

# ГЕНОТИПИ ГЕНІВ VEGF, TNF-A ТА TNF-B У ХВОРИХ РАКОМ СЕЧОВОГО МІХУРА В СТАДІЇ $T_1N_0M_0$ ТА ЇХ ЗВ'ЯЗОК ЗІ СТУПЕНЕМ НЕОПЛАЗІЇ ПУХЛИНИ

В.С. Федевич

*Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького  
Львівська обласна клінічна лікарня  
Інститут спадкової патології НАМНУ*

**Вступ.** Нині накопичено безліч даних, що підтверджують участь факторів росту, зокрема, VEGF (фактор росту ендотелію судин) і TNF (Фактор некрозу пухлини), відповідальних за мітогенну активність клітин, у розвитку та прогресуванні злоякісних новоутворень і, отже, є перспективними мішенями при використанні таргетної терапії [2, 3, 4].

VEGF, який представляє собою глікопротеїн і є одним з найважливіших стимуляторів ангиогенезу в різноманітних за характеристиками здорових і уражених раком тканинах. Свої функції VEGF виконує через тирозин-кіназний рецептор, розташований у мембрані ендотеліальних клітин [5].

Одним з основних факторів виживання і поширення пухлинних клітин є ангиогенез. Ключову роль у формуванні нової судинної мережі при розвитку пухлини відіграє сімейство ендотеліальних факторів росту судин – VEGF. Поява нових судин сприяє прогресуванню захворювання, збільшуючи темпи росту пухлини і її здатність до метастазування. Оцінка ангиогенезу пухлини є важливою для прогнозування перебігу хвороби і призначення хіміотерапії при багатьох злоякісних пухлинах [6].

Альфа-фактор некрозу пухлини (ФНП) був ідентифікований в сироватці крові мишей. Як ендогенний тумороцидний агент, він продукується активованими під дією ендотоксину мононуклеарними макрофагами. Його характерна особливість – висока селективна токсичність по відношенню до пухлинних клітин [1]. Тумороцидний фактор не має видової специфічності і не має пошкоджуючої дії на здорові клітини.

TNF-a TNF-b – два близьких (подібних) білки (гомологічними є приблизно 30% амінокислотних залишків) – проявляють подібну активність до запальної реакції, імунних та пухлинних процесів. TNF-b або лімфотоксин був виявлений у лімфатичних вузлах імунізованих

щурів. Джерелом TNF-a є активований макрофаг, TNF-b – активована Т-клітина. Через однакові специфічні рецептори TNF клітинної поверхні обидва фактори викликають лізіс клітин лімфоми, некроз саркоми індукованої метилхолантреномом, активують поліморфно-ядерні лімфоцити, проявляють противірусну активність.

У літературі ми не знайшли інформацію про значення генотипів генів VEGF, TNF-a та TNF-b діагностиці та прогнозі протікання неопластичного процесу у хворих із раком сечового міхура в стадії T1, що і послужило предметом даного дослідження.

**Мета дослідження:** визначити поліморфізм генотипів генів VEGF, TNF-a та TNF-b у хворих із раком сечового міхура в стадії  $T_1N_0M_0$  і їх зв'язок зі ступенем неоплазії G.

Завдання:

1. Виявити різницю у співвідношенні генотипів генів VEGF, TNF-a та TNF-b та здорових осіб.

2. Дослідити зв'язок генотипів генів VEGF, TNF-a та TNF-b зі ступенем неоплазії G у хворих із раком сечового міхура  $T_1N_0M_0$ .

**Матеріали та методи дослідження.** У дослідженні вибрано 36 хворих із раком сечового міхура в стадії  $T_1N_0M_0$ . Із 36 хворих було 20 чоловіків та 16 жінок. Вік чоловіків складав  $57,1 \pm 5,0$ , жінок  $54,2 \pm 5,1$  року. 30 здорових осіб склало контрольну групу, гендерні особливості та вік відповідали показникам хворих із раком сечового міхура.

У 36 хворих РСМ G1 діагностовано в 2 пацієнтів, G<sub>2</sub> в 30 пацієнтів, G<sub>3</sub> в 4 пацієнтах.

Праймери для ампліфікації VEGF взяті з роботи Lee et al., умови ПЛР підбиралися експериментально. Для визначення G + 405C поліморфізму ампліфіковані фрагменти довжиною 273 п.н. піддавали рестрикційному розщепленню ендонуклеазою BsmFI. Продукти рестрикції

фракціонували в 2,2%-вому агарозному гелі з бромистим етидієм і візуалізували в УФ-світлі. Генотипи VEGF ідентифікували по довжині отриманих в ході рестрикції фрагментів: GG, GC, CC.

Патоморфологічне дослідження проводилось на світлооптичному мікроскопі «Prima Star», препарати фарбувались гематоксилін-еозином, переглядалися при збільшеннях 100 та 400 разів.

**Результати та їх обговорення.** Як представлено в табл. 1, із 36 хворих із РСМ в стадії T<sub>1</sub> в 16, що складає 46,7%, виявлено генотип GG, в 15, що склало 40,1%, генотип GC, в 5 – відповідно 13,3% виявлено генотип CC. Співвідношення генотипів GG / GC / CC гену VEGF склало 46,7% / 40,1% / 13,3% у здорових осіб відповідно 43,3% / 46,7% / 10%.

Як бачимо, із наведених даних спостерігається дисбаланс генотипів GG, GC, CC гену VEGF у хворих з С-г сечового міхура в стадії T<sub>1</sub>, у порівнянні із контрольною групою (здорові особи) – незначно збільшена наявність ге-

нотипу GG – 46,7% проти 43,3%, натомість спостерігається зменшення виявлення генотипу GC – у хворих 40,1% проти 46,7% в здорових, та збільшення виявлення генотипу CC – 13,3% у хворих проти 10% в контрольній групі.

Як представлено в таблиці 2, найчастіше у хворих з С-г сечового міхура в стадії T<sub>1</sub> виявлялися ступінь неоплазії G<sub>2</sub> – в 30 пацієнтів із 36 – в 14 з них, що склало 40%, виявлено генотип GG, в 11, що склало 26,7%, генотип GC, і 5 пацієнтів – CC, відповідно 13,3%.

У 4 пацієнтів у стадії T<sub>1</sub>G<sub>3</sub> – в 2(6,7%) виявлено генотип GG та ще в 2 (6,7%) генотип GC – гену VEGF.

Виходячи з наведених у таблиці 3 даних можна виявити різницю у співвідношенні генотипів GG/GA/AA гену TNF-а у хворих С-г сечового міхура T<sub>1</sub>, та здорових осіб (контрольна група). Співвідношення генотипів GG / GA / AA гену TNF-а у хворих С-г сечового міхура T<sub>1</sub> становить 43,75% / 56,25% / 0%, у здорових відповідно 48% / 30% / 2%. У наведених даних

Таблиця 1

Розподіл генотипів гену VEGF у хворих з РСМ у стадії T<sub>1</sub>

Групи	Генотипи					
	GG		GC		CC	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
T <sub>1</sub> G <sub>1</sub> , n=2	–	–	2	6,7	–	–
T <sub>1</sub> G <sub>2</sub> , n=30	14	40	11	26,7	5	13,3
T <sub>1</sub> G <sub>3</sub> , n=4	2	6,7	2	6,7	–	–
n=36	16	46,7	15	40,1	5	13,3
Контроль, n=30	13	43,3	14	46,7	3	10

Таблиця 2

Розподіл хворих із раком сечового міхура в стадії T<sub>1</sub> по степені неоплазії G

Групи	Неоплазія					
	G <sub>1</sub>		G <sub>2</sub>		G <sub>3</sub>	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
T <sub>1</sub>	2	5,5	30	83,3	4	11,1

Таблиця 3

Розподіл генотипів GG, GA, AA гену TNF-а у хворих з РСМ в стадії T<sub>1</sub>

Групи	Генотипи					
	GG		GA		AA	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
T <sub>1</sub> G <sub>1</sub> , n=2	2	6,25	–	–	–	–
T <sub>1</sub> G <sub>2</sub> , n=30	12	31,25	18	50	–	–
T <sub>1</sub> G <sub>3</sub> , n=4	2	6,25	2	6,25	–	–
n=36	16	43,75	20	56,25	–	–
Контроль, n=50	24	48	25	30	1	2

виявили, що наявність генотипу GA гену TNF-а у хворих із С-г сечового міхура  $T_1$  суттєво зростає в порівнянні зі здоровими особами, відповідно 56,25% – в здорових 30%, натомість наявність генотипу GG гену TNF -а у хворих С-г сечового міхура  $T_1$  зменшується – відповідно 43,7% та 48%.

У таблиці 3 представлено дані про розповсюдженість генів GG, GA, AA гену TNF-а у хворих С-г сечового міхура в стадії  $T_1$ . Як бачимо, найчастіше виявляли генотип GA у 20 із 36 хворих, що склало 56,25%, дещо рідше генотип GG у 16 пацієнтів, що склало 43,75%. В таблиці 3 наведені дані про зв'язок між ступенем неоплазії G та генотипами через TNF-а у хворих із раком сечового міхура в стадії  $T_1$ . Із 36 обстежених хворих із С-г сечового міхура в стадії  $T_1$ , найчастіше виявляли неоплазію  $G_2$  – у 30 пацієнтів, що склало 83,3%, з яких у 18 (50% від цієї групи) виявили генотип GA гену TNF-а. Виходячи з даних таблиці 3, в 31,25% хворих в стадії  $T_1$  виявляли генотип GG гену TNF-а. У хворих цієї групи в стадії  $T_1G_3$  – в 6,25% виявили генотип GC та GA. У цих же хворих із

PCM  $T_1$  зі ступенем неоплазії  $G_1$  – в 6,25% пацієнтів виявили генотип GG.

У таблиці 4 наведені дані про розподіл генотипів TT, TC, та CC гену TNF-b у хворих на С-г сечового міхура в стадії  $T_1$ . Як представлено в таблиці 4 із 36 хворих із С-г сечового міхура в стадії  $T_1$  – генотип TT гену TNF-b виявили у 12,5% пацієнтів, генотип TC у 56,2% та генотип CC у 31,25% хворих. У контрольній групі відповідно TT 13,3% / TC 56,2% / CC 31,25%. Якщо проаналізувати співвідношення генотипів генів VEGF, TNF-a, TNF-b, то можна зауважити, що найменші відхилення у співвідношенні генотипів у порівнянні до контрольної групи (практично здорові особи) виявлено в гені TNF-b, в якій відхилення від контрольної групи були в межах статистичної похибки. Як виходить із таблиці 4 найбільше хворих із С-г сечового міхура в стадії  $T_1$  було із неоплазією  $G_2$  – 30 осіб, в яких в 43,7% випадків виявлено генотип TC, на другому місці по частоті виявлений генотип CC – 25% пацієнтів із  $T_1G_2$ , значно менше був представлений генотип TT – в 12,5% пацієнтів.

Таблиця 4

Розподіл генотипів гену TNF-b у хворих з PCM в стадії  $T_1$

Групи	Генотипи					
	TT		TC		CC	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
$T_1G_1$ , n=2	–	–	2	6,25	–	–
$T_1G_2$ , n=30	4	12,5	17	43,7	9	25
$T_1G_3$ , n=4	–	–	2	6,25	2	6,25
n=36	4	12,5	21	56,2	11	31,25
Контроль, n=30	4	13,3	15	50	11	36,7

### Висновки

1. Співвідношення генотипів GG/GC/CC гену VEGF хворих С-г сечового міхура в стадії  $T_1$  склало 46,7% / 40,1% / 13,3%, у групі здорових осіб 43,3% / 46,7% / 10%.

2. Співвідношення генотипів GC/GA/AA гену TNF-а з хворих С-г сечового міхура в стадії  $T_1$  становить 43,75% / 56,25% / 0% у групі здорових осіб 43,3% / 46% / 10%.

3. Співвідношення генотипів TT / TC / CC гену TNF-b у хворих С-г сечового міхура в стадії

$T_1$  становить 12,5% / 56,2% / 31,25% відповідно у здорових 13,3% / 50% / 36,7%.

4. Із 36 хворих із С-г сечового міхура в стадії  $T_1$  у 83,3% пацієнтів виявили неоплазію  $G_2$ , у 11,1% – неоплазію  $G_3$  та у 5,5% –  $G_1$ .

5. У хворих із раком сечового міхура  $T_1G_2$  генотип GG гену VEGF виявили у 40% пацієнтів, GC – в 26,7%, генотип гену TNF-а GA виявили у 50% пацієнтів, GG – у 31,25% та генотип TC гену TNF-b – в 43,7% і CC – в 25% пацієнтів.

### Список літератури

1. Вікарчук М.В., Вітрук Ю.В., Котов В.П. Рецидивування поверхневого раку сечового міхура: [Електронний ресурс]. URL: <http://uroweb.org/guideline/non-muscle-invasive-bladder-cancer/>
2. Сайдакова Н.О., Клименко І.О., Заєць Ю.М. Тенденції прогнозу захворюваності на рак сечового міхура серед населення України // Здоров'я мужчини. – 2007. – № 1(20). – С. 168–171.

3. Identification of polymorphism within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production / C.J. Watson [et al.] // *Cytokine*. – 2000. – V. 12. – P. 1230–1235.

4. Vascular Endothelial Growth Factor Gene Polymorphisms and Risk of Primary Lung Cancer / S.J. Lee [et al.] // *Canc. Epid. Biom. and Prev.* – 2002. – V. 14. – P. 571–575.

5. Vascular endothelial growth factor polymorphisms in relation to breast cancer development and prognosis / Q. Jin [et al.] // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – V. 11, N 10. – P. 3647–3653.

