

КЛАСТЕРНИЙ АНАЛІЗ ЦИТОКІНОВОГО ПРОФІЛЮ ТА ПОКАЗНИКІВ БІЛКОВОГО ОБМІНУ ПРИ КАНЦЕРОГЕНЕЗІ ТА ЗАПАЛЕННІ

Харківський національний медичний університет,
м. Харків, Україна;
e-mail: Irinakarmazina805@gmail.com

Ключові слова: білковий обмін, канцерогенез, запалення, цитокіни, кластерний аналіз.

Трансформація нормальної клітини в злоякісну супроводжується змінами всіх видів обміну речовин, насамперед, білкового: в ядрі та цитоплазмі починається продукція специфічних пухлинних антигенів, які експресуються на поверхні клітин, потрапляють у кров та стимулюють синтез антитіл імунною системою пухлиноносія [1, 5]. Динаміка пухлинного росту визначається рівновагою між антибластомними факторами імунного нагляду та пробластомними, які сприяють пухлинній прогресії. Останнім часом в якості таких факторів важливе місце посідають цитокіни, серед яких ІЛ-1, ІЛ-4, ІЛ-6, ФНП- α та ін. [2, 6, 11, 12]. Ця зацікавленість обумовлена можливостями імунотерапевтичних підходів до лікування пухлин, які базуються на блокаді біологічної активності пробластомних цитокінів та їх рецепторів [9, 12]. В якості антибластомних факторів вивчаються протизапальні цитокіни, насамперед ІЛ-4 [8].

Натепер продовжуються дослідження ролі, яку відіграють інші білки у розвитку злоякісних пухлин. Обговорюється, що С-реактивний білок є не тільки маркером гострої фази запалення, але й предиктором серцево-судинних захворювань, а також злоякісних пухлин [3, 7, 10]. З іншого боку цитокіни є тригерами синтезу білків гострої фази запалення і виступають як первинні активатори генів, що вмикаються при запаленні та пухлинній трансформації.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИКИ

Досліджено 84 зразки крові хворих зі запальними та злоякісними захворюваннями гортані. Зразки були розділені на дві серії: I серія – 23 зразки крові хворих на гостре запалення, представлене паратонзиллярним абсцесом, II серія – 61 зразок крові

хворих з різними стадіями плоскоклітинного раку гортані. В якості контрольної групи досліджені зразки крові 18 здорових осіб.

Морфологічні ознаки різних стадій канцерогенезу та запалення визначали цитологічним та гістологічним методами; за допомогою біохімічних методів визначено концентрацію загального білка, його фракцій, загального фібриногену, АЧТЧ та С-реактивного білку; для визначення концентрації цитокінів (ФНП- α , ІЛ-1, ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-1РА) використовували імуноферментний метод. Отримані результати обробляли статистично за допомогою програми STATISTICA 7.0. Первинну оцінку розподілення отриманих даних проводили за допомогою дисперсійного аналізу. Для статистичної оцінки значущості відмінностей у групах STATISTICA 7.0. використовували однофакторний аналіз модуля ANOVA (analysis of variance). На підставі отриманих статистичних даних проводили кластерний аналіз: розрахунок евклідових відстаней між точками та побудування дерев об'єднання [4].

РЕЗУЛЬТАТИ

Проведені дослідження показали, що зміни цитокінового профілю відбивають стадіезалежність продукування цитокінів при злоякісному пухлинному процесі (табл. 1).

