

**Key words:** cold agglutinins, titer, range of thermal activity, combined antibody.

**Відомості про автора:**

**Мироненко Галина Анатоліївна** – н. с. групи імуногематології, ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України». Адреса: Київ, вул. Берлінського, 12.

**УДК 616.155.392-036.1-076:577.112.85:616.13**

**Т.П. НИКОЛАЕНКО-КАМЫШОВА, 2014**

***Т.П. Николаенко-Камышова***

## **СТРУКТУРНО- ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ФИБРОНЕКТИНА ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫХ НЕОПЛАЗИЯХ**

**КУ «Многопрофильная городская клиническая  
больница №4» ОГА», г. Днепропетровск**

**Введение.** Хронические миелопролиферативные неоплазии (ХМПН) – хронические лейкомии с изменениями в структуре клеток крови и межклеточного матрикса. Весомая роль в этих механизмах принадлежит фибронектину (ФН). Связь между функциональной активностью и гликозилированием при ХМПН не изучалась.

**Цель.** Изучение структурно-функциональных особенностей фибронектина и его активности при ХМПН.

**Материалы и методы.** Изучали содержание, гепарин- и лектинсвязывающую активность ФН, деградацию его под действием трипсина и хемотрипсина у 72 больных с ХМПН (18 –с ИП, 54 –с ПМФ). Контрольная группа - 30 доноров.

**Результаты.** Уровень и гепарин-связывающая активность фибронектина в плазме крови больных с ХМПН –ИП и ПМФ достоверно снижены. При определении деградации ФН установлено, что состав фФН у больных ИП был представлен фрагментами с м. м. 200, 190-180, 98-90 и 49-20 кДа , более широкий спектр фФН зарегистрирован при ПМФ - м. м. от 230 до 15 кДа - м. м. 200, 190-180, 80-75 , 59-50, 49-40 и 19-15 кДа при преобладании фФН с м.м. 98-90 кДа (ММП 9). При ХМПН появлялись фФН со средней и малой м. м. - при ИП - фФН м.м.49-20 кДа (гепаринсвязывающий домен), при ПМФ – 59-50 (желатиназосвязывающий компонент ММП2), 19-15 кДа (фибринсвязывающий домен, сигнальные молекулы - активаторы лейкоцитов и тромбоцитов). При уточнении структуры гликопротеинов ФН при ХМПН в составе фФН особенностей не выявлено – содержание двухантенных гликанов и связь их с сиалоспецифическими лектинами соответствовала показателям контрольной группы. Фукозоспецифические лектины LCA, AAL, LABA проявляли афинность к ФН с м.м. 220 кДа, LABA и AAL - дополнительно

реагировали с фФН с м.м. 52 кДа, а LCA и AAL – с фФН с м.м.76 кДа (маркеры фукозы). У больных с ИП связывание ФН с LABA (наличие коровой фукозы в составе гликанов) было высоким -  $182 \pm 14,11\%$ , при ПМФ - низким  $65,85 \pm 5,92\%$ . Значительно повышалась лектинсвязывающая способность ФН с WGA, что свидетельствует о наличии полиантенных сиаловых кислот в составе гликанов лейкоцитов опухолевого клона. При ХМГН разветвленность гликанов кФН возрастала за счет повышения гликозилированности в нейтрофильных элементах различной степени зрелости лейкемического клона. Вследствие значительной разветвленности гликанов ФН при ХМГН усиливается его деградация с образованием фФН с малой и средней м.м, нарушается связывание ФН с гепарином, и поэтому снижается его функциональная активность. Взаимодействие ФН с лектином LABA (маркер альфа1→2 связанной фукози О-гликанов), которая преобладает в гликанах при ИП может быть дополнительным диагностики Истинной Полицитемии.

**Ключевые слова:** хронические миелопролиферативные неоплазии, фибронектин, функциональная активность, лектины.

### ВСТУПЛЕНИЕ

Хронические миелопролиферативные неоплазии (ХМГН) – хронические лейкоемии с клональными нарушениями на уровне клетки-предшественницы гемопоэза, и изменением в структуре кроветворного микроокружения [6]. Одним из связующих звеньев между экстрацеллюлярным матриксом и клетками–резидентами является гепаринзависимый гликопротеин Фибронектин (ФН) [2]. Наиболее распространен растворимый ФН плазмы (пФН), он синтезируется гепатоцитами [7], в его состав входят двухантенные гликаны; пФН расщепляется сериновыми протеиназами – тромбином, плазминогеном, трипсином, хемотрипсином. Функциональная активность ФН определяется взаимодействием с гепарином [8].

Нерастворимый клеточный фибронектин (кФН) находится на поверхностных мембранах синтезирующих его клеток - нейтрофилов, тромбоцитов, эндотелиоцитов. Деградация кФН осуществляется металлопротеиназами (ММП) экстрацеллюлярного матрикса [9].

Структурно-функциональные особенности ФН определяют его гликозилированность. Гликановая часть синтезируется под воздействием цитокинов в экстрацеллюлярном матриксе. Состав гликанов определяется с помощью лектинов, избирательно связывающих углеводы. В ФН существует 7 сайтов связывания с N-гликанами и 2 сайта - с О-гликанами. При злокачественной трансформации синтезируются полиантенные гликаны ФН, деградация которых усугубляет деструктивные процессы в органах и тканях.

По степени деградации различают три вида: нативный ФН – димеры с м.м. 220 кДа и фрагменты фибронектина (фФН) с м.м. 175-160, 155-150, 140-125, 120, 110-100 и 98-90 кДа [9]; агрегированный – в виде мультимеров и комплексов; деградированный – в виде фрагментов, образующихся в процессе протеолиза [1]. Связь между функциональной активностью ФН и гликозилированием при ХМГН не изучалась.

**Цель.** Изучение структурно- функциональных особенностей фибронектина при хронических миелопролиферативных неоплазиях

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Содержание, гепарин- и лектинсвязывающую активность фФН определяли у 72 больных с ХМПН (18 - с истинной полицитемией (ИП), 54 – с первичным миелофиброзом (ПМФ)). Контрольная группа состояла из 30 доноров. Определяли концентрацию фФН методом иммунодота с кроличьими антителами к фФН; его функциональную активность [3], ферментативный гидролиз фФН [9] с сериновыми протеиназами: (трипсин, химотрипсин, тромбин, плазминоген), лектин-связывающую активность фФН с лектинами ландыша мечевидного – ConA (Sigma, США), чечевицы - LCA (Лектинотест, Украина), коры золотого дожда обычного - LABA, зародышей пшеницы – WGA (Лектинотест, Украина), алеурии оранжевой - AAL (US Biological, США), мааки амурской - MAA-II (Sigma, США) по методу М.Д. Луцика, С.И. Кусеня [4] .

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Уровень и гепарин-связывающую активность фибронектина в плазме крови больных с ХМПН – ИП, ПМФ достоверно ( $P < 0,05$ ) снижены (табл. 1).

Таблица 1

#### Уровень и гепарин-связывающая активность фибронектина при ХМПН

Группа исследования	Концентрация фибронектина (мкг/мл)	Степень связывания с гепарином (%)	Коэффициент корреляции (r)
Контроль	324,56±14,62	100	0,322
ИП, n=18	240,72±12,97***	55,48±7,22*	0,849
ПМФ, n=54	237,85±10,99**	59,96±2,41*	0,746

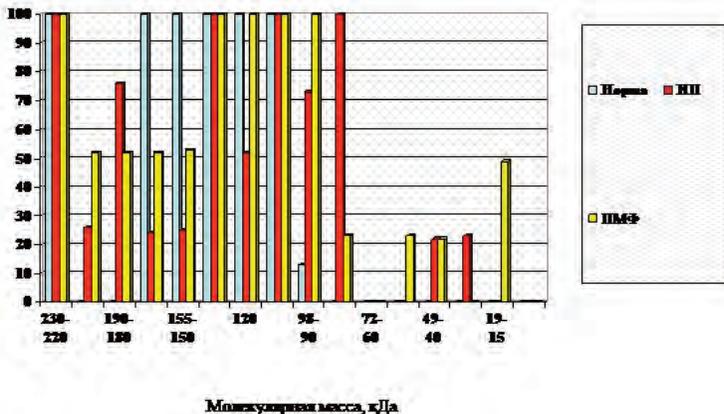
**Примечание:** \* - достоверная разница в сравнении с контролем при  $p < 0,05$ , \*\* -  $p < 0,01$ , \*\*\* -  $p < 0,001$ .

Деградация фФН под действием трипсина и хемотрипсина рассматривалась с интервалом действия 30 мин, 1 час.

В контрольной группе через 30 мин. определялись фФН с м.м. 165 кДа, через час - фФН с м.м. 115-17,5 кДа,

У больных ИП состав фФН представлен фрагментами с м. м. 200, 190-180, 98-90 и 49-20 кДа (рис. 1), спектр фФН при ПМФ представлен фрагментами с м. м. от 230 до 15 кДа - м. м. 200, 190-180, 80-75 , 59-50, 49-40 и 19-15 кДа с преобладанием фФН с м.м. 98-90 кДа (ММП 9).

Деградація фФН при ХМПН характеризувалась присутством фФН со середньої і малої м. м. - при ИП - фФН м.м.49-20 кДа (гепаринсвязывающий домен), при ПМФ – 59-50 (желатиназосвязывающий компонент ММП2), 19-15 кДа (фибрин- связывающий домен, сигнальные молекулы - активаторы лейкоцитов и тромбоцитов) (рис. 1).



**Рис.1. Частота виявлення фрагментів фибронектина в плазмі крові досліджуваних груп**

Высокая степень деградации фФН при ХМПН обусловлена особенностями структуры его составляющих гликопротеинов.

При ХМПН в структуре пФН особых изменений не отмечено и содержание двухантенных гликанов (взаимодействие с ConA.) и связывание с сиалоспецифическими лектинами соответствовало показателям контрольной группы.

Фукозоспецифические лектины LCA, AAL, LABA проявляли аффинность к фФН с м.м. 220 кДа, LABA и AAL - дополнительно реагировали с фФН с м.м. 52 кДа, а LCA и AAL – с фФН с м.м.76 кДа(маркеры фукозы).

У больных с ИП связывание фФН с LABA (наличие коровой фукозы в составе гликанов) было высоким и составляло  $182 \pm 14,11\%$ , при ПМФ низким -  $65,85 \pm 5,92\%$ .

Значительное повышение лектинсвязывающей способности фФН у больных ХМПН при связывании с WGA указывает на наличие полиантенных сиаловых кислот в составе гликанов кФН на мембранах лейкоцитов. В схеме 2 представлена направленность структурных изменений фибронектина под действием лектинов.

Таблиця 2

## Структурные и функциональные изменения ФН при ХМПН

Нозология	ЛЕКТИНЫ					
	LABA	AAL	LCA	WGA	SNA	MAA
Норма, %	100	100	100	100	100	100
Истинная Полицитемия, %	182±14,11↑	-	159,64±21,54↑	↑	Норма	Норма
Первичный миелофиброз, %	65,85±5,92↓	↑	117,07±11,78 Н	↑	Норма	Норма

Гликановый компонент наиболее чувствителен при нарушении структуры лейкоцитов. Различная степень зрелости нейтрофилов и появление элементов лейкемического клона четко отслеживается при проведении комплексного лектин-анализа (рис.2), различие форм заболевания в структуре одной нозологии может быть использовано в качестве дополнительного критерия при диагностике ХМПН.

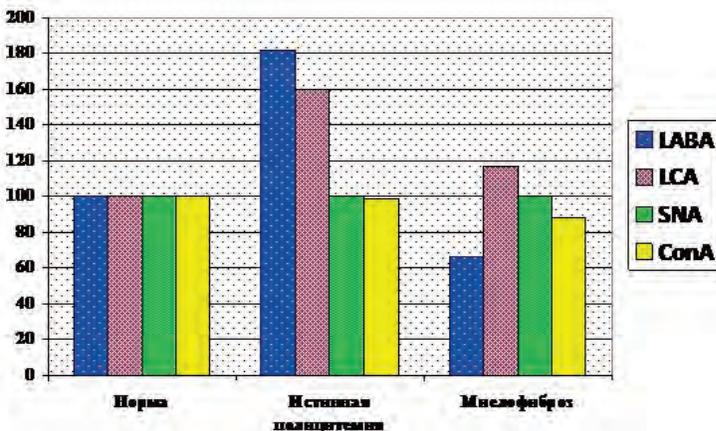


Рис. 2. Взаимодействие ФН с лектинами при ИП и ПМФ  
**ВЫВОДЫ**

1. При ХМПН разветвленность гликанов кФН возрастала за счет повышенной гликозилированности в нейтрофильных элементах различной степени зрелости лейкемического клона.

2. Вследствие высокой разветвленности гликанов ФН при ХМПН повышается его деградация с образованием фФН с малой и средней м.м, нарушается связывание ФН с гепарином, за счет чего снижается его функциональная активность.

Взаимодействие ФН с лектином LABA (маркер альфа1→2 связанной фукозы О-гликанов), преобладающей в гликанах при ИП может служить дополнительным критерием в диагностике Истинной Полицитемии.

**Литература**

1. Активність желатинази і деградація фібронектину при метаболічних порушеннях та проліферативних захворюваннях крові / Гордієнко Ю.А., Кулініч А.А., Ніколаєнко-Камишова Т.П., Шевцова А.І. // Медична хімія. – 2009. – Т. 11, № 3. – С. 57-59.
2. Жерносеков Д.А. Роль адгезивних белков в процессе нормального и патологического тромбообразования // Лабораторная диагностика. - 2007. - № 2. - С.72-75.
3. Левитан Б.Н. Плазменный фибронектин как маркер синдрома эндогенной интоксикации при хронических гепатитах и циррозах печени / Левитан Б.Н., Умерова А.Н., Астахин А.В. // Кубанский национальный медицинский вестник. – 2009. - № 109(4). – С.116-120.
4. Луцик М.Д., Кусень С.И. Исследование мембранных гликопротеинов эритроцитов человека с применением лектинов // Укр. биох. журн. – 1987. - Т. 59, №6. –С. 3-8.
5. Молекулярно-біологічні аспекти структурно-функціонального стану клітинної поверхні як основа розвитку нової стратегії терапії раку / Чехун В. Ф., Кулик Г. І., Триндяк В. П., Тодор І. М. // Онкологія. – 2002. – Т.4, №1. – С.4-8.
6. Tefferi Gilliland. Classification of myeloproliferative disorders from Dameshek toward a semi-molecularsystem // Best. Pract. Res. Clin. Gematmatol. - 2006. - № 19. - С. 361-364.
7. Cho J. Enhancement of thrombogenesis by plasma fibronectin crosslinked to fibrin and assembled in platelet thrombi / J. Cho, D. Mosher // Blood. – 2006. – Vol. 107, N 9. – P. 3555-3563.
8. Three-dimensional structural analysis of fibronectin heparin-binding domain mutations / Y. Kapila, D. Doan, E. Tafolla, R. Fletterick // J. Cell. Biochem. - 2000. – Vol. 81, N S36. - P. 156 – 161.
9. Native and fragmented fibronectin oppositely modulate secretion of MMP-9 / B. Marom, M.A. Rahat, N. Lahat [et al.] // J. Leukoc. Biol. – 2007. – Vol. 81, N 6. – P. 1466-1476.
10. Towbin H. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications / H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1979. - Vol. 76, N 9. - P.4350-4354.

**Т.П.Ніколаєнко-Камишова****Структурно- функціональні особливості фібронектину при хронічних мієлопроліферативних неоплазіях**

**КУ «Багатопрофільна міська клінічна лікарня №4» ОДА», м. Дніпропетровськ**

**Вступ.** Хронічні мієлопроліферативні неоплазії (ХМПН) – хронічні лейкемії зі змінами в структурі клітин крові і міжклітинному матриксі. Значна роль в цих механізмах належить фібронектину (ФН). Зв'язок між функціональною активністю і гликозуванням при ХМПН не вивчався.

**Мета** Вивчення структурно-функціональних особливостей фібронектину та його активності при хронічних мієлопроліферативних неоплазіях.

**Матеріали та методи.** Вивчали вміст, гепарин- та лектинзв'язуючу активність ФН, деградацію його під дією трипсину та хемотрипсину у 72 хворих на ХМПН (18 - на СП, 54 – на ПМФ). Контрольна група - 30 донорів.

**Результати.** Рівень та гепарин-зв'язуюча активність фібронектину в плазмі крові хворих на ХМПН –СП та ПМФ достовірно знижені. При визначенні деградації ФН встановлено, що склад фФН у хворих на СП був представлений фрагментами з м. м. 200, 190-180, 98-90 та 49-20 кДа, більш значний спектр фФН зареєстрований при ПМФ - м. м. від 230 до 15 кДа - м. м. 200, 190-180, 80-75, 59-50, 49-40 та 19-15 кДа при перевазі фФН з м.м. 98-90 кДа (ММП 9). При ХМПН з'являлись фФН з середньою та малою м. м. - при СП - фФН м.м.49-20 кДа (гепаринзв'язуючий домен), при ПМФ – 59-50 (желатиназозв'язуючий компонент ММП2), 19-15 кДа (фібрин- зв'язуючий домен, сигнальні молекули - активатори лейкоцитів і тромбоцитів). При уточненні структури глікопротеїнів ФН при ХМПН у складі фФН особливостей не було встановлено – вміст двоантенних гліканів і зв'язок їх з сіалоспецифічними лектинами відповідав показникам контрольної групи. Фукозоспецифічні лектини LCA, AAL, LABA проявляли афінність до ФН з м.м. 220 кДа, LABA и AAL - додатково реагували з фФН з м.м. 52 кДа, а LCA та AAL – з фФН з м.м.76 кДа(маркери фукози). У хворих з СП зв'язування ФН з LABA (наявність корової фукози у складі гліканів) було значним -  $182 \pm 14, 11\%$ , при ПМФ - низьким  $65,85 \pm 5,92\%$ . Значно підвищувались лектинзв'язуючі спроможності ФН з WGA, що свідчить про наявність поліантенних сіалових кислот у складі гліканів лейкоцитів пухлинного клону.

**Висновки.** При ХМПН розгалуженість гліканів кФН зростала за рахунок підвищення глікозульованості в нейтрофільних елементах різного ступеню дозрілості лейкоемічного клону. Внаслідок значної розгалуженості гліканів ФН при ХМПН підвищується його деградація з утворенням фФН з низькою та середньою м.м, порушується зв'язування ФН з гепарином, і тому знижується його функціональна активність. Взаємодія ФН з лектином LABA (маркер альфа $1 \rightarrow 2$  зв'язаної фукози О-гліканів), яка має перевагу в гліканах при СП може бути додатковим критерієм діагностики Справжньої Поліцитемії.

**Ключові слова:** хронічні мієлопроліферативні неоплазії, фібронектин, функціональна активність, лектини.

**T.P.Nikolaienko-Kamyshova**

**Structural-functional peculiarities of fibronectin in chronic myeloproliferative neoplasias**

**MI «Multi-field Clinical City hospital №4», RSA, Dnipropetrovsk**

**Introduction.** Chronic myeloproliferative neoplasias (CMPN) are chronic leukemias with changes in the structure of blood cells and intercellular matrix. An important role in these mechanisms belongs to fibronectin (FN). A link between functional activity and glycosylation in CMPN has not been studied yet.

**The aim** of the investigation was to study structural-functional peculiarities of fibronectin in chronic myeloproliferative diseases.

**Materials and methods.** There was studied content, heparin- and lectin-binding activity of FN, degradation under the impact of tripsin and chemotripsin in 72 patients with CMPN (18 - with PV, 54 – with PMF). A control group included 30 donors.

**Results.** The level and heparin-binding activity of fibronectin in blood plasma of patients with CMPN– PV and PMF were reliably decreased.

While studying FN degradation in patients with PV, fFN content was found to be presented by fragments with m. m. 200, 190-180, 98-90 and 49-20 kDa, more significant spectrum of fFN was registered in PMF: m.m. from 230 to 15 kDa - m. m. 200, 190-180, 80-75, 59-50, 49-40 and 19-15 kDa in prevalence of fFN with m. m. 98-90 kDa (MMP 9). In CMPN there appeared fFN with medium and low m. m. - in PV - fFN m.m. 49-20 kDa (heparin-binding domain), in PMF – 59-50 (gelatin-binding component MMP 2), 19-15 kDa (fibrin-binding domain, signal molecules – activators of leukocytes and thrombocytes).

While ascertaining precise structures of FN glycoproteins in CMPN in the content of pFN, abnormalities were no found (content of two-antenna glycans and link with sialo-specific lectins corresponded to the findings of the control group).

LCA, AAL, LABA fucose-specific lectins showed affinity to FN with m.m. 220 kDa, LABA and AAL, they additionally interacted with fFN (m.m. 52 kDa), and LCA and AAL – with fFN (m.m.76 kDa) (markers of fucose). In patients with PV binding of FN with LABA (presence of  $\alpha$  1,2 fucose-contained glycans) was significant (182 $\pm$ 14.11%), in PMF it was low (65.85 $\pm$ 5.92%). Lectin-binding abilities of FN with WGA significantly increased, this testifies to the presence of multiantennary sialic acids-comprising glycans of leukocytes of a tumor clone.

**Conclusions.** In CMPN, branching of glycans to kFN grows due to increased glycosylation at presence of elements of leukemic clone and various degree of neutrophil maturity. Considerable branching of glycans in FN in case of CMPNH results in its increased degradation with formation of low and medium m.m. fFN, this affects FN binding to heparin, its functional activity decreases. Interaction of FN with LABA (marker of alpha 1,2-linked fucose of O-glycans), which has pre-dominance in glycans in PV, can be an additional criterion of PV diagnostics.

**Key words:** chronic myeloproliferative neoplasias, fibronectin, functional activity, lectins.

#### **Ведомости об авторе:**

**Николаенко-Камышова Татьяна Петровна** - врач городского гематологического центра КУ «Многопрофильная городская клиническая больница №4» ОГА», г. Днепропетровска.