных эффекторных механизмов (секреция перфоринов, гранзимов, IFN- $\gamma$  и др.) [42];

2) приводит к секреции IFN I типа (IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ ) [43].

Таблица 2. TLR в клинических исследованиях

Злокачественное образование	TLR
Мелкоклеточный рак легкого поздней стадии	TLR9
Меланома IV стадии	TLR7
Меланома IIIb/c, или IV стадии	TLR9
Неполностью операбельный рак поджелудочной железы	TLR2/6
Рецидив неходжкинской лимфомы	TLR9
Рецидив глиобластомы	TLR9
Хронический лимфобластный лейкоз	TLR7

Таблица 3. Влияние TLR на развитие и рост опухоли

Опухолестимулирующая активность	TLR	Противоопухолевая активность	TLR
Стимуляция ангиогенеза	2, 9	Подавление ангиогенеза	7, 9
Стимуляция пролиферации	3, 4	Развитие апоптоза	3, 4, 7, 9
Химиорезистентность	4	Повышение химиочувствительности	2, 4, 7
Активация регуляторных Т-клеток (Treg)	4, 5	Ингибирование Treg, презентация антигена	4, 5, 7, 8, 9
		Цитотоксичность	9

Еще один вероятный механизм противоопухолевой активности TLR – возможность TLR-зависимого перехода опухолестимулирующего типа макрофагов (M2) в опухолесупрессирующий тип M1. Макрофаги типа M2 характеризуются экспрессией таких цитокинов, как TGF- $\beta$  и IL-10, компонентов, необходимых для репарации и ремоделирования тканей. TGF- $\beta$  стимулирует пролиферацию опухолевых клеток, IL-10 направляет развитие иммунного ответа в сторону Th2, блокируя тем самым развитие клеточного противоопухолевого иммунитета. Макрофаги типа M1, напротив, экспрессируют IL-1, -6, -12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  и стимулируют развитие противоопухолевого клеточного (Th1) иммунного ответа [44].

#### ОПУХОЛЕСТИМУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ TLR

Как известно, хронические инфекции и воспаление являются важнейшими факторами, стимулирующими развитие злокачественных новообразований. В частности, рак желудка может быть связан с хроническим воспалением, вызванным таким патогеном, как *Helicobacter pylori*, а хроническое воспаление пищеварительного тракта часто ассоциировано с развитием рака толстой кишки [45]. Более того, показано, что применение нестероидных противовоспалительных препаратов может снижать риск развития некоторых типов злокачественных новообразований [46].

TLR служат ключевым звеном системы врожденного иммунитета человека и животных, они участвуют в развитии воспалительных реакций при контакте клеток с различными патогенами. В настоящее время активно изучается роль TLR в развитии и прогрессии опухолей различного происхождения. TLR могут быть вовлечены в процесс развития и стимуляции опухолеобразования посредством нескольких механизмов (табл. 3).

Один из важнейших факторов, обуславливающих взаимосвязь хронического воспаления и опухолеобразования – NF- $\kappa$ B [47]. Этот фактор конститутивно активирован более чем в 90% опухолей человека, включая острый и хронический миелоидный лейкоз, рак предстательной железы, множественную миелому, злокачественную гепатому (рак печени) и т.д. [48,

49]. В связи с этим агенты, способные активировать NF- $\kappa$ B, могут непосредственно участвовать в процессе развития и прогрессии опухоли. Как известно, взаимодействие патогенов с TLR на поверхности клетки приводит к активации NF- $\kappa$ B и экспрессии NF- $\kappa$ B-зависимых генов, что и обуславливает участие TLR в стимуляции канцерогенеза. Активация NF- $\kappa$ B приводит к повышению продукции цитокинов IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ ; миграции клеток иммунной системы к месту воспаления в результате повышения продукции хемокинов; «поддержанию» хронического воспаления; повышению продукции антиапоптотических факторов и т.д. Указанные свойства могут обеспечивать выживаемость и прогрессию опухоли за счет подавления апоптоза и цитотоксичности, а также индукции ангиогенеза [50].

