

ДИСФУНКЦИЯ ЭНДОТЕЛИЯ И НАРУШЕНИЕ ГЕМОСТАЗА В ДЕБЮТЕ ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА У ВЗРОСЛЫХ БОЛЬНЫХ

О.Ю. Скольская¹, Л.Н. Тарасова¹, С.Г. Владимирова¹, В.В. Черепанова²

¹ФГБУН Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА России, Киров;

²ГБУЗНО Городская больница № 33, Нижний Новгород

Резюме. Представлен анализ функционального состояния эндотелия и плазменного гемостаза в дебюте острого лимфобластного лейкоза. Показано, что наряду с геморрагическим синдромом, встречающимся у 44% лиц, наблюдаются также тромботические осложнения (4%). В дебюте острого лимфобластного лейкоза выявлена дисфункция эндотелия и активация внутрисосудистого свертывания при физиологическом уровне естественных антикоагулянтов. Подобное состояние следует охарактеризовать как "зыбкое равновесие", которое может разрушить любой неблагоприятный фактор.

Ключевые слова: острый лимфобластный лейкоз, эндотелий, гемостаз

ENDOTHELIAL DYSFUNCTION AND HEMOSTATIC DISORDERS IN ADULT PATIENTS WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA DE NOVO

O.Yu. Skolskaya¹, L.N. Tarasova¹, S.G. Vladimirova¹, V.V. Cherepanova²

¹Kirov Institute of Hematology and Blood Transfusion; ²Municipal Hospital N 33, Nizhny Novgorod

Summary. Endothelial dysfunction and hemostatic disorders in the adult patients with acute lymphoblastic leukemia de novo were studied. Hemorrhagic syndrome developed in 44% of patients, in 4% of patients developed thrombotic complications. Endothelial dysfunction and activation of intravascular blood coagulation in the presence of normal levels of natural anticoagulants were detected in patients with acute lymphoblastic leukemia de novo. This status could be characterized as unstable balance which could be disturbed by an unfavorable factor of any kind.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, endothelium, hemostasis

Одним из основных осложнений интенсивного лечения острых лейкозов (ОЛ) взрослых являются инфекционные и тромбогеморрагические осложнения, которые препятствуют современной интенсивной терапии ОЛ взрослых и получению полных длительных ремиссий. Появление резистентности к современным антимикробным средствам приводит к увеличению частоты и тяжести инфекционных осложнений, летальным исходам [1]. Воспаление и гемостаз — это два тесно взаимосвязанных процесса, поэтому инфекционный процесс вызывает нарушения гемостаза [2]. Указанные осложнения у больных ОЛ могут возникать не только на этапах химиотерапии, но и в дебюте заболевания [1, 3—6]. Бластные клетки способны активировать эндотелий посредством секреции провоспалительных цитокинов: интерлейкина 1 (ИЛ-1) и фактора некроза опухоли α (ФНО α) [7]. При этом запускается процесс их адгезии к эндотелию, обеспеченный теми же молекулярными механизмами, что при воспалительных и иммунных реакциях [8]. В культуре эндотелиальных клеток (ЭК) ИЛ-1 и ФНО α вызывают высвобождение фактора Виллебранда (ФВ) без нарушения их структуры. Эти интерлейкины стимулируют ЭК, моноциты и макрофаги, приводя к синтезу и секреции тканевого фактора (ТФ) [9, 10]. Помимо того,

ИЛ-1 препятствует образованию тромбомодулина (ТМ), в результате чего снижается способность ЭК активировать протеин С (ПрС), так как на их поверхности снижается количество мест связывания протеина S (PrS). При повышении уровня этого интерлейкина угнетается фибринолиз в результате увеличения секреции ингибитора активатора плазминогена 1-го типа (РАI-1) ЭК; противовоспалительные цитокины ИЛ-4 и ИЛ-10 опосредованно (через Т- и В-лимфоциты) могут влиять на фибринолитическую активность [11]. При этом ИЛ-4 ускоряет коагуляцию и стимулирует фибринолиз, что связано с появлением в кровотоке активатора плазминогена, а ИЛ-10 — замедляет ее [12]. Независимо от факторов, вызвавших появление цитокинов, будь то экспрессия бластными клетками или воспаление, они могут привести к дисфункции эндотелия и активировать свертывающую систему крови [13].

Запуск свертывания начинается с ТФ. Это трансмембранный гликопротеин, посредник межклеточных взаимодействий в ангиогенезе, опухолевой прогрессии и метастазировании, единственный инициатор синтеза тромбина и образования фибрина [14—16]. Лейкемические клетки содержат прокоагулянтные, фибринолитические и антифибринолитические субстанции [17]. Их прокоагулянтная активность также реализуется посредством ТФ, образующего комплекс с ФVII и активирующего ФХ, ФXI [8].