Таблиця 1. Цитокіновий профіль на різних стадіях канцерогенезу

Показники (пг/мл)	Контрольна група (здорові особи) n = 18	Серія II (злоякісна пухлина)			
		Загальні показники серії II n = 61	Група 1 важка дисплазія, T1N0M0 n = 14	Група 2 Ca гортані T2N0M0, T3N0M0 n = 26	Група 3 Ca гортані T4N0M0, T4N1(2)Mx, T4NxMx n = 21
ФНП- α	3,11 \pm 1,23	21,50 \pm 6,34*	15,91 \pm 1,19*	18,38 \pm 1,32* **	29,10 \pm 4,73* **
ІЛ-1 β	4,37 \pm 1,84	13,16 \pm 4,86*	6,34 \pm 2,21	13,16 \pm 2,66* **	17,70 \pm 2,12* **
ІЛ-6	3,89 \pm 1,81	14,40 \pm 4,69*	7,85 \pm 1,98* **	14,42 \pm 2,72* **	18,73 \pm 2,12* **
ІЛ-4	7,04 \pm 2,66	11,89 \pm 3,90*	11,26 \pm 2,02* **	15,48 \pm 1,22* **	7,88 \pm 2,68**
ІЛ-1РА	521,8 \pm 180,6	1293 \pm 672,0*	804 \pm 141,5*	2016 \pm 298,6* **	721,1 \pm 201,5**

Примітка: * – вірогідність відмінностей з контрольною групою при $p < 0,01$;

** – вірогідність відмінностей з іншими групами при $p < 0,01$.

Серед показників білкового обміну, які вивчалися у цьому дослідженні, ключові позиції у розвитку запалення та злоякісного росту займають СРБ, γ -глобулінова фракція, АЧТЧ (табл. 2).

Для визначення ролі окремих досліджених показників у розвитку запалення та злоякісного процесу, їхніх взаємозв'язків та взаємообумовленості, було проведено кластерний аналіз отриманих

результатів, який продемонстрував загальну характерну особливість незалежно від патологічного процесу: найбільшою спорідненістю у комплексі вивчених показників цитокінової мережі володіють ФНП-α та ІЛ-6 (евклідова відстань між ними складає 5,4) (рис. 1).

Значний зв'язок існує між розглянутими цитокінами та ІЛ-1β (евклідова відстань між ФНП-α та ІЛ-1β складає 7,4, між ІЛ-6 та ІЛ-1β – 6,8). В окремому блоці та у меншій залежності знаходяться показники опозиційного пулу цитокінів – ІЛ-4 та ІЛ-1РА (евклідова відстань між ними складає 6,8).

При кластерному аналізі досліджених показників у зразках сироваток І серії (запалення) та ІІ серії (злоякісний пухлинний ріст) між ними виявлені значні відмінності. Так, у серії І між показниками білкового обміну формується 2 кластери: один з них об'єднує α₁- та α₂-глобуліни (евклідова відстань 3,9), другий – об'єднує всі інші показники (рис. 3). У другому кластері найзначніша спорідненість спостерігається між СРБ та β-глобуліновою фракцією (евклідова відстань 3,3) та СРБ з γ-глобулінами (відстань 3,9). Взаємозв'язок між цими кластерами добре виражений – відстань об'єднання складає 11,6. АЧТЧ знаходиться у тісній спорідненості з СРБ (відстань 2,69), з β-глобулінами (евклідова відстань – 3,5) та з γ-глобулінами (евклідова відстань – 3,6), а також зі зігільним фібриногеном (відстань об'єднання – 3,9).

Таблиця 2. Показники білкового обміну на різних етапах канцерогенезу

Показники	Контрольна група (здорові особи) n = 18	Серія ІІ (плоскоклітинний рак гортані)			
		Група 1 важка дисплазія, T1N0M0 n = 14	Група 2 Са гортані T2N0M0, T3N0M0 n = 26	Група 3 Са гортані T4N0M0, T4N1(2)Mx, T4NxMx n = 21	
Загальний білок, г/л	71,82 ± 5,13	77,61 ± 3,71*	77,91 ± 5,41*	77,45 ± 5,53*	
Білкові фракції	альбумін, %	60,97 ± 2,06	50,07 ± 2,84*	48,05 ± 3,20*	48,73 ± 2,53*
	α ₁ -глобуліни, %	2,91 ± 0,51	3,17 ± 0,61	5,77 ± 1,05* **	3,35 ± 0,78
	α ₂ -глобуліни, %	8,22 ± 0,95	9,59 ± 1,74	12,01 ± 1,58* **	9,02 ± 1,53
	β-глобуліни, %	10,51 ± 1,51	9,59 ± 1,74	9,81 ± 1,49	15,94 ± 1,85* **
	γ-глобуліни, %	17,39 ± 1,72	25,49 ± 2,38*	24,36 ± 1,74*	22,95 ± 1,81*
СРБ, мг/л	2,78 ± 0,38	5,45 ± 1,55* **	9,98 ± 1,56* **	10,54 ± 1,71* **	
Загальний фібриноген, г/л	3,15 ± 0,43	4,77 ± 0,76	6,62 ± 1,18*	6,98 ± 1,14*	
АЧТЧ, с	46,90 ± 4,98	43,90 ± 4,56*	38,10 ± 3,42* **	49,40 ± 2,43**	

Примітка: * – вірогідність відмінностей з контрольною групою при p < 0,01;

** – вірогідність відмінностей з іншими групами при p < 0,01.

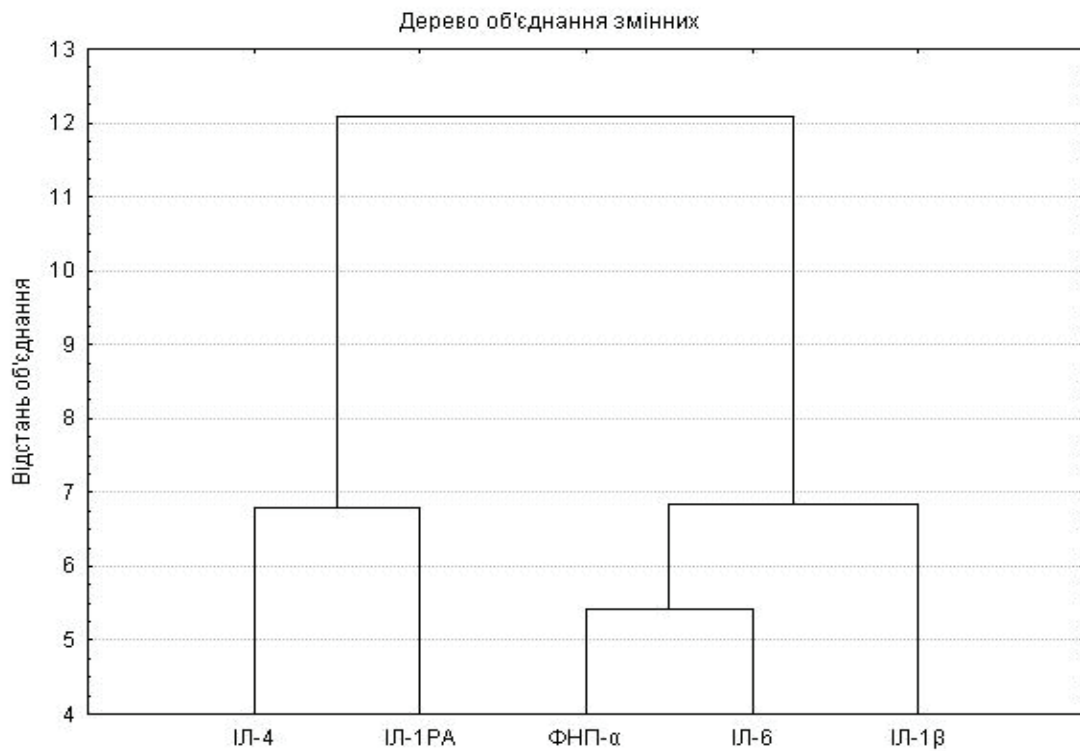


Рис. 1. Кластерний аналіз взаємозв'язків інтерлейкінів.