В настоящее время известно, что уровень TLR повышен в клетках различных опухолей, и у мышей с нокаутом генов TLR снижена частота образования индуцируемых опухолей [67]. Более того, повышение экспрессии TLR на поверхности клеток опухоли предстательной железы или опухоли головы и шеи может стимулировать их пролиферацию [51].

Huang и соавт. [31] показали, что *Listeria monocytogenes* обладает прямым опухолестимулирующим действием, связанным с ее способностью активировать TLR2-зависимые сигнальные пути в клетках рака яичника. Более того, TLR2-зависимая активация NF- $\kappa$ B, вызванная *L. monocytogenes*, приводила к повышению устойчивости опухолевых клеток к действию химиотерапевтических препаратов [31]. Взаимосвязь TLR2 с опухолевой прогрессией подтверждена в еще одном независимом исследовании, в котором Karin и соавт. [67] доказали ключевую роль этого рецептора в метастазировании рака легкого. Оказалось, что у мышей с нокаутом гена TLR2 метастазирование и прогрессия опухолей происходит значительно медленнее, чем у мышей дикого типа. Ключевую роль в прогрессии рака легкого играли миелоидные клетки, экспрессирующие TNF- $\alpha$  в ответ на их стимуляцию версиканом (протеогликаном внеклеточного матрикса, лиганда TLR2, уровень которого повышен в опухолевых клетках многих ти-

пов). В наших исследованиях также изучали роль TLR2 в опухолевой прогрессии. В частности, оказалось, что микоплазменная инфекция (*Mycoplasma arginini*) или добавление структурных компонентов (ЛАМБ) этого возбудителя к клеткам, экспрессирующим TLR2, приводит к подавлению в них апоптоза, а также к усилению опухолевого роста в условиях *in vivo* [52, 53]. Таким образом показано, что TLR могут оказывать опосредованный опухолестимулирующий эффект через клетки миелоидного ряда [54].

Сходные данные получены и для другого представителя семейства TLR – TLR4. Системное (внутривенное) введение лиганда этого рецептора – ЛПС, стимулировало миграцию опухолевых клеток (аденокарцинома молочной железы) и повышало их инвазивность, а также стимулировало ангиогенез в опухолях [30]. Аналогичные результаты получены на другой модели – аденокарциноме кишечника: ЛПС увеличивал выживаемость клеток опухоли, стимулировал их пролиферацию, а при интраперитонеальном введении усиливал метастазирование [55]. Более того, Huang и соавт. показали, что опухолевые клетки, экспрессирующие TLR4, вызывают значительно более агрессивное течение заболевания (сокращение времени жизни животных) по сравнению с мышами изогенной линии, у которых TLR4 инактивирован специфической мiРНК. Полученные данные позволили предположить, что на прогрессию TLR4-позитивных опухолей могут влиять эндогенные лиганды (белки теплового шока;  $\beta$ -дефензины; эндогенный ЛПС, забрасываемый из кишечника), что отчасти напоминает ситуацию с опухолестимулирующим действием TLR2 и его лигандом эндогенного происхождения – версиканом [56].

Однако данные, иллюстрирующие опухолестимулирующее действие TLR, получены не только для TLR2 и 4. Известно, что повышенная экспрессия TLR5 и TLR9 на клетках эпителия шейки матки может быть ассоциирована с прогрессией рака шейки матки [57]. Высокий уровень экспрессии TLR9 обнаружен в клинических образцах рака легкого и в линиях опухолевых клеток. В этих клетках стимуляция TLR9 специфическими агонистами приводила к повышению продукции опухоль-ассоциированных цитокинов [58]. На поверхности клеток опухоли предстательной железы человека также повышен уровень TLR9 [59]. Обработка таких клеток CpG-олигодезоксинуклеотидами (ODN-CpG) или бактериальной ДНК, служащих лигандами для TLR9, способствовала повышению инвазии опухолевых клеток. Повышение инвазии опухолевых клеток в результате активации TLR9 можно рассматривать как новый механизм, посредством которого хронические инфекции могут стимулировать рост клеток опухоли предстательной железы.