## Реферат

ГЕНОТИПЫ ГЕНОВ VEGF, TNF-A И TNF-B У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ В СТАДИИ T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub> И ИХ СВЯЗЬ СО СТЕПЕНЬЮ НЕОПЛАЗИИ ОПУХОЛИ

В.С. Федевич

В исследование отобрано 36 больных с раком мочевого пузыря в стадии T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>.

Из 36 больных было 20 мужчин и 16 женщин. Возраст мужчин составлял 57,1±5,0, женщин 54,2±5,1 лет. 30 здоровых лиц составило контрольную группу, гендерные особенности и возраст соответствовал показателям больных раком мочевого пузыря.

Из 36 больных G<sub>1</sub> диагностировано у 2 пациентов, G<sub>2</sub> – у 30 пациентов, G<sub>3</sub> – у 4 пациентов. Соотношение генотипов GG / GC / CC гена VEGF больных раком мочевого пузыря в стадии T<sub>1</sub> составило 46,7% / 40,1% / 13,3%, в группе здоровых лиц 43,3% / 46,7% / 10%.

Соотношение генотипов GC / GA / AA гена TNF-а у больных раком мочевого пузыря в стадии T<sub>1</sub> составляет 43,75% / 56,25% / 0% в группе здоровых лиц 43,3% / 46% / 10%.

Соотношение генотипов TT / TC / CC гена TNF-b у больных раком мочевого пузыря в стадии T<sub>1</sub> составляет 12,5% / 56,2% / 31,25% соответственно у здоровых 13,3% / 50% / 36,7%.

Из 36 больных раком мочевого пузыря в стадии T<sub>1</sub> у 83,3% пациентов обнаружили неоплазию G<sub>2</sub>, у 11,1% – неоплазию G<sub>3</sub> и у 5,5% – G<sub>1</sub>. У больных раком мочевого пузыря T<sub>1</sub>G<sub>2</sub> генотип GG VEGF обнаружили у 40% пациентов, GC – у 26,7%, генотип TNF- а GA обнаружили у 50% пациентов, GG – у 31,25%, генотип TC гена TNF-b – у 43,7% и CC – у 25% пациентов.

**Ключевые слова:** карцинома, мочевого пузыря, генотип, фактор роста, фактор некроза, полиморфизм, дифференциация.

## Адреса для листування

В.С. Федевич

E-mail: fedevychvit@gmail.com

## Summary

GENOTYPES OF THE GENES OF VEGF, TNF-A AND TNF-B IN PATIENTS WITH BLADDER CANCER IN THE T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub> STAGE AND THEIR ASSOCIATION WITH THE DEGREE OF NEOPLASIA OF THE TUMOR

V.S. Fedevych

36 patients with bladder cancer in the T<sub>1</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub> stage were selected in the study

Of the 36 patients, there were 20 men and 16 women. The age of men was 57.1±5.0, women 54.2±5.1 years. Thirty healthy individuals constituted a control group, gender characteristics and age consistent with those of patients with bladder cancer.

36 patients with RSM G<sub>1</sub> were diagnosed in 2 patients, G<sub>2</sub> in 30 patients, G<sub>3</sub> in 4 patients. The ratio of GG / GC / CC GEG / GC / CC gene of VEGF patients to the C-r bladder in the T<sub>1</sub> stage was 46.7% / 40.1% / 13.3%, in the group of healthy subjects 43.3% / 46.7% / 10%.

The ratio of the genotypes of the GC / GA / AA gene of TNF-a to patients with C-r bladder in the T<sub>1</sub> stage is 43.75% / 56.25% / 0% in the group of healthy subjects, 43.3% / 46% / 10%.

The ratio of TT / TC / SS genotypes of the TNF-b gene in patients with C-r bladder in the T<sub>1</sub> stage is 12.5% / 56.2% / 31.25%, respectively, in healthy 13.3% / 50% / 36.7%.

Of the 36 patients with Cr with bladder Cr in the T<sub>1</sub> stage, 83.3% of patients showed G<sub>2</sub> neoplasia, 11.1% found G<sub>3</sub> neoplasia and 5.5% G<sub>1</sub> in G<sub>1</sub> patients. With T<sub>1</sub>G<sub>2</sub> bladder cancer, the GG VEGF genotype was detected in 40% of patients, GC in 26.7%, TNF-a genotype and GA were detected in 50% of patients, GG at 31.25%, and TNF-b gene genotype 43.7% and CC in 25% of patients.

**Keywords:** carcinoma, bladder, genotype, growth factor, necrosis factor, polymorphism, differentiation.