Обобщая изложенное, следует подчеркнуть, что изучение нарушений функции эндотелия и гемостаза позволит определить их значение в общем патогенезе коагулопатий при ОЛ, а также поможет выделить прогностические факторы развития этих нарушений.

Для корреспонденции:

Владимирова Софья Геннадьевна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Центра патологии гемостаза ФГБУН Кировский НИИ гематологии и переливания крови ФМБА России. Адрес: 610027, Киров, ул. Красноармейская, д. 72. Телефон: +7 (8332) 67-57-00. Телефон/факс: +7 (8332) 54-97-31. E-mail: vlsg@mail.ru

Таблица 1
Клинико-лабораторные данные о больных с впервые выявленным ОЛЛ

Показатель	Медиана (разброс)
Лейкоциты, · 10 ⁹ /л	11,9 (1,2—322,1)
Бластные клетки периферической крови, · 10 ⁹ /л	2,5 (0—296,3)
Тромбоциты, · 10 ⁹ /л	60 (3—508)
ЛДГ, МЕ	1229 (206—5598)

Цель работы — выявление нарушений функций эндотелия и плазменного звена гемостаза у взрослых больных острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ) в дебюте заболевания.

Материалы и методы

В исследование было включено 25 больных (16 мужчин и 9 женщин) с впервые диагностированным ОЛЛ в возрасте от 16 до 70 лет (медиана 42 года). При включении в исследование у больных не было инфекционных осложнений. При иммунофенотипировании установлен В-клеточный вариант: ранний В — у 7, В-common — у 4, пре-В — у 10; Т-клеточный вариант (ранний Т) — у 4 больных. Филадельфийская хромосома выявлена у 6 пациентов. При поступлении у больных определяли количество лейкоцитов, бластных клеток и тромбоцитов периферической крови, а также содержание лактатдегидрогеназы (ЛДГ) (табл. 1). Степень тромбоцитопении оценивали по количеству тромбоцитов согласно классификации ВОЗ: 0-я степень — тромбоциты в пределах нормы, 1-я степень — более 75 · 10⁹/л, 2-я степень — от 50 · 10⁹/л до 75 · 10⁹/л, 3-я степень — от 10 · 10⁹/л до 50 · 10⁹/л и 4-я степень — менее 10 · 10⁹/л. Геморрагический синдром оценивали по четырем типам согласно классификации Н. Дабберха [18].

Показатели коагулограммы при диагностике заболевания были оценены у 19 больных. Определяли прямые маркеры повреждения эндотелия: антиген фактора Виллебранда (ФВ:Ag) с помощью твердофазного иммуноферментного анализа, тест-системы фирмы "Technoclone" (Австрия), ТМ — с помощью тест-системы фирмы "Diaclone" (Франция) и эндотелин — с использованием тест-системы фирмы "Biomedica gruppe" (Австрия). Активность антитромбина III (АТIII) исследовали клоттинговым методом [19], ПрС — с помощью на-

Таблица 2
Распределение случаев тромбоцитопении и геморрагического синдрома среди больных с впервые выявленным ОЛЛ

Состояние	Степень тяжести	Больные ОЛЛ (n = 25)	
		абс.	%
Тромбоцитопения	0	5	20
	1	4	16
	2	6	24
	3	9	36
	4	1	4
Геморрагический синдром	Нет	14	56
	I	4	16
	II	5	20
	III	—	—
	IV	2	8

Таблица 3
Лабораторные показатели у больных с впервые выявленным ОЛЛ (медиана, разброс)

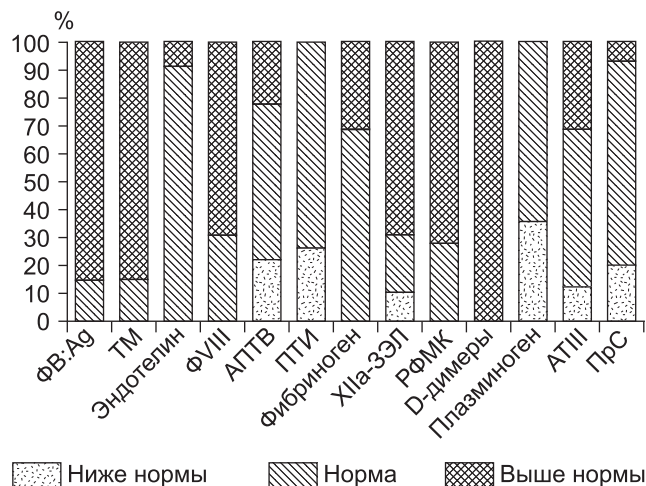
Показатель	Больные ОЛЛ	Здоровые лица
ТМ, нг/мл	3,99 (0,9—13,5)	0,55 (0,12—1,98)
Эндотелин, фмоль/мл	0,43 (0,16—6,28)	0,38 (0—2,19)
ФВ:Ag,%	152 (69—298)	82 (46—146)
ФVIII,%	178 (98—241)	86 (51—166)
Индекс АПТВ	0,99 (0,71—1,33)	1,01 (0,82—1,24)
ПТИ,%	90 (74—98)	100 (85—114)
Фибриноген, г/л	3,69 (2—7,18)	2,83 (1,94—3,59)
Время XIIa-ЗЭЛ, мин	14 (5—60)	7 (5,5—12,5)
АТIII,%	114 (69—178)	105 (84—162)
ПрС,%	90 (41—154)	87 (58—146)
Плазминоген,%	88 (66—124)	96 (72—139)
РФМК в ортофенантролиновом тесте, мкг/мл	90 (30—280)	35 (30—55)
РФМК в этаноловом тесте, баллы	2 (0—3)	0 (0—1)
D-димеры, баллы	6 (3—8)	1—2

