

Т.П. Николаенко-Камышова

КУ «Городская
многопрофильная клиническая
больница № 4» ОГА,
Днепропетровск, Украина

Ключевые слова: фибронектин,
сосудистые осложнения,
миелопролиферативные
неоплазии.

О РОЛИ ФИБРОНЕКТИНА КАК ФАКТОРА РИСКА В РАЗВИТИИ СОСУДИСТЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ У БОЛЬНЫХ С МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫМИ НОВООБРАЗОВАНИЯМИ

Цель: уточнение зависимости развития тромботических осложнений у пациентов с миелопролиферативными новообразованиями (МПН) от содержания в плазме крови и функциональной активности фибронектина (ФН) и его фрагментов (фФН). **Объект и методы:** проанализированы клинические проявления и стандартные клиничко-лабораторные показатели 110 больных с МПН (31 — с истинной полицитемией, 75 — с первичным миелофиброзом, 4 — с эссенциальной тромбоцитемией), у 38 из которых развились тромботические осложнения. Группы сравнения — 92 пациента с атеросклеротическим поражением сосудов нижних конечностей (проявления атеротромбоза) и 30 практически здоровых людей. Определяли также концентрацию, фрагментированность, гепаринсвязывающую активность ФН. **Результаты:** изменения исследованных характеристик ФН определяют риск развития сосудистых осложнений и при МПН, и при атеросклеротическом поражении сосудов, однако имеют ряд отличий. При МПН связывание ФН с гепарином снижено, определяется значительное количество фФН с мол. массой 180–200; 90–98 и 75–80 кДа. При атеросклеротических процессах функциональная активность ФН повышена, существенно возрастает и степень его деградации (дополнительно увеличивается количество фФН со средней (80–40 кДа) и малой (20–15 кДа) мол. массой). **Вывод:** изменение характеристик ФН плазмы крови может быть использовано для прогнозирования тромбозоморрагических осложнений у больных с МПН.

В условиях онкогематологической клиники проблема сосудистых осложнений наиболее актуальна у пациентов с миелопролиферативными новообразованиями (МПН). Кардиоваскулярные события являются основной причиной смерти примерно $\frac{1}{3}$ пациентов [1–3].

Поскольку постоянное субклиническое тромбообразование (тромбофилия) приводит к микрососудистым нарушениям с периферической сосудистой ишемией, готовность к тромбообразованию формируется еще до изменений в гемостазиограмме. В ходе патологических изменений развиваются стенозирующие процессы в сосудах за счет фибропролиферативного клеточного ответа с органными и общими расстройствами кровообращения [4]. Последовательность биологических событий заключается в проникновении в субэндотелиальное пространство клеточных элементов, связанных с воспалением, а также в активации и дегрануляции тромбоцитов с выделением ими тканевого фактора, миграции и пролиферации стромальных клеток. Ведущая роль в этом процессе принадлежит пролиферирующим гладкомышечным клеткам и/или макрофагам. Активный фиброгенез происходит не только при органосклерозах (цирроз печени, нефро-, кардио-, пневмо-, атеро-

склероз, спаечные процессы, миелофиброз, коллагенозы), но и при любых других повреждениях ткани.

Процессы воспаления, регенерации, злокачественной трансформации клеток имеют общие черты с изменением синтеза белков острой фазы: С-реактивного белка (СРБ), церулоплазмينا, альфа-2-микроглобулина, фибриногена, альфа-кислого гликопротеина, фибронектина (ФН). Общей функциональной характеристикой белков острой фазы является их способность изменять коагуляцию крови и реакции микроциркуляторного русла, ограничивать процессы деструкции тканей и удалять продукты их распада.

Усиленная продукция компонентов соединительнотканного матрикса, вызванная воспалительной реакцией, как правило, сбалансирована, но остаются неуточненными ключевые регуляторные механизмы, детерминирующие уровень фиброзного ответа. Эти процессы могут быть связаны с изменением состояния основного адгезивного гликопротеина соединительной ткани — ФН.

ФН — мультифункциональный гепаринзависимый гликопротеин плазмы и экстрацеллюлярного матрикса, который является связующим звеном между системами гемостаза, фибринолиза и иммунитета. Наиболее распространен ФН плазмы (растворимый),

который синтезируется гепатоцитами и циркулирует в кровяном русле. Около 60–95% образующегося белка секретируется в экстрацеллюлярном матриксе, 5–40% остается внутри клетки и на ее поверхности. Клеточный ФН (нерастворимый) — основной адгезивный фактор соединительной ткани, содержащийся преимущественно в эндотелии и в экстрацеллюлярном матриксе в виде мультимеров, может синтезироваться фибробластами, эндотелиоцитами, лейкоцитами, тромбоцитами и другими клетками.

Концентрация ФН в плазме крови здоровых людей зависит от пола, возраста, массы тела, гормонального статуса, функции печени и колеблется в пределах 0,3–0,6 г/л. Ее определение используют как маркер ряда заболеваний, но этот показатель не является специфичным. Высокое содержание ФН в плазме свидетельствует о повреждении эндотелия. В этой связи ФН считают фактором тромбогенности в артериальной и венозной системах [5]. Поскольку в процессе тромбообразования наиболее значимыми являются повреждение сосудистой стенки, тромбофилия и гемодинамические расстройства, а ФН в них задействован, степень деградации ФН может отображать тяжесть и глубину патологического процесса.

Белковая часть молекулы ФН составляет 75–90%, углеводная часть — 10–25% от общей массы. В ФН содержится от 4 до 9% углеводов, определяющих его устойчивость к действию протеолитических ферментов и взаимодействиям между клеточной поверхностью и экстрацеллюлярным матриксом. ФН может находиться в различных состояниях: нативном — в виде димеров, состоящих из одинаковых субъединиц; агрегированном — в виде мультимеров и комплексов; деградированном — в виде фрагментов, возникающих в процессе протеолиза. Молекула нативного ФН имеет мол. массу 220 кДа и содержит участки с высокой чувствительностью к действию отдельных протеиназ. Расщепление ФН плазмы крови происходит под влиянием протеолитических энзимов: сериновых протеиназ, участвующих в тромбообразовании (тромбин, плазминоген, трипсин, хомотрипсин), и металлопротеиназ — компонентов, участвующих в деградации экстрацеллюлярного матрикса. Особенности функциональной активности, степени гликозилирования и фрагментированности ФН плазмы крови больных МПН изучены недостаточно.

Целью проведенного исследования было уточнение зависимости развития тромботических осложнений у пациентов с МПН от содержания и функциональной активности ФН и его фрагментов.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведен анализ клинических проявлений и клинико-лабораторных показателей 110 пациентов (69 мужчин, 41 женщина) с МПН. У 31 больного диагностирована истинная полицитемия, у 75 — первичный миелофиброз, у 4 — эссенциальная тромбоцитемия. У 33 пациентов с МПН развились тромботические осложнения. В две группы срав-

нения были включены: 92 больных (67 мужчин, 25 женщин) с атеросклеротическим поражением сосудов нижних конечностей (38 из них — с атеротромбозом); 30 практически здоровых людей (доноров). Возраст больных с МПН колебался в пределах 22–75 лет; первые признаки заболевания появлялись чаще всего в возрасте >50 лет. Пациенты с атеросклеротическим поражением сосудов были в возрасте 45–75 лет. Средний возраст в обеих группах достоверно не отличался ($p > 0,05$). Все лица, входящие в перечисленные выше группы, дали информированное согласие на включение в исследование.

Определение клинико-лабораторных характеристик проводили в момент первичной диагностики МПН. У пациентов был проведен стандартный комплекс клинико-лабораторных исследований, включающий развернутый анализ крови; определение ряда биохимических показателей (СРБ, активность лактатдегидрогеназы); гемостазиограмма, миелограмма; гистологическое изучение трепанобиоптатов подвздошной кости, УЗИ органов брюшной полости.

Анализ концентрации, гепарин-связывающей активности, фрагментированности ФН проводили согласно общепринятым методикам.

Функциональную активность ФН оценивали с помощью метода холодовой гепарин-преципитации, который базируется на способности ФН выпадать в осадок при температуре 4 °С в присутствии гепарина. К 50 мкл плазмы крови добавляли гепарин («Pharma Life», Украина) с активностью 1 МО и инкубировали в течение ночи при температуре 4 °С. Образовавшийся преципитат отделяли центрифугированием при 2400 об./мин в течение 10 мин. В дальнейшем содержание ФН в супернатанте определяли с помощью иммуодота. Количество функционального ФН, который перешел в гепариновый преципитат, определяли по формуле:

$$A_{\text{ФН}} = ((C_{\text{ФН1}} - C_{\text{ФН2}}) / C_{\text{ФН1}}) \cdot 100\%,$$

где $A_{\text{ФН}}$ — активность ФН; $C_{\text{ФН1}}$ — концентрация ФН в плазме до преципитации; $C_{\text{ФН2}}$ — концентрация ФН в гепариновом супернатанте. Конечный показатель рассчитывали как процент относительно нормы, принятой за 100%; нормативный уровень — $0,324 \pm 0,045$ мкг/мл.

Ферментативный гидролиз ФН *in vitro* проводили путем инкубации коммерческого препарата ФН («Sigma», США) с сериновыми протеиназами: (трипсин, хомотрипсин, тромбин, плазминоген). Протеолиз осуществляли в 0,1 М забуференном физиологическом растворе хлорида натрия pH 7,4 при 37 °С при различных соотношениях (w/w) энзим/субстрат: 1/10, 1/100, 1/1000. Время инкубации зависело от активности фермента: для трипсина (Sigma, США) и хомотрипсина (Sigma, США) были выбраны интервалы 30 с, 1 мин, 10 мин, 30 мин, 1 ч, 4 ч; для тромбина («Ренам», Россия) — 6; 12; 24 ч. Плазминоген использовали в соотношении (w/w) энзим/субстрат 0,5/1,0, что отвечает физиологическим условиям (средняя концентрация ФН в плазме крови 300–400 мкг/мл, плазми-

ногена — 150–200 мкг/мл). Уже после 30 мин инкубации с трипсином и хемотрипсином ФН расщеплялся с образованием 26 полипептидов, мол. масса наибольшего из них составляла 165 кДа, а зона 220 кДа (нативная единица) отсутствовала. Через час на блотограмме определяли фрагменты фибронектина (фФН) в пределах 115,0–17,5 кДа, а увеличение продолжительности действия ферментов привело к дальнейшей деградации ФН с исчезновением фФН 115 кДа и уменьшением общего количества пептидов.

Статистический анализ результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента; определяли также коэффициент корреляции r . Различия результатов считали статистически значимым при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Показатели уровня и гепаринсвязывающей активности ФН в плазме крови здоровых доноров, больных с МПН (истинная полицитемия, первичный миелофиброз, эссенциальная тромбоцитемия), а также больных с атеросклерозом приведены в табл. 1.

Таблица 1

Содержание и функциональная активность ФН плазмы крови

Группа обследованных	Концентрация ФН (мкг/мл)	Степень связывания с гепарином (%)	Коэффициент корреляции (r)
Доноры ($n = 30$)	$324,56 \pm 14,62$	100,00	0,322
Пациенты с атеросклеротическим поражением сосудов нижних конечностей ($n = 92$)	$375,19 \pm 21,34$	$149,76 \pm 8,64^*$	0,114 [*]
Пациенты с истинной полицитемией ($n = 31$)	$240,72 \pm 12,97^{***}$	$55,48 \pm 7,22^*$	0,849 ^{**}
Пациенты с первичным миелофиброзом ($n = 75$) и эссенциальной тромбоцитемией ($n = 4$)	$237,85 \pm 10,99^{**}$	$59,96 \pm 2,41^*$	0,746 ^{**}

Тут и далее: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по сравнению с показателями доноров.

Уровень ФН в плазме крови при МПН достоверно снижался (по сравнению с показателями практически здоровых людей $p < 0,001$ — при истинной полицитемии, $p < 0,01$ — при первичном миелофиброзе и тромбоцитемии). У больных с атеросклерозом его уровень оставался в пределах нормативных значений. Определение функциональной активности ФН по степени связывания с гепарином показало достоверное ($p < 0,05$) снижение этого показателя при МПН, тогда как у больных с атеротромбозом активность ФН, напротив, была достоверно повышена ($p = 0,05$). Концентрация ФН и его функциональная активность положительно коррелировали во всех группах обследованных, однако по сравнению с коэффициентом корреляции у практически здоровых лиц степень корреляции была статистически значимо снижена ($p < 0,05$) у пациентов с атеросклерозом и повышена ($p < 0,01$) у пациентов с МПН.

Сравнительные данные подгрупп больных атеросклерозом или МПН с неосложненным течением и перенесших сосудистые осложнения приведены в табл. 2. Как видно, изменения концентрации

и функциональной активности ФН у больных с МПН и атеросклерозом носят разнонаправленный характер и зависят от типа заболевания. Снижение уровня ФН плазмы крови и его гепаринсвязывающей активности при МПН особенно выражено у больных с тромботическими осложнениями, что можно объяснить повышенным потреблением ФН в процессе тромбообразования. При неосложненном атеросклеротическом поражении сосудов концентрация ФН существенно повышена по сравнению с нормативными показателями, при атеротромбозе — соответствует показателям контрольной группы. Тенденцию к снижению уровня ФН у больных атеросклерозом, перенесших сосудистые осложнения, можно объяснить повышенным его потреблением в коагуляционных процессах. Функциональная активность ФН возрастает, особенно у пациентов с атеротромбозом, что указывает на прогрессирующую гиперкоагуляцию.

Таблица 2

Содержание и функциональная активность ФН плазмы крови при МПН и атеросклерозе с неосложненным течением и тромботическими осложнениями

Группа обследованных	Концентрация ФН, мкг/мл	Степень связывания с гепарином (%)
Пациенты с атеросклеротическим поражением сосудов нижних конечностей		
неосложненным ($n = 54$)	$376,3 \pm 16,1^*$	$154,4 \pm 8,9^{**}$
осложненным ($n = 38$)	$367,4 \pm 19,7$	$176,3 \pm 20,2^{**}$
Пациенты с истинной полицитемией		
неосложненной ($n = 18$)	$257,2 \pm 13,3^*$	$63,8 \pm 6,8^*$
осложненной ($n = 13$)	$223,4 \pm 9,1^{**}$	$48,8 \pm 8,5^*$
Пациенты с первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией		
неосложненной ($n = 59$)	$263,4 \pm 17,6^*$	$65,5 \pm 13,3^*$
осложненной ($n = 20$)	$218,5 \pm 13,2^{**}$	$42,5 \pm 12,5$

Как свидетельствуют данные рис. 1, 2, фрагментированность ФН плазмы крови и в процессе протеолитической деградации *in vitro* имеет ряд отличий при сравнении материалов, взятых от практически здоровых людей, пациентов с МПН и атеросклеротическим поражением сосудов. В условиях нормы в крови циркулируют ФН с мол. массой 230–220; 175–160; 155–150; 140–125; 120; 110–100 и 98–90 кДа соответственно (см. рис. 1, 2).

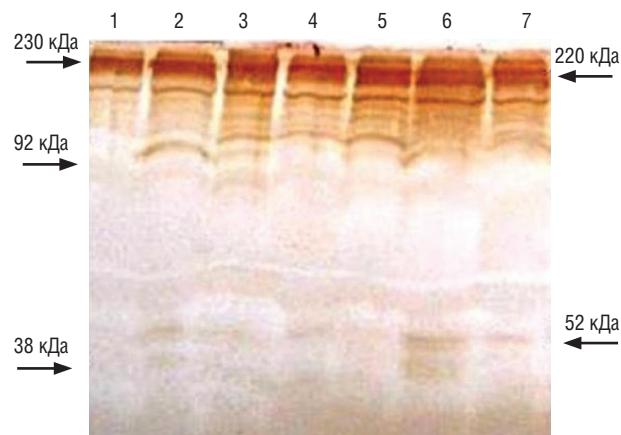


Рис. 1. Фрагментированность ФН плазмы крови: 1 — донора; 2, 3 — больных с первичным миелофиброзом; 4, 5 — больных с истинной полицитемией; 6, 7 — больных с атеросклерозом

При истинной полицитемии наряду с фФН, присутствующими в норме, выявляли новые фрагменты с мол. массой 200; 190–180 и 49–20 кДа. Одновременно уменьшалось количество фФН с мол. массой 175–160; 150–155 и 120 кДа, тогда как частота выявления фФН с мол. массой 98–90 кДа в плазме крови больных значительно повышалась в сравнении с нормой (см. рис. 2).

Спектр фФН плазмы крови больных с первичным миелофиброзом был представлен фрагментами с мол. массой 230–15 кДа, причем у них появлялись новые полипептиды с мол. массой 200; 190–180; 80–75; 59–50; 49–40 и 19–15 кДа, которые в норме, как правило, не выявлялись. Отмечали также значительно больше, чем при истинной полицитемии, содержание фФН с мол. массой 98–90 кДа, но уменьшилось количество фрагментов с мол. массой 175–160 и 155–150 кДа относительно нормы (см. рис. 2).

При атеросклеротическом поражении сосудов выявляли фФН от 220 до 15 кДа. Среди них были новые полипептиды с мол. массой 200; 190–180; 80–75; 72–60; 59–50; 49–40; 39–20 и 19–15 кДа, а содержание фФН с мол. массой 175–160 и 155–150 кДа снизилось. Степень деградации ФН была значительно выше у больных с атеротромбозом, чем у больных с МПН (табл. 3). Сопоставляя данные табл. 2 и 3, можно предположить, что функциональная (гепаринсвязывающая) активность ФН зависит от его фрагментированности.

У больных МПН, перенесших тромботические осложнения, выявляли фФН с мол. массой 200; 190–180; 98–90 кДа (табл. 4). Наиболее характерным признаком было наличие высоких концентраций фФН с мол. массой 98–90 кДа. У пациентов с истинной полицитемией выявляли также фФН с мол. массой 111 и 49–20 кДа. Особенности больных с первичным миелофиброзом были преобладание фФН с мол. массой 200 кДа и наличие фФН с мол. массой 59–50; 19–15 кДа. У пациентов с атеротром-

бозом фФН в основном имели среднюю и малую мол. массу: 80–75; 59–50; 49–40; 19–15 кДа.

Таблица 3
Зависимость функциональной активности ФН от степени его фрагментированности

Группа обследованных	Мол. масса фФН, кДа	Концентрация ФН, мкг/мл	Гепаринсвязывающая активность, %
Пациенты с атеротромбозом (n = 38)	230–15; 200; 190–180; 80–75; 72–60; 59–50; 49–40; 39–20; 19–15	367,4 ± 19,7	176,3 ± 20,2
Пациенты с осложненной истинной полицитемией (n = 13)	200–20; 200; 175–160; 155–150; 120; 59–50; 19–15	223,4 ± 9,1	48,8 ± 8,5
Пациенты с осложненными первичным миелофиброзом и эссенциальной тромбоцитемией (n = 20)	200–15; 200; 175–160; 155–150; 120; 59–50; 19–15	218,5 ± 13,2	42,5 ± 12,5

Таким образом, содержание ФН изменяется в зависимости от типа патологического процесса; его уменьшение отмечают при МПН, увеличение — при атеротромбозе. Снижение уровня ФН, возможно, обусловлено недостаточностью функции печени (основного источника ФН в плазме крови), но вероятна и повышенная его утилизация в печени в качестве опсонина.

Таблица 4
фФН у больных с тромботическими осложнениями

Группы обследованных	Большая мол. масса, кДа	Средняя мол. масса, кДа	Малая мол. масса, кДа
С истинной полицитемией	200; 190–180; 111; 98–90	49–20	Не выявлено
С первичным миелофиброзом	200; 190–180; 98–90	59–50	19–15
С атеротромбозом	200; 190–180; 98–90	80–75; 59–50; 49–40	19–15

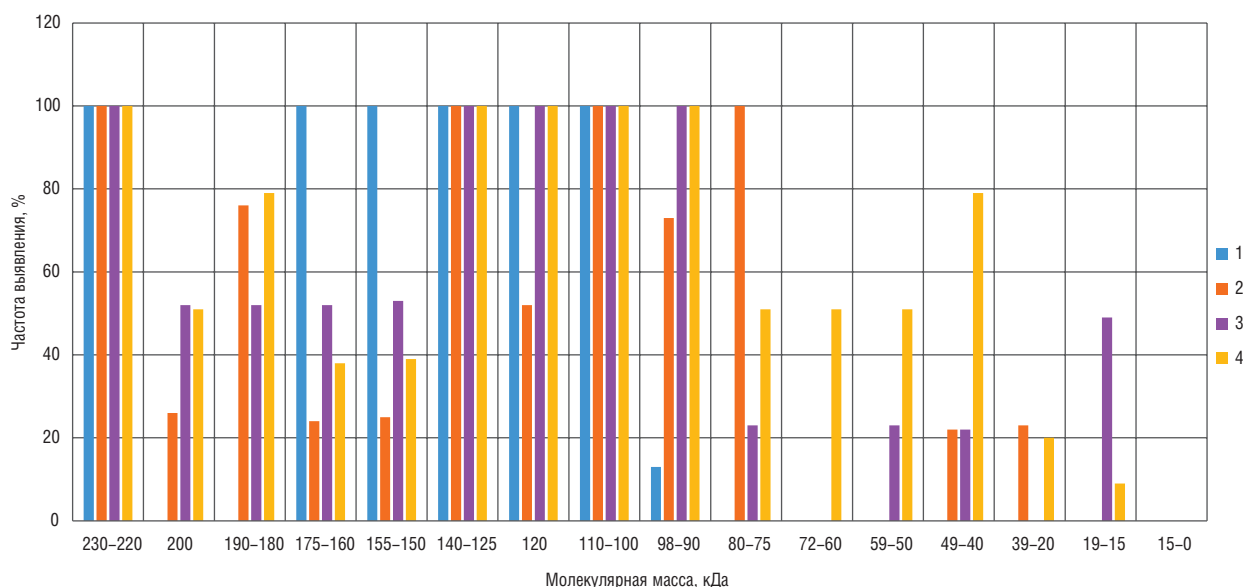


Рис. 2. Частота выявления фФН (%) в норме (1), при истинной полицитемии (2), первичном миелофиброзе и эссенциальной тромбоцитемии (3), атеросклеротическом поражении сосудов (4)

У пациентов всех групп выявлены фФН с большой мол. массой (200–180 кДа), которые отсутствуют в норме. Отмечена также повышенная фрагментированность ФН, в первую очередь за счет фрагментов с мол. массой 98–90 кДа. При атеросклерозе значительным было количество фФН со средней мол. массой. При первичном миелофиброзе и при атеросклерозе выявляли фФН с мол. массой 19–15 кДа. Не исключено, что эти низкомолекулярные фрагменты (как и фрагменты с мол. массой 180–200 кДа) являются компонентами деградации молекулы клеточного ФН. Повышение частоты выявления фрагментов, характерных для деградации ФН под действием трипсина, химотрипсина, коллагеназы и тромбина, может свидетельствовать о гиперкоагуляции.

Повышение функциональной активности ФН при атеросклерозе может указывать на увеличение циркулирующих гепаринсвязывающих фФН, образующихся под действием металлопротеиназ. В частности, увеличивается количество фрагментов с мол. массой 42 кДа, которые могут образовываться при действии ММП-2 и -9. Известно, что эти фрагменты могут связывать гепарин, способствуя тем самым тромбообразованию и формированию гиперкоагуляции.

Наличие фФН 50 и 19–15 кДа (при первичном миелофиброзе и атеротромбозе) также способствует активизации тромбоцитов и лейкоцитов, которые могут повышать риск тромбообразования.

ВЫВОДЫ

1. Концентрация, функциональная активность и фрагментированность ФН определяют степень риска развития сосудистых осложнений у пациентов с атеросклеротическим поражением сосудов и при МПН. Во всех случаях изменения вышеперечисленных показателей свидетельствуют о гиперкоагуляции, проявлениях эндотелиальной дисфункции и деградации экстрацеллюлярного матрикса.

2. ФН как маркер тромбгеморрагических осложнений участвует в тромбообразовании разнонаправленно: при атеросклеротических процессах функциональная активность ФН повышается и деградация его наиболее высока; при МПН степень связывания ФН с гепарином снижена, но определяется значительное количество фФН, которые, связываясь с фибрином, становятся дополнительным компонентом в стимуляции активности нейтрофилов и тромбоцитов, что может привести к внутрисосудистому тромбообразованию.

3. Степень деградации ФН значительно выше у больных с атеротромбозом, чем у больных с осложненными МПН.

4. Изменение характеристик ФН плазмы крови может быть использовано для прогнозирования тромбгеморрагических осложнений у больных с МПН.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Демидова АВ. Истинная полицитемия. В кн.: Клиническая онкогематология. /Под ред.: МА Волковой. Москва: Медицина, 2001: 272–89.

2. Вознюк ВП. Напряжение сдвига и механочувствительность эндотелия у пациентов с истинной полицитемией. Укр журн гематол трансфузиол 2008; (2): 27–30.

3. Гусева СА, Бессмельцев СС, Абдулкадыров КМ, Гончаров ЯП. Истинная полицитемия. Киев — Санкт-Петербург: Логос, 2009. 398 с.

4. Габассов АГ. Тромбоциты и ядросодержащие клетки крови в развитии стенозирующих поражений артерий [Автореф дис... док биол наук]. Москва, 2011. 31 с.

5. Баркаган ЗС, Рудакова ВЕ, Суханова ГА, Виноградов ВЛ. Гиперкоагуляционный синдром у больных с гематогенными тромбофилиями. Лаб диагностика 2006; (3): 71–5.

ROLE OF FIBRONECTIN AS A RISK FACTOR IN DEVELOPING OF VASCULAR COMPLICATIONS IN PATIENTS WITH MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASIAS

T.P. Nikolaenko-Kamyschova

Summary. Objective: clarification based on development of thrombotic complications in patients with myeloproliferative neoplasms (MPN) according the content and functional activity of fibronectin (FN) and its fragments (fFN) in the blood plasma. **Object and methods:** we have analyzed clinical manifestations and standard clinical and laboratory indices in 110 MPN patients (31 — with polycythemia vera, 75 — primary myelofibrosis, 4 — essential thrombocythemia), 38 of which were developed thrombotic complications. A comparison group — 92 patients with atherosclerotic defeat of vessels of lower extremities (manifestations of atherothrombosis) and 30 apparently healthy people. Also were determined concentration, fragmented, heparin-binding activity of FN. **Results:** the changes of the FN examined characteristics determine the risk of the development of vascular complications and MPN, and in atherosclerotic vascular lesions, however, have a number of differences. In MPN linking of TN with heparin is reduced, a considerable number of fFN with a molecular weight 180–200, 90–98 and 75–80 kDa is determined. In atherosclerotic processes functional activity of FN increased significantly, and increases the degree of its degradation (optional increases the number fFN with average (80–40 kDa) and small (20–30 kDa) molecular mass). **Conclusion:** changing characteristics of FN blood plasma may be used for forecasting thrombohemorrhagic complications in MPN patients.

Key Words: fibronectin, vascular complications, myeloproliferative neoplasias.

Адрес для переписки:

Николаенко-Камышова Т.П.
49102, Днепропетровск, ул. Ближняя, 31
КУ «Городская многопрофильная клиническая больница № 4» ОГА, городской гематологический центр
E-mail: dr.nik4@rambler.ru

Получено: 13.02.2014