

УДК 616.132.2-008.6-002:615.224:577.112

ХАРАКТЕР ФРАГМЕНТАЦИИ ФИБРОНЕКТИНА У БОЛЬНЫХ С ОСТРЫМИ КОРОНАРНЫМИ СИНДРОМАМИ В РАННИЕ СРОКИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

О.А. Мараренко¹, Е.А. Коваль², А.И. Шевцова²¹- Коммунальное учреждение «Клиническое объединение скорой медицинской помощи» при Днепропетровском областном совете, Днепропетровск, Украина²- ГУ «Днепропетровская медицинская академия», Днепропетровск, Украина

Целью работы было исследование степени деградации фибронектина при различных формах острых коронарных синдромов. Методом иммуноблоттинга с использованием специфических антител к фибронектину плазмы крови человека исследовали спектр фрагментов фибронектина у больных с острым коронарным синдромом: без элевации сегмента ST (n=40), с элевацией ST в ранние сроки с тромболитисом (n=64), с элевацией ST в поздние сроки без тромболитиса (n=31). Установлено, что во всех исследуемых группах появляются новые фрагменты фибронектина 125-140кДа, достоверно увеличивается частота выявления фрагментов 20-38, 100-110 и 165-175кДа, снижается частота фрагментов 60-72, 75-80, 90-95кДа. Сделан вывод об активации процессов деградации фибронектина при всех формах острого коронарного синдрома, обоснована его роль в патогенезе заболевания как звена, связывающего механизмы тромбоза и воспаления.

Ключевые слова: острый коронарный синдром, протеолиз, фрагментация фибронектина.

Введение. Высокая частота острых коронарных синдромов и их осложнений определяет актуальность поиска новых прогностических маркеров этих состояний. К числу возможных кандидатов на эту роль можно отнести продукты деградации фибронектина [1].

Фибронектин - полифункциональный гликопротеин плазмы крови, межклеточного матрикса, цереброспинальной, амниотической и синовиальной жидкости [2]. Молекула фибронектина состоит из двух субъединиц молекулярной массой 220 кДа, связанных двумя дисульфидными связями в С-терминальном конце [7, 9]. В организме фибронектин может находиться в разных состояниях: нативный - в форме димеров, агрегированный - в форме комплексов и мультимеров [12], деградированный - в виде фрагментов (ФФН). На сегодняшний день выявлено большое количество ФФН, формирование которых зависит от специфичности и активности разных протеаз [2]. Установлено, что отдельные фрагменты имеют свою биологическую активность, отличающуюся от нативного фибронектина, причем некоторые из них могут проявлять аутокаталитическую активность и усиливать деградацию исходного белка [5]. В наших предыдущих исследованиях показано, что атеросклероз и его осложнения сопровождаются изменением спектра фрагментов фибронектина [1, 2], однако характер фрагментации этого белка при разных формах острого коронарного синдрома (ОКС) не исследовался. Между тем, изучение этих показателей может дать ценную информацию для прогноза дальнейшего течения заболевания.

Целью настоящего исследования был сравнительный анализ продуктов деградации фибронектина, циркулирующих в крови на момент госпитализации у пациентов с разными формами ОКС, с учетом особенностей формирования и биологической активности отдельных его фрагментов.

Материалы и методы. Обследовано 135 больных с разными формами острого коронарного синдрома: 1-я группа -больные без элевации сегмента ST с формированием ос-

трого инфаркта миокарда без зубца Q (не-Q-ИМ, NSTEMI);

2-я группа - больные с элевацией сегмента ST с последующим формированием острого инфаркта миокарда с зубцом Q без реперфузии (тромболитиса) (STEMI без ТЛТ); 3-я группа - больные с элевацией сегмента ST с последующим формированием острого инфаркта миокарда с зубцом Q (Q-ИМ), которым была проведена реперфузионная терапия - тромболитис (STEMI с ТЛТ). В исследуемые группы не были включены пациенты с хроническими заболеваниями, проявлениями почечно-печеночной недостаточности, онкологическими заболеваниями (табл. 1). Средний возраст обследованных пациентов составил 59,8±1,3 лет, из них 69,3% - лица мужского пола. В качестве контрольной обследована группа здоровых доноров (n=14) подобного возраста, поскольку именно возраст является решающим фактором для адекватной оценки процессов протеолиза [6].

Таблица 1 - Общая характеристика групп больных с разными формами острого коронарного синдрома

Признак	Группа 1 n = 40	Группа 2 n = 31	Группа 3 n = 64
Мужчины, %	47,5	80,6	79,7
Возраст, годы, (M±m)	63,5±1,2	58,2±1,8	57,8±1,3
Время от начала симптомов, часы	12,3±1,07	7,02±0,63	2,99±0,13
Передний инфаркт миокарда, %	87,5	51,6	54,7
Инфаркт миокарда в анамнезе, %	35,0	9,7	3,1
Артериальная гипертензия в анамнезе, %	87,5	67,7	65,6
Сахарный диабет в анамнезе, %	5,0	6,5	10,9
Killip, класс ОСН при поступлении, %	I	87,1	92,2
	II	12,9	7,8
Стенокардия в анамнезе, %	72,5	16,1	31,3
САД, мм Hg (M±m)	164,7±5,5	153,1±4,6	135,0±2,6
ДАД, мм Hg, (M±m)	95,4±2,2	92,4±2,5	85,7±1,6
ЧСС, уд/мин., (M±m)	82,6±1,6	80,3±3,3	81,7±1,6

Исследования были проведены в соответствии с этическими нормами, с письменного согласия пациентов.

Все пациенты получали стандартную антитромбоцитарную терапию (аспирин, клопидогрель), базовую терапию (бета-адреноблокаторы, иАПФ, статины). В зависимости от группы назначали в различных вариациях эноксапарин, фондапаринукс на протяжении 8-ми дней, внутривенно нефракционированный гепарин на протяжении 48-ми часов под контролем АЧТВ; при раннем поступлении, наличии показаний и при отсутствии противопоказаний – тромболизисную терапию. Комплексная клиническая оценка больных проводилась на основании изучения жалоб, анамнеза и физикального обследования.

В контрольной группе и у всех больных в момент поступления в стационар были получены образцы плазмы, в которых исследовался спектр фрагментов фибронектина методом иммуноблоттинга с использованием кроличьих антител к этому белку (DASO, Дания). В качестве негативного и позитивного контроля использовали соответствующие стандарты из тест-набора ИФА-ФН фирмы НВО Иммунотех (Россия, Москва).

Статистическая обработка данных выполнена с помощью пакета программ «Videodensitometr Sorbfil Version 1.8.», «Статистика 6.0», «Prophet 5.0». Вероятность расхождений средних величин оценивали с помощью непарного Т-теста, а частот – с помощью критерия χ^2 Пирсона, с использованием таблиц частот 2×2 .

Результаты и их обсуждение. Установлено, что характер деградации фибронектина достоверно качественно меняется у всех больных с острым коронарным синдромом. Основные закономерности изменения частоты определенных фрагментов фибронектина представлены на рисунках 1-3.

Так, во всех исследуемых группах найдено достоверное повышение фрагментов с молекулярной массой 20-28, 100-110 и 165-175 кДа (рис. 1). Следует отметить практически одинаковое повышение частоты фрагментов 20-38 кДа у больных с разными формами ОКС. Согласно литературным данным, эти фрагменты проявляют хемотаксическую активность, активируют экспрессию генов матричных металлопротеиназ ММП-9 и ММП-13, взаимодействуют с фактором ЧПв и замедляют АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов [5, 8]. Совокупность этих свойств приводит к активации процессов протеолиза в соединительной ткани и изменению скорости гемокоагуляции.

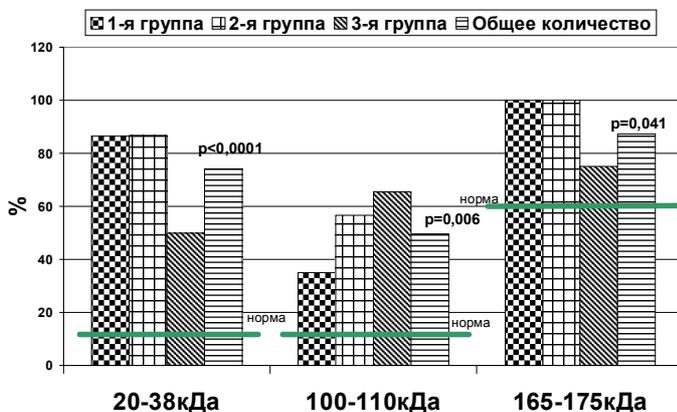


Рисунок 1 - Частота (%) фрагментов фибронектина с Мм 20-38 кДа, 100-110 кДа, 165-175 кДа при разных формах острого коронарного синдрома в первые сутки заболевания

Фрагменты фибронектина 100-110 кДа стимулируют продукцию макрофагами важных цитокинов: фактора некроза опухолей- α (TNF- α), фактора роста фибробластов-1 (FGF-1), инсулиноподобного фактора роста (IGF-1), которые способны вызывать ишемизированных кардиомиоцитов, предохраняя еще жизнеспособные кардиомиоциты от действия сигналов, индуцирующих процессы апоптоза [1, 13].

В общей популяции при норме 60% частота фрагментов 165-175 кДа в 1-й и 2-й группах составляет 100% ($p < 0,05$), а в 3-й наблюдается некоторое снижение данных фрагментов в острый период с последующим повышением его содержания ($p > 0,05$). Это связано со способностью этих фрагментов связывать гепарин и обеспечивать адгезию типа клетка-субстрат [5].

Иная картина наблюдается при исследовании частоты среднемолекулярных фрагментов фибронектина (рис.2).

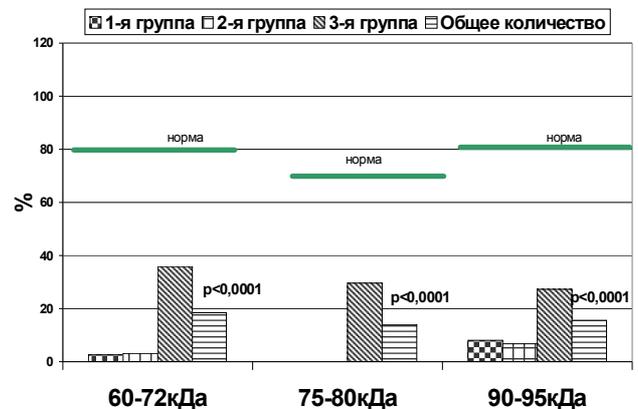


Рисунок 2 - Частота (%) фрагментов фибронектина с Мм 60-72 кДа, 75-80 кДа, 90-95 кДа при разных формах острого коронарного синдрома в первые сутки заболевания

Согласно полученным нами данным, во всех группах больных с ОКС зафиксировано достоверное ($p \leq 0,005$) снижение частоты выявления фрагментов 60-72, 75-80 и 90-95 кДа. По имеющимся в литературе сведениям, фибронектиновые фрагменты 60-72 образуются под действием металлопротеиназ, содержат в своем составе домены с аутокаталитическими свойствами и проявляют хемотаксическую активность в отношении нейтрофилов и моноцитов [5, 10, 14]. Исходя из этих свойств, трудно объяснить механизм достоверного снижения частоты этих фрагментов на ранних сроках ОКС по сравнению с нормой. В то же время относительное их увеличение на фоне тромболизисной терапии (3-я группа), отражает повышенный уровень протеолиза и большую степень повреждения миокарда у этих пациентов.

Что касается фрагментов 75-80 кДа, то они полностью отсутствуют в группах 1 и 2, а в группе 3 их частота в 2 раза ниже нормы ($p < 0,05$). Указанные фрагменты фибронектина могут быть продуктами действия катепсина D, эластазы, трипсина, химотрипсина и термолитина [3, 5].

В общей популяции на момент госпитализации наблюдалось резкое, достоверно значимое ($p < 0,05$), снижение частоты фибронектиновых фрагментов 90-95 кДа во всех трех группах. Учитывая, что эти фрагменты имеют прострептокиназную активность [11], можно говорить об истощении нативных меха-

низмов фибринолиза и, вследствие этого, дальнейшего образования тромбов с развитием разных форм острого коронарного синдрома.

Особого внимания заслуживают полученные нами

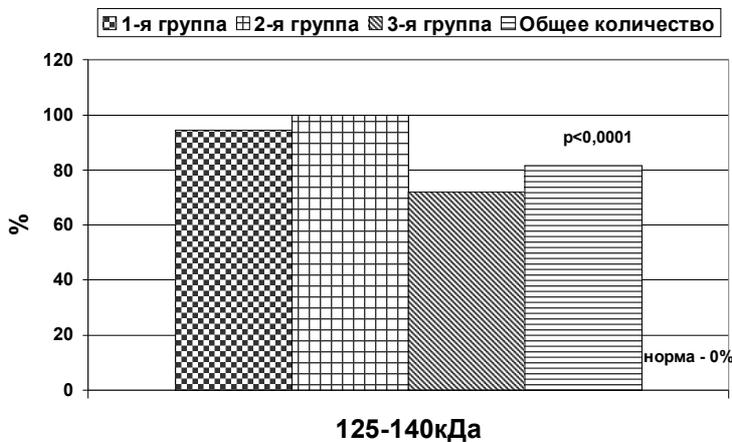


Рисунок 3 - Частота появления фрагментов фибронектина с Мм 125-140 кДа при разных формах острого коронарного синдрома в первые сутки заболевания

данные о появлении новых фрагментов фибронектина 125-140 кДа во всех исследуемых группах ($p > 0,05$), причем, частота их достигает 100% в 1-й и 2-й группах. Считают, что эти фрагменты образуются под действием матриксных металлопротеиназ ММП-1, ММП-2, ММП-3 и ММП-9 [5]. Очевидно, их выявление в крови пациентов с ОКС на ранних стадиях заболевания свидетельствует об общей активации протеолиза в соединительной ткани. Учитывая, что указанные фрагменты фибронектина отсутствуют в крови здоровых доноров, можно предположить, что их появление в крови имеет прогностическое значение при острых коронарных синдромах.

Выводы

1. Развитие всех форм острых коронарных синдромов связано со значительной активацией процессов деградации нативного фибронектина с образованием большого количества его фрагментов, которые имеют дополнительные патогенетично значимые свойства.

2. Во всех группах при госпитализации в сравнении с нормой достоверно растет частота выявления фрагментов фибронектина с молекулярной массой 20-38, 100-110 и 165-175 кДа, основными свойствами которых являются геномная активация продукции матриксных металлопротеиназ ММП-9 и ММП-13, апоптоза кардиомиоцитов, усиление клеточной адгезии.

3. Во всех группах при госпитализации в сравнении с нормой достоверно снижается частота выявления фрагментов фибронектина 60-72, 75-80 и 90-95 кДа, основными свойствами которых являются хемотаксическая активность в отношении моноцитов и гранулоцитов, скрытая металлопротеиназная и стрептокиназная активность.

4. Во всех группах при госпитализации в сравнении с нормой появляются новые фрагменты фибронектина с молекулярной массой 125-140 кДа, основными свойствами которых являются участие в активировании матриксных металлопротеиназ ММП-1, 2, 3, 9.

Заключение

При всех формах ОКС наблюдается высокая степень деградации нативного фибронектина с образованием большого количества фрагментов с разными функциями, отображающих активность тромботического и воспалительного процессов. Фрагментация фибронектина у больных с разными формами острого коронарного синдрома в первый день заболевания может иметь дополнительное прогностическое значение.

