



Оригинальная статья

Связь полиморфизма rs2010963 гена *VEGFA* с развитием и прогрессированием рака шейки матки

Рогалев А.В.¹ • Кишеня М.С.¹ • Пищулина С.В.¹ • Хомутов Е.В.¹

Рогалев Артем Валериевич – канд. мед. наук, доцент, доцент кафедры онкологии и радиологии¹; ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-7781-6833>. E-mail: dr.onc.art@mail.ru

Кишеня Мария Сергеевна – канд. мед. наук, ст. науч. сотр., начальник отдела молекулярно-генетических исследований Центральной научно-исследовательской лаборатории¹; ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-7987-4091>
✉ 83003, г. Донецк, пр-т Ильича, 16, Российская Федерация. E-mail: maria.kishenya@gmail.com

Пищулина Светлана Владимировна – канд. мед. наук, ст. науч. сотр., доцент кафедры патологической физиологии им. проф. Н.Н. Транквилиати¹. E-mail: svetlana-pishulina@mail.ru

Хомутов Евгений Владимирович – канд. хим. наук, заведующий Центральной научно-исследовательской лабораторией¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5621-0304>. E-mail: cnil@dnmu.ru

Актуальность. Рак шейки матки (РШМ) – наиболее распространенная форма злокачественных новообразований женской половой системы. В России заболеваемость РШМ составляет 17–19 случаев на 100 тыс. женского населения. РШМ характеризуется высокой активностью, быстрым формированием радио-/химиорезистентности, и сопровождается неблагоприятным прогнозом. Для оценки риска рецидива, метастазирования и для определения оптимальной тактики лечения РШМ изучаются факторы, связанные с прогрессированием заболевания. Повышенная экспрессия фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) связана со степенью опухолевого ангиогенеза и с неблагоприятным прогнозом при различных видах рака, включая РШМ. **Цель** – изучить связь полиморфизма rs2010963 гена *VEGFA* с риском развития и прогрессирования РШМ.

Материал и методы. В исследование «случай – контроль» включены 120 пациенток (возраст 49 [42; 65] лет) с установленным РШМ I–II стадии и 112 женщин без РШМ, а также других онкологических заболеваний. По результатам патогистологического исследования были сформированы две подгруппы: с наличием опухолевых эмболов (ОЭ+) в сосудах опухоли и перитуморозной ткани (41 пациентка; 34,17%) и без опухолевых эмболов (ОЭ-) (79 пациенток; 65,83%). Анализ полиморфных ДНК-локусов rs2010963 гена *VEGFA* проводили с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. У пациенток с РШМ с развитием заболевания был связан аллельный полиморфизм ($\chi^2 = 5,47$; $p = 0,021$) rs2010963 гена *VEGFA*.

Минорная аллель С увеличивала шансы развития РШМ в 1,6 раза (отношение шансов (ОШ) 1,58, 95% доверительный интервал (ДИ) 1,08–2,31), а предковая аллель G уменьшала шансы развития заболевания (ОШ 0,63, 95% ДИ 0,43–0,93). Распределение генотипов в доминантной модели (GG и GC + CC), а именно условие наличия в генотипе минорной аллели С (GC + CC), подтверждало наличие ассоциации rs2010963 гена *VEGFA* с РШМ ($\chi^2 = 4,73$; $p = 0,031$). Установлена связь аллельного полиморфизма rs2010963 гена *VEGFA* с развитием РШМ с наличием ОЭ в сосудах опухоли и окружающих ее тканях ($\chi^2 = 3,94$; $p = 0,049$) как неблагоприятного фактора прогрессирования и метастазирования РШМ. Минорная аллель С увеличивала шансы развития ОЭ в 1,7 раза (ОШ 1,72, 95% ДИ 1,004–2,98), тогда как предковая аллель G эти шансы снижала (ОШ 0,58, 95% ДИ 0,34–0,996).

Заключение. Аллель С полиморфизма rs2010963 гена *VEGFA* – фактор риска развития РШМ, а также фактор риска появления опухолевых эмболов.

Ключевые слова: рак шейки матки, опухолевые эмболы, полиморфизм, ген *VEGFA*

Для цитирования: Рогалев АВ, Кишеня МС, Пищулина СВ, Хомутов ЕВ. Связь полиморфизма rs2010963 гена *VEGFA* с развитием и прогрессированием рака шейки матки. Альманах клинической медицины. 2023;51. doi: 10.18786/2072-0505-2023-51-041.

Поступила 19.10.2023; доработана 24.11.2023; принята к публикации 27.11.2023; опубликована онлайн 05.12.2023

¹ ФГБОУ ВО «Донецкий государственный медицинский университет имени М. Горького» Минздрава России; 83003, г. Донецк, пр-т Ильича, 16, Российская Федерация

Рак шейки матки (РШМ) – один из наиболее распространенных видов рака, занимающий четвертое место в структуре онкологических заболеваний после рака молочной железы, колоректального рака и рака легкого, а также третье место по смертности

среди женщин с онкологическими заболеваниями в странах Африки, Азии и Латинской Америки [1, 2]. В России заболеваемость РШМ составляет 17–19 случаев на 100 тыс. женского населения, увеличившись на 23,9% за последнее десятилетие [3, 4]. В структуре заболеваемости злокачественными



новообразованиями РШМ занимает 6-е место, в структуре смертности от онкологических заболеваний – 7-е место, в структуре онкогинекологической патологии – 2-е место. Заболеваемость РШМ связана с инфицированием вирусами папилломы человека, особенно типов 16, 18, 31 и 35 [5, 6].

Среди прогностических факторов РШМ, связанных с формированием групп риска пациентов на ранних стадиях заболевания, выделяют несколько патологических параметров – размер, гистологический тип, степень дифференцировки опухоли, глубина инвазии, перинеуральная инвазия, опухолевые эмболы в кровеносных и лимфатических сосудах, количество инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, состояние лимфатических узлов и др. [7–10]. Однако, несмотря на многочисленные исследования, проблема РШМ все еще остается одной из самых актуальных, что объясняется ростом частоты рецидивов и высокими показателями смертности, составляющими 40–50% в течение 5-летнего наблюдения [5, 6, 11].

РШМ относится к наиболее агрессивным видам рака, характеризуется ранним формированием опухолевых сосудов гемоциркуляторного и лимфоциркуляторного русла, которые способствуют быстрой прогрессии и метастазированию [12–14]. Патогенетическая роль опухолевого ангиогенеза заключается в создании условий для перемещения трансформированных клеток в лимфатические узлы, органы и ткани. К наиболее распространенным формам опухолевого ангиогенеза относят прорастание, кооптацию, васкулогенную мимикрию, инвагинационный ангиогенез; для них характерны незрелость и незавершенность гистогенеза, развитие метаболических нарушений в опухоли в виде гипоксии за счет дефицита поступления кислорода и питательных веществ [15–17]. Ответ опухолевых клеток на гипоксию связан с увеличением уровня индуцируемого гипоксией фактора-1 α (HIF-1 α). HIF-1 α – один из ключевых факторов транскрипции, ответственных за регуляцию экспрессии множества генов во время гипоксии [18]. Повышение уровня экспрессии HIF-1 α направлено на перестройку метаболизма опухолевых клеток, способствуя их инвазии и метастазированию, увеличению поступления кислорода посредством ангиогенеза [19, 20], что сопровождается формированием причинно-следственных отношений в виде «порочного круга» онкогенеза.

Среди факторов, участвующих в регуляции опухолевого ангиогенеза, ключевое место занимает фактор роста эндотелия сосудов (VEGF). VEGF представляет семейство полипептидов, включающее VEGF-A, -B, -C, -D, -E и плацентарный фактор

роста (PLGF) [21]. VEGF действует на рецепторы VEGFR, способствуя артериальному, венозному и лимфатическому ангиогенезу, выполняя важную роль в росте опухоли и метастазировании [22, 23]. Ген *VEGF* расположен на хромосоме 6p21.3, имеет восемь экзонов и семь интронов, в которых выявлено более 30 полиморфных участков, связанных с однонуклеотидными заменами (SNP); они демонстрируют альтернативный сплайсинг, образуя семейство белков [24]. Замены в нуклеотидной последовательности ДНК в гене *VEGF* могут приводить к изменению продукции и/или активности фактора VEGF, тем самым обуславливая различные варианты предрасположенности к развитию и прогрессированию РШМ в результате влияния на механизмы опухолевого ангиогенеза. Наличие полиморфных участков в регуляторных регионах гена *VEGFA* способно влиять на уровень экспрессии мРНК и изменять, таким образом, интенсивность синтеза VEGF. При изучении полиморфизма rs2010963 (G-634C) гена *VEGFA* была установлена ассоциация С-аллели с высоким уровнем экспрессии VEGF [25]. Обнаружено также, что генотип СС связан с более высокой концентрацией VEGF в крови по сравнению с генотипами СG и GG [26, 27]. Повышенная экспрессия VEGF связана со степенью ангиогенеза и неблагоприятным прогнозом при различных видах рака, включая РШМ [28].

С учетом высокой заболеваемости, частоты рецидивов и смертности, постоянно ведется поиск новых параметров, которые могли бы обеспечить прогностическую оценку клинического течения РШМ. В связи с этим особое значение приобретает исследование маркеров, позволяющих прогнозировать развитие РШМ и степень прогрессирования с метастазированием и рецидивированием [12–14, 29]. Настоящее исследование было направлено на выяснение генетической роли полиморфизма rs2010963 гена *VEGFA* как предрасполагающего фактора развития и прогрессирования РШМ.

Цель – изучить связь полиморфизма rs2010963 гена *VEGFA* с риском развития и прогрессирования РШМ.

Материал и методы

В исследование «случай – контроль» для определения связи полиморфизма rs2010963 гена *VEGFA* с РШМ были включены 120 женщин (возраст 49 [42; 65] лет) с диагнозом РШМ I–II стадии (TNM (2009) и FIGO (2018)) [30], проходивших лечение в период с 2005 по 2023 г. в Республиканском онкологическом центре им. проф. Г.В. Бондаря Минздрава ДНР. Пациенткам проводили радикальную гистерэктомию по Вертгейму с последующим



патогистологическим исследованием. По результатам патогистологического исследования были сформированы две подгруппы: с наличием опухолевых эмболов (ОЭ+) в сосудах опухоли и перитуморозной ткани (41 пациентка; 34,17%) и без опухолевых эмболов (ОЭ-) (79 пациенток; 65,83%). Контрольную группу составили 112 женщин (возраст 50 [40; 62] лет) без РШМ в анамнезе, а также других онкологических заболеваний. Пациентки основной и контрольной групп были сопоставимы по возрасту ($p > 0,05$).

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2004). Все участницы исследования подписывали добровольное информированное согласие. Протокол исследования одобрен локальным этическим комитетом при ФГБОУ ВО ДонГМУ Минздрава России (протокол № 4/5-1 от 04.02.2021).

Анализ полиморфизма rs2010963 гена *VEGFA* изучали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с дальнейшей электрофоретической разгонкой продуктов амплификации в 3% агарозном геле от источника постоянного тока «Эльф-4» (ООО «ДНК-Технология», Россия). Детекцию фрагментов ДНК осуществляли после окрашивания 1% раствором бромистого этидия в проходящем ультрафиолетовом свете при длине волны 312 нм в трансиллюминаторе TFX-20 M («Vilber Lourmat», Франция). Выделение геномной ДНК из лейкоцитов цельной венозной крови проводили с использованием комплекта реактивов «ДНК-экспресс-кровь» НПФ «Литех» (Россия). ПЦР осуществляли на амплификаторе IQ5 («BIO-RAD», США). С каждым образцом выделенной ДНК проводили амплификацию с двумя аллель-специфичными праймерами соответственно контексту SNP (G-634C). В качестве набора реагентов для амплификации применяли «SNP-экспресс, *VEGFA*(-C634G)» (НПФ

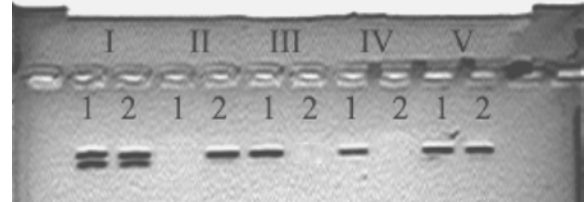


Рис. 1. Фрагмент агарозного геля после электрофоретического разделения продуктов амплификации rs2010963 гена *VEGFA*: I, II, III, IV, V – номера исследуемых образцов ДНК; 1-я дорожка – фрагменты ДНК, специфичные к аллели G; 2-я дорожка – фрагменты ДНК, специфичные к аллели C. Пример заключения: образцы I и V – генотип GC; образец II – генотип CC; образцы III и IV – генотип GG

«Литех», Россия). Готовили две ПЦР-смеси для аллелей G и C, содержащие по 17,5 мкл разбавителя, по 2,5 мкл реакционной смеси, включавшей праймеры для аллелей G и C, 0,2 мкл Taq-полимеразы, вносили 5 мкл образца ДНК. ПЦР-смеси с образцом ДНК инкубировали при 93 °C в течение 60 с; затем 35 циклов при 95 °C – 10 с, при 64 °C – 10 с, при 72 °C – 20 с, при 72 °C – 60 с. Каждая проба ДНК занимала в геле 2 лунки, в которые помещали продукты амплификации с аллель-специфичными праймерами для rs2010963 гена *VEGFA*: 1-я лунка содержала фрагменты ДНК, специфичные к аллели G, 2-я – к аллели C (рис. 1).

Статистическую обработку данных проводили при помощи методов вариационной статистики с использованием пакета компьютерных программ Statistica 10 (StatSoft, Inc., США). Частоты распределения генотипов в исследуемых выборках проверяли на отклонение от равновесия Харди – Вайнберга с помощью критерия χ^2 Пирсона [31]. Статистическую значимость различий в распределении частот генотипов и аллелей при сравнении групп «случай – контроль» оценивали с помощью анализа таблиц сопряженности по критерию χ^2 . Степень ассоциации генотипов и аллелей с заболеванием определяли по величине отношения шансов (ОШ). Величина ОШ более 1 указывала на повышение, а ниже 1 – на снижение риска, при условии попадания в 95% доверительный интервал (95% ДИ). Все различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Распределение частот генотипов полиморфизма rs2010963 гена *VEGFA* и оценку соответствия популяционного равновесия Харди – Вайнберга проводили отдельно в контрольной группе (РШМ-) и в группе пациентов с РШМ. Отклонения равновесия Харди – Вайнберга для полиморфизма rs2010963 гена *VEGFA* не установлено (табл. 1).

Таблица 1. Распределение генотипов полиморфизма C-634G гена *VEGFA* в соответствии с равновесием Харди – Вайнберга в группах пациенток с раком шейки матки и без рака шейки матки

| Генотип | Пациентки с РШМ, абс. (%) (n = 120)* | Контрольная группа, абс. (%) (n = 112)** |
|---------|---|---|
| GG | 41 (34,0) | 54 (48,2) |
| GC | 59 (49,0) | 47 (42,0) |
| CC | 20 (17,0) | 11 (9,8) |

РШМ – рак шейки матки

* $\chi^2 = 0,025$; $p = 1,031$

** $\chi^2 = 0,027$; $p = 1,03$

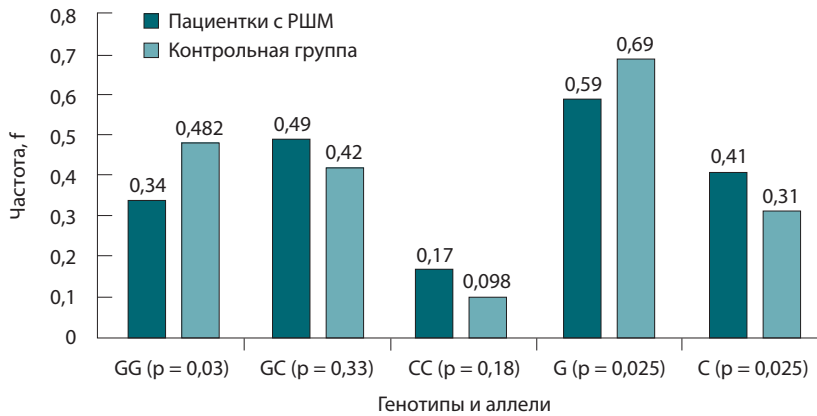


Рис. 2. Результаты распределения генотипов и аллелей полиморфизма rs2010963 гена *VEGFA* в группах пациенток с раком шейки матки (РШМ) и без РШМ; p – статистическая значимость различий частот показателей между группами

Распределение генотипов и аллелей полиморфизма rs2010963 гена *VEGFA* показало статистически значимые различия для предкового генотипа GG (p = 0,03) и аллелей (p = 0,025) при сопоставлении основной группы и группы сравнения (рис. 2).

Генотип GG встречался в 1,42 раза реже в группе пациенток с РШМ в сравнении с контрольной группой (34 и 48,2% соответственно). Частота гетерозиготного и минорного генотипов GC и CC увеличивалась в 1,2 и 1,7 раза соответственно, но их распределение не было статистически значимым (p = 0,33 и p = 0,18).

Анализ различий в распределении аллелей в основной группе (РШМ+) и группе сравнения (РШМ-) показал статистически значимые результаты: предковая аллель G встречалась в 1,2 раза реже (у 59% против 69%, p = 0,025), а минорная аллель C – в 1,32 раза чаще (у 41% против 31%, p = 0,025).

Для проверки связи между полиморфизмом rs2010963 гена *VEGFA* и РШМ были применены множественные модели наследования (кододоминантная, мультипликативная доминантная и рецессивная) [31, 32]. На основании логистического регрессионного анализа установлено: полиморфизм rs2010963 гена *VEGFA* коррелировал с увеличением риска развития РШМ в мультипликативной ($\chi^2 = 5,47$; p = 0,021) и доминантной ($\chi^2 = 4,73$; ОШ 1,79, 95% ДИ 1,06–3,04, p = 0,031) моделях. Минорная аллель C увеличивала шансы развития РШМ в 1,6 раза (ОШ 1,58, 95% ДИ 1,08–2,31), а предковая аллель G уменьшала шансы развития заболевания (ОШ 0,63, 95% ДИ 0,43–0,93). Распределение генотипов в доминантной модели (GG и GC + CC) имело статистическую значимость ($\chi^2 = 4,73$; p = 0,031), что подтверждало наличие ассоциации rs2010963 гена *VEGFA* с РШМ, а именно, при условии наличия в генотипе минорной аллели C (GC + CC). В кододоминантной и рецессивной моделях полиморфизм rs2010963 гена *VEGFA* не имел связи с развитием РШМ ($\chi^2 = 5,48$; p = 0,067 и $\chi^2 = 2,35$; p = 0,119 соответственно) (табл. 2).

Таблица 2. Анализ связи между полиморфизмом rs2010963 гена *VEGFA* и риском развития рака шейки матки

| Генотипы/аллели | Пациентки с РШМ, абс. (f) (n = 120) | Контрольная группа, абс. (f) (n = 112) | χ^2 | p | ОШ | 95% ДИ |
|---------------------------------|-------------------------------------|--|----------|-------|-------|-------------|
| Кододоминантная модель | | | | | | |
| GG | 41 (0,34) | 54 (0,482) | 5,48 | 0,067 | 0,557 | 0,328–0,946 |
| GC | 59 (0,49) | 47 (0,420) | | | 1,338 | 0,796–2,247 |
| CC | 20 (0,17) | 11 (0,098) | | | 1,836 | 0,837–4,03 |
| Мультипликативная модель | | | | | | |
| G | 141 (0,59) | 155 (0,69) | 5,47 | 0,021 | 0,634 | 0,432–0,93 |
| C | 99 (0,41) | 69 (0,31) | | | 1,577 | 1,076–2,31 |
| Доминантная модель | | | | | | |
| GG | 41 (0,342) | 54 (0,482) | 4,73 | 0,031 | 0,557 | 0,328–0,986 |
| GC + CC | 79 (0,658) | 58 (0,518) | | | 1,794 | 1,057–3,044 |
| Рецессивная модель | | | | | | |
| GG + GC | 100 (0,833) | 101 (0,902) | 2,35 | 0,119 | 0,545 | 0,248–1,076 |
| CC | 20 (0,167) | 11 (0,098) | | | 1,836 | 0,837–4,03 |

χ^2 – критерий Пирсона, f – частота, p – статистическая значимость различий между группами, 95% ДИ – 95% доверительный интервал для отношения шансов (ОШ), РШМ – рак шейки матки

**Таблица 3.** Анализ связи между полиморфизмом rs2010963 гена *VEGFA* и распространением опухолевых эмболов при раке шейки матки

| Генотипы/аллели | Пациентки с РШМ и ОЭ, абс. (f) (n = 41) | Пациентки с РШМ без ОЭ, абс. (f) (n = 79) | χ^2 | p | ОШ | 95% ДИ |
|-----------------|--|--|----------|-------|-------|-------------|
| GG | 10 (0,244) | 31 (0,392) | 4,025 | 0,14 | 0,499 | 0,215–1,161 |
| GC | 21 (0,512) | 38 (0,481) | | | | |
| CC | 10 (0,244) | 10 (0,127) | | | | |
| G | 41 (0,50) | 100 (0,633) | 3,935 | 0,049 | 0,580 | 0,338–0,996 |
| C | 41 (0,50) | 58 (0,367) | | | | |

χ^2 – критерий Пирсона, f – частота, p – статистическая значимость различий между группами, 95% ДИ – 95% доверительный интервал для отношения шансов (ОШ), ОЭ – опухолевые эмболы, РШМ – рак шейки матки

Далее проведено исследование связи rs2010963 гена *VEGFA* с наличием ОЭ в сосудах опухоли и перитуморозной ткани (табл. 3). Анализ генотипов rs2010963 по таблице сопряженности показал отсутствие влияния на формирование ОЭ в гемодинамическом русле ($\chi^2 = 4,03$; p = 0,14). Сравнение частот аллелей показало наличие влияния rs2010963 на появление ОЭ ($\chi^2 = 3,94$; p = 0,049). Таким образом, аллельный полиморфизм rs2010963 гена *VEGFA* имел связь с формированием ОЭ как неблагоприятного фактора прогрессирования РШМ, при этом минорная аллель С увеличивала шансы развития ОЭ в 1,7 раза (ОШ 1,72, 95% ДИ 1,004–2,98), тогда как предковая аллель G эти шансы снижала (ОШ 0,58, 95% ДИ 0,34–0,996). Это позволяло считать минорную аллель С фактором риска формирования ОЭ при РШМ, тогда как предковую аллель G – протективным фактором.

Обсуждение

Проведенное исследование позволило установить связь полиморфизма гена *VEGFA* с риском развития и прогрессирования РШМ. Наличие аллельного варианта С полиморфизма гена *VEGFA* приводило к риску развития РШМ, а также было связано с инвазией опухолевых клеток в кровеносные сосуды с формированием ОЭ при РШМ. Носительство минорной аллели С полиморфизма гена *VEGFA* сопряжено с гиперэкспрессией гена *VEGFA* и приводит к избыточному синтезу фактора роста, что служит патогенетическим фактором канцерогенеза [25].

Клинико-патогенетические особенности опухолевого роста и процесса интравазации как начальной стадии метастазирования включают механизмы образования новых кровеносных сосудов [33]. Ген *VEGFA* – ключевой генетический маркер, связанный с ангиогенезом. Ангиогенный фактор *VEGFA* участвует в реализации молекулярно-клеточных

механизмов, регулирующих увеличение проницаемости сосудов, пролиферацию, миграцию и дифференцировку эндотелиальных клеток. *VEGFA* секретируется нейтрофилами, моноцитами/макрофагами, тромбоцитами, активированными Т-клетками, а также эндотелиальными и опухолевыми клетками [34]. *VEGFA* опосредует реакции ангиогенеза, сосудистой проницаемости и воспаления путем связывания с тирозинкиназными рецепторами VEGFR1 и VEGFR2, экспрессируемыми главным образом на эндотелии и опухолевых клетках [35].

VEGF-индуцированные сосуды опухоли имеют аномальный тип строения с тонкими стенками и структурной дезорганизацией в виде сосудистого сплетения, что способствует росту опухоли, инвазии и метастазированию с интравазацией опухолевых клеток и образованием ОЭ в сосудах опухоли и перитуморозной ткани [36]. Установленная ассоциация полиморфизма гена *VEGFA* с формированием ОЭ свидетельствовала об активном участии ангиогенного фактора роста в инвазии через эндотелиальный барьер. Вероятно, наличие аллельного полиморфизма гена *VEGFA* индуцировало пролиферацию эндотелиальных клеток со слабыми межклеточными контактами, создающими условия для интравазации опухолевых клеток. Известно, что *VEGFA* индуцирует интернализацию эндотелиального кадгерина, тем самым уменьшая его количество в адгезионных соединениях и повреждая барьер эндотелиальных клеток с дальнейшим повышением проницаемости кровеносных сосудов для инвазии опухолевых клеток [37, 38]. Вместе с тем *VEGFA* запускает инфильтрацию опухолевой ткани макрофагами, нейтрофилами, вызывает активацию плазминогена и матриксных металлопротеиназ, способствующих деградациии базальной мембраны и внеклеточного матрикса при инфильтративном росте и интравазации [39].



В исследовании [40] была установлена связь полиморфизма rs2010963 гена *VEGFA* с метастазированием в тазовые лимфатические узлы при ранней стадии РШМ, с экспрессией и продукцией белка VEGF, индуцирующего пролиферацию и миграцию эндотелиоцитов, а также синтез металлопротеиназ, необходимых для инвазии новообразованных сосудов в окружающие ткани [41–43].

Установление прогностических критериев, как при выявлении рака, так и при определении степени прогрессирования и метастазирования РШМ, – важная задача современных онкологических исследований, решение которой направлено на оптимизацию диагностики и подбор эффективных схем лечения. Изучение генетического

маркера rs2010963 гена *VEGFA* позволит прогнозировать развитие и прогрессирование РШМ.

Заключение

В нашем исследовании минорная аллель С rs2010963 гена *VEGFA* увеличивала шансы развития РШМ, будучи фактором риска данного заболевания. Впервые установлена связь между аллельным полиморфизмом С rs2010963 гена *VEGFA* и наличием ОЭ, что позволяет считать данный полиморфизм генетическим маркером для пациенток с РШМ и ОЭ. Исследование добавило новые доказательства того, что полиморфизм rs2010963 гена *VEGFA* играет важную роль в прогрессировании РШМ, что может стать ценным инструментом при прогнозе заболевания. ☺

Дополнительная информация

Финансирование

Работа проведена в рамках выполнения Госзадания Минздрава России, рег. № НИОКТР ZUNO–2023–0001.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Участие авторов

А.В. Роголев – разработка дизайна клинической части исследования, формирование групп пациентов и сбор клинического материала, анализ полученных данных, редактирование текста, утверждение

итогового варианта текста рукописи; М.С. Кишняя – анализ литературы, проведение молекулярно-генетических исследований методом полимеразной цепной реакции, анализ полученных результатов, статистическая обработка данных, написание текста; С.В. Пищулина – анализ литературы, проведение молекулярно-генетических исследований методом полимеразной цепной реакции, анализ полученных результатов, редактирование текста; Е.В. Хомутов – анализ полученных результатов, статистическая обработка данных, редактирование текста. Все авторы прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией, согласны нести ответственность за все аспекты работы и гарантируют, что ими надлежащим образом были рассмотрены и решены вопросы, связанные с точностью и добросовестностью всех частей работы.

Список литературы / References

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394–424. doi: 10.3322/caac.21492.
2. Torre LA, Islami F, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer in Women: Burden and Trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2017;26(4):444–457. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-16-0858.
3. Зароченцева НВ, Белая ЮМ, Джиджихия ЛК. Вакцинопрофилактика рака шейки матки и заболеваний, ассоциированных с вирусом папилломы человека: вопросы и ответы. *Российский вестник акушера-гинеколога.* 2017;17(5):23–28. doi: 10.17116/rosakush201717523-28. [Zarochentseva NV, Belaia IuM, Dzhidzhikhia LK. [Vaccinal prevention of cervical cancer and diseases associated with human papillomavirus: questions and answers]. *Russian Bulletin of Obstetrician-Gynecologist.* 2017;17(5):23–28. Russian. doi: 10.17116/rosakush201717523-28.]
4. Клинышкова ТВ, Турчанинов АВ, Буян МС. Эпидемиологические аспекты рака шейки матки. *Российский вестник акушера-гинеколога.* 2018;18(2):22–26. doi: 10.17116/rosakush201818222-26. [Klinyshkova TV, Turchaninov DV, Buyan MS. [Epidemiological aspects of cervical cancer]. *Russian Bulletin of Obstetrician-Gynecologist.* 2018;18(2):22–26. Russian. doi: 10.17116/rosakush201818222-26.]
5. Аксель ЕМ, Виноградова НН. Статистика злокачественных новообразований женских репродуктивных органов. *Онкогинекология.* 2018;(3):64–78. doi: 10.52313/22278710_2018_3_64. [Aksel EM, Vinogradova NN. [Statistics of malignant neoplasms of female reproductive organs]. *Onkoginekologiya [Oncogynecology].* 2018;(3):64–78. Russian. doi: 10.52313/22278710_2018_3_64.]
6. Заридзе МИ, Каприн АД, Стилиди ИС. Динамика заболеваемости и смертности от злокачественных новообразований в России. *Вопросы онкологии.* 2018;64(5):578–591. doi: 10.37469/0507-3758-2018-64-5-578-591. [Zaridze MI, Kaprin AD, Stilidi IS. [Dynamics of morbidity and mortality from malignant tumors in Russia]. *Problems in Oncology.* 2018;64(5):578–591. Russian. doi: 10.37469/0507-3758-2018-64-5-578-591.]
7. Wang M, Yuan B, Zhou ZH, Han WW. Clinicopathological characteristics and prognostic factors of cervical adenocarcinoma. *Sci Rep.* 2021;11(1):7506. doi: 10.1038/s41598-021-86786-y.
8. Park KJ, Selinger CI, Alvarado-Cabrero I, Duggan MA, Kiyokawa T, Mills AM, Ordi J, Otis CN, Plante M, Stolnicu S, Talia KL, Wiredu EK, Lax SF, McLuggage WG. Dataset for the Reporting of Carcinoma of the Cervix: Recommendations From the International Collaboration on Cancer Reporting (ICCR). *Int J Gynecol Pathol.* 2022;41(Suppl 1):S64–S89. doi: 10.1097/PGP.0000000000000909.
9. Santoro A, Angelico G, Inzani F, Arciuolo D, Spadola S, Valente M, D'Alessandris N, Piermattei A, Fiorentino V, Clanfrini F, Bizzarri N, Pedone Anchora L, Fagotti A, Scambia G, Zannoni GF. Standard ultrastaging compared to one-step nucleic acid amplification (OSNA) for the detection of sentinel lymph node metastases in early stage cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2020;30(12):1871–1877. doi: 10.1136/ijgc-2020-001710.
10. Zannoni GF, Travaglino A, Raffone A, Arciuolo D, D'Alessandris N, Scaglione G, Tralongo P, Inza-



- ni F, Angelico G, Santoro A. Depth of Stromal Invasion as the Most Prognostically Relevant Regression System in Locally Advanced Cervical Cancer after Neoadjuvant Treatment: A Systematic Review and Meta-Analysis Grading. *Diagnosics (Basel)*. 2021;11(10):1772. doi: 10.3390/diagnostics11101772.
11. Каприн АД, Новикова ЕГ, Трушина ОИ, Грецова ОП. Скрининг рака шейки матки – нерешенные проблемы. Исследования и практика в медицине. 2015;2(1):36–41. doi: 10.17709/2409-2231-2015-2-1-36-41. [Kaprin AD, Novikova EG, Trushina OI, Gretzova OP. The cervical cancer screening – Unsolved problems]. *Research and Practical Medicine Journal*. 2015;2(1):36–41. Russian. doi: 10.17709/2409-2231-2015-2-1-36-41.]
 12. Randall LM, Monk BJ, Darcy KM, Tian C, Burger RA, Liao SY, Peters WA, Stock RJ, Fruehauf JP. Markers of angiogenesis in high-risk, early-stage cervical cancer: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*. 2009;112(3):583–589. doi: 10.1016/j.ygyno.2008.11.013.
 13. Hu X, Liu H, Ye M, Zhu X. Prognostic value of microvessel density in cervical cancer. *Cancer Cell Int*. 2018;18:152. doi: 10.1186/s12935-018-0647-3.
 14. Zhang J, Liu J, Zhu C, He J, Chen J, Liang Y, Yang F, Wu X, Ma X. Prognostic role of vascular endothelial growth factor in cervical cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(15):24797–24803. doi: 10.18632/oncotarget.15044.
 15. Dvorak HF. Tumor stroma, tumor blood vessels, and antiangiogenesis therapy. *Cancer J*. 2015;21(4):237–243. doi: 10.1097/PPO.0000000000000124.
 16. Paduch R. The role of lymphangiogenesis and angiogenesis in tumor metastasis. *Cell Oncol (Dordr)*. 2016;39(5):397–410. doi: 10.1007/s13402-016-0281-9.
 17. Zuazo-Gaztelu I, Casanovas O. Unraveling the Role of Angiogenesis in Cancer Ecosystems. *Front Oncol*. 2018;8:248. doi: 10.3389/fonc.2018.00248.
 18. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl)*. 2015;3:83–92. doi: 10.2147/HP.S93413.
 19. Harada H. Hypoxia-inducible factor 1-mediated characteristic features of cancer cells for tumor radioresistance. *J Radiat Res*. 2016;57 Suppl 1(Suppl 1):i99–i105. doi: 10.1093/jrr/rrw012.
 20. Zeng L, Morinibu A, Kobayashi M, Zhu Y, Wang X, Goto Y, Yeom CJ, Zhao T, Hirota K, Shinomiya K, Itasaka S, Yoshimura M, Guo G, Hammond EM, Hiraoka M, Harada H. Aberrant IDH3a expression promotes malignant tumor growth by inducing HIF-1-mediated metabolic reprogramming and angiogenesis. *Oncogene*. 2015;34(36):4758–4766. doi: 10.1038/onc.2014.411.
 21. Holmes DI, Zachary I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biol*. 2005;6(2):209. doi: 10.1186/gb-2005-6-2-209.
 22. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9(6):669–676. doi: 10.1038/nm0603-669.
 23. Monk BJ, Willmott LJ, Sumner DA. Anti-angiogenesis agents in metastatic or recurrent cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2010;116(2):181–186. doi: 10.1016/j.ygyno.2009.09.033.
 24. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*. 1996;93(8):1493–1495. doi: 10.1161/01.cir.93.8.1493.
 25. Shahbazi M, Fryer AA, Pravica V, Brogan IJ, Ramsay HM, Hutchinson IV, Harden PN. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13(1):260–264. doi: 10.1681/ASN.V131260.
 26. Han L, Zhang L, Xing W, Zhuo R, Lin X, Hao Y, Wu Q, Zhao J. The associations between VEGF gene polymorphisms and diabetic retinopathy susceptibility: a meta-analysis of 11 case-control studies. *J Diabetes Res*. 2014;2014:805801. doi: 10.1155/2014/805801.
 27. Awata T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, Inukai K, Inoue I, Katayama S. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51(5):1635–1639. doi: 10.2337/diabetes.51.5.1635.
 28. Piškur I, Topolovec Z, Bakula M, Zagorac I, Milić Vranješ I, Vidosavljević D. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) in Adenocarcinoma and Squamous Cell Cervical Cancer and Its Impact on Disease Progression: Single Institution Experience. *Medicina (Kaunas)*. 2023;59(7):1189. doi: 10.3390/medicina59071189.
 29. Toi M, Matsumoto T, Bando H. Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Lancet Oncol*. 2001;2(11):667–673. doi: 10.1016/S1470-2045(01)00556-3.
 30. Du GH, Wang JK, Richards JR, Wang JJ. Genetic polymorphisms in tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 are associated with an increased risk of cervical cancer. *Int Immunopharmacol*. 2019;66:154–161. doi: 10.1016/j.intimp.2018.11.015.
 31. Solé X, Guinó E, Valls J, Iñiesta R, Moreno V. SNP-Stats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006;22(15):1928–1929. doi: 10.1093/bioinformatics/btl268.
 32. Jin T, Wu X, Yang H, Liu M, He Y, He X, Shi X, Wang F, Du S, Ma Y, Bao S, Yuan D. Association of the miR-17-5p variants with susceptibility to cervical cancer in a Chinese population. *Oncotarget*. 2016;7(47):76647–76655. doi: 10.18632/oncotarget.12299.
 33. Alečković M, McAllister SS, Polyak K. Metastasis as a systemic disease: molecular insights and clinical implications. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2019;1872(1):89–102. doi: 10.1016/j.bbcan.2019.06.002.
 34. Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Miha C, Istrate M, Moldovan IM, Roman AL, Miha CM. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*. 2018;59(2):455–467.
 35. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling – in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(5):359–371. doi: 10.1038/nrm1911.
 36. Yang Y, Cao Y. The impact of VEGF on cancer metastasis and systemic disease. *Semin Cancer Biol*. 2022;86(Pt 3):251–261. doi: 10.1016/j.semcancer.2022.03.011.
 37. Gavard J, Gutkind JS. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol*. 2006;8(11):1223–1234. doi: 10.1038/ncb1486.
 38. Brock T, Budriot E, Klawitter A, Großer M, Nguyen TDP, Giebe S, Klapproth E, Temme A, El-Armouche A, Breier G. The Influence of VE-Cadherin on Adhesion and Incorporation of Breast Cancer Cells into Vascular Endothelium. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11):6049. doi: 10.3390/ijms22116049.
 39. Güç E, Pollard JW. Redefining macrophage and neutrophil biology in the metastatic cascade. *Immunity*. 2021;54(5):885–902. doi: 10.1016/j.immuni.2021.03.022.
 40. Zhong W, Guo X, He Y, Yasen M, Adilai M, Abudubari H, Abudukadier A, Alifu X. Association between single nucleotide polymorphisms of VEGF gene and pelvic lymph node metastasis in patients with early-stage cervical cancer. *J Obstet Gynaecol*. 2022;42(5):1347–1351. doi: 10.1080/01443615.2021.1963691.
 41. Yehya AHS, Asif M, Petersen SH, Subramaniam AV, Kono K, Majid AMSA, Oon CE. Angiogenesis: Managing the Culprits behind Tumororigenesis and Metastasis. *Medicina (Kaunas)*. 2018;54(1):8. doi: 10.3390/medicina54010008.
 42. Li H, Huang N, Zhu W, Wu J, Yang X, Teng W, Tian J, Fang Z, Luo Y, Chen M, Li Y. Modulation the crosstalk between tumor-associated macrophages and non-small cell lung cancer to inhibit tumor migration and invasion by ginsenoside Rh2. *BMC Cancer*. 2018;18(1):579. doi: 10.1186/s12885-018-4299-4.
 43. Zheng B, Hao D, Guo H, He B. Correlation between the progression of cancer and the expression of matrix metalloproteinase-9 in metastatic spinal tumor. *J BUON*. 2018;23(5):1534–1539.



Association of *VEGFA* gene rs2010963 polymorphism with cervical cancer and its progression

A.V. Rogalev¹ • M.S. Kishenya¹ • S.V. Pishchulina¹ • E.V. Khomutov¹

Background: Cervical cancer is the most common type of female genital malignancies. In Russia, its incidence is 17 to 19 cases per 100,000 of female population. Cervical cancer is characterized by high activity, rapid development of radio/chemoresistance and unfavorable prognosis. To assess the risk of recurrence, metastasis and choice of the optimal treatment strategy, factors related to the disease progression are under study. Vascular endothelial growth factor (VEGF) overexpression is related to tumor angiogenesis and poor outcome in various cancer types, including cervical cancer.

Aim: To study an association between the rs2010963 polymorphism of the *VEGFA* gene and risk of development and progression of cervical cancer.

Materials and methods: This case-control study included 120 women (aged 49 [42; 65] years) with cervical cancer stage I-II and 112 women without cervical or other types of cancer. Based on the results of histological examination, two subgroups were formed: the one with tumor emboli (TE+) in the tumor vasculature and surrounding tissues (n = 41, 34.17%) and the other without tumor emboli (TE-) (n = 79, 65.83%). The polymorphic DNA loci of the rs2010963 *VEGFA* gene were analyzed by real time polymerase chain reaction.

Results: In the patients, cervical cancer has associated with the *VEGFA* gene allelic polymorphism rs2010963 ($\chi^2 = 5.47$; $p = 0.021$). The minor C allele increased risk of cervical cancer by 1.6-fold (odds ratio (OR) 1.58, 95% confidence interval (CI) 1.08-2.31),

and the ancestral G allele reduced the cervical cancer probability (OR 0.63, 95% CI 0.43-0.93). The genotypes distribution in the dominant model (GG and GC + CC) confirmed the association of the rs2010963 *VEGFA* gene polymorphism with cervical cancer ($\chi^2 = 4.73$; $p = 0.031$), specifically, if there was a minor C allele in the genotype (GC + CC). We found that the association of the rs2010963 *VEGFA* gene polymorphism with TE in the tumor vessels and surrounding tissues was a predictor of unfavorable progression and metastasis of cervical cancer ($\chi^2 = 3.94$; $p = 0.049$). The minor C allele increased the risk of TE by 1.7-fold (OR 1.72, 95% CI 1.004-2.98), whereas the ancestral G allele reduced this chance (OR 0.58, 95% CI 0.34-0.996).

Conclusion: The C allele of the rs2010963 polymorphism of the *VEGFA* gene is a risk factor for cervical cancer, as well as a risk factor for the development of tumor emboli.

Key words: cervical cancer, tumor emboli, polymorphism, *VEGFA* gene

For citation: Rogalev AV, Kishenya MS, Pishchulina SV, Khomutov EV. Association of *VEGFA* gene rs2010963 polymorphism with cervical cancer and its progression. Almanac of Clinical Medicine. 2023;51. doi: 10.18786/2072-0505-2023-51-041.

Received 19 October 2023; revised 24 November 2023; accepted 27 November 2023; published online 5 December 2023

Artem V. Rogalev – MD, PhD, Associate Professor, Chair of Oncology and Radiology¹; ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-7781-6833>. E-mail: dr.onc.art@mail.ru

Maria S. Kishenya – MD, PhD, Senior Research Fellow, Head of Department of Molecular Genetic Testing, Central Scientific Research Laboratory¹; ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-7987-4091>

✉ Pr-t Il'icha 16, Donetsk, 83003, Russian Federation. E-mail: maria.kishenya@gmail.com

Svetlana V. Pishchulina – MD, PhD, Senior Research Fellow, Associate Professor, Chair of Pathophysiology named after N.N. Trankvilitati¹. E-mail: svetlana-pishulina@mail.ru

Evgeniy V. Khomutov – PhD (in Chem.), Head of Central Scientific Research Laboratory¹; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5621-0304>. E-mail: cnil@dnmu.ru

Funding

The study was conducted as a part of the State task from the Russian Ministry of Health, registration No. NIOCTR ZUNO-2023-0001.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

Authors' contributions

A.V. Rogalev, the study concept and design of the clinical part of the study, formation of groups of patients, data collection and analysis, text editing, approval of the final version of the manuscript; M.S. Kishenya, literature analysis, molecular genetic studies, analysis of the results, statistical analysis, text writing; S.V. Pishchulina, literature analysis, molecular genetic studies, analysis of the results, text editing; E.V. Khomutov, analysis of the results, statistical analysis, text editing. All the authors have read and approved the final version of the manuscript before submission, agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

¹ M. Gorky Donetsk State Medical University; pr-t Il'icha 16, Donetsk, 83003, Russian Federation