



Проф. А.Е. Дорофєєв¹, С.В. Голуб², О.Е. Ананьїн², Ю.З. Диня¹

¹Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика

²Черкаський державний технологічний університет

Моделювання взаємозв'язків біологічних маркерів при оцінці активності неспецифічного виразкового коліту

Діагностика, профілактика і лікування запальних захворювань кишківника (ЗЗК) актуальна проблема не тільки сучасної гастроентерології, а й медицини в цілому. Це пов'язано з тим, що в останні роки як в Україні, так і в світі, визначається збільшення кількості хворих на неспецифічний виразковий коліт (НВК) та хворобу Крона. [4] Визначається зростання важких форм і ускладнень цієї патології. Такі пацієнти потребують тривалої базисної терапії, іноді хірургічної допомоги. Важливу роль в ефективному лікуванні НВК відіграє рання, своєчасна діагностика захворювання. На жаль, як в нашій країні, так і за кордоном, від прояву перших симптомів хвороби до постановки діагнозу НВК проходить досить багато часу і тривалість цього періоду варіюється від декількох місяців до декількох років. Рання діагностика НВК з подальшим призначенням адекватної протизапальної терапії має певне значення не тільки в досягненні ремісії, але і робить істотний вплив на прогнозовану тривалість захворювання [11].

При ранній діагностиці НВК на сьогоднішній день велику увагу приділяють малоінвазивним методам дослідження з визначенням біомаркерів. Вони здатні підтвердити наявність запалення в товстому кишечнику і нашкодити лікарю на думку про його імунний характер, що дозволить поставити правильний діагноз. При НВК розвиваються суттєві зміни місцевої і системної імунної відповіді, тому роль в патогенезі НВК імунних змін складно переоцінити. В останні роки увагу дослідників було зосереджено на

комплексному вивченні імунних порушень в поєднанні з аналізом генетичної схильності і змін кишкової мікробіоти. Однак, на ранніх етапах розвитку НВК, при мінімальній його активності не завжди ці зміни досить виражені для повноцінного і правильного трактування діагнозу [14].

Одним з напрямків вивчення імунних порушень є зміни цитокінового каскаду, переважно співвідношення про- та протизапальних інтерлейкінів. При цьому стан іншого компонента імунної відповіді — зміни молекулярних чинників та регуляторів вивчено недостатньо. Нами вивчені епідермальний фактор росту (EGF), фактор росту фібробластів (FGF), які беруть участь в репарації епітелію і відповідають за загоєння поверхневих дефектів слизової оболонки товстої кишки у пацієнтів з НВК [6] Трансформуючий ростовий фактор бета (TGF β) — білок, який контролює проліферацію, клітинне диференціювання, який бере активну участь як в місцевій так і в системній імунній відповіді [3]. А також фактор росту ендотелію судин (VEGF) — сигнальний білок, що виробляється клітинами для стимулювання ангиогенезу, що важливо для відновлення подачі кисню до тканин, особливо в ситуації хронічного запалення, коли циркуляція крові недостатня [12]. Був досліджений хемокіновий (СС мотив) ліганд 17 (CCL 17), який також відомий як TARC. Він являє собою невеликий цитокін, що належить до сімейства СС-хемокінів. Цей хемокін специфічно зв'язує і індукує хемотаксис Т-клітин, що є важливим у розвитку

НВК, особливо при його загостреннях. Крім цього були вивчені одонуклеотидні поліморфізми генів TGF β і VEGF для оцінки ролі генетичної схильності в ранній діагностиці НВК.

З огляду на складність цитокинового каскаду при НВК, була побудована математична модель оцінки впливу досліджуваних показників на ступінь активності у хворих на НВК.

Метою даної роботи було дослідити процес застосування інформаційної технології багаторівневого інтелектуального моніторингу для неінвазивної діагностики активності НВК та оцінки впливовості біомаркерів.

Постановка задачі досліджень

Мета моделювання формалізована як задача класифікації станів хворого.

Дано:

- вектори ознак, що характеризують стани пацієнта

$$X_i = \{x_{i,1}; x_{i,2}; \dots, x_{i,9}\}, i = \{1, n\}, \quad (1)$$

де n — кількість пацієнтів навчальної вибірки. Перелік ознак та їх позначення подані в таблиці 1;

- перелік станів пацієнта:

$$Y = \{y_1, y_2\}, \quad (2)$$

де y_1 — стан пацієнта до лікування, y_2 — пацієнт після лікування перебуває в стані ремісії;

Таблиця 1

Первинний опис об'єктів дослідження

№ з/п	Ознака	Змінна
1	Стать пацієнта	x_1
2	Вік пацієнта	x_2
3	Фактор росту хемокіновий (CC мотив) ліганд 17 (CCL17)	x_3
4	Епідермальний фактор росту (EGF),	x_4
5	Фактор росту фібробластів (FGF)	x_5
6	Трансформуючий ростовий фактор бета (TGF β)	x_6
7	Фактор росту ендотелію судин (VEGF)	x_7
8	Одонуклеотидний поліморфізм гену TGF β	x_8
9	Одонуклеотидний поліморфізм гену VEGF	x_9

- лікарем-експертом сформовані класи станів хворих за векторами ознак, які можуть бути використані для навчання моделей-класифікаторів;

- існує невідоме вирішуюче правило f^* , скориставшись яким за вектором ознак X лікар-дослідник має віднести стан хворого до одного із класів вектору Y . Іншими словами правило f^* відображає множину векторів ознак, що є об'єктами множини X на множину станів Y :

$$f^*: X \rightarrow Y \quad (3)$$

Завдання. Необхідно:

- 1) побудувати вирішуюче правило f^* , що дозволяє класифікувати довільний стан хворого за вектором його ознак.

- 2) оцінити впливовість факторів, ознаки яких утворюють вектор X .

Наукові гіпотези

Для виконання першого завдання була сформульована гіпотеза 1 про те, що різноманітність синтезатора моделей моніторингової інтелектуальної системи (МІС), яка реалізує інформаційну технологію багаторівневого інтелектуального моніторингу [1], є достатньою для синтезу моделі-класифікатора, яка може бути використана в якості вирішуючого правила f^* , при розв'язанні задачі (3).

Для виконання другого завдання була сформульована гіпотеза 2 про те, що якщо модель-класифікатор є корисною і має властивості адекватності та стійкості, то вона містить достовірну інформацію про впливовість факторів, ознаки яких використані в процесі моделювання.

Опис об'єкта моделювання

В останні роки вивчення імунної відповіді й особливо цитокинового каскаду відбувається досить активно, з'являється все більше нової інформації про молекули, що впливають на механізми активації імуннокомпетентних клітин та їх диференціювання, однак увагу дослідників все більше привертають молекулярні системи, що беруть участь у регуляції як місцевої, так і системної імунної відповіді при різноманітних патологіях. Однією з таких регуляторних систем може бути розглянуте суперсімейство трансформуючих факторів росту- β (TGF β), які складаються з TGF β , активінів, інгібіторів, Nodal, кісткових морфогенетичних білків (BMPs), анти-мюллерівського гормону (AMH; також відомого як інгібуєчий фактор Мюллера), а також факторів росту і диференціації (GDFs) [8]. TGF β сам по собі бере участь у багатьох клітинних процесах, в тому числі у інгібуванні росту, міграції клітин, інвазії, епітеліально-мезенхімальній трансформації (EMT), ремодельованні позаклітинного матриксу (ECM) та імуносупресії. [16] Хоча він зазвичай динамічно регулюється і бере участь в підтримці гомеостазу тканин, TGF β часто хронічно надмірно експресується при розвитку раку, фіброзу і запалення, і ця надлишкова продукція TGF β стимулює прогресування захворювання шляхом модуляції клітинного росту, міграції чи зміни клітинного фенотипу [10].

Результати досліджень

З метою підтвердження гіпотези 1 був проведений експеримент. Первинний опис та масив вхідних даних (МВД) формувався за результатами обстеження 93 пацієнтів з НВК різного ступеня активності захворювання. Хворі були у віці від 18 до 68 років. У всіх пацієнтів вивчався епідермальний фактор росту (EGF), фактор росту фібробластів (FGF), трансформуючий ростовий фактор бета (TGF β) фактор росту ендотелію судин (VEGF), а також хемокіновий (CC мотив) ліганд 17 (CCL17). Рівні цих цитокінів вивчали в сироватці крові з використанням імуноферментного методу із застосуванням спеціа-

лізованих наборів ELISA BCM. Крім цього були визначені однонуклеотидні поліморфізми генів TGFβ і VEGF. Для генотипування пацієнтів за вказаними поліморфізмами використовували зразки тотальної ДНК і ДНК, виділені з цільної венозної крові. ДНК виділяли набором «АмпліПрайм ДНК-сорб-В». Аallelні варіанти генів визначали методом ПЛР з використанням діагностичних наборів для виявлення поліморфізмів в геномі людини «SNP — експрес» виробництва НВФ «Літех». Матеріалом для виділення ДНК була цільна венозна кров.

Масив вхідних даних формувалася шляхом поєднання вектору ознак хворого у двовимірну таблицю даних. Для синтезу моделі-класифікатора використовувався багаторядний алгоритм МГУА [2], який реалізовано в структурі синтезатора МІС [1].

Для навчання моделей використовувались результати досліджень 84 пацієнтів, що були попередньо класифіковані лікарем-експертом і перебували в обох станах. Клас «у₁» позначено як «10», клас «у₂» позначався як «0». Для випробування моделей використовувались вектори ознак 9 пацієнтів екзаменаційної послідовності, які перед цим не використовувались для навчання моделей.

Модель отримувалася у формі ступеневого полінома. Результати випробування моделі подані в таблиці 2.

Таблиця 2

Результати випробувань моделі-класифікатора

Номер карти	Значення класу задане	Значення класу змодельоване	Результат класифікації
302131	10	0,05	1
302132	10	0,27	1
302133	10	0,49	1
302135	10	0,94	1
302116	0	-0,01	1
302117	0	-0,31	1
302118	0	-0,14	1
302120	0	-0,51	1
302121	0	-0,04	1

Межею розділення результатів моделювання на класи є значення змодельованого класу «0». Всі пацієнти, результат моделювання яких був більше нуля, відносився до класу у₁. Всі інші відносились до класу у₂.

Зважаючи на результати, подані в таблиці 2, є можливість зробити висновок, що вдалось отримати модель f*, яка правильно класифікувала всі стани пацієнтів. Це доводить її адекватність. Цей результат отримано на даних, які не використовувались для навчання моделі. І це доводить її стійкість. Таким чином, гіпотеза 1 отримала своє експериментальне підтвердження. Різноманітності синтезатора моделей МІС достатньо для побудови вирішуючих правил, що дозволяють класифікувати стан хворого за вектором ознак, перелік яких поданий в таблиці 1.

Для експериментального підтвердження гіпотези 2 була досліджена модель-класифікатор f* з метою

оцінки впливовості факторів, ознаки яких використані в процесі моделювання. Для цього визначались частинні похідні моделі f* по кожній змінній [1]. Коефіцієнти впливовості розраховувались за виразом (4):

$$W_j = \frac{f_j^{*'}}{\sum_{j=1}^k f_j^{*'}}, \quad (4)$$

де W_j — коефіцієнт впливовості j-го фактору, f_j* — частинна похідна моделі f* по ознаці, позначеній змінною моделювання x_j, k — кількість змінних моделювання, поданих в таблиці 1.

Результати досліджень подані в таблиці 3.

Таблиця 3

Впливовість факторів моделі-класифікатора

№ з/п	Змінна	Значення вагового коефіцієнта, %	Напрямок зміни функції f*
1	x ₁	13,15	Спадає
2	x ₂	21,68	Зростає
3	x ₃	2,97E-17	Спадає
4	x ₄	2,97E-17	Спадає
5	x ₅	2,97E-17	Спадає
6	x ₆	65,17	Зростає
7	x ₇	1,06E-16	Спадає
8	x ₈	1,06E-16	Спадає
9	x ₉	1,06E-16	Спадає

Інтерпретація результатів дослідження моделі проводилась експертним шляхом. За результатами таблиці 3 можна зробити висновок про те, що найбільший вплив на стан досліджених пацієнтів має фактор, що позначений змінною x₆ — трансформуючий ростовий фактор бета (TGFβ). Його коефіцієнт впливовості 65,17%. При збільшенні кількості цього цитокіну при дослідженні пацієнта, значення модельованого показника зростає, тобто наближається до класу у₁ — до стану, в якому пацієнт перебував до лікування. Зростання значення змінної x₁ приводить до зменшення значення модельованого показника, наближаючи його до класу «ремісія», що може означати те, що хворих чоловіків серед досліджених пацієнтів менше ніж жінок. Зростання віку пацієнта, який позначено змінною x₂, призводить до зростання модельованого показника, тобто наближає пацієнта до класу у₁ — хворий перед лікуванням.

