

ПРОГНОЗУВАННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ВНУТРІШНЬОМІХУРОВОЇ БЦЖ-ТЕРАПІЇ У ХВОРИХ НА РАК СЕЧОВОГО МІХУРА НА ПІДСТАВІ РІВНІВ ФАКТОРА РОСТУ ЕНДОТЕЛІЮ СУДИН, ФАКТОРІВ НЕКРОЗУ ПУХЛИНИ α ТА β

В.С. Федевич

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

Вступ. Згідно з даними національного канцер-реєстру, у 2018 році показник захворюваності на рак сечового міхура складав 11,4 особи на 100 тис. населення України. З числа вперше виявлених стадію Т3 мали 14,7% хворих, а показник смертності становив 8 на 100 тис. чоловіків та 1,3 – жінок [1]. Все вищенаведене підтверджує, що актуальність цієї онкоурологічної проблеми залишається донині.

Одним з основних факторів виживання і поширення пухлинних клітин є ангиогенез. Нині накопичено безліч даних, що підтверджують участь VEGF (фактор росту ендотелію судин – ФРЕС) і TNF (фактор некрозу пухлини – ФНП), відповідальних за мітогенну активність клітин, у розвитку та прогресуванні злоякісних новоутворень і, отже, є перспективними мішенями при використанні таргетної терапії [2, 3, 4].

TNF- α та TNF- β – два близьких (подібних) білки (гомологічними є приблизно 30% амінокислотних залишків) – проявляють подібну активність до запальної реакції, імунних та пухлинних процесів. TNF- β або лімфотоксин був виявлений у лімфатичних вузлах імунізованих щурів. Джерелом TNF- α є активований макрофаг, TNF- β – активована Т-клітина. Через однакові специфічні рецептори TNF-клітинної поверхні обидва фактори викликають лізис клітин лімфоми, некроз саркоми індукованої метилхолантрономом, активують поліморфно-ядерні лімфоцити, проявляють противірусну активність [5, 6].

Song Y. та співавт. [7] провели метааналіз 15 різноманітних публікацій з баз даних PubMed, Embase и Medline для оцінки зв'язку між поліморфізмом VEGF rs699947 та ризиком урологічних новоутворень. Авторами були доведені більш тісний зв'язок вказаного VEGF щодо ризику раку сечового міхура у гетерозиготній генетичній моделі (OR=1,48, 95%CI=1,17–1,89), а також підвищений ризик нирково-клітинного раку у домінантних, рецесивних гомо- та ге-

терозиготних генетичних моделях, але при раку передміхурової залози ніякої асоціації виявлено не було. Fu D. та співавт. [3] при дослідженні однонуклеотидних поліморфізмів з поліморфізмами генів VEGF, довели зв'язок з ризиком розвитку раку сечового міхура. у свою чергу Stingl Jankovic K. та співавт. [8] довели позитивний зв'язок алеля TNF- β у пацієнтів з раком передміхурової залози, що демонструє можливу роль в етіології захворювання.

Мета дослідження: вивчення ефективності застосування рівнів біомаркерів ФРЕС, ФНП- α та ФНП- β у сечі хворих на рак сечового міхура для прогнозування ефективності внутрішньоміхурової БЦЖ-терапії на її ранньому етапі.

Матеріал і методи дослідження. До дослідження увійшли 35 дорослих хворих на РСМ виключно стадії T₁N₀M₀, яким була виконана ТУР, середній вік яких становив 58,3 \pm 6,1 року. У всіх випадках спостерігався монофокальний варіант росту пухлини. Середній розмір пухлини до ТУР складав 1,6 \pm 1,7 см. Розподіл хворих згідно зі ступенем неоплазії мав наступний вигляд: G1 – 9 (25,7%) хворих, G2 – 15 (42,9%) пацієнтів та G3 – 11 (31,4%) осіб.

