

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОСВЯЗЕЙ МЕТАБОЛИЗМА ВЫСШИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ, УРОВНЯ TNF- α И ЕГО РАСТВОРИМОГО РЕЦЕПТОРА sTNF-RI В КЛЕТКАХ ЦЕРВИКАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ ПРИ ОПУХОЛЕВОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ

Каюкова Е.В.¹, Белокриницкая Т.Е.¹, Терешков П.П.¹, Шолохов Л.Ф.²

¹ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Чита, e-mail: pochta@chitgma.ru;

²ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», Чита, e-mail: iphr@sbamsr.irk.ru

Биохимический атипизм является одной из характерных особенностей опухолевых клеток. Известно, что в процессе цервикального канцерогенеза локально возникает избыток насыщенных жирных кислот, в том числе за счет увеличения доли жирных кислот с нечетным числом атомов углерода. На фоне этого регистрируется высокий уровень фактора некроза опухолей- α (TNF- α) и его растворимого рецептора (sTNF-RI). Цель исследования: установить особенности взаимосвязей между величинами спектра высших жирных кислот (ВЖК), уровнями TNF- α и sTNF-RI в клетках экзоцервикса при дис- и неопластической трансформации. Для выявления патогенетических взаимосвязей между изучаемыми параметрами проводился корреляционный анализ изучаемых величин с помощью метода ранговой корреляции Спирмена. Установлены многообразные корреляционные взаимосвязи между исследуемыми параметрами. Наиболее патогенетически значимыми из них являются: положительные корреляции с уровнем насыщенных жирных кислот, отрицательные связи с величинами мононенасыщенных аналогов и различные корреляции с полиненасыщенными жирными кислотами. Представлены научные данные, подтверждающие возможность существования этих взаимосвязей. Выявленные корреляционные взаимоотношения между изучаемыми параметрами свидетельствуют о важной патогенетической роли высших жирных кислот, а также фактора некроза опухолей- α и его растворимого рецептора в процессах цервикального канцерогенеза.

Ключевые слова: высшие жирные кислоты, TNF- α , sTNF-RI, рак шейки матки, биохимический атипизм.

THE CHARACTERISTICS OF CORRELATIONS BETWEEN HIGHER FATTY ACIDS METABOLISM, THE LEVEL OF TNF- α AND sTNF-RI IN THE CERVICAL CELLS DURING CERVICAL CANCEROGENESIS

Kayukova E.V.¹, Belokrinickaya T.E.¹, Tereshkov P.P.¹, Sholohov L.F.²

¹Chita state medical academy, Chita, e-mail: pochta@chitgma.ru;

²Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Chita, e-mail: iphr@sbamsr.irk.ru

The biochemical atypism is one of the feature of tumor cells. It is known that there is an excess of saturated fatty acids with increasing the proportion of the odd chain fatty acids in the cervical cancer cells. Against this background, a high level of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and its soluble receptor (sTNF-RI) is recorded. The aim of the study was to establish the characteristics of correlation between higher fatty acids, the level of TNF- α and sTNF-RI in the cervical cells during cervical cancerogenesis. Methods of research was the spearman rank correlation method. The variety of correlations relationships between the investigated parameters were established. The most pathogenetically significant of them were positive correlations with the level of saturated fatty acids, negative bonds with the values of monounsaturated fatty acids, and various correlations with polyunsaturated fatty acids. The revealed correlations between the studied parameters indicated to the important pathogenetic role of higher fatty acids, tumor necrosis factor and its soluble receptor in the cervical carcinogenesis.

Keywords: higher fatty acids, TNF- α , sTNF-RI, cervical cancer, biochemical atypism.

Биохимический атипизм является одной из характерных особенностей опухолевых клеток [1]. В настоящее время актуальными являются научные исследования, посвященные изучению особенностей биохимического фенотипа клеток для обоснования молекулярных звеньев канцерогенеза и на этой основе разработки новых онкомаркеров для диагностики

онкопатологии.

Рак шейки матки является одной из самых частых злокачественных опухолей среди женщин репродуктивного и трудоспособного возраста во всем мире [2]. Ранее было установлено, что в клетках малигнизированного цервикального эпителия возникает дисбаланс высших жирных кислот (ВЖК) в сторону преобладания насыщенных аналогов, а также увеличение доли жирных кислот с нечетным числом атомов углерода [3]. На фоне этого регистрируется высокий уровень TNF- α и его растворимого рецептора sTNF-RI [4].