Примечание. Здесь и в табл. 4 жирным шрифтом обозначены показатели отличающиеся от нормы ($p < 0,05$).

боров реагентов Реахром-Протеин С фирмы "РЕНАМ" (Москва) и активность плазминогена — с использованием наборов реагентов ХромоТех-Плазминоген фирмы "Технология-Стандарт" (Барнаул). Определяли также протромбиновый индекс (ПТИ), активированное парциальное тромбoplastинное время (АПТВ), фибриноген по методу Клаусса, используя коагулометр Start-4 и тест-системы фирмы "Roche". Результаты АПТВ выражали в виде индекса, представляющего собой отношение АПТВ пациента к АПТВ нормальной плазмы [20]. Исследовали также время XIIa-зависимого зуглобулинового лизиса — XIIa-ЗЭЛ [21] и активность фактора VIII (ФVIII) [22]. Уровень D-димеров определяли полуколичественным методом латексной агглютинации, используя наборы реагентов D-dimer Test "Diagnostica Stago", "Roche" (Франция); результаты теста получали в следующих интервалах: до 500, 500, 501—1000, 1001—1500, 1501—2000, 2001—2500, 2501—3000, более 3000 нг/мл; им присвоены соответствующие баллы от 1 до 8. Растворимые фибрин-мономерные комплексы (РФМК) определяли в ортофенантролиновом тесте, используя наборы фирмы "Технология-Стандарт" (Барнаул), и в этаноловом тесте [21]. Все исследования у больных проводили до начала химиотерапии. Группу сравнения составили результаты обследования 35 здоровых добровольцев. Поскольку результаты не подчинялись закону нормального распределения, данные представляли с помощью медианы, минимального и максимального значений. Для сравнения выборок применяли непараметрический критерий Манна—Уитни, корреляцию оценивали по коэффициенту ранговой корреляции Спирмена (r_s). Статистический анализ проводили с помощью программы Biostatistics 4.03.

Результаты и обсуждение

Данные о наличии тромбоцитопении и геморрагического синдрома у больных с впервые выяв-



Отклонения результатов различных тестов от нормы.

ленным ОЛЛ представлены в табл. 2. В дебюте заболевания геморрагический синдром, проявления которого в основном носили легкий и умеренный характер, выявляли у 44% больных. Тромбоцитопению наблюдали у 80% больных. У 1 (4%) больного при поступлении наряду с геморрагическим синдромом II степени был обнаружен тромбоз центральной вены левого глаза. Количество лейкоцитов составило $19 \times 10^9/\text{л}$, что не позволяет ассоциировать данный тромботический эпизод с лейкостазом. По данным Н. Kwaan [23], обобщившего сведения разных авторов о тромботических осложнениях у больных ОЛЛ, их частота колеблется от 1,4 до 10,6%.

В остром периоде ОЛЛ до проведения химиотерапии установлено значительное повышение содержания прямых маркеров дисфункции эндотелия: ФВ:Ag и ТМ ($p < 0,05$; табл. 3). Эти показатели превышали норму у 85% обследованных больных (см. рисунок), т.е. наличие бластных клеток или продуктов их распада способно вызывать повреждение эндотелия, приводящее к потере им антитромбогенных свойств. Концентрация эндотелина статистически не отличалась от нормы ($p > 0,05$) и была повышена лишь в 9% наблюдений. При корреляционном анализе выявлена положительная связь концентрации ТМ с уровнем D-димеров ($r_s = 0,598$; $p < 0,05$) и отрицательная — с активностью ПрС ($r_s = -0,634$; $p < 0,05$).

Поскольку дисфункция эндотