

УДК: 575.174.015.3:618.19-006.04

Марковский А.В., Страмбовская Н.Н.

**НОСИТЕЛЬСТВО ПОЛИМОРФИЗМА Thr399Ile и Asp299Gly ГЕНА TLR4  
И УРОВЕНЬ TLR4 В ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ У БОЛЬНЫХ  
ПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ****ФГБОУ ВО Читинская государственная медицинская академия, г. Чита**

**Резюме.** Исследован генетический полиморфизм TLR4(Thr399Ile) и TLR4(Asp299Gly) у 157 больных пролиферативными заболеваниями молочной железы и 176 относительно здоровых женщин. Обнаружены все аллели и генотипы, с частотным подчинением закону Харди-Вайнберга (HWE,  $p > 0,05$ ). В исследуемой популяции ассоциации носительства TLR4 (rs4986790 и rs4986791) с пролиферативными заболеваниями молочной железы не выявлены. При этом, уровень TLR4 в опухолевой ткани был значительно выше у пациенток с ДОМЖ и преимущественно с гаплотипом Thr/Ile×Asp/Gly гена TLR4, в сравнении с больными РМЖ.

**Ключевые слова:** пролиферативные заболевания молочной железы, толл-подобные рецепторы, генетический полиморфизм, предрасположенность.

*Markovsky A.V., Strambovskaia N.N.***THE PREVALENCE OF POLYMORPHISMS ASP299GLY AND THR399ILE  
OF TLR4 GENE AND THE CONCENTRATION OF TLR4 IN TUMOR TISSUE  
OF PATIENTS PROLIFERATIVE BREAST DISEASE**

**Summary.** As a result of study of association genetic polymorphism of TLR4(Asp299Gly) and TLR4 (Thr399Ile) from 157 patients with breast cancer and at 176 rather healthy women of Transbaykal Region are investigated. We discover all were burning and genotypes frequency submission to the Hardy-Weinberg law (HWE,  $p > 0,05$ ). TLR4 carriers the association (rs4986790 and rs4986791) with breast proliferative diseases are not revealed in the study population. Thus, TLR4 level in tumor tissue was significantly higher in patients with benign breast disease and a haplotype preferably Thr/Ile×Asp/Gly TLR4 gene in compared with breast cancer patients.

**Keywords:** proliferative breast disease, toll-like receptors, genetic polymorphism, predisposition.

В последнее время отмечена тенденция к увеличению числа доброкачественных опухолей молочных желез (ДОМЖ), которые диагностируются у каждой 4-й пациентки в возрасте моложе 30 лет, а рак молочной железы (РМЖ) продолжает оставаться ведущей онкологической патологией у женского населения в России (2014 г.) [1]. РМЖ относится к числу опухолей, в развитии которых существенную роль играют генетические факторы [7]. Среди многочисленных генов, в разной степени ассоциированных с развитием заболевания, интерес представляют гены Toll-like рецепторов (TLR), эффекты которых, выходят за рамки реакций врожденного иммунного ответа и первый, обнаруженный из этой группы (в 1997 году) – TLR4. Однако роль TLR в онкогенезе неоднозначна: с одной стороны они участвуют в противоопухолевом иммунитете, с другой – способствуют уклонению опухолевых клеток от иммунного ответа [16, 15], что указывает на сложный механизм эффектов TLR и их лигандов, который вызывает определенный интерес и обосновывает необходимость более детального изучения.

**Цель работы.** Сравнить частоту аллелей и генотипов генетического полиморфизма TLR4(Thr399Ile) и TLR4(Asp299Gly) среди относительно здоровых женщин и больных пролиферативными заболеваниями молочной железы (ПЗМЖ) в Забайкальском крае, в том числе влияние носительства SNPs (Single nucleotide polymorphism) на уровень TLR4.

**Материалы и методы.** В исследование включены 35 больных ДОМЖ и 122 пациентки с РМЖ, в возрасте 46-66 лет. Диагноз подтвержден гистологическим методом исследования. Контрольную группу составили 176 здоровых женщин Забайкальского края в возрасте 31-50 лет, не имеющих на момент исследования онкологической патологии. Все участники

исследования подписывали информированное согласие. Исследование одобрено ЛЭК при ФГБОУ ВО ЧГМА 24 декабря 2014 г. (протокол № 69).

Материалом для молекулярно-генетического анализа (PCR-Ef) служили образцы ДНК, выделенные из лейкоцитов периферической венозной крови. Амплификацию для выявления полиморфизма *TLR4*(Thr399Ile) и *TLR4*(Asp299Gly) проводили в термоциклере (ООО «Бис-Н», Новосибирск). В работе использовались стандартные наборы для исследуемых SNP научно-производственной фирмы «Литех» (Москва). Для оценки соответствия распределений наблюдаемых генотипов ожидаемым значениям при равновесии Харди-Вайнберга и для сравнения распределений частот генотипов и аллелей в двух субпопуляциях использовали критерий  $\chi^2$ . Статистическая обработка данных проводилась с использованием on-line калькулятора ([http://gen-exp.ru/calculator\\_or.php](http://gen-exp.ru/calculator_or.php)).

Для определения концентрации *TLR4* методом сэндвич-ИФА использовался операционный материал 62 больных РМЖ и 25 ДОМЖ и коммерческий набор ELISA Kit for Toll Like Receptor 4 (Cloud-Clone Corp., USA) в соответствии с инструкциями изготовителя. Для механического разрушения и гомогенизации, плотных образцов ткани молочной железы использовали гомогенизатор TissueLyser LT (TissueLyser II, Qiagen, Германия). Результаты представлены в расчете на 1 мг биоптата молочной железы из очага опухолевого процесса. Статистическую значимость различий количественных признаков определяли по критерию Манна-Уитни с помощью Ms Excel 10.0, Statistica 6.0. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Результаты представлены в виде Me [P25-P75].

**Результаты и обсуждение.** В ходе работы обнаружены все искомые мутации в гомо- и гетерозиготном состоянии с частотным подчинением закону Харди-Вайнберга ( $p > 0,05$ ). Выявлено, что частоты генотипов и аллелей гена *TLR4* (rs4986790 и rs4986791) не отличались в группах сравнения (в двух клинических и контрольной) (табл. 1).

Таблица 1

**Частота аллелей и генотипов полиморфизма гена *TLR4*(Thr399Ile) и *TLR4*(Asp299Gly) в группах сравнения\***

Генотипы Аллели	Группы			$\chi^2$ (P) <sup>1</sup>	$\chi^2$ (P) <sup>2</sup>	$\chi^2$ (P) <sup>3</sup>
	контрольная (n=176)	больные с ДОМЖ <sup>1</sup> (n=35)	больные с РМЖ <sup>2</sup> (n=122)			
<i>TLR4</i> (Thr399Ile)						
Thr/Thr	149 (84,7)	30 (80%)	100 (82%)	1,48 (0,48)	1,09 (0,58)	0,42 (0,81)
Thr/Ile	24 (13,6%)	5 (20%)	21 (17,2%)			
Ile/Ile	3 (1,7%)	0 (0%)	1 (0,8%)			
Thr	322 (0,915)	63 (0,900)	221 (0,906)	0,16 (0,69)	0,15 (0,7)	0,02 (0,89)
Ile	30 (0,085)	7 (0,100)	23 (0,094)			
<i>TLR4</i> (Asp299Gly)						
Asp/Asp	147 (83,5)	27 (77,1%)	104 (85,2%)	2,78 (0,25)	3,56 (0,17)	1,29 (0,52)
Asp/Gly	24 (13,6%)	8 (22,9%)	18 (14,8%)			
Gly/Gly	5 (2,8%)	0 (0%)	0 (0%)			
Asp	318 (0,903)	62 (0,886)	226 (0,926)	0,20 (0,65)	0,94 (0,33)	1,18 (0,28)
Gly	34 (0,097)	8 (0,114)	18 (0,074)			

Примечание: <sup>1,2,3</sup> ( $\chi^2$  тест) \* – сравнение распределений частот генотипов и аллелей групп больных РМЖ и ДОМЖ, с соответствующим показателем в группе контроля и между собой

Таким образом, нами не было обнаружено ассоциаций полиморфизма гена *TLR4* (rs4986790 и rs4986791) с развитием ПЗМЖ. Схожие данные получены в работах К.К. Tsilidis [4], S. Landi с соавт. [14], Н. Davoodi и Seow [5] в отношении носительства *TLR4*(Asp299Gly) и отсутствия риска развития колоректального рака в американской, испанской и в смешанной азиатской популяциях. Однако исследования, посвященные *TLR4*, в случае с аденокарциномой молочной железы [9,10] или колоректальным раком в хорватской популяции [12],

доказывают, что данный белок может оказывать опосредованный опухолестимулирующий эффект.

Изучив уровень TLR4 в опухолевой ткани, мы определили, что его концентрация была значительно выше в группе с ДОМЖ (0,88 [0,65;1,20] пг/мг), чем у больных с раком молочной железы (0,50 [0,37;0,64] пг/мг) ( $p=0,0001$ ). Это может быть связано с недостаточной активацией TLR4 у страдающих РМЖ и, как следствие, опухолевой прогрессией. Так, например, исследование E. LeBouder и соав. (2003) показало, что при стимуляции клеток кинетика высвобождения TLR2 в кровь повышается, а истощение его сывороточной формы приводит к увеличению клеточного ответа [17].

Анализ ассоциации носительства отдельных аллелей полиморфизма гена *TLR4* (rs4986790 и rs4986791) с уровнем тканевого TLR4 в группах сравнения, показал отсутствие различий по концентрации белка. Однако носительство гаплотипов Thr399Thr×Asp299Asp и Thr399Ile×Asp299Gly гена *TLR4*, показало, что уровень TLR4 был выше у пациентов ДОМЖ с гаплотипом Thr399Thr×Asp299Asp гена *TLR4*, а у больных РМЖ, наоборот, с Thr399Thr×Asp299Asp ( $p<0,05$ ) (табл. 2).

Таблица 2

**Уровень TLR4 в группах больных РМЖ и ДОМЖ, с учетом аллелей и генотипов полиморфизма *TLR4*(Thr399Ile) и *TLR4*(Asp299Gly), Me [P25-P75]**

Аллели Генотипы		TLR4 (пг/мг)	
		больные с ДОМЖ (n=25)	больные с РМЖ (n=62)
TLR4 (Thr399Ile)	Thr	0,82 [0,60;1,20]	0,55 [0,37;0,68]*
	Ile	1,07 [0,69;1,42]	0,41 [0,35;0,52]**
TLR4 (Asp299Gly)	Asp	0,82 [0,60;1,20]	0,55 [0,37;0,68]*
	Gly	1,06 [0,93;1,18]	0,41 [0,35;0,52]**
Thr/Thr×Asp/Asp		0,82 [0,60;1,20]	0,55 [0,37;0,68]*
Thr/Ile×Asp/Gly		1,07 [0,93;1,42] <sup>#</sup>	0,41 [0,35;0,52]** <sup>#</sup>

Примечание: (u-тест): \* -  $p<0,001$ , \*\* -  $p<0,005$  - сравнение концентрации TLR4 у больных РМЖ и ДОМЖ носителей одинаковых аллелей и гаплотипов, <sup>#</sup> -  $p<0,003$  - сравнение концентрации TLR4 у больных РМЖ и ДОМЖ носителей разных аллелей и гаплотипов.

TLR4 (толл-подобный рецептор 4, CD284) — мембранный белок, который относится к группе толл-подобных рецепторов, участвующих во врожденном иммунитете [2]. Он способен запускать иммунный ответ по MyD88-независимому пути, который осуществляется посредством адаптерного белка TRIF (англ. TIR-domain-containing adaptor-including IFNfi), напрямую связывающегося через свой N-конец с TRAF-6 и впоследствии активирующий NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) – один из важнейших факторов, обуславливающих взаимосвязь хронического воспаления и опухолеобразования [13, 3]. Из полиморфизмов гена *TLR4* в мировых популяциях наиболее распространены *TLR4*(Asp299Gly) и *TLR4*(Thr399Ile), где в соотношении частот преобладает нормальная аллель. Носители редких *TLR4*-299Gly, *TLR4*-399Ile аллелей не превышают 7% населения мира, а в азиатских популяциях этот полиморфизм практически не выявлен [6, 8].

Таким образом, мы предполагаем, что носительство определенных гаплотипов гена *TLR4* может привести к дисрегуляции сигнализации TLR4 и, как следствие, к изменению взаимосвязи лиганда и баланса между про- и противовоспалительными цитокинами, модулируя тем самым риск хронического воспаления и рака, а значительное содержание TLR4 в опухолевых тканях обеспечивает высокую скорость регулирования клеточной активации. Учитывая это, полиморфизм *TLR4*(Thr399Ile) и *TLR4*(Asp299Gly) вместе с TLR4 могут быть рассмотрены в качестве диагностических биомаркеров. Следует отметить, что в литературе

встречаются противоречивые результаты ассоциации модифицирующего влияния гена *TLR4* на риск развития рака [10, 12, 14], что можно объяснить различными факторами, модулирующими действие генотипа и проявляющимися с различной силой в изучаемых популяциях (различный генетический фон в популяциях, особенности окружающей среды или кишечной микрофлоры). Не исключено и влияние сочетанного носительства полиморфных вариантов нескольких генов на канцерогенез.

**Выводы.** В результате исследования частоты аллелей и генотипов полиморфизма гена *TLR4*(Thr399Ile) и *TLR4*(Asp299Gly) у больных пролиферативными заболеваниями молочной железы значимых отличий не выявлено. При этом уровень TLR4 в опухолевых тканях был выше у пациенток с ДОМЖ, и преимущественно на фоне носительства гаплотипа Thr/Ile×Asp/Gly гена *TLR4*, по сравнению с концентрацией белка у больных РМЖ.

#### Литература:

1. Каприн А.Д. Злокачественные новообразования в России в 2014 году (заболеваемость и смертность) / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2016. – 250 с.
2. Сульская Ю. В. Генетический полиморфизм Толл-рецепторов 4 типа у больных сахарным диабетом 2 типа / Ю.В. Сульская // Таврический медико-биологический вестник. – 2009. – №3. – С.72-74.
3. Хорева М.В. «Комплексный анализ системы толл-подобных рецепторов при различных патологических состояниях человека» : автореф. дис.док.мед.наук: 24.12.2012 / М.В. Хорева. – М., – 2012. – 72 с.
4. Association of common polymorphisms in IL10, and in other genes related to inflammatory response and obesity with colorectal cancer / K.K. Tsilidis [et al.] // Cancer Causes Control. – 2009. – № 20 (9). – P. 1739-1751.
5. Davoodi H. Variant Toll-like receptor4 (Asp299Gly and Thr399Ile alleles) and Toll-like receptor2 (Arg753Gln and Arg677Trp alleles) in colorectal cancer / H. Davoodi, H.F. Seow // Iran J. Allergy Asthma Immunol. – 2011. – № 10 (2). – P. 91-99.
6. Ensembl (2016). Available at. URL: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population) (accessed November 2016).
7. Genetic risk assessment and BRCA mutation testing for breast and ovarian cancer susceptibility: Systematic evidence review for the U.S. Preventive Services Task Force / H.D. Nelson [et al.] // Annals Int. Medicine. – 2005. – Vol. 143 (5). – P. 362–379.
8. HuGENavigator (2016). Available at. URL: <http://www.hugenavigator.net/HuGENavigator/geneProspector> (accessed November2016).
9. Lipopolysaccharide-induced metastatic growth is associated with increased angiogenesis, vascular permeability and tumor cell invasion / J.H. Harmeý [et al.] // Int. J. Cancer. – 2002. – V. 101. – P. 415–422.
10. Masquerader: high mobility group box-1 and cancer / J.E. Ellerman [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2008. – V. 13. – P. 2836–2848
11. Mechanism of anticancer host response induced by OK-432, a streptococcal preparation, mediated by phagocytosis and Toll-like receptor 4 signaling / M. Okamoto [et al.] // J. Immunother. – 2006. – V. 29. – P. 78–86.
12. Microsatellite GT polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with colorectal cancer / Jelavic T. Boraska [et al.] // Clin Genet. – 2006. – № 70 (2). – P. 156-160.
13. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer / E. Pikarsky [et al.] // Nature. – 2004. – V. 431. – P. 461-466.
14. Polymorphisms within inflammatory genes and colorectal cancer / S. Landi [et al.] // J. Negat Results Biomed. – 2006. – № 5. – 15 p.
15. Role of toll-like receptors and their adaptors in adjuvant immunotherapy for cancer. / T. Seya [et al.] // Anticancer Res. – 2003. – V. 23, № 6a. – P. 4369-4376.

16. Zeromski J. Significance of toll-like receptors expression in tumor growth and spreading: a short review / J. Zeromski, I. Mozer-Lisewska, M. Kaczmarek // Cancer Microenviron. – 2008. – V. 1, №1. – P. 37–42.
17. Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk / E. LeBouder [et al.] // J. Immunol. – 2003. – V. 171, №12. – P. 6680-6689.