Однако способностью стимулировать канцерогенез через взаимодействие с TLR обладают не только различные инфекционные агенты и их структурные компоненты. Как известно, лигандами для TLR служат также DAMP – ядерные и цитоплазматические белки клеток, подвергшихся некрозу. Высвобождаемые из поврежденных клеток DAMP могут распознаваться различными TLR на поверхности иммунных клеток, а последующая активация TLR-зависимых сигналов способна приводить к подавлению противоопухолевого иммунного ответа и, как следствие, к стимуляции прогрессии опухоли [60].

К таким молекулам, обладающим потенциальным опухолестимулирующим действием, относятся: белки теплового шока (HSP60, 70), АТФ и мочевиная кислота, семейство  $Ca^{2+}$ -модулирующих белков (S100), белок HMGB1 и нуклеиновые кислоты, из которых наиболее хорошо изучен ДНК-связывающий белок HMGB1. Высвобождаемый в результате повреждения клеток белок HMGB1 активирует иммунную систему через взаимодействие с TLR. На культурах клеток показано, что белок HMGB1 стимулирует рост клеток меланомы, рака молочной железы, толстой кишки, поджелудочной и предстательной железы. HMGB1 способен активировать TLR2 и TLR4 на опухолевых клетках и клетках иммунной системы и, как следствие, индуцировать опухолевую прогрессию и метастазирование [61].

Показано, что в клетках меланомы повышена экспрессия таких DAMP, как белки семейства S100, способные стимулировать рост и самих клеток меланомы, и лимфоцитов периферической крови, действуя как аутокринный фактор роста опухоли. Белок S100A4, служащий лигандом для TLR, стимулирует метастазирование клеток рака молочной железы, а его повышенная экспрессия является показателем плохого прогноза. Несмотря на взаимосвязь S100A4 с метастазированием, этот белок может экспрессироваться макрофагами, лимфоцитами и фибробластами. Недавние исследования показали, что белки S100A8 и S100A9, продуцируемые первичной опухолью, способны активировать сывороточный амилоид А (SAA) 3 в легочных тканях и создавать тем самым условия для образования метастатической ниши. SAA3 служит лигандом для TLR4 на эндотелиальных клетках легкого и макрофагах. Активация TLR4 облегчает миграцию опухолевых клеток из первичного очага в ткань легкого за счет формирования микроокружения, способствующего росту опухоли. Таким образом, подавление сигнального пути S100–TLR4 может эффективно противодействовать образованию метастазов в легком [62].

Суммируя описанные эффекты, можно сделать вывод о способности TLR, с одной стороны, прямо или опосредованно участвовать в опухолевой про-

грессии, а с другой – повышать устойчивость опухолевых клеток к проапоптотическим воздействиям.

Представленные данные показывают, что опухолестимулирующие эффекты TLR и их лигандов имеют сложный механизм, который необходимо изучать более детально. Однако, несмотря на сложность данного вопроса, можно выделить несколько ключевых моментов, определяющих опухолестимулирующее действие TLR:

1) взаимодействие TLR с собственными лигандами индуцирует активацию транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B и, как следствие, повышение продукции различных провоспалительных цитокинов (IL-6, MCP-1, MIF, GRO $\alpha$  и др.), а также ряда антиапоптотических белков, тем самым способствуя прямому или опосредованному опухолестимулирующему действию;

2) TLR-зависимая активация миелоидных клеток и их предшественников, по-видимому, является определяющим фактором в формировании метастазов. В серии независимых работ показано, что миелоидные клетки, мигрирующие из костного мозга (в ответ на эндогенную стимуляцию) в ткани, играют ключевую роль в формировании метастатических ниш [30, 54]. Поскольку известно, что эндогенные (версикан, фибронектин и др.) и экзогенные (микробного происхождения) лиганды TLR способны, с одной стороны, стимулировать миелоидные клетки и их предшественники, а с другой – увеличивать метастатический потенциал опухоли, то можно с высокой вероятностью предположить существование взаимосвязи между TLR-зависимой активацией миелоидных клеток и их последующим участием в метастазировании;

3) активация TLR может стимулировать ангиогенез через такие ангиогенные факторы, как IL-8, фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF) и матриксные металлопротеиназы (ММР), а также усиливать адгезивные и инвазивные свойства опухолевых клеток наряду с увеличением проницаемости сосудов.