Литература

- Дзяк, Г.В. Тип деградации фибронектина как новый дополнительный фактор риска тромботических и геморрагических осложнений острого инфаркта миокарда с зубцом Q/ Г.В. Дзяк, Е.А. Коваль, А.П. Иванов, А.И. Шевцова // Серце і судини. - Київ: ТОВ "ВІТ-А-ПОЛ", 2007 - №1(17). - 13 с.
- Кулініч, А.О. Деградація плазматичного фібронектину під дією сери нових та цинкових протеаз / А.О. Кулініч, А.І. Шевцова, А.С. Маслак, А.С. Скоромная, О.Е. Грунтковська // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. - Львів: "Світ", 2009. - № 4. - 6 с.
- Курята, О.В. Взаємозалежність між клінічним перебігом системної склеродермії та станом фібронектину, ступенем його фрагментації / О.В. Курята, Т.К. Лисунець, А.І. Шевцова, Г.Б. Пелешенко // Український ревматологічний журнал. - Київ: ТОВ "МОРИОН", 2006. - №4(26). - 5 с.
- Пелешенко, Г.Б. Фібронектин та його фрагменти при деяких патологічних станах / Г.Б. Пелешенко, Н.В. Лутай, В.В. Пеліпас // Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції "Біохімія" - Дніпропетровськ: Наука і освіта. - 2003. - С. 42.
- Пелешенко, А.Б. Фрагменти фибронектина в патогенезе, диагностике и лечении заболеваний / А.И. Шевцова, А.З. Бразалук, Н.В. Лутай // Лабораторная диагностика. - Київ, 2004. - №2. - 8 с.
- Пелешенко, Г.Б. Вікові особливості стану фібронектину людини при запальних процесах у сполучній тканині / Г.Б. Пелешенко, А.І. Шевцова, Н.І. Стегленкова // Буковинський Медичний Вісник. - Чернівці: Міністерство охорони здоров'я України, Буковинський державний медичний університет, 2005. - Том 9, №2. - 3 с.
- Magnusson, M. Fibronectin: structure, assembly and cardiovascular implications / M. Magnusson, D.F. Mosher // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. - 1998. - Vol.18. - 8 p.
- Mosher, D.F. Cross-linking of cold-insoluble globulin by fibrin-stabilizing factor / D.F. Mosher // Biol Chem. - 1975. - 8 p.
- Pankov, R. Fibronectin at a glance / R. Pankov, K.M. Yamada // J.Cell Science. - 2002. - Vol.15, № 115. - 3 p.
- Schnepel, J. Recombinant cryptic human fibronectinase cleaves actin and myosin: substrate specificity and possible role in muscular dystrophy / J. Schnepel, J. Unger, H. Tschesche // Biological Chemistry. - 2001. - Vol.382. - 8 p.
- Sharma, A. Crystal structure of a heparin- and integrin-binding segment of human fibronectin / A. Sharma, J.A. Askari, M.J. Humphries, E.Y. Jones, D.I. Stuart // EMBO. - 1999. - Vol.18. - 12 p.
- Sottile, J. Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions / J. Sottile, D.C. Hocking // Molecular Biology of the Cell. - 2002. - Vol.13. - 14 p.
- Trial, J. Inflammation and ischemia: macrophages activated by fibronectin fragments enhance the survival of injured cardiac myocytes / J. Trial // Exp.Biol.Med. - 2004. - 22. - 8 p.

14. Vidmar, S.L. Collagen-binding domain of human plasma fibronectin contains a latent type IV collagenase / S.L. Vidmar, F. Lottshpreich, I. Emod, J.M. Imhoff, V. Keil-Dlouha // European Journal of Biochemistry. - 1991. - Vol.201. - 6 p.

CHARACTER OF FIBRONECTIN FRAGMENTATION IN ACUTE CORONARY SYNDROMES IN EARLY STAGES OF THE DISEASE

O.A. Mararenko¹, E.A. Kovač, A.I. Shevtsova²

¹ - Municipal Institution "Dnipropetrovsk Clinical Entity of Emergency Medicine of Dnipropetrovsk Regional Council", Dnipropetrovsk, Ukraine

² - "Dnipropetrovsk Medical Academy", Dnipropetrovsk, Ukraine

The aim of the study was to investigate the degree of fibronectin degradation in various forms of acute coronary syndromes. The spectrum of fibronectin fragments was studied by immunoblotting technique, using specific antibodies to fibronectin of human blood plasma in patients with acute coronary syndrome: without ST elevation (n=40); with ST elevation and thrombolysis in the late stages of the disease (n=64); with ST elevation without thrombolysis (n=31). It has been estimated that the new fibronectin fragments 125-140 kDa appear in acute coronary syndromes.

The increase in frequency of fibronectin fragments 20-38, 100-110 and 165-175 kDa in all groups under review has been established and the decrease in 60-72, 75-80 and 90-95 kDa fibronectin fragments has been marked as well. The conclusion was made about the activation of fibronectin degradation in all forms of acute coronary syndromes. The role of fibronectin fragments in pathogenesis of the disease, as an important link between the mechanisms of thrombosis and inflammation, has been confirmed.

Key words: acute coronary syndrome, proteolysis, fibronectin fragmentation.

Адрес для корреспонденции: e-mail: mdv_70@mail.ru

Поступила 22.01.2013