Аналіз та інтерпретація результатів досліджень

За результатами інтелектуального моніторингу у пацієнтів з НВК виявлено значну роль TGFβ у розвитку активного запалення порівняно з іншими вивченими цитокінами, а також показано мінімальний вплив на процеси, що індукуються, TGFβ, однонуклеотидного поліморфізму гена TGFβ. Це може бути пов'язано з тим, що регуляторні Т-клітини і дендритні клітини (ДК) слизової оболонки кишківника можуть брати участь в синтезі як TGFβ, так і кофакторних молекул, що активують TGFβ-залежний шлях

імунної відповіді, і цим допомагають підтримувати імунний гомеостаз кишечника [13]. TGF β -залежні регуляторні T-лімфоцити при низькому рівні TGF β профілактично можуть обмежувати активність і поширеність запалення в кишечнику шляхом прямого пригнічення T-ефекторної первинної активності і вродженої ефекторної функції [5]. Паралельно ДК слизової оболонки товстого кишечника можуть продукувати ретиноеву кислоту, важливий кофактор у TGF β -залежній генерації T-регуляторних клітин в кишечнику [7]. Це може стимулювати розвиток запалення в слизовій оболонці товстого кишечника і призводити до високої активності НВК.

Іншим важливим механізмом впливу TGF β -залежного сигнального шляху при НВК є EMT і ESM. Запальні зміни кишечника з перебудовою позаклітинного матриксу можуть відігравати важливу роль у розвитку пухлини — колоректального раку, виникнення якого залежить не тільки від тривалості НВК, але і від його активності і поширеності [9]. Аберрантно функціонуючі загальні сигнальні шляхи і молекули можуть пов'язувати між собою імунну відповідь і прогресування раку [17]. Відповідно з цим, дефекти імунної толерантності в кишечнику по відношенню до алергенів, харчових антигенів, коменсальних мікроорганізмів або недостатня негативна імунна регуляція може викликати сильне запалення, що призводить до колоректального раку, пов'язаного з НВК. [15]

Отже, сигнальний шлях імунної відповіді, що пов'язаний з TGF β є важливим у патогенезі НВК, а його рівень у сироватці крові може бути біологічним маркером активності захворювання.

Висновки

В роботі вперше використано інформаційну технологію багаторівневого інтелектуального моніторингу з метою виявлення залежності активності НВК від особливостей цитокинового каскаду та оцінки впливовості біоіндикаторів. Виявлено:

1. Індуктивні моделі, що побудовані моніторинговою інтелектуальною системою за результатами спостереження залежності активності НВК від значень біоіндикаторів цитокинового каскаду, є адекватними і можуть використовуватись для забезпечення інформацією процесів прийняття рішення лікаря.

2. За допомогою отриманої моделі можна прогнозувати і оцінювати активність НВК, а також визначати важливість окремих цитокинів, регуляторних молекул і генетичних поліморфізмів у розвитку захворювання.

3. TGF β -залежний сигнальний шлях імунної відповіді відіграє важливу роль у патогенезі НВК, а рівень TGF β у сироватці крові може розглядатись як новий незалежний біологічний маркер активності захворювання.

Список використаної літератури

1. Голуб С.В. Багаторівневе моделювання в технологіях моніторингу оточуючого середовища. /Голуб С.В./ Черкаси: Вид. від. ЧНУ імені Богдана Хмельницького, 2007. — 220 с.
2. Ивахненко А.Г. Индуктивный метод самоорганизации моделей сложных систем. /Ивахненко А.Г./ Киев: Наукова думка, 1981. 296 с.
3. Akhurst RJ. The paradoxical TGF- β vasculopathies. //Nature Genet. — 2012. -Vol.44. — P.838—839
4. Burisch J, Munkholm P. The epidemiology of inflammatory bowel disease.// Scand J Gastroenterol. — 2015. — Vol.50(8). — P.942-51.
5. Coombes JL, Robinson NJ, Maloy KJ, Uhlig HH, Powrie F. Regulatory T-cells and intestinal homeostasis. //Immunol Rev. — 2005. — Vol.204.-P.184—94.
6. Durante C., Agostini F., Abbruzzese L., Toffola R. T., Zanolin S., Suine C., and Mazzucato M. (2013) Growth factor release from platelet concentrates: analytic quantification and characterization for clinical applications.// Vox Sang. — 2018. — Vol.105. — P. 129—136
7. Elias KM, Laurence A, Davidson TS, et al. Retinoic acid inhibits Th17 polarization and enhances FoxP3 expression through a Stat-3/Stat-5 independent signaling pathway. // Blood. — 2008. — Vol.111. — P.1013—20.
8. Flavell RA, Sanjabi S, Wrzesinski SH, Licona-Limon P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGF β //Nature Rev. Immunol. — 2010. — Vol.10. — P. 554—567.
9. Grivennikov S. I., Greten F. R., Karin M. Immunity, inflammation, and cancer.// Cell. — 2010. — Vol.140(6). — P.883—899.
10. Hawinkels LJ, Ten Dijke P. Exploring anti-TGF- β therapies in cancer and fibrosis.// Growth Factors. — 2011. — Vol.29. — P.140—152.
11. Harbord M, Eliakim R, Bettenworth D, et al. Third European Evidence-Based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 2: Current Management.// J Crohns Colitis. — 2017. — Vol.38. — P.12-78.
12. Johnson K.E., Wilgus T.A. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair.// Adv. Wound Care. — 2014. — Vol.3. — P.647—661.
13. Maynard CL, Weaver CT. Intestinal effector T-cells in health and disease.// Immunity. — 2009. — Vol.31. — P.389—400
14. Nguyen GC, Seow C, Maxwell C, et al. The Toronto consensus statements for the management of inflammatory bowel disease in pregnancy.// Gastroenterology.- 2016. — Vol.150. — P.734—57.
15. Saleh M., Trinchieri G. Innate immune mechanisms of colitis and colitis-associated colorectal cancer. // Nature Reviews Immunology. — 2011. — Vol.11(1). — P.9—20.
16. Schmierer B, Hill CS. TGF β -SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. //Nature Rev. Mol. Cell Biol. — 2007. — Vol.8. — P.970—982
17. Taniguchi K., Karin M. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age.// Nature Reviews Immunology. — 2018. — Vol.18(5). — P.309—324.

Моделирование взаимосвязей биологических маркеров при оценке активности неспецифического язвенного колита

Проф. А.Е. Дорофеев¹, С.В. Голуб², О.Е. Ананьин², Ю.З. Диня¹

¹Национальная медицинская академия последиplomного образования имени П. Л. Шупика

²Черкасский государственный технологический университет

В статье представлено исследование процессов применения информационной технологии многоуровневого интеллектуального мониторинга для неинвазивной диагностики активности неспецифического язвенного колита (НЯК) и оценки влияния биомаркеров. У всех пациентов изучался эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста фибробластов (FGF), трансформирующий ростовой фактор бета (TGF β) фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), а также хемокиновый (CC мотив) лиганд 17 (CCL17). Кроме этого были определены однонуклеотидные полиморфизмы генов TGF β и VEGF. Индуктивные модели, построенные мониторинговой интеллектуальной системой по результатам наблюдения зависимости активности НЯК от значений биоиндикаторов цитокинового каскада, являются адекватными и могут использоваться для обеспечения информацией процессов принятия решения врача. TGF β -зависимый сигнальный путь иммунного ответа играет важную роль в патогенезе НЯК, а уровень TGF β в сыворотке крови может рассматриваться как новый независимый биологический маркер активности заболевания.

Ключевые слова: неспецифический язвенный колит, математическое моделирование, биологические маркеры.

Relationship modeling of biomarkers in assessing the activity of ulcerative colitis

Prof. A.E. Dorofeyev¹, S.V. Golub², O.E. Ananin², Yu.Z. Dynia¹

¹National Medical Academy of Postgraduate Education named after P. L. Shupyk

²Cherkasy State Technological University

The article presents a study of the processes of information technology application of multi-level intelligent monitoring for non-invasive diagnosis of ulcerative colitis (UC) activity and assessment of the impact of biomarkers. Epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), transforming growth factor beta (TGF β) vascular endothelial growth factor (VEGF), and chemokine (CC motif) ligand 17 (CCL17) were studied in all patients. In addition, single nucleotide polymorphisms of the TGF β and VEGF genes were identified. Inductive models constructed by the monitoring intellectual system based on the observation of the dependence of UC activity on the values of bioindicators of the cytokine cascade are adequate and can be used to provide information to the physician's decision-making processes. The TGF β -dependent signaling pathway of the immune response plays an important role in the pathogenesis of UC, and the serum TGF β level can be considered as a new independent biological marker of disease activity.

Key Words: ulcerative colitis, mathematical modeling, biomarkers.

Контактна інформація: Дорофеев Андрій Едуардович —
доктор медичних наук, професор кафедри терапії Національної медичної
академії післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика,
Київ, 04112, вул. Рейтарська, 22, тел.: +38-099-769-39-45,
e-mail: doroseyevand@gmail.com

Стаття надійшла до редакції 20.02.2019 р.