### **ТОЛЛ-ПОДОБНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ В ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ**

Благодаря способности агонистов TLR индуцировать противоопухолевый иммунный ответ путем регуляции функции клеток иммунной системы, находящихся в микроокружении опухоли, перспективной представляется противоопухолевая терапия, основанная на доставке лигандов TLR в очаги роста опухоли. Примером такой терапии может стать препарат имиквимод, содержащий агонист TLR7. Этот препарат используется при актиническом кератозе и базальноклеточной карциноме. Изучается также возможность использования этого препарата в качестве адъюванта в терапии мелано-

мы [63, 64]. Еще один агонист TLR7, используемый в терапии опухолей, – препарат 852A. В настоящее время рассматривается возможность использования препарата 852A в терапии хронического лимфоидного лейкоза и других солидных опухолей [65]. Агонист TLR9 – ODN-CpG, индуцирует активацию и созревание дендритных клеток, стимулирует развитие Т-клеточного противоопухолевого ответа. В настоящее время проводятся клинические испытания безопасности и эффективности агонистов TLR9 в терапии рака молочной железы, толстой кишки, легкого, меланомы, глиобластомы и др. [28]. Макрофаг-активирующий липопептид-2 (MALP-2), агонист TLR2/6, показал обнадеживающие результаты в терапии рака поджелудочной железы: внутриопухолевое введение MALP-2 совместно с гемцитабином во время лапоротомии значительно повышало продолжительность жизни больных с неполовностью операбельным раком (от 9 до 17 месяцев) [66]. Описанные примеры эффективного использования агонистов TLR в терапии опухолей показывают перспективность использования этих препаратов, а также целесообразность дальнейших исследований, направленных на создание противоопухолевых препаратов с аналогичным механизмом действия.

Однако, как сказано ранее в этом обзоре, большое количество опухолевых клеток могут экспрессировать TLR на своей поверхности, и прямое взаимодействие таких клеток с лигандами к TLR может усиливать прогрессию опухоли, а также делать ее менее чувствительной к химиотерапевтическим препаратам. Таким образом, существует вероятность того, что постоянно циркулирующие в организме агонисты TLR (патогенные микроорганизмы, способные преодолеть иммунный барьер; ЛПС бактерий, входящих в состав нормальной микрофлоры кишечника, который может забрасываться в кровоток; собственные эндогенные лиганды) могут прямо или опосредованно способствовать усилению опухолевой прогрессии.

В связи с этим перспективное направление в терапии злокачественных новообразований состоит в использовании подходов, ориентированных на подавление TLR-зависимых сигнальных путей. В качестве уже известных подходов, применяемых в терапии злокачественных новообразований, можно выделить использование ингибиторов NF- $\kappa$ B.

Как известно, конститутивная активация этого фактора наблюдается в таких типах опухолей, как: болезнь Ходжкина, острый лимфобластный лейкоз, множественная миелома, рак молочной железы, толстой кишки, легкого, яичников, предстательной железы, различные виды лимфом, рак печени, меланомы и др. [48, 49].



Для подавления активности NF- $\kappa$ B используются несколько групп лекарственных средств: нестероидные противовоспалительные средства, ингибирующие активность ИКК и СОХ-2; природные и биодоступные ингибиторы ИКК $\beta$  – флавоноиды, простагландины, BMS-345541, PS1145, SC-514 и SPC839; а также ингибиторы протеасом, подавляющие активность NF- $\kappa$ B за счет предотвращения деградации I $\kappa$ B – бортезомиб (PS-341), иринотекан, гемцитабин и др. препараты, широко используемые в терапии опухолей толстого и тонкого кишечника, желудка, поджелудочной железы и др. [67]

Поскольку фактор NF- $\kappa$ B является ключевым звеном TLR-зависимого сигнального пути, то использование его ингибиторов представляется перспективным для подавления TLR-зависимой стимуляции опухолевого роста.

Другой перспективной мишенью, по нашему мнению, могут быть сами TLR. Поскольку TLR2 и TLR4 (рецепторы, участвующие в стимуляции опухолевого роста) экспрессируются на поверхности клетки, представляется возможным использовать специфические молекулы (антитела, химические ингибиторы), подавляющие их функциональную активность. К настоящему моменту получены антитела, блокирующие активность TLR, однако данные по их клиническому использованию в доступной научной литературе отсутствуют.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

TLR входят в состав семейства PRR. Эффекты, связанные с их активацией, выходят за рамки реакций врожденного иммунного ответа. Участие в активации дендритных клеток, регуляции специфических иммунных реакций на уровне Т- и В-клеток, повышение экспрессии IFN и др. обуславливают вовлечение TLR в формирование эффективного ответа врожденной и адаптивной иммунной системы при попадании в организм различных патогенов или при поддержании тканевого гомеостаза. Опубликованы результаты многочисленных исследований, согласно которым лиганды к TLR могут использоваться в качестве адъювантов для иммунотерапии злокачественных новообразований. Однако известно, что активация TLR на поверхности опухолевых клеток может приводить к усилению прогрессии опухолей различного происхождения.

Такое различие в эффектах зависит, в первую очередь, от типа используемого лиганда. Как показано в *табл. 1*, TLR можно разделить на две группы: индуцирующие и неиндуцирующие выработку IFN. Как правило, при введении агонистов TLR3, 4, 7, 8, 9, активирующих IRF, наблюдается подавление роста опухоли. В то же время данные о противоопу-

холевом действии агонистов TLR2, который в отличие от перечисленных рецепторов (TLR3, 4, 7, 8, 9) не способен активировать выработку IFN I типа, в настоящее время отсутствуют. Еще одна характерная особенность, обуславливающая различия в действии агонистов TLR на опухоль, – это способ их введения. Внутритропуховое введение лигандов TLR3, 4, 7, 8, 9 в подавляющем большинстве случаев вызывает гибель клеток опухоли и уменьшение ее размеров. Наиболее вероятное объяснение противоопухолевой активности этих TLR заключается в их способности в ответ на взаимодействие с лигандом: а) индуцировать локальную экспрессию IFN типа I и II, которые, как известно, способны вызывать гибель опухолевых клеток; б) активировать клеточный иммунитет. При этом гибель опухолевых клеток, их фагоцитоз и последующая презентация опухолеспецифических антигенов обуславливают дополнительную стимуляцию специфического противоопухолевого иммунитета. Однако в ряде работ [30, 55, 56] показано, что системное введение лигандов к TLR4 наоборот часто ассоциировано со стимуляцией роста опухоли. По нашему мнению, такое различие связано с тем, что внутритропуховые инъекции лиганда TLR4 (ЛПС) вызывают существенно большее накопление IFN непосредственно в опухолях, чем при системном введении лиганда. Поскольку IFN это короткодистантные эффекторные белки, действующие при достаточно высоких концентрациях, то их выработка вне опухоли (при системном введении) не приводит к гибели опухолевых клеток, а следовательно, и к развитию противоопухолевого иммунитета. При этом индуцируемые после локального или системного введения ЛПС провоспалительные цитокины и хемокины могут играть двойную роль: при внутритропуховом введении ЛПС способствовать развитию противоопухолевого иммунитета, а при системном – в отсутствие мишеней для иммунной системы – положительно влиять на рост опухоли, устойчивость ее клеток и их метастатический потенциал.

Таким образом, имеющиеся данные указывают на двойственный эффект агонистов TLR на рост опухоли. Такое двойное влияние TLR говорит о более сложной функциональной роли TLR в биологии опухоли. Понятно, что подобная роль TLR выходит за рамки простой активации фактора NF- $\kappa$ B. Изучать влияние различных лигандов TLR на опухоль необходимо с учетом многих факторов, включая уровень экспрессии TLR; тип ткани, из которой происходит опухоль; микроокружение опухоли и многие другие. Системное исследование функций и роли TLR на клетках опухоли может внести существенный вклад в разработку новых противоопухолевых средств с TLR-зависимым механизмом действия. ●