Цель исследования: установить особенности взаимосвязей между величинами спектра ВЖК, уровнями TNF- α и sTNF-RI в клетках экзоцервикса при дис- и неопластической трансформации.

Материалы и методы исследования

В качестве образцов для исследования служили биоптаты шейки матки, полученные путем прицельной ножевой биопсии или в ходе проведения оперативного лечения. Средний возраст пациенток составил $38 \pm 8,26$ года. Все обследуемые были информированы о проводимой работе и дали свое письменное согласие на участие в ней. Исследование проведено с соблюдением принципов Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki, 1964, 2013 ред.) с согласия Локального этического комитета Читинской государственной медицинской академии.

В соответствии с данными гистологического исследования были выделены 2 сопоставимые клинические группы. I клиническая группа – больные с предраковыми заболеваниями шейки матки: цервикальная интраэпителиальная неоплазия III степени (20 женщин). II – пациентки с впервые выявленным плоскоклеточным раком шейки матки Ia - Ib стадии (28 пациенток). В каждой группе выделены 2 фрагмента исследования: А – locus злокачественной трансформации или предопухоловое поражение шейки матки; Б – интактная ткань без признаков злокачественного роста и предраковых изменений.

Образцы контрольной группы были взяты у 18 практически здоровых женщин в возрасте от 28 до 48 лет ($34,5 \pm 6,5$ года), проходивших диспансерное наблюдение по поводу неопухоловой патологии экзоцервикса, леченной ранее, ознакомленных с дизайном исследования и давших информированное согласие на участие в нем. Интактность цервикального эпителия подтверждена морфологически.

Для получения клеточной суспензии биоптат измельчали и гомогенизировали в гомогенизаторе Gentle MACS Dissociator (Германия) с пробирками С типа и с использованием набора реагентов Tumor Dissociation Kit (Германия). Затем суспензию клеток фильтровали через капроновый фильтр размером ячеек 30 мкм. Полученные клетки отмывали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% телячьей сыворотки и стандартного набора

антибиотиков.

Для изучения спектра ВЖК липиды экстрагировали методом J. Folch (1957) [5]. Спектр ВЖК анализировали на хроматографе «Кристалл-2000М» (Россия) с использованием плазменно-ионизационного детектора и капиллярной колонки FFAP (США).

Исследование уровня TNF- α и растворимого рецептора sTNF-RI производилось методом ИФА с использованием реагентов BenderMedSystems (Австралия) на микропланшетном ридере Multiscan DigiScan (Австрия) при длине волны 450 нм. Результаты оценивались автоматически с использованием программы IFAN.

Оцениваемый спектр высших жирных кислот: C_{14:0} – миристиновая, C_{14:1} – миристоолеиновая, C_{15:0} – пентадекановая, C_{15:1} – пентадекаеновая, C_{16:0} – пальмитиновая, C_{16:1} – пальмитолеиновая, C_{17:0} – маргаринавая, C_{17:1} – гептадекаеновая, C_{18:0} – стеариновая, C_{18:1} – олеиновая, C_{18:2 ω 6} – линолевая, C_{18:3 ω 6} – γ -линоленовая, C_{18:3 ω 3} – α -линоленовая, C_{19:0} – α -метилстеариновая, C_{20:0} – арахидовая, C_{20:3 ω 6} – дигомо- γ -линоленовая кислота, C_{20:4 ω 6} – арахидоновая, C_{20:5 ω 3} – эйкозапентаеновая, C_{22:5 ω 3} – докозапентаеновая кислоты.

Для выявления патогенетических взаимосвязей между изучаемыми параметрами проводился корреляционный анализ изучаемых величин с помощью метода ранговой корреляции Спирмена.

Результаты исследования

В представленных иллюстративных материалах отражены только статистически значимые зависимости.

В здоровых клетках шейки матки выявлены единичные корреляционные взаимосвязи между уровнем TNF- α и его растворимого рецептора sTNF-RI и величинами отдельных ВЖК. Так, между TNF- α и sTNF-RI были зарегистрированы отрицательные корреляции с пальмитолеиновой и арахидоновой кислотами, и положительные – с C_{18:0} (рис. 1).

	TNF- α	sTNF-RI
C _{16:1}	-0,74 (p=0,001)	-0,74 (p=0,001)
C _{18:0}	0,79 (p=0,001)	0,79 (p=0,001)
C _{20:4ω6}	-0,55 (p=0,028)	-0,55 (p=0,028)

Рис. 1. Схема корреляционных взаимосвязей между величинами ВЖК и уровнем TNF- α и его растворимого рецептора sTNF-RI в клетках шейки матки контрольной группы

В очаге «предрака» было выявлено большое количество корреляционных взаимоотношений между уровнем TNF- α и sTNF-RI, а также ВЖК-составом клеток экзоцервикса (таблица). Между содержанием исследуемого цитокина и концентрацией $C_{15:0}$, $C_{17:0}$, а также $C_{16:0}$ выявлены сильные прямые взаимосвязи. Аналогичная зависимость была характерна и для sTNF-RI. Что касается мононенасыщенных жирных кислот, то зарегистрированы отрицательные связи средней силы между пулом пальмитолеиновой и гептадекаеновой кислотами, с одной стороны, и уровнем TNF- α и sTNF-RI - с другой. Корреляционные взаимосвязи между исследуемым цитокином, его рецептором и концентрацией полиненасыщенных аналогов были многообразны: так, положительные сильные взаимосвязи были зарегистрированы с линолевой, линоленовой ($\omega 3$), дигомо- γ -линоленовой, эйкозапентаеновой, докозапентаеновой кислотами. Отрицательные корреляции TNF- α и sTNF-RI были выявлены с $C_{18:3\omega 6}$ и $C_{20:4\omega 6}$.

В парадиспластических клетках среди насыщенных жирных кислот сильные положительные корреляции зарегистрированы между пулом $C_{14:0}$, $C_{16:0}$, $C_{18:0}$ и $C_{20:0}$, с одной стороны, и уровнем TNF- α и sTNF-RI - с другой. Значения пальмитолеиновой и олеиновой кислот были взаимосвязаны отрицательными связями с исследуемым цитокином и рецептором. Аналогичные взаимоотношения были характерны и для линолевой, линоленовой ($\omega 3$), арахидоновой, эйкозапентаеновой, докозапентаеновой кислот. Положительные корреляции были выявлены с концентрациями линоленовой ($\omega 6$) и дигомо- γ -линоленовой кислот (таблица).

Коэффициент корреляции Спирмена между величинами ВЖК, уровнем TNF- α и sTNF-RI в группе «предрак»

Параметры	Очаг поражения		Парадиспластический участок	
	TNF- α	sTNF-RI	TNF- α	sTNF-RI
$C_{14:0}$	-0,58	-0,51	0,86	0,86
	p=0,056	p=0,86	p=0,001	p=0,001
$C_{15:0}$	0,93	0,96	-0,51	-0,51
	p=0,001	p=0,001	p=0,78	p=0,52
$C_{16:0}$	0,93	0,75	0,82	0,82

	p=0,001	p=0,001	p=0,001	p=0,001
C _{16:1}	-0,58	-0,51	-0,51	-0,51
	p=0,021	p=0,04	p=0,04	p=0,04
C _{17:0}	0,93	0,82	-0,51	-0,51
	p=0,001	p=0,001	p=0,56	p=0,245
C _{17:1}	-0,58	-0,51	0,04	0,12
	p=0,021	p=0,04	p=0,52	p=0,46
C _{18:0}	-0,58	-0,51	0,94	0,86
	p=0,56	p=0,046	p=0,001	p=0,001
C _{18:1}	0,48	0,80	-0,51	-0,51
	p=0,489	p=0,135	p=0,04	p=0,04
C _{18:2ω6}	0,93	0,74	-0,51	-0,51
	p=0,001	p=0,001	p=0,04	p=0,04
C _{18:3ω6}	-0,58	-0,51	0,86	0,84
	p=0,021	p=0,04	p=0,001	p=0,001
C _{18:3ω3}	0,93	0,92	-0,51	-0,51
	p=0,001	p=0,001	p=0,04	p=0,04
C _{20:0}	-0,58	-0,51	0,84	0,86
	p=0,45	p=0,53	p=0,001	p=0,001
C _{20:3ω6}	0,93	0,85	0,85	0,91
	p=0,001	p=0,001	p=0,001	p=0,001
C _{20:4ω6}	-0,58	-0,51	-0,51	-0,51
	p=0,021	p=0,04	p=0,04	p=0,04
C _{20:5ω3}	0,93	0,76	-0,51	-0,51
	p=0,001	p=0,001	p=0,04	p=0,04
C _{22:5ω3}	0,93	0,86	-0,51	-0,51
	p=0,001	p=0,001	p=0,04	p=0,04

В очаге цервикального рака не было выявлено достоверных корреляций между исследуемыми показателями.

В паранеопластических клетках цервикального эпителия с уровнем TNF-α выявлены положительные взаимосвязи концентраций линолевой, линоленовой (ω6) кислот и отрицательные – линоленовой (ω3), дигомо-γ-линоленовой и докозапентаеновой кислот. Аналогичные корреляции были характерны и для sTNF-RI (рис. 2).

	TNF- α	sTNF-RI
C _{18:2ω6}	0,65 (p=0,004)	0,64 (p=0,005)
C _{18:3ω6}	0,64 (p=0,005)	0,65 (p=0,001)
C _{18:3ω3}	-0,50 (p=0,035)	-0,40 (p=0,10)
C _{20:3ω6}	-0,65 (p=0,004)	-0,62 (p=0,01)
C _{20:5ω3}	-0,80 (p=0,001)	-0,77 (p=0,001)

Рис. 2. Схема корреляционных взаимосвязей между величинами ВЖК и уровнем TNF- α и его растворимого рецептора sTNF-RI в паранеопластических клетках шейки матки

Обсуждение

Установленные корреляционные взаимосвязи между исследуемыми параметрами были многообразны, что определяется различными патогенетическими ролями высших жирных кислот в опухолевом процессе.

Наличие положительных корреляций между уровнем насыщенных жирных кислот (C_{15:0}, C_{16:0}, C_{17:0} в локусе «предрака» и C_{14:0}, C_{16:0} и C_{18:0} в парадиспластических клетках) и величиной TNF- α и sTNF-RI при диспластической трансформации цервикального эпителия указывает на их провоспалительное действие. Известны механизмы активации синтеза цитокинов пальмитиновой кислотой. Во-первых, она является лигандом TLR-2 и TLR-4 (Toll-like receptor), в результате взаимодействия с которыми формируются инфламмосомы. Последние представляют собой мультимерный цитозольный белковый комплекс, посредством активации которого реализуется синтез провоспалительных цитокинов клетками иммунной системы [6]. Во-вторых, C_{16:0} активирует фактор транскрипции NF- κ B, регулирующий синтез провоспалительных цитокинов [7]. В-третьих, пальмитат способен активировать протеинкиназу C, которая участвует в механизмах шеддинга мембранного рецептора TNF- α [8]. Следует обратить внимание на наличие положительных взаимосвязей между пулом C_{15:0}, C_{17:0} и концентрацией исследуемого цитокина и его рецептора в очаге «предрака», что указывает на причастность жирных кислот с нечетным числом атомов углерода к цервикальному канцерогенезу.

Что касается мононенасыщенных жирных кислот, то наличие отрицательных корреляционных взаимосвязей с пулом TNF- α и sTNF-RI в исследуемых группах указывает на их противовоспалительное действие. Молекулярные механизмы, объясняющие данный факт, практически не изучены. Имеются данные, что олеиновая кислота способна предотвращать активацию NF- κ B в культуре клеток, обработанных пальмитатом [9].

Влияние полиненасыщенных жирных кислот на уровень TNF- α и sTNF-RI неоднозначно, поскольку нами были выявлены как положительные, так и отрицательные взаимосвязи между ними.

Наличие обратных корреляций с пулом ПНЖК ω 3 серии свидетельствует об их противовоспалительном потенциале. Установлено, что ПНЖК ω 3 серии способны влиять на синтез провоспалительных цитокинов, реализуя несколько механизмов [10]. Известно, что представители данного класса жирных кислот способны блокировать продукцию TNF- α и ИЛ-6 путем связывания с GPR120 рецептором на поверхности макрофагов [11]. Группа ученых во главе с Y. Williams-Bey (2014) сообщили, что докозагексаеновая кислота ингибирует образование инфламмасом макрофагами путем блокирования транскрипционного фактора NF- κ B, тем самым препятствуя выработке провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α , ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-6 и другие [6].

Вместе с тем наличие прямых корреляций TNF- α и sTNF-RI с линоленовой (ω 3), эйкозапентаеновой, докозапентаеновой кислотами в локусе цервикального «предрака» указывают на их обусловленность. Вероятнее всего, это следует объяснять не самими эффектами ПНЖК, а их метаболитами, образовавшимися в результате 15-липоксигеназного преобразования, которые и проявляют провоспалительное действие.