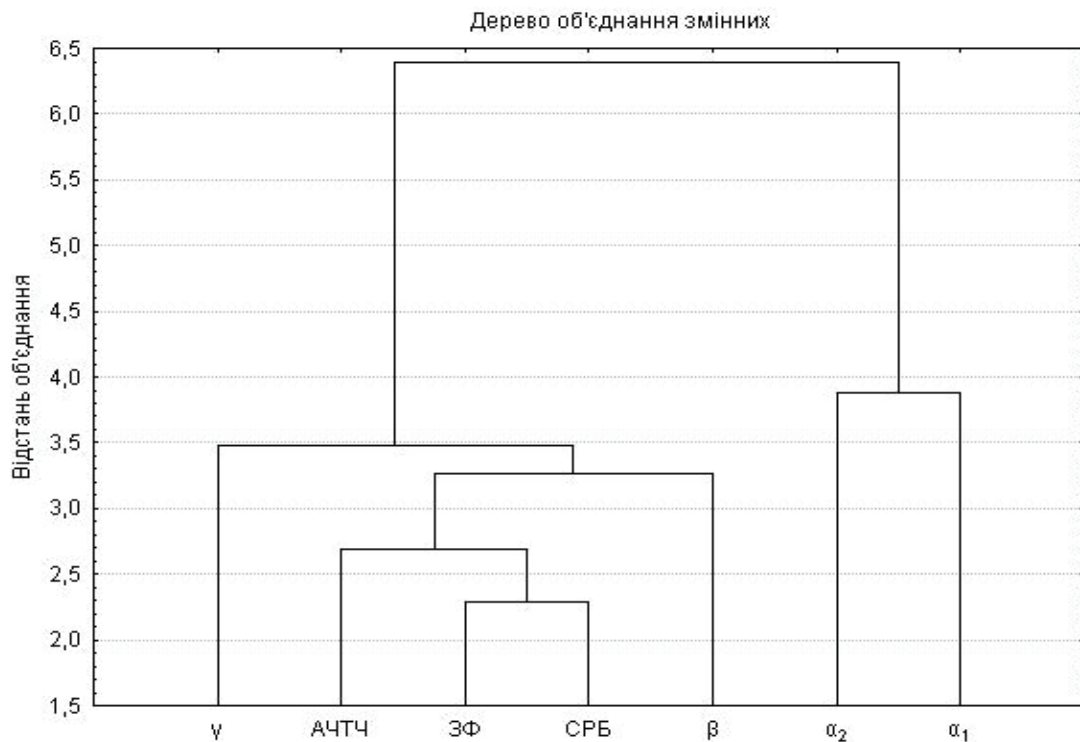


Рис. 2. Кластерний аналіз взаємозв'язків показників білкового обміну при запаленні (І серія).

Цитокіни також формують 2 кластери: в одному знаходяться протизапальні цитокіни (ІЛ-4 та ІЛ-1РА), в другому – запальні

цитокіни (ІЛ-1 β , ІЛ-6, ФНП- α) та СРБ (рис. 3). Найбільше виражена спорідненість спостерігається між ФНП- α та СРБ та між ФНП- α та ІЛ-6 (відстань об'єднання – 1,17 та 2,12 відповідно). Значно менше виражений взаємозв'язок між ІЛ-6 та ІЛ-1 β , ФНП- α та ІЛ-1 β (відстань об'єднання – 3,8 та 4,29 відповідно), ІЛ-1 β та СРБ (відстань об'єднання – 4,53). Протизапальні цитокіни ІЛ-4 та ІЛ-1 β знаходяться в одному кластері (відстань об'єднання – 5,55). Зв'язок між кластерами прозапальних та протизапальних цитокінів також виражений помірно – відстань об'єднання між ними складає 8,72.

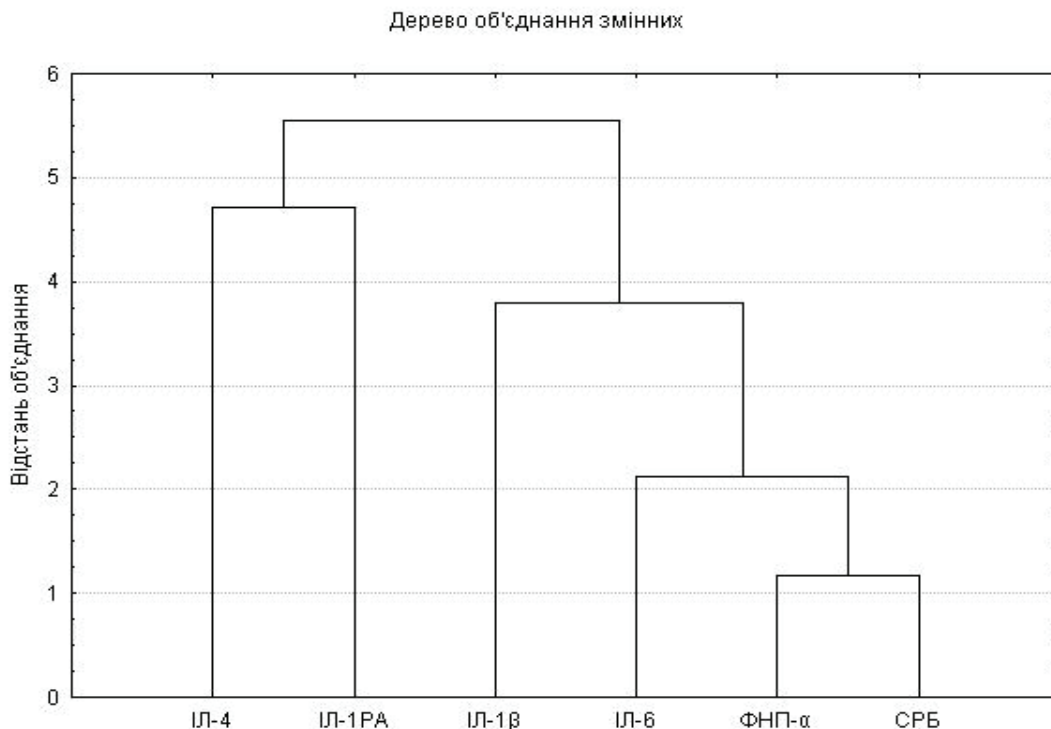


Рис. 3. Кластерний аналіз взаємозв'язків між цитокінами та СРБ при запаленні (І серія).

При злякiсному пухлинному зростi формуються новi кластери, якi значно відрiзняються від кластерiв при запаленнi; спорiдненiсть між цитокiнами у цiй серiї зразкiв сироваток стає значно тiснiшим (рис. 4).

ФНП- α тепер знаходиться в одному кластері з ІЛ-4, який відомий своїми антибластомними властивостями, відстань об'єднання між ними складає 1,66, що свідчить про їхню тісну спорідненість. Інший кластер формують ІЛ-6 та ІЛ-1РА (відстань об'єднання – 1,63), ІЛ-1 β (відстань об'єднання – 2,62) та СРБ (відстань об'єднання – 2,62). Оскільки пробластомні властивості ІЛ-6 не викликають сумнівів, то слід визнати, що антагоніст рецептору ІЛ-1 β у цитокіновому каскаді виконує аналогічні функції. У тісній спорідненості з антагоністом

свого рецептору знаходиться ІЛ-1 β . СРБ знаходиться у тісному зв'язку з ІЛ-1РА (відстань об'єднання – 1,9), та в менш тісному зв'язку – з ІЛ-1 β (відстань об'єднання – 2,74), з ІЛ-6 відстань об'єднання складає 2,62, а крізь дерево об'єднання – й з ФНП- α (відстань об'єднання – 2,61) та з ІЛ-4 (відстань об'єднання – 2,49). Відстань об'єднання між цими кластерами свідчить про достатньо сильний взаємозв'язок кластерів.

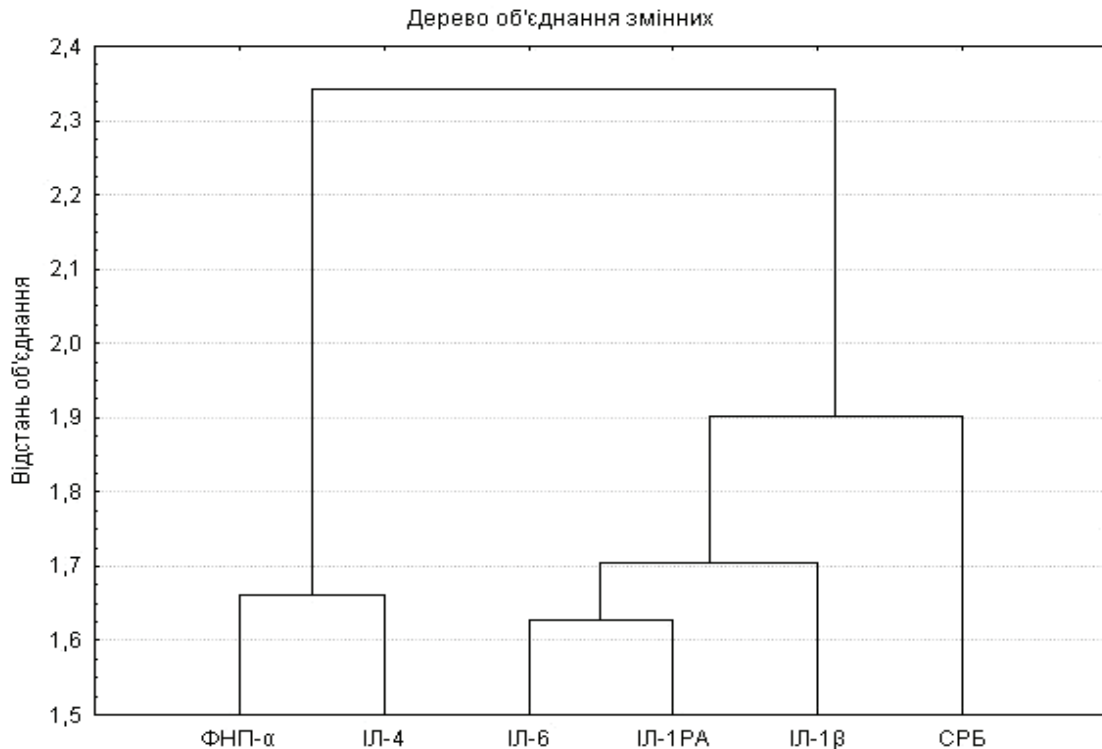


Рис. 4. Кластерний аналіз взаємозв'язків між цитокінами та СРБ при злоякісному пухлинному процесі.

Кластерний аналіз показників білкового обміну виявив, що зберігається тісна спорідненість між СРБ та загальним фібриногеном (відстань об'єднання – 1,64) (рис. 5). Менший взаємозв'язок існує між СРБ та α_1 -фракцією глобулінів (відстань об'єднання – 3,38).

Ці закономірності підкреслюють участь СРБ у розвитку гострого запалення у мікрооточенні пухлини, яке виступає предиктором її прогресування.

ВИСНОВКИ

Таким чином, кластерний аналіз свідчить про важливу роль СРБ у формуванні каскаду запальних реакцій. Оскільки у системі розглянутих показників він знаходиться поза кластером α_1 - й α_2 -глобулінових фракцій та знаходиться в одному кластері з фракцією β -глобулінів та частково з γ -фракцією, можна припустити, що СРБ

віддзеркалює активність хронічного запалення, та у меншому ступені – імунного запалення.

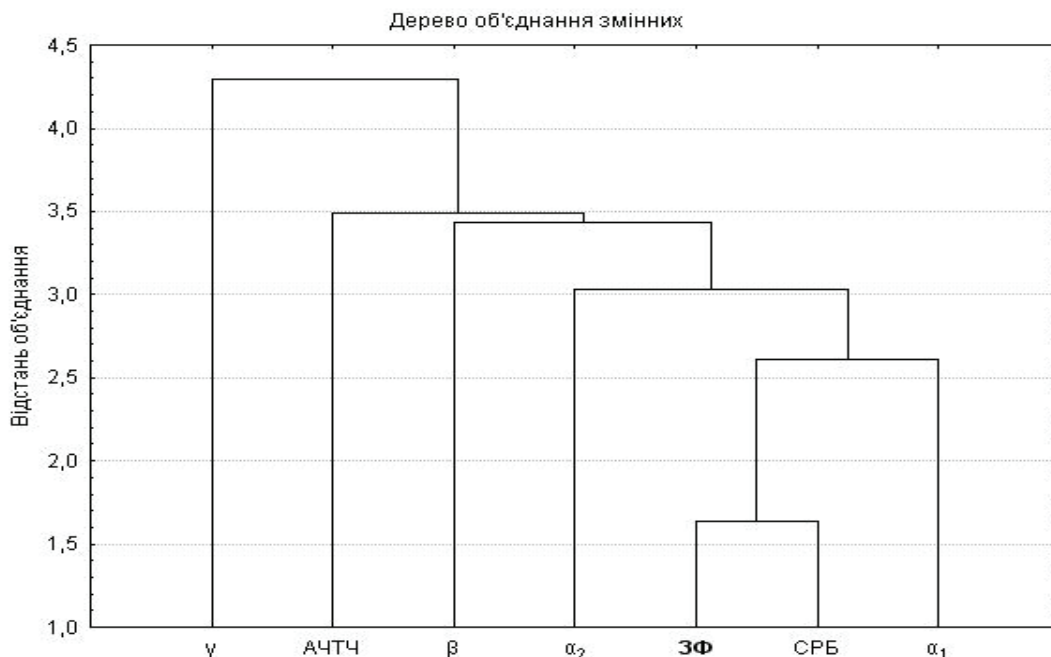


Рис. 5. Кластерний аналіз взаємозв'язків між показниками білкового обміну при злоякісному пухлинному процесі.

СРБ знаходиться також у тісній спорідненості з ФНП-а та у помірному зв'язку з ІЛ-6. При запаленні існує тісний взаємозв'язок між ФНП-а та дуже слабкий – з ІЛ-1β. Зв'язок між протизапальними цитокінами є помірним, також і взаємозалежність між двома сформованими кластерами показників цитокінової мережі.

Кластерний аналіз продемонстрував значні якісні та кількісні розбіжності між реакцією організму на запалення та пухлинний процес: злоякісний ріст супроводжується формуванням нових кластерів – антибластомного (ФНП-а й ІЛ-4) та пробластомного (ІЛ-6, ІЛ-1РА та ІЛ-1β), до котрого входить СРБ, який зв'язує обидва кластери достатньо сильним зв'язком. Відрізняється також реакція білків сироватки крові: всі показники поєднані в один кластер, у якому особливо тісною спорідненістю володіють СРБ та загальний фібриноген.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бережная Н.М., Чехун В. Иммунология злокачественного роста. – К.: Наукова думка. – 2005. – 790 с.
2. Васильева Г.И., Иванова И.А., Тюкавкина С.Ю. Цитокины – общая система гомеостатической регуляции клеточных функций // Цитология. – 2001. – Т.43, №12. – С. 1101–1111.

3. Вельков В.В. С-реактивный белок – структура, функция, методы определения, клиническая значимость // Лабораторная медицина. – 2006. – №8. – С. 1–7.
4. Гланц С. Медико-генетическая статистика. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
5. Драннік Г.Н. Клінічна імунологія та алергологія: навчальний посібник. – Одеса: Астропринт, 1999. – 604 с.
6. Кадагидзе З.Г. Цитокины // Практическая онкология. – 2003. – Т. 4, №3. – С. 24–35.
7. Erlinger T., Plaiz E., Rifai N., Helzlsouer K. C-reactive protein and the risk of incident colorectal cancer // JAMA. – 2004. – V. 291, N. 5. – P. 585–590.
8. Kleinrath T., Gassner C., Lackner P., Thurnher M., Ramoner R. Interleukin-4 promoter polymorphisms: a genetic prognostic factor for survival in metastatic renal cell carcinoma // J. Clin. Oncol. – 2000. – V. 25. – P. 845–851.
9. Lakour S., Hammann A., Wotava A. Anticancer agents sensitize tumor cells to TNF related apoptosis inducing ligand mediated Caspase 8 activation and apoptosis // Cancer Res. – 2001. – V. 61. – P. 1645–1651.
10. Lehrer S., Diamond E., Mamkine B. C-reactive protein is significantly associate with prostate-specific antigen and metastatic disease in prostate cancer // BJU Int. – 2005. – V. 95. – P. 961–962.
11. McCornick C., Freshney R.I. Activity of growth factors in the IL-6 group in the differentiation of human lung adenocarcinoma // Britain J. Cancer. – 2000. – V. 82. – P. 881–890.
12. Zav'yalov V.P. Chernovskaya T.V., Novolotskaya E.V., Karlyshev A.V., Macintyre S., Vasiliev A.M., Abramov V.M. Specific high affinity binding of human interleukin 1 β by Caf1A usher protein of Yersinia pestis // FEBS Lett. – 1995. – V. 371. – P. 65–68.

Кармазина И. С.

КЛАСТЕРНЫЙ АНАЛИЗ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ И ПОКАЗАТЕЛЕЙ БЕЛКОВОГО ОБМЕНА ПРИ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ И ВОСПАЛЕНИИ

Ключевые слова: белковый обмен, канцерогенез, воспаление, цитокины, кластерный анализ.

Трансформация нормальной клетки в злокачественную сопровождается изменениями всех видов обмена веществ, в первую очередь, белкового. Динамика опухолевого роста определяется равновесием между антибластомными факторами иммунного надзора и пробластомными факторами, способствующими опухолевой прогрессии.

В последнее время в качестве таких факторов используют цитокины, среди которых ИЛ-1, ИЛ-4, ИЛ-6, ФНО- α и др.

Кластерный анализ исследованных показателей выявил наличие тесных связей между СРБ и воспалительными цитокинами, что позволяет рассматривать СРБ как маркер системного воспаления. На

основе кластерного анализа обнаружены значительные качественные и количественные различия между реакцией организма на воспаление и опухолевый процесс: злокачественный рост сопровождается формированием новых кластеров – антибластомного (ФНО- α и ИЛ-4) и пробластомного (ИЛ-6, ИЛ-1РА и ИЛ-1 β), в который также входит СРБ, связывая оба кластера достаточно сильной связью. Белки сыворотки крови объединяются в отдельный кластер, в котором особенно тесным сродством обладают СРБ и общий фибриноген

Karmazina I. S.

THE CLUSTER ANALYSIS OF CYTOKINE LEVELS AND PROTEIN METABOLISM IN THE CANCEROGENESIS AND IN THE INFLAMMATION

Keywords: an albuminous exchange, cancerogenez, an inflammation, cytokines, cluster analysis.

Transformation of a normal cell into malignant one is accompanied by changes of all kinds of a metabolism, first of all, proteins. Dynamics of tumoral growth is determined by balance between antitumoral factors of immune supervision and protumoral factors which are favour to a tumoral progression.

Recently cytokines are regarded as such factors, among them IL-1, IL-4, IL-6, TNF- α and so on.

The cluster analysis of researched parameters has revealed presence of close relations between CRP and inflammatory cytokines allowing to use CRP as a marker of a systemic inflammation. As a result of cluster analysis considerable qualitative and quantitative differences between organism reaction to the inflammation and malignant tumoral growth was found out. Cancerogenesis is accompanied by new clusters formation. They are antitumoral cluster (TNF- α and IL-4) and protumoral one (IL-6, IL-1RA and IL-1 β), in which also CRP is included to bind both clusters with strong binding. Serum proteins are united into the separate cluster in which CRP and fibrinogen possess the closest relations.