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Coussens L.M., Werb Z. // *Nature*. 2002. V. 420(6917). P. 860–867.
2. Mantovani A., Allavena P., Sica A., Balkwill F. // *Nature*. 2008. V. 454(7203). P. 436–444.
3. Okamoto T. // *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug. Targets*. 2006. V. 6(4). P. 359–372.
4. Thomas H.G., Han J.H., Balentien E., et al. // *Methods Enzymol*. 1991. V. 198. P. 373–383.
5. Kleeff J., Kusama T., Rossi D.L. // *Int. J. Cancer*. 1999. V. 81. P. 650–657.
6. Deveraux Q.L., Schendel S.L., Reed J.C. // *Cardiol. Clin*. 2001. V. 19(1). P. 57–74.
7. Dong Z., Wang J.Z., Yu F., Venkatachalam M.A. // *Am. J. Pathol*. 2003. V. 163(2). P. 663–671.
8. Bartsch H., Nair J. // *Langenbecks Arch. Surg*. 2006. V. 391(5). P. 499–510.
9. Moser B., Willmann K. // *Ann. Rheum. Dis*. 2004. V. 63 Suppl 2. P. 84–89.
10. Rasmussen S.B., Reinert L.S., Paludan S.R. // *APMIS*. 2009. V. 117(5–6). P. 323–337.
11. Palm N.W., Medzhitov R. // *Immunol. Rev*. 2009. V. 227(1). P. 221–233.
12. Zeromski J., Mozer-Lisewska I., Kaczmarek M. // *Cancer Microenviron*. 2008. V. 1(1). P. 37–42.
13. Jego G., Bataille R., Geffroy-Luseau A., et al. // *Leukemia*. 2006. V. 20(6). P. 1130–1137.
14. Seya T., Akazawa T., Uehori J., et al. // *Anticancer Res*. 2003. V. 23(6a). P. 4369–4376.
15. Grauer O.M., Molling J.W., Bennink E., et al. // *J. Immunol*. 2008. V. 15. P. 6720–6729.
16. Medzhitov R. // *Nat. Rev. Immunol*. 2001. V. 1(2). P. 135–145.
17. Pasare C., Medzhitov R. // *Nature*. 2005. V. 438(7066). P. 364–368.
18. Zaslloff M. // *Nature*. 2002. V. 415(6870). P. 389–395.
19. Doyle S.E., O'Connell R.M., Miranda G.A., et al. // *J. Exp. Med*. 2004. V. 5. P. 81–90.
20. Werling D., Hope J.C., Howard C.J., Jungi T.W. // *Immunology*. 2004. V. 111(1). P. 41–52.
21. Nijhuis M.M., Pasterkamp G., Sluis N.I., et al. // *J. Vasc. Res*. 2007. V. 44(3). P. 214–222.
22. Kaisho T., Akira S. // *J. Allergy Clin. Immunol*. 2006. V. 117(5). P. 979–988.
23. Salaun B., Romero P., Lebecque S. // *Eur. J. Immunol*. 2007. V. 37(12). P. 3311–3318.
24. Iwasaki A., Medzhitov R. // *Nat. Immunol*. 2004. V. 5(10). P. 987–995.
25. Pasare C., Medzhitov R. // *Adv. Exp. Med. Biol*. 2005. V. 560. P. 11–18.
26. Li M., Zhou Y., Feng G., Su S.B. // *Curr. Mol. Med*. 2009. V. 9(3). P. 365–374.
27. Curtiss L.K., Tobias P.S. // *J. Lipid. Res*. 2009. V. 50 Suppl. P. 340–345.
28. Krieg A.M. // *J. Clin. Invest*. 2007. V. 117. P. 1184–1194.
29. Chicoine M.R., Zahner M., Won E.K. // *Neurosurgery*. 2007. V. 60. P. 372–381.
30. Harmey J.H., Bucana C.D., Lu W. // *Int. J. Cancer*. 2002. V. 101. P. 415–422.
31. Huang B., Zhao J., Shen S. // *Cancer. Res*. 2007. V. 67. P. 4346–4352.
32. Means T.K., Golenbock D.T., Fenton M.J. // *Life Sci*. 2000. V. 8. P. 241–258.
33. Diebold S.S. // *Handb. Exp. Pharmacol*. 2009. V. 188. P. 3–30.
34. West A.P., Koblansky A.A., Ghosh S. // *Annu Rev. Cell. Dev. Biol*. 2006. V. 22. P. 409–437.
35. Zhang Z., Schluesener H.J. // *Cell Mol. Life Sci*. 2006. V. 63(24). P. 2901–2907.
36. O'Neill L.A., Bowie A.G. // *Nat. Rev. Immunol*. 2007. V. 7(5). P. 353–364.
37. Stockfleth E., Trefzer U., Garcia-Bartels C. // *Br. J. Dermatol*. 2003. V. 149 (Suppl. 66). P. 53–56.
38. Noguerras S., Merino A., Ojeda R. // *Heart. Circ. Physiol*. 2008. V. 294. P. 708–713.
39. Okamoto M., Oshikawa T., Tano T., et al. // *J. Immunother*. 2006. V. 29. P. 78–86.
40. D'Agostini C., Pica F., Febbraro G., et al. // *Int. Immunopharmacol*. 2005. V. 5(7–8). P. 1205–1212.
41. Morales A., Eiding D., Bruce A.W. // *J. Urol*. 1976. V. 116. P. 180–183.
42. Street S.E., Cretney E., Smyth M.J. // *Blood*. 2001. V. 1; 97(1). P. 192–197.
43. Swann J.B., Hayakawa Y., Zerafa N., et al. // *J. Immunol*. 2007. V. 15;178(12). P. 7540–7549.
44. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., et al. // *Front. Biosci*. 2008. V. 13. P. 453–461.
45. Balkwill F., Coussens L.M. // *Nature*. 2004. V. 431. P. 405–406.
46. Robak P., Smolewski P., Robak T. // *Leuk. Lymphoma*. 2008. V. 49. P. 1452–1462.
47. Pikarsky E., Porat R.M., Stein I., et al. // *Nature*. 2004. V. 431. P. 461–466.
48. Palayoor S.T., Youmell M.Y., Calderwood S.K., et al. // *Oncogene*. 1999. V. 18. P. 7389–7394.
49. Griffin J.D. // *Blood*. 2001. V. 98. P. 2291.
50. Philip M., Rowley D.A., Schreiber H. // *Semin. Cancer Biol*. 2004. V. 14. P. 433–439.
51. Swann J.B., Vesely M.D., Silva A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 652–656.
52. Щебляков Д.В., Логунов Д.Ю., Зубкова О.В. и др. // *Мол. генетика, микробиол. и вирусол*. 2008. № 4. С. 6–9.
53. Logunov D., Scheblyakov D., Zubkova O., et al. // *Oncogene*. 2008. V. 27. P. 4521–4531.
54. Kim S., Takahashi H., Lin W.W., et al. // *Nature*. 2009. V. 457. P. 102–106.
55. Luo J.L., Maeda S., Hsu L.C., et al. // *Cancer Cell*. 2004. V. 6. P. 297–305.
56. Huang B., Zhao J., Li H. // *Cancer Res*. 2005. V. 65. P. 5009–5014.
57. Kim W.Y., Lee J.W., Choi J.J., et al. // *Int. J. Gynecol. Cancer*. 2008. V. 18. P. 300–305.
58. Droemann D., Albrecht D., Gerdes J., et al. // *Respir. Res*. 2005. V. 6. P. 1–6.
59. Iivesaro J.M., Merrell M.A., Swain T.M., et al. // *Prostate*. 2007. V. 67. P. 774–781.
60. Lotze M.T., Zeh H.J., Rubartelli A., et al. // *Immunol. Rev*. 2007. V. 220. P. 60–81.
61. Ellerman J.E., Brown C.K., Vera M., et al. // *Clin. Cancer Res*. 2008. V. 13. P. 2836–2848.
62. Cabezón T., Celis J.E., Skibshøj I., et al. // *Int. J. Cancer*. 2007. V. 121. P. 1433–1444.
63. Adams S., O'Neill D.W., Nonaka D., et al. // *J. Immunol*. 2008. V. 181. P. 776–784.
64. Spaner D.E., Miller R.L., Mena J., et al. // *Leuk. Lymphoma*. 2005. V. 46. P. 935–939.
65. Dudek A.Z., Yunis C., Harrison L.I., et al. // *Clin. Cancer Res*. 2007. V. 13. P. 7119–7125.
66. Schmidt J., Welsch T., Jäger D., et al. // *Br. J. Cancer*. 2007. V. 97. P. 598–604.
67. Karin M., Yamamoto Y., Wang Q.M. // *Nat. Rev. Drug*. 2004. V. 3. P. 17–26.