Установленные прямые и обратные взаимосвязи между представителями ПНЖК ω -6 серии и пулом TNF- α и sTNF-RI подтверждают их активное участие в опухолевом и воспалительном процессе. Так, наличие отрицательных корреляций с арахидоновой кислотой свидетельствуют об активном участии ее метаболитов в синтезе провоспалительных цитокинов. Кроме того, полиеновые кислоты ω 6 серии способны активировать ген NF- κ B [12].

Выводы

Многообразные корреляционные взаимосвязи между исследуемыми параметрами обусловлены разными биохимическими фенотипами клеток цервикального эпителия в зависимости от ее морфологического статуса (здоровая, дисплазия или малигнизация), а также плеiotропными эффектами ВЖК и TNF- α в цервикальном канцерогенезе. Наиболее патогенетически значимыми из них являются: положительные корреляции TNF- α и sTNF-RI с уровнем насыщенных жирных кислот, отрицательные связи – с величинами

мононенасыщенных аналогов и различные корреляции с полиненасыщенными жирными кислотами.

Выявленные корреляционные взаимоотношения между изучаемыми параметрами свидетельствуют о важной патогенетической роли высших жирных кислот, а также фактора некроза опухолей и его растворимого рецептора в процессах цервикального канцерогенеза.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых МК-6143.2018.7.

Список литературы

1. Мартынов В.А. Об изменениях структуры и биохимических параметров в клетках под влиянием раковой трансформации и их восстановлении под влиянием средств, не обладающих противоопухолевой активностью // Вестник ТГУ. – 2003. – № 8 (2). – С. 315-322.
2. Sawaya G.F., Huchko M.J. Cervical Cancer Screening // Med. Clin. North. Am. – 2017. – Vol. 101 (4). - P. 743-753.
3. Каюков В.А., Хышиктуев Б.С., Каюкова Е.В. Жирнокислотный спектр опухолевой ткани при поражениях шейки матки // Онкохирургия. - 2009. – Т. 1, № 1. - С. 40-42.
4. Каюкова Е.В. Влияние пропионата на уровень TNF- α и его рецептора sTNF-RI в клетках шейки матки в процессе цервикального канцерогенеза // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии: материалы Всероссийской конференции молодых ученых-онкологов, посвященной памяти академика РАМН Н.В. Васильева (г. Томск, 13 мая 2016 г.). – Томск: Изд-во Томского университета. – С. 76-80.
5. Folch J., Less M. Sloane-Stanley A.G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. - 1957. - Vol. 226 (1). – P. 497-509.
6. Omega-3 free fatty acids suppress macrophage inflammasome activation by inhibiting NF- κ B activation and enhancing autophagy [Electronic resource] / У. Williams-Bey [et al.] // PLoS One. – 2014. – № 9 (6). <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0097957>. (mode of access: 19.04.2018).
7. Шварц В.Я. Воспаление жировой ткани (часть 4). Ожирение - новое инфекционное заболевание? (Обзор литературы) // Проблемы эндокринологии. – 2011. – № 5. – С. 63-71.
8. Boneh A. Signal transduction in inherited metabolic disorders: a model for a possible pathogenetic mechanism // J. Inherit. Metab. Dis. – 2015. – № 38 (4). – P. 729-740.
9. Protective role of oleic acid against cardiovascular insulin resistance and in the early and late cellular atherosclerotic process [Electronic resource] / L. Perdomo [et al.] // Cardiovasc

Diabetol. – 2015. – Mode of access: <http://www.cardiab.com/content/14/1/75>. - 10.06.2015.

10. Effect of marine-derived n-3 polyunsaturated fatty acids on c-reactive protein, interleukin 6 and tumor necrosis factor α : a meta-analysis / K. Li [et al.] // PLoS One. – 2014. – <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0088103> (mode of access: 05.02.2018).

11. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin sensitizing effects / D. Young [et al.] // Cell. – 2010. – № 142 (5). – P. 687–698.

12. Impact of the omega-3 to omega-6 polyunsaturated fatty acid ratio on cytokine release in human alveolar cells / P. Cotogni [et al.] // JPEN J. Parenter Enteral Nutr. – 2011. – № 35 (1). – P. 114-121.