Усі досліді проводили у відповідності до Конвенції Ради Європи «Про захист прав людини і людської гідності у зв'язку з застосуванням досягнень біології та медицини: Конвенція про права людини та біомедицину (ETS № 164)» від 04.04.1997 р., і Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації (2008). Кожен пацієнт підписував інформовану згоду на участь у дослідженні і вжиті всі заходи для забезпечення анонімності пацієнтів.

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

BsmFI. Продукти рестрикції фракціонували в 2,2% агарозному гелі з бромистим етидієм і візуалізували в УФ-світлі. Патоморфологічне дослідження проводилось на світлооптичному мікроскопі «Prima Star», препарати фарбувались гематоксилін-еозином, переглядались при збільшеннях 100 та 400 разів.

Аналіз отриманих даних проводили за допомогою стандартних методів статистичної обробки з використанням програмного забезпечення Microsoft Office Excel та пакета програм Statistica v6.0. Статистичну обробку отриманих даних проводили методами непараметричної статистики. Як критерій достовірності різниці між групами використовували непараметричний U-критерій Манна–Уїтні і тест Вілкоксона. Також отримані дані представлені у вигляді медіани з мінімальним та максимальним розбігом для непараметричних складових. 95%-вий довірчий інтервал оцінювався з використанням моделей випадкових та фіксованих ефектів [9].

Результати та їх обговорення. У результаті проведеного дослідження, у 24 (68,6%) хворих на РСМ станом на 12-й місяць після початку інстиляції БЦЖ, за даними цистоскопії не було виявлено ознак відновлення пухлинного процесу (основна група). Розподіл згідно зі ступенем неоплазії у даній групі хворих мав наступний вигляд: G1 – 25,5% хворих, G2 – 40,5% пацієнтів та G3 – 34% хворих. Водночас, на той самий термін спостереження, у 11 (31,4) пацієнтів було зареєстровано гістологічно верифікований рецидив (група порівняння). Розподіл згідно зі ступенем неоплазії у даній групі був таким: G1 – 28,3% хворих, G2 – 39% пацієнтів та G3 – 32,7% осіб.

При проведенні ретроспективного аналізу було виявлено (табл. 1), що у хворих основної, порівняльної та контрольної груп вихідні середні значення ФРЕС у сечі становили 218,45±6,56 пг/мл, 221,15±6,84 пг/мл та

131,23±7,80 пг/мл відповідно. У хворих без ознак рецидиву на 2-й день після шостої інстиляції БЦЖ-вакцини, середній рівень ФРЕС залишався майже незмінним у порівнянні із вихідним показником і становив 219,37±5,33 пг/мл проти 218,45±6,56 пг/мл відповідно (p=0,45). Водночас, у групі порівняння середній рівень ФРЕС у сечі мав тенденцію до зростання порівняно з початковим значенням і складав 229,41±8,34 пг/мл та 221,15±6,84 пг/мл відповідно, проте, така різниця також не була достовірною (p=0,11).

Середні значення ФРЕС у сечі різних ступенів неоплазії (G1, G2, G3) як у основній групі, так і в групі порівняння не мали між собою статистично достовірних відмінностей до початку лікування та через 6 тижнів після (p>0,05).

Таким чином, визначення рівнів ФРЕС у сечі не продемонструвало доцільності їх застосування у прогнозуванні ефективності внутрішньоміхурової ад'ювантної БЦЖ-терапії у хворих на РСМ стадії T1N0M0.

За даними ретроспективного аналізу (табл. 2), у хворих основної групи порівняння та контрольної групи початкові середні значення ФНП-α в сечі не мали між собою статистично достовірної різниці і складали 349,26±6,11 пг/мл, 355,13±5,98 пг/мл та 352,68±6,75 пг/мл відповідно (p>0,05). Водночас, у хворих без ознак рецидиву на 2-й день після шостої інстиляції БЦЖ-вакцини, середній рівень ФНП-α достовірно зростав з 349,26±6,11 пг/мл до 445,32±6,12 пг/мл, що становило в середньому +27,5%, 95%ДІ=20,6–35,7 (p=0,04). На противагу цьому, у групі із рецидивом середній рівень ФНП-α у сечі був майже незмінним порівняно з початковим значенням і становив 355,13±5,98 пг/мл та 361,21±6,75 пг/мл відповідно, така різниця не була достовірною (p=0,21).

Середні значення ФНП-α в сечі різних ступенів неоплазії (G1, G2, G3) як у основній групі,

Таблиця 1

Динаміка рівнів ФРЕС у сечі у хворих на РСМ стадії T₁N₀M₀ до та на 6-й тиждень після внутрішньоміхурової БЦЖ-терапії, в залежності від характеру перебігу захворювання

Група	Середній рівень ФРЕС±Δ, пг/мл		p
	до лікування	через 6 тижнів	
Хворі з безрецидивним перебігом РСМ (n=24)	218,45±6,56	219,37±5,33	0,45
Рецидив РСМ (n=11)	221,15±6,84	229,41±8,34	0,11
Контроль (n=30)	131,23±7,80	134,51±5,53	0,42
P _{1,2}	0,55	0,12	–
P _{1,3}	0,04	0,04	–
P _{2,3}	0,04	0,03	–

Динаміка рівнів ФНП- α в сечі у хворих на РСМ стадії T1N0M0 до та на 6-й тиждень після внутрішньоміхурової БЦЖ-терапії, в залежності від характеру перебігу захворювання

Група	Середній рівень ФНП- $\alpha \pm \Delta$, пг/мл		p
	до лікування	через 6 тижнів	
Хворі з безрецидивним перебігом РСМ (n=24)	349,26 \pm 6,11	445,32 \pm 6,12	0,04
Рецидив РСМ (n=11)	355,13 \pm 5,98	361,21 \pm 6,75	0,21
Контроль (n=30)	352,68 \pm 6,75	356,45 \pm 6,41	0,34
P _{1,2}	0,35	0,03	–
P _{1,3}	0,31	0,03	–
P _{2,3}	0,36	0,33	–

так і в групі порівняння, як і у випадку з ФРЕС, не мали між собою статистично достовірних відмінностей до початку лікування та через 6 тижнів після нього (p>0,05).

З отриманих даних випливає, що підвищення ФНП- α (який, як відомо, відіграє важливу роль у процесах запуску процесів клітинного апоптозу, пригнічення росту пухлини, регулює продукцію прозапальних інтерлейкінів IL1 та IL6) при ад'ювантній внутрішньоміхуровій БЦЖ-терапії у хворих на РСМ стадії T1N0M0 пов'язане із позитивним терапевтичним ефектом, що в нашому дослідженні відобразалося у відсутності ознак рецидиву захворювання. Водночас, відсутність підвищення даного молекулярного маркера через 6 тижнів після початку індукуючої БЦЖ-терапії свідчило про недостатню запальну відповідь (або ж її відсутність) і як наслідок – рецидивуючому перебігу захворювання.

При вивченні показників ФНП- β у сечі хворих на РСМ було виявлено (табл. 3), що у хворих досліджуваних груп, до лікування вихідні середні значення даного молекулярного маркера суттєво між собою не відрізнялись і стано-

вили 36,23 \pm 5,63 пг/мл, 34,72 \pm 6,16 пг/мл та 33,82 \pm 4,62 пг/мл відповідно (p>0,05). Проте, ми виявили, що у хворих основної групи на 2-й день після шостої інстиляції БЦЖ-вакцини, середній рівень ФНП- β достовірно збільшувався з 36,23 \pm 5,63 пг/мл до 68,45 \pm 7,12 пг/мл, тобто в середньому +88,9%, 95%ДІ=76,5–98,4 (p=0,02). Однак у групі із рецидивуючим перебігом середній рівень ФНП- β у сечі суттєво не змінювався порівняно з початковим значенням і складав 34,72 \pm 6,16 пг/мл та 38,35 \pm 6,89 пг/мл відповідно (p=0,36).

Подібно до попередньо вивчених маркерів, середні значення ФНП- β в сечі різних ступенів неоплазії (G1, G2, G3) як у основній групі, так і в групі порівняння, не мали між собою статистично достовірних відмінностей до початку лікування та через 6 тижнів після нього (p>0,05).

Таким чином, як віддзеркалюють отримані дані, підвищений на 6-й тиждень після БЦЖ-інстиляцій, середній рівень промотора запальної відповіді ФНП- β , був тісно пов'язаний із позитивним терапевтичним ефектом індукуючої БЦЖ-терапії у хворих на РСМ стадії T1N0M0.

Таблиця 3

Динаміка рівнів ФНП- β в сечі у хворих на РСМ стадії T1N0M0 до та на 6-й тиждень після внутрішньоміхурової БЦЖ-терапії, в залежності від характеру перебігу захворювання

Група	Середній рівень ФНП- $\beta \pm \Delta$, пг/мл		p
	до лікування	через 6 тижнів	
Хворі з безрецидивним перебігом РСМ (n=24)	36,23 \pm 5,63	68,45 \pm 7,12	0,02
Рецидив РСМ (n=11)	34,72 \pm 6,16	38,35 \pm 6,89	0,36
Контроль (n=30)	33,82 \pm 4,62	35,14 \pm 5,45	0,31
P _{1,2}	0,32	0,02	–
P _{1,3}	0,33	0,02	–
P _{2,3}	0,39	0,33	–

Висновок. Таким чином, визначення молекулярних маркерів VEGF, TNF- α та TNF- β у сечі хворих на рак сечового міхура після вве-

дення внутрішньоміхурової БЦЖ-терапії може слугувати підставою для розробки нових методів лікування та оцінки їх ефективності.

Список літератури

1. Рак в Україні, 2017–2018. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби. Бюлетень Національного канцер-реєстру України № 20. Київ, 2019. С.58–59.
2. Попков В.М., Понукалин А.Н., Захарова Н.Б. Фактор роста эндотелия сосудов в диагностике метастазов мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря. *Онкоурология*. 2016. Т. 12, № 2. С. 53–57.
3. Fu D., Li P., Cheng W. et al. Impact of vascular endothelial growth factor gene-gene and gene-smoking interaction and haplotype combination on bladder cancer risk in Chinese population. *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, No 14. P. 22927–22935.
4. Song Y., Yang Y., Liu L., Liu X. Association between five polymorphisms in vascular endothelial growth factor gene and urinary bladder cancer risk: A systematic review and meta-analysis involving 6671 subjects. *Gene*. 2019. Vol. 698. P. 186–197.
5. Wang J., Shen C., Fu Y., Yu T., Song J. The associations between five polymorphisms of vascular endothelial growth factor and renal cell carcinoma risk: an updated meta-analysis. *Onco Targets Ther.* 2017. Vol. 10. P. 1725–1734. DOI: 10.2147/OTT.S125965.
6. Stingl Jankovic K., Hudolin T., Kastelan Z., Zunec R., Grubic Z. The possible role of the tumour necrosis factor polymorphisms and human leucocyte antigens in the development of prostate cancer. *Int J Immunogenet.* 2016. Vol. 43, No 3. P. 143–150. DOI: 10.1111/iji.12262.
7. Song Y., Hu J., Chen Q. et al. Association between vascular endothelial growth factor rs699947 polymorphism and the risk of three major urologic neoplasms (bladder cancer, prostate cancer, and renal cell carcinoma): A meta-analysis involving 11,204 subjects. *Gene*. 2018. Vol. 679. P. 241–252.
8. Shen M., Zhou L., Zhou P., et al. Lymphotoxin β receptor activation promotes mRNA expression of RelA and pro-inflammatory cytokines TNF α and IL-1 β in bladder cancer cells. *Mol Med Rep.* 2017. Vol. 16, No 1. P. 937–942. DOI: 10.3892/mmr.2017.6676.
9. Глантс С. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. М.: Практика, 1998. 459 с.

References

1. *Rak v Ukraini, 2017–2018. Zakhvoryuvanist, smertnist, pokaznyky diyalnosti onkologichnoi sluzhby [Cancer in Ukraine, 2017–2018. Morbidity, mortality, indicators of oncology service activity]*. (2019). Kyiv [in Ukrainian].
2. Попков, В.М., Понукалин, А.Н., & Захарова, Н.Б. (2016). Фактор роста эндотелия сосудов в диагностике метастазов мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря [Vascular endothelial growth factor in the diagnosis of metastases of muscle-invasive bladder cancer]. *Onkourolohiya. – Oncourology, 2, 12*, 53–57. doi: 10.17650/1726-9776-2016-12-2-53-57 [in Russian].
3. Fu, D., Li, P., Cheng, W., Tian, F., Xu, X., Yi, X., et al. (2017). Impact of vascular endothelial growth factor gene-gene and gene-smoking interaction and haplotype combination on bladder cancer risk in Chinese population. *Oncotarget, 8, 14*, 22927–22935. doi: 10.18632/oncotarget.15287.
4. Song, Y., Yang, Y., Liu, L., & Liu, X. (2019). Association between five polymorphisms in vascular endothelial growth factor gene and urinary bladder cancer risk: A systematic review and meta-analysis involving 6671 subjects. *Gene., 698*, 186–197. doi: 10.1016/j.gene.2019.02.070.
5. Wang, J., Shen, C., Fu, Y., Yu, T., & Song, J. (2017). The associations between five polymorphisms of vascular endothelial growth factor and renal cell carcinoma risk: an updated meta-analysis. *Onco Targets Ther., 10*, 1725–1734. doi: 10.2147/OTT.S125965.
6. Stingl Jankovic, K., Hudolin, T., Kastelan, Z., Zunec, R., & Grubic, Z. (2016). The possible role of the tumour necrosis factor polymorphisms and human leucocyte antigens in the development of prostate cancer. *Int J Immunogenet., 43, 3*, 143–150. doi: 10.1111/iji.12262.
7. Song, Y., Hu, J., Chen, Q., Guo, J., Zou, Y., Zhang, W., et al. (2018). Association between vascular endothelial growth factor rs699947 polymorphism and the risk of three major urologic neoplasms (bladder cancer, prostate cancer, and renal cell carcinoma): A meta-analysis involving 11,204 subjects. *Gene., 679*, 241–252. doi: 10.1016/j.gene.2018.09.005.

8. Shen, M., Zhou, L., Zhou, P., Zhou, W., & Lin, X. (2017). Lymphotoxin β receptor activation promotes mRNA expression of RelA and pro-inflammatory cytokines TNF α and IL-1 β in bladder cancer cells. *Mol Med Rep.*, 16, 1, 937–942. doi: 10.3892/mmr.2017.6676.

Реферат

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВНУТРИПУЗЫРНОЙ БЦЖ-ТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ НА ОСНОВАНИИ УРОВНЯ ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ, ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ α И β

В.С. Федевич

В нашем исследовании изучалась эффективность применения уровней биомаркеров фактора роста эндотелия сосудов (ФРЭС), фактора некроза опухоли (ФНО)- α и ФНО- β в моче больных раком мочевого пузыря (РМП) для прогнозирования эффективности внутрипузырной БЦЖ-терапии на ее раннем этапе. В исследование вошли 35 взрослых больных РМП исключительно стадии T1N0M0, которым была выполнена трансуретральная резекция, средний возраст которых составлял $58,3 \pm 6,1$ лет.

Средние значения ФРЭС в моче пациентов с различной степенью неоплазии (G1, G2, G3) как в основной группе, так и в группе сравнения не имели между собой статистически достоверных различий до начала лечения и через 6 недель после ($p > 0,05$). Таким образом, определение уровней ФРЭС в моче не продемонстрировало целесообразности их применения в прогнозировании эффективности внутрипузырной адьювантной БЦЖ-терапии у больных РМП стадии T1N0M0.

Повышение ФНО- α при адьювантной внутрипузырной БЦЖ-терапии у больных РМП стадии T1N0M0 связано с положительным терапевтическим эффектом, что в нашем исследовании выражалось в отсутствии признаков рецидива заболевания. В то же время, отсутствие повышения данного молекулярного маркера через 6 недель после начала индуцирующей БЦЖ-терапии свидетельствовало о недостаточном воспалительном ответе (или его отсутствии) и, как следствие, – рецидивирующем течении заболевания.

Подобно предварительно изученным маркерам, средние значения ФНО- β в моче пациентов с различной степенью неоплазии (G1, G2, G3) как в основной группе, так и в группе сравнения, не имели между собой статистически до-

Summary

PREDICTION OF THE EFFICACY OF INTRAVESICAL BCG THERAPY IN PATIENTS WITH BLADDER CANCER BASED ON THE LEVEL OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR, TUMOR NECROSIS FACTOR α AND β

V.S. Fedevych

In our study, we studied the effectiveness of the use of biomarker levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), tumor necrosis factor (TNF)- α and TNF- β in the urine of patients with bladder cancer (BC) to predict the effectiveness of intravesical BCG therapy at its early stage. The study included 35 adult patients with BC exclusively of the T1N0M0 stage, who underwent transurethral resection, the average age of which was 58.3 ± 6.1 years.

The mean values of the VEGF in the urine of patients with various degrees of neoplasia (G1, G2, G3) in the main group and in the comparison group did not have statistically significant differences between themselves before treatment and 6 weeks after ($p > 0.05$). Thus, the determination of the levels of VEGF in urine did not demonstrate the appropriateness of their use in predicting the effectiveness of intravesical adjuvant BCG therapy in patients with BC stage T1N0M0.

An increase in TNF- α in adjuvant intravesical BCG therapy in patients with BC stage T1N0M0 is associated with a positive therapeutic effect, which in our study was expressed in the absence of signs of disease recurrence. At the same time, the absence of an increase in this molecular marker 6 weeks after the initiation of BCG-inducing therapy indicated an insufficient inflammatory response (or its absence) and, as a consequence, a relapsing course of the disease.

Like previously studied markers, the mean values of TNF- β in the urine of patients with various degrees of neoplasia (G1, G2, G3) in the main group and in the comparison group did not have statistically significant differences between themselves before treatment and 6 weeks after him ($p > 0.05$). The average level of the promoter of the inflammatory response of TNF- β increased at the 6th week after BCG instillation was closely associated with the positive therapeutic effect of

стоверных различий до начала лечения и через 6 недель после него ($p > 0,05$). Повышенный на 6-й неделе после БЦЖ-инстилляций средний уровень промотора воспалительного ответа ФНО- β , был тесно связан с положительным терапевтическим эффектом индуцирующей БЦЖ-терапии у больных РМП стадии T1N0M0.

Таким образом, определение молекулярных маркеров ФРЭС, ФНО- α и ФНО- β в моче больных раком мочевого пузыря после введения внутривезикулярной БЦЖ-терапии может служить основанием для разработки новых методов лечения и оценки их эффективности.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, фактор роста эндотелия сосудов, фактор некроза опухоли, полиморфизм, внутривезикулярная БЦЖ-терапия.

Адреса для листування

В.С. Федевич

E-mail: tatyana.torak@gmail.com

inducing BCG therapy in patients with stage T1N0M0 RMP.

Thus, the determination of molecular markers of VEGF, TNF- α and TNF- β in the urine of patients with bladder cancer after administration of intravesical BCG therapy can serve as the basis for the development of new methods of treatment and evaluation of their effectiveness.

Keywords: bladder cancer, vascular endothelial growth factor, tumor necrosis factor, polymorphism, intravesical BCG therapy.