

С.А. Лялькін, Л.А. Сивак, Н.М. Храновська, Н.О. Верьовкіна

# Особливості поліморфізму генів *TLR-2*, *TLR-4*, *TLR-9* та їхня роль у перебігу та прогнозі тричі негативного раку грудної залози

Національний інститут раку, Київ

Одержано 24.05.2019

Прийнято до друку 26.06.2019

DOI: 10.32471/clinicaloncology.2663-466X.39.22677

Терапія метастатичного тричі негативного раку грудної залози (ТНРГЗ) на сьогодні залишається однією з найбільш актуальних проблем сучасної онкології. Незважаючи на негативний прогноз в цілому для пацієнток з ТНРГЗ, існує підгрупа хворих з кращою відповіддю на системну поліхіміотерапію та кращим прогнозом, що доводить гетерогенність ТНРГЗ. Метою дослідження є визначення прогностичної ролі поліморфізму генів *TLR-2*, *TLR-4* та *TLR-9* у пацієнток із метастатичним ТНРГЗ. **Об'єкт та методи.** Проведено аналіз результатів лікування 101 пацієнтки з метастатичним ТНРГЗ. Визначення поліморфізму генів *TLR-2* (G753A), *TLR-4* (C399T) та *TLR-9* (G2848A) виконували за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції з аналізом поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів. **Результати.** Доведено асоціацію поліморфізму гена *TLR-4* (C399T) та рівня проліферативної активності пухлини Ki-67 у післяопераційному матеріалі хворих на ТНРГЗ ( $p=0,02$ ). Виявлено асоціацію поліморфізму гена *TLR-2* (G753A) з рівнем пухлина-інфільтруючих лімфоцитів у пацієнток із метастатичним ТНРГЗ ( $p=0,02$ ). **Висновки.** Встановлено, що ризик розвитку рецидиву у пацієнток з ТНРГЗ був найвищим у носіїв генотипу TT за геном *TLR-4* (C399T) порівняно з носіями генотипу CC (відношення ризиків 0,28; 95% довірчий інтервал 0,10–0,80) та носіями генотипу СТ (відношення ризиків 0,24; 95% довірчий інтервал 0,08–0,74) відповідно ( $p=0,01$ ).

**Ключові слова:** тричі негативний рак грудної залози; поліморфізм генів *TLR-2*, *TLR-4* та *TLR-9*; клінічний прогноз; безрецидивна виживаність; загальна виживаність.

## ВСТУП

Тричі негативний рак грудної залози (ТНРГЗ) — це група гетерогенних пухлин, яка не має рецепторів до естрогенів, прогестерону та гіперекспресії HER2/neu. Вживаність у цій групі найнижча порівняно з будь-яким іншим молекулярним підтипом раку грудної залози (РГЗ), лікування якого залишається однією з найбільших проблем сучасної онкології [1, 4, 5]. Єдиним затвердженням на сьогодні методом лікування при ТНРГЗ залишається поліхіміотерапія [1, 4, 5]. Незважаючи на негативний прогноз в цілому для пацієнток з ТНРГЗ, існує підгрупа хворих з кращою відповіддю на системну поліхіміотерапію та кращим прогнозом, що доводить гетерогенність ТНРГЗ.

Тол-подібні рецептори (toll like receptors — TLR) — це сімейство трансмембранних рецепторів вродженого імунітету, які розпізнають ліганди бактеріального, грибкового, паразитарного та вірусного походження і переважно розташовані на різних клітинах імунної системи, дендритних клітинах, макрофагах та NK-клітинах [6]. Вони відіграють ключову роль у реалізації механізмів вродженої та набутої імунної відповіді, беручи участь в регуляції запалення та активації адаптивних імунних шляхів у відповідь на інфекційні патогени або антигени злоскісних клітин [6, 9].

У людини вивчено 10 типів тол-подібних рецепторів (TLR-1–10), які розподілені на дві групи відповідно до їх локалізації [9].

Кожен підтип тол-подібних рецепторів розпізнає специфічний ліганд: TLR-2 — бактеріальні ліпопротеїди, TLR-3 — двохниткові вірусні РНК, TLR-7 — однониткові вірусні РНК, а TLR-9 — CpG ділянки ДНК. TLR-4 ефективно розпізнає ліпополісахариди або ендотоксин, який експресують грамнегативні бактерії, а TLR-5 — бактеріальний флагелін. Експресія TLR-10, для якого не виявлено специфічного ліганду, значно виражена в селезінці та В-лімфоцитах. Згідно з багатьма даними літератури, очевидною постає роль тол-подібних рецепторів у процесі розвитку РГЗ та еволюції його мікрооточення. Дані щодо високої експресії TLR не тільки на імунокомпетентних

клітинах пухлинного мікрооточення, але й на самих клітинах РГЗ отримано багатьма дослідниками [6–8].

TLR-4 відіграє важливу роль у процесах міграції клітин, в тому числі стимулює інвазивність клітин РГЗ. Результати клінічних досліджень свідчать про значний взаємозв'язок між гіперекспресією TLR-4, розмірами первинної пухлини, ураженням лімфовузлів при РГЗ [2, 3]. TLR-9 також експресується клітинами РГЗ, а його вплив на інвазивний потенціал злоскісних клітин регулюється стероїдними статевими гормонами та залежить від експресії рецепторів цих гормонів на клітинах РГЗ [7]. Результати значної кількості наукових робіт вказують на зв'язок різних варіантів генетичних поліморфізмів тол-подібних рецепторів з ризиком розвитку РГЗ, його розповсюдженістю, а також відповіддю пухлини на хіміотерапію [8–11].

Враховуючи поширеність та соціальну значущість РГЗ у всьому світі, вивчення прогностичної та предиктивної ролі тол-подібних рецепторів та їх поліморфізмів є актуальним питанням сучасної онкології. Не менш важливим є глибоке розуміння ролі тол-подібних рецепторів у процесах пухлинної прогресії, ухилення від контролю з боку імунної системи, а також у виникненні резистентності до різних видів протипухлинного лікування.

Метою дослідження є визначення прогностичної ролі поліморфізму генів *TLR-2*, *TLR-4* та *TLR-9* у пацієнток із метастатичним ТНРГЗ.

## ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проведено аналіз результатів лікування 101 пацієнтки з метастатичним ТНРГЗ. Визначення поліморфізму генів *TLR-2* (G753A), *TLR-4* (C399T) та *TLR-9* (G2848A) виконували за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції з аналізом поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПЛР — ПДРФ). Геномну ДНК виділяли з периферичної крові за допомогою комерційної тест-системи NucleoSpin® BloodQuickPure (Macherey-Nagel, Німеччина) відповідно до інструкції виробника. Необхідні фрагменти генів *TLR-2* (rs5743708), *TLR-4* (rs4986791) та *TLR-9* (rs352140) ампліфікували за допомогою комерційного набору TaqMan Universal PCR MasterMix

(ThermoScientific, США) з використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів. Відповідно до ПДРФ-аналізу зони розміром 228, 75 і 40 п.о. відповідали гомозиготному генотипу *TLR-2* G/G; 268, 228, 75, 40 п.о. діапазони були позначені як гетерозиготні особи G/A; смуги 268, 75 п.о. відповідали поліморфному варіанту гена A/A. Зони 406 п.о. відповідали *TLR-4* C/C; 406, 377, 29 п.о. зони були позначені як гетерозиготні особи C/T; зони 377, 29 п.о. відповідали гомозиготному генотипу T/T. Смуги 135, 42 п.о. відповідали *TLR-9* G/G; 177, 135, 42 п.о. зони були позначені як гетерозиготні особи G/A; смуга 177 п.о. відповідала гомозиготному генотипу A/A.

Математичну обробку отриманих даних проводили з використанням пакета програм MedCalc. У рамках дослідження використовували методи описової статистики. Проведено аналіз асоціацій для 4 генів (для оцінки ступеня зв'язку розраховувався коефіцієнт V Крамера). Відмінності між вибірками, що розподілені за нормальним законом, оцінювалися за параметричним критерієм Стюдента (t), для порівняння рангових ознак використано критерій W-Вілкоксона; для порівняння якісних ознак — точний критерій Фішера та критерій  $\chi^2$ . Також застосовувався однофакторний дисперсійний аналіз (у випадку нормального закону розподілу) або критерій Крускала — Уолліса (у випадку закону розподілу, відмінного від нормального). При проведенні апостеріорних попарних порівнянь використано методи множинних порівнянь.

## РЕЗУЛЬТАТИ

Нами вивчено поліморфізм генів *TLR-2* (G753A), *TLR-4* (C399T), *TLR-9* (G2848A) у 101 хворой на метастатичний ТНРГЗ (табл. 1). При встановленні розповсюдженості мутацій генів тол-подібних рецепторів 2-го, 4-го та 9-го типів виявлено, що генотип GC за геном *TLR-2* (G753A) був у 33 (33%), генотип GG — у 7 (7%), а генотип GG — у 60 (60%) пацієнток; генотип CC за геном *TLR-4* (C399T) — у 71 (70,3%) пацієнтки, генотип CT — у 25 (24,8%), а генотип TT за геном *TLR-4* (C399T) — у 5 (5%) пацієнток. Вивчення поліморфізму гена *TLR-9* (G2848A) виявило генотип GA у 50 (49,5%) пацієнток; генотип AA — у 37 (36,6%), а генотип GG — у 14 (13,9%) хворих на метастатичний ТНРГЗ.

Також ми дослідили асоціацію поліморфізму генів тол-подібних рецепторів 2-го, 4-го та 9-го типів з особливостями перебігу ТНРГЗ. Як видно з табл. 2, у нашому дослідженні не виявлено асоціації мутацій гена *TLR-2* (G753A) з розміром первинної пухлини (категорія pT згідно з класифікацією TNM), статусом аксілярних лімфатичних вузлів (категорія pN за класифікацією TNM), стадією захворювання та станом менструальної функції у пацієнток із метастатичним ТНРГЗ. Натомість, при дослідженні рівня проліферативної активності пухлини за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу встановлено статистично достовірний взаємозв'язок між поліморфізмом гена *TLR-2* (G753A) та індексом проліферативної активності Ki-67 у післяопераційному матеріалі (табл. 3).

Дослідження асоціації поліморфізму гена *TLR-2* (G753A) та рівня проліферативної активності пухлини Ki-67 у після-

**Таблиця 1.** Розповсюдженість мутацій генів *TLR-2* (G753A), *TLR-4* (C399T), *TLR-9* (G2848A) у хворих на ТНРГЗ

| Гени, генотипи                   | Кількість пацієнток (n) | %     |
|----------------------------------|-------------------------|-------|
| <b>Ген <i>TLR-4</i> (C399T)</b>  |                         |       |
| CC                               | 71                      | 70,3  |
| CT                               | 25                      | 24,8  |
| TT                               | 5                       | 5,0   |
| Усього                           | 101                     | 100,0 |
| <b>Ген <i>TLR-2</i> (G753A)</b>  |                         |       |
| GC                               | 33                      | 33,0  |
| GG                               | 60                      | 60,0  |
| CC                               | 7                       | 7,0   |
| Усього                           | 100                     | 100,0 |
| <b>Ген <i>TLR-9</i> (G2848A)</b> |                         |       |
| GA                               | 50                      | 49,5  |
| AA                               | 37                      | 36,6  |
| GG                               | 14                      | 13,9  |
| Усього                           | 101                     | 100,0 |

операційному матеріалі хворих на ТНРГЗ за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу виявило статистично достовірний взаємозв'язок ( $p=0,03$ ). Так, у хворих на ТНРГЗ — носіїв генотипу GC за геном *TLR-2* (G753A) середні значення індексу Ki-67 у післяопераційному матеріалі були нижчими порівняно з хворими — носіями генотипів GG та CC за цим геном і становили  $35,8 \pm 17,3\%$ ;  $46,3 \pm 24,1\%$  та  $59,3 \pm 31,2\%$  відповідно.

Також було вивчено взаємозв'язок молекулярно-генетичних особливостей за геном *TLR-4* (C399T) з перебігом захворювання у пацієнток із ТНРГЗ. Проведений аналіз не виявив асоціації мутацій гена *TLR-4* (C399T) з розміром первинної пухлини (категорія pT за класифікацією TNM), статусом аксілярних лімфатичних вузлів (категорія pN за класифікацією TNM), стадією захворювання та станом менструальної функції у пацієнток із метастатичним ТНРГЗ. Також не відмічено відмінностей за розподілом мутантних алелей (табл. 4).

Як видно з табл. 5, дослідження асоціації поліморфізму гена *TLR-4* (C399T) та рівня проліферативної активності пухлини Ki-67 у післяопераційному матеріалі хворих на ТНРГЗ за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу виявило статистично достовірний взаємозв'язок ( $p=0,02$ ). Так, у хворих на ТНРГЗ — носіїв генотипу TT за геном *TLR-4* (C399A) середні значення індексу Ki-67 у післяопераційному матеріалі були вищими ( $72,8 \pm 15,8\%$ ) порівняно з хворими — носіями генотипів CC та CT за цим геном ( $40,3 \pm 21,8\%$  та  $45,7 \pm 24,1\%$  відповідно).

Проведений аналіз не виявив асоціації мутацій гена *TLR-9* (G2848A) з розміром первинної пухлини (категорія pT за класифікацією TNM) та статусом аксілярних лімфатичних вузлів (категорія pN за класифікацією TNM), стадією захворювання та індексом проліферативної активності пухлини Ki-67 у матеріалі трепан-біопсії та у післяопераційному матеріалі хворих на ТНРГЗ. Також не відмічено відмінностей за розподілом мутантних алелей за геном *TLR-9* (G2848A) у різних вікових групах хворих на метастатичний ТНРГЗ та залежно від стану менструальної функції.

При вивченні асоціації поліморфізму генів *TLR-2* (G753A), *TLR-4* (C399T) та *TLR-9* (G2848A) у цієї категорії хворих до-

**Таблиця 2.** Асоціація поліморфізму гена *TLR-2* (G753A) з клінічними особливостями пухлини у хворих на метастатичний ТНРГЗ

| Показник             | n (%) |          |           | Рівень значущості відмінності, p |      |
|----------------------|-------|----------|-----------|----------------------------------|------|
|                      | CC    | GC       | GG        |                                  |      |
| T                    | 1     | 1 (14,3) | 4 (12,1)  | 10 (17,2)                        | 0,49 |
|                      | 2     | 4 (57,1) | 17 (51,5) | 32 (55,2)                        |      |
|                      | 3     | 1 (14,3) | 5 (15,2)  | 11 (19)                          |      |
|                      | 4     | 1 (14,3) | 7 (21,2)  | 5 (8,6)                          |      |
| N                    | 0     | 3 (42,9) | 14 (42,4) | 20 (34,5)                        | 0,94 |
|                      | 1     | 1 (14,3) | 9 (27,3)  | 24 (41,4)                        |      |
|                      | 2     | 3 (42,9) | 10 (30,3) | 13 (22,4)                        |      |
| M                    | 3     | 0 (0)    | 0 (0)     | 1 (1,7)                          | 0,10 |
|                      | 0     | 6 (85,7) | 31 (93,9) | 45 (76,3)                        |      |
| Стадія               | 1     | 1 (14,3) | 2 (6,1)   | 14 (23,7)                        | 0,82 |
|                      | IIA   | 2 (28,6) | 10 (30,3) | 15 (25,4)                        |      |
|                      | IIIB  | 0 (0)    | 7 (21,2)  | 12 (20,3)                        |      |
|                      | IIIA  | 3 (42,9) | 5 (15,2)  | 11 (18,6)                        |      |
|                      | IIIB  | 0 (0)    | 6 (18,2)  | 1 (1,7)                          |      |
|                      | IV    | 1 (14,3) | 2 (6,1)   | 14 (23,7)                        |      |
| Менструальна функція | 0*    | 2 (28,6) | 11 (33,3) | 21 (35,6)                        | 0,92 |
|                      | 1*    | 5 (71,4) | 22 (66,7) | 38 (64,4)                        |      |

Для порівняння рангових ознак використано критерій Крускала — Уолліса; для порівняння якісних ознак використано критерій  $\chi^2$ . \*Пременопауза; \*менопауза.

**Таблиця 3.** Асоціація мутації гена *TLR-2* (G753A) із індексом проліферативної активності Ki-67 у хворих на метастатичний ТНРГЗ

| Показник                 | $\bar{X} \pm SD$ |           |           | Рівень значущості відмінності, p |
|--------------------------|------------------|-----------|-----------|----------------------------------|
|                          | CC (n=7)         | GC (n=33) | GG (n=60) |                                  |
| Вік, років               | 50,7±6,7         | 51,3±8,9  | 53,5±10,0 | 0,50                             |
| Ki-67 (% до операції)    | 54,4±16,7        | 44,4±17,0 | 50,6±19,2 | 0,28                             |
| Ki-67 (% після операції) | 59,3±31,2        | 35,8±17,3 | 46,3±24,1 | <b>0,03</b>                      |

Для порівняння використано однофакторний дисперсійний аналіз.

сліджено асоціацію поліморфізму вищезазначених генів із такими маркерами імунного мікрооточення пухлини, як рівень пухлина-інфільтруючих лімфоцитів (ПЛ), стромальних та перитуморальних CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> та FOXP3<sup>+</sup> лімфоцитів до та після оперативного лікування.

У нашому дослідженні (табл. 6) виявлено асоціацію поліморфізму гена *TLR-2* (G753A) з рівнем ПЛ у хворих на ТНРГЗ ( $p=0,02$ ). Визначено, що у більшості хворих (66%) — носіїв генотипу СС за геном *TLR-2* (G753A) виявлено пухлини без лімфоїдної інфільтрації (ПЛ0), помірна лімфоїдна інфільтрація (ПЛ12<sup>+</sup>) відмічена у 33% пацієнток, а пухлини з вираженою лімфоїдною інфільтрацією ПЛ3<sup>+</sup> у цій групі не траплялися. Протилежні закономірності були виявлені у хворих — носіїв генотипів GC та GG за геном *TLR-2* (G753A). Так, виражену лімфоїдну інфільтрацію ПЛ3<sup>+</sup> встановлено у 36,6% хворих — носіїв генотипу GC та у 30% хворих — носіїв генотипу GG за геном *TLR-2* (G753A).

Взаємозв'язку поліморфізму гена *TLR-2* (G753A) з іншими параметрами імунного мікрооточення не виявлено.

У пацієнток з метастатичним ТНРГЗ не встановлено взаємозв'язку між поліморфізмом генів *TLR-4* (C399T), *TLR-9* (G2848A) та рівнем ПЛ, стромальних та перитуморальних CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> та FOXP3<sup>+</sup> лімфоцитів до та після оперативного лікування.

Для оцінки впливу поліморфізму генів *TLR-2* (G753A), *TLR-4* (C399T), *TLR-9* (G2848A) на загальну та безрецидивну виживаність проведено аналіз результатів лікування 101 хворої на ТНРГЗ шляхом побудови однофакторних моделей пропорційних інтенсивностей Кокса та розрахунку співвідношення ризиків з 95% довірчим інтервалом (ДІ).

Проведений аналіз не виявив незалежного прогностичного впливу поліморфізму генів *TLR-2* (G753A), *TLR-9* (G2848A) на загальну та безрецидивну виживаність хворих на ТНРГЗ. Та-

**Таблиця 4.** Асоціація поліморфізму гена *TLR-4* (C399T) з клінічними особливостями пухлини у хворих на метастатичний ТНРГЗ

| Показник             | п (%) |           |           | Рівень значущості відмінності, p |      |
|----------------------|-------|-----------|-----------|----------------------------------|------|
|                      | СС    | СТ        | ТТ        |                                  |      |
| Т                    | 1     | 11 (15,7) | 3 (12,5)  | 1 (20)                           | 0,68 |
|                      | 2     | 39 (55,7) | 14 (58,3) | 1 (20)                           |      |
|                      | 3     | 10 (14,3) | 5 (20,8)  | 2 (40)                           |      |
|                      | 4     | 10 (14,3) | 2 (8,3)   | 1 (20)                           |      |
| N                    | 0     | 24 (34,3) | 12 (50)   | 2 (40)                           | 0,29 |
|                      | 1     | 25 (35,7) | 8 (33,3)  | 1 (20)                           |      |
|                      | 2     | 20 (28,6) | 4 (16,7)  | 2 (40)                           |      |
|                      | 3     | 1 (1,4)   | 0 (0)     | 0 (0)                            |      |
| M                    | 0     | 59 (83,1) | 20 (83,3) | 4 (80)                           | 0,98 |
|                      | 1     | 12 (16,9) | 4 (16,7)  | 1 (20)                           |      |
| Стадія               | I     | 7 (9,9)   | 2 (8,3)   | 1 (20)                           | 0,70 |
|                      | IIA   | 17 (23,9) | 10 (41,7) | 1 (20)                           |      |
|                      | IIB   | 15 (21,1) | 4 (16,7)  | 0 (0)                            |      |
|                      | IIIA  | 15 (21,1) | 2 (8,3)   | 2 (40)                           |      |
|                      | IIIB  | 5 (7)     | 2 (8,3)   | 0 (0)                            |      |
| Менструальна функція | IV    | 12 (16,9) | 4 (16,7)  | 1 (20)                           | 0,75 |
|                      | 0*    | 24 (33,8) | 9 (37,5)  | 1 (20)                           |      |
|                      | 1*    | 47 (66,2) | 15 (62,5) | 4 (80)                           |      |

Для порівняння рангових ознак використано критерій Крускала – Уолліса; для порівняння якісних ознак використано критерій  $\chi^2$ . \*пременопауза; \*менопауза.

**Таблиця 5.** Асоціація мутації гена *TLR-4* (C399T) із індексом проліферативної активності Ki-67 у хворих на метастатичний ТНРГЗ

| Показник                 | $\bar{X} \pm SD$       |           |            | Рівень значущості відмінності, p |
|--------------------------|------------------------|-----------|------------|----------------------------------|
|                          | СС (n=71)              | СТ (n=25) | ТТ (n=5)   |                                  |
| Вік, років               | 52,2±9,1               | 53,7±10,5 | 54,0±10,3  | 0,75                             |
| Ki-67 (% до операції)    | 48,9±18,6              | 50,1±19,6 | 45,0±14,3  | 0,86                             |
| Ki-67 (% після операції) | 40,3±21,8 <sup>§</sup> | 45,7±24,1 | 72,8±15,8* | <b>0,02</b>                      |

Для порівняння використано однофакторний дисперсійний аналіз. При проведенні апостеріорних попарних порівнянь використано методи множинних порівнянь: \*відмінність від групи з мутацією СС статистично значуща ( $p<0,05$ ); \*відмінність від групи з мутацією СТ статистично значуща ( $p<0,05$ ); \*відмінність від групи з мутацією ТТ статистично значуща ( $p<0,05$ ).

кож не зафіксовано незалежного прогностичного впливу поліморфізму гена *TLR-4* (C399T) на загальну виживаність. Натомість у результаті однофакторного аналізу з використанням моделі пропорційних інтенсивностей Кокса встановлено вплив мутації гена *TLR-4* (C399T) на безрецидивну виживаність хворих на ТНРГЗ.

Як видно з табл. 7, у пацієнток із ТНРГЗ — носіїв генотипу СС за геном *TLR-4* (C399T) ризик рецидиву захворювання був нижчий у 3,75 раза (відношення ризиків (ВР) 0,28; 95% ДІ 0,10–0,80) порівняно з носіями генотипу ТТ за цим геном. Також виявлено зниження ризику розвитку віддалених метастазів у носіїв генотипу СТ за геном *TLR-4* (C399T) (ВР 0,24; 95% довірчий інтервал 0,08–0,74) у 4 рази порівняно з хворими — носіями генотипу ТТ за геном *TLR-4* (C399T).

## ВИСНОВКИ

За допомогою однофакторного дисперсійного аналізу доведено асоціацію поліморфізму гена *TLR-4* (C399T) та рівня проліферативної активності пухлини Ki-67 у післяопераційному матеріалі хворих на ТНРГЗ ( $p=0,02$ ). Виявлено асоціацію поліморфізму гена *TLR-2* (G753A) з рівнем ПЛ у пацієнток із метастатичним ТНРГЗ ( $p=0,02$ ). Встановлено, що ризик

**Таблиця 6.** Асоціація поліморфізму гена *TLR-2* (G753A) з особливостями імунного мікрооточення пухлини у хворих на метастатичний ТНРГЗ

| Показник                                   | п (%) |           |           | Рівень значущості відмінності, p |             |
|--|-------|-----------|-----------|----------------------------------|-------------|
|  | СС    | GC        | GG        |                                  |             |
| CD4 <sub>S</sub> трепан-біопсія            | 0     | 0 (0)     | 4 (13,8)  | 10 (20)                          | 0,53        |
|  | 1     | 4 (80)    | 10 (34,5) | 20 (40)                          |             |
|  | 2     | 1 (20)    | 13 (44,8) | 17 (34)                          |             |
|  | 3     | 0 (0)     | 2 (6,9)   | 3 (6)                            |             |
| CD4 <sub>T</sub> трепан-біопсія            | 0     | 0 (0)     | 6 (20,7)  | 12 (24)                          | 0,98        |
|  | 1     | 3 (60)    | 9 (31)    | 14 (28)                          |             |
|  | 2     | 2 (40)    | 14 (48,3) | 22 (44)                          |             |
|  | 3     | 0 (0)     | 0 (0)     | 2 (4)                            |             |
| CD8 <sub>S</sub> трепан-біопсія            | 0     | 1 (20)    | 2 (6,9)   | 11 (22)                          | 0,59        |
|  | 1     | 1 (20)    | 9 (31)    | 17 (34)                          |             |
|  | 2     | 2 (40)    | 17 (58,6) | 13 (26)                          |             |
|  | 3     | 1 (20)    | 1 (3,4)   | 9 (18)                           |             |
| CD8 <sub>T</sub> трепан-біопсія            | 0     | 1 (20)    | 4 (13,8)  | 14 (28)                          | 0,62        |
|  | 1     | 1 (20)    | 11 (37,9) | 15 (30)                          |             |
|  | 2     | 2 (40)    | 11 (37,9) | 14 (28)                          |             |
|  | 3     | 1 (20)    | 3 (10,3)  | 7 (14)                           |             |
| FOXP3 трепан-біопсія                       | 0     | 1 (25)    | 4 (14,3)  | 12 (24)                          | 0,59        |
|  | 1     | 1 (25)    | 9 (32,1)  | 15 (30)                          |             |
|  | 2     | 2 (50)    | 10 (35,7) | 17 (34)                          |             |
|  | 3     | 0 (0)     | 5 (17,9)  | 6 (12)                           |             |
| ПЛ   | 0     | 4 (66,7)* | 1 (3,3)*  | 8 (18,6)                         | <b>0,02</b> |
|  | 1     | 0 (0)     | 6 (20)    | 10 (23,3)                        |             |
|  | 2     | 2 (33,3)  | 12 (40)   | 12 (27,9)                        |             |
|  | 3     | 0 (0)     | 11 (36,7) | 13 (30,2)                        |             |
| CD4 <sub>S</sub> післяопераційний матеріал | 0     | 3 (50)    | 6 (20)    | 10 (23,8)                        | 0,14        |
|  | 1     | 2 (33,3)  | 7 (23,3)  | 12 (28,6)                        |             |
|  | 2     | 1 (16,7)  | 11 (36,7) | 14 (33,3)                        |             |
|  | 3     | 0 (0)     | 6 (20)    | 6 (14,3)                         |             |
| CD4 <sub>T</sub> післяопераційний матеріал | 0     | 5 (83,3)  | 11 (36,7) | 17 (40,5)                        | 0,11        |
|  | 1     | 1 (16,7)  | 12 (40)   | 13 (31)                          |             |
|  | 2     | 0 (0)     | 6 (20)    | 9 (21,4)                         |             |
|  | 3     | 0 (0)     | 1 (3,3)   | 3 (7,1)                          |             |
| CD8 <sub>S</sub> післяопераційний матеріал | 0     | 4 (66,7)  | 5 (16,7)  | 10 (23,8)                        | 0,22        |
|  | 1     | 0 (0)     | 9 (30)    | 10 (23,8)                        |             |
|  | 2     | 1 (16,7)  | 5 (16,7)  | 9 (21,4)                         |             |
|  | 3     | 1 (16,7)  | 11 (36,7) | 13 (31)                          |             |
| CD8 <sub>T</sub> післяопераційний матеріал | 0     | 3 (50)    | 7 (23,3)  | 9 (21,4)                         | 0,09        |
|  | 1     | 3 (50)    | 5 (16,7)  | 16 (38,1)                        |             |
|  | 2     | 0 (0)     | 13 (43,3) | 5 (11,9)                         |             |
|  | 3     | 0 (0)     | 5 (16,7)  | 12 (28,6)                        |             |
| FOXP3 післяопераційний матеріал            | 0     | 3 (60)    | 7 (25,9)  | 11 (29,7)                        | 0,35        |
|  | 1     | 1 (20)    | 8 (29,6)  | 12 (32,4)                        |             |
|  | 2     | 1 (20)    | 10 (37)   | 12 (32,4)                        |             |
|  | 3     | 0 (0)     | 2 (7,4)   | 2 (5,4)                          |             |

Для порівняння використано критерій Крускала – Уолліса. При проведенні апостеріорних попарних порівнянь використано методи множинних порівнянь: \*відмінність від групи з мутацією СС статистично значуща ( $p<0,05$ ); \*відмінність від групи з мутацією GC статистично значуща ( $p<0,05$ ); \*відмінність від групи з мутацією GG статистично значуща ( $p<0,05$ ).



**Таблиця 7.** Коефіцієнти однофакторних моделей Кокса прогнозування безрецидивної виживаності хворих на ТНРГЖ залежно від поліморфізму гена *TLR-4* (С399Т)

| Показник                                   | Коефіцієнт моделі, $b \pm m$ | Рівень значущості відмінності коефіцієнта моделі від 0, $p$ | ВР (95% ДІ)      |
|--|------------------------------|---|------------------|
| Ген <i>TLR-4</i> (С399Т), генотип СС vs ТТ | -1,2540                      | 0,01  | 0,28 (0,10–0,80) |
| Ген <i>TLR4</i> (С399Т), генотип СТ vs ТТ  | -1,3984                      | 0,01  | 0,24 (0,08–0,74) |

розвитку рецидиву у хворих на ТНРГЖ був найвищим у носіїв генотипу ТТ за геном *TLR-4* (С399Т) порівняно з носіями генотипу СС (ВР 0,28; 95% ДІ 0,10–0,80) та носіями генотипу СТ (ВР 0,24; 95% ДІ 0,08–0,74) відповідно ( $p=0,01$ ).

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Anders, C. K., Abramson, V., Tan, T., & Dent, R. (2016). The evolution of triple-negative breast cancer: from biology to novel therapeutics. *American Society of Clinical Oncology Education Book*, 35, 34–42. doi:10.1200/EDBK\_159135.
- Ahmed, A., Redmond, H. P., & Wang, J. H. (2013). Links between Toll-like receptor 4 and breast cancer. *Oncoimmunology*, 2, e22945. doi: 10.4161/onci.22945.
- Bhattacharya, D., & Yusuf, N. (2012). Expression of toll-like receptors on breast tumors: taking a toll on tumor microenvironment. *International Journal of Breast Cancer*, 12, 716–724. doi: 10.1155/2012/716564.
- Dana, A., Franzese, E., Centonze, S., Carlino, F., Della Corte, C. M., Ventriglia, J., ... Orditura, M. (2018). Triple-negative breast cancers: systematic review of the literature on molecular and clinical features with a focus on treatment with innovative drugs. *Current Oncology Reports*, 20(10), 76. doi: 10.1007/s11912-018-0726-6.
- Hudis, C., & Gianni, L. (2011). Triple negative breast cancer: an unmet medical need. *The Oncologist*, 28(2), 135–146. doi: 10.1634/theoncologist.2011-S1-01.
- Kawai, T., & Akira, S. (2013). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11, 373–384. doi: 10.1038/ni.1863.
- Qiu, J., Shao, S., Yang, G., Shen, Z., & Zhang, Y. (2011). Association of Toll like receptor 9 expression with lymph node metastasis in human breast cancer. *Neoplasma*, 58, 251–255.
- Sun, L., Jiang, Q., Zhang, Y., Liang, H., Ren, H., & Zhang, D. (2016). Toll-like receptors and breast cancer. *Integrative Cancer Science and Therapeutics*, 3(2), 432–436. doi: 10.15761/ICST.1000183.
- Wang, R. F., Miyahara, Y., & Wang, H. Y. (2008). Toll-like receptors and immune regulation: implications for cancer therapy. *Oncogene*, 27, 181–189. doi: 10.1038/sj.onc.1210906.
- Yang, C. X., Li, C. Y., & Feng, W. (2012). Toll-like receptor 4 genetic variants and prognosis of breast cancer. *Tissue Antigens*, 8, 221–226. doi: 10.1111/tan.12096.
- Zhu, L., Yuan, H., Jiang, T., Wang, R., Ma, H., Zhang, S. (2013). Association of *TLR-2* and *TLR-4* polymorphisms with risk of cancer: a meta-analysis. *PLoS ONE*, 8(12), 828–858. doi: 10.1371/journal.pone.0082858.

#### Особенности полиморфизма генов *TLR-2*, *TLR-4*, *TLR-9* и их роль в прогнозе трижды негативного рака грудной железы

С.А. Лялькин, Л.А. Сивак, Н.Н. Храповская, Н.О. Верёвкина  
Национальный институт рака, Киев

**Резюме.** Терапия метастатического трижды негативного рака грудной железы (ТНРГЖ) на сегодня остается одной из наиболее актуальных проблем современной онкологии. Несмотря на в целом негативный прогноз для пациенток с ТНРГЖ, существует подгруппа больных с лучшим ответом на системную полихимиотерапию и лучшим прогнозом, что доказывает гетерогенность ТНРГЖ. **Целью** исследования является определение прогностической роли полиморфизма генов *TLR-2*, *TLR-4* и *TLR-9* у пациенток с метастатическим ТНРГЖ. **Объект и методы.** Проведен анализ результатов лечения 101 пациентки с метастатическим ТНРГЖ. Определение полиморфизма

генов *TLR-2* (G753A), *TLR-4* (С399Т) и *TLR-9* (G2848A) осуществляли с помощью метода полимеразной цепной реакции с анализом полиморфизма длины рестрикционных фрагментов. **Результаты.** Доказана связь полиморфизма гена *TLR-4* (С399Т) и уровня пролиферативной активности Ki-67 в послеоперационном материале больных ТНРГЖ ( $p=0,02$ ). Выявлена связь полиморфизма гена *TLR-2* (G753A) с уровнем опухолеинфильтрирующих лимфоцитов у пациенток с метастатическим ТНРГЖ ( $p=0,02$ ). **Выводы.** Установлено, что риск развития рецидива у пациенток с ТНРГЖ был наименьшим у носителей генотипа ТТ по гену *TLR-4* (С399Т) по сравнению с носителями генотипа СС (отношение рисков 0,28; 95% доверительный интервал 0,10–0,80) и носителями генотипа СТ (отношение рисков 0,24; 95% доверительный интервал 0,08–0,74) соответственно ( $p=0,01$ ).

**Ключевые слова:** трижды негативный рак грудной железы; полиморфизм генов *TLR-2*, *TLR-4* и *TLR-9*; клинический прогноз; безрецидивная выживаемость; общая выживаемость.

#### Role of *TLR-2*, *TLR-4*, *TLR-9* gene polymorphism in prognosis of triple negative breast cancer

S.A. Lyalkin, L.A. Syvak, N.M. Khranovska, N.O. Verevkina  
National Cancer Institute, Kyiv

**Summary.** Treatment of patients with triple negative breast cancer (TNBC) remains one of the most difficult problems in clinical oncology. Despite the negative prognosis for TNBC, there exists the group of patients with better response to chemotherapy and better prognosis, which proves the heterogeneity of TNBC. The **aim** of the study was to evaluate the prognostic role of *TLR-2*, *TLR-4*, *TLR-9* gene polymorphism in patients with TNBC. **Materials and methods.** The prognostic role of *TLR-2*, *TLR-4*, *TLR-9* gene polymorphism was assessed in 101 metastatic TNBC patients. The *TLR-2*, *TLR-4*, *TLR-9* gene polymorphism was evaluated by polymerase chain reaction with analysis of polymorphism of restriction fragment length. **Results.** The *TLR-4* (С399Т) gene polymorphism was associated with the level of Ki-67 in patients with TNBC ( $p=0,02$ ). The *TLR-2* gene polymorphism was associated with the level of tumor infiltrative lymphocytes in patients with metastatic TNBC ( $p=0,02$ ). **Conclusion.** The risk of relapse was the highest in TNBC patients with *TLR-4* polymorphism of TT genotype comparing CC genotype (hazard ratio 0.28; 95% confidence interval 0.10–0.80) and CT genotype (hazard ratio 0.24; 95% confidence interval 0.08–0.74), respectively ( $p=0,01$ ).

**Key words:** triple negative breast cancer; *TLR-2*, *TLR-4*, *TLR-9* gene polymorphism; clinical prognosis; disease free survival; overall survival.

#### Адреса:

Лялькин Сергей Анатолійович  
03022, Київ, вул. Ломоносова, 33/43  
Національний інститут раку  
E-mail: slyalkin@yahoo.com

#### Correspondence:

Lyalkin Sergiy  
33/43 Lomonosova str., Kyiv 03022  
National Cancer Institute  
E-mail: slyalkin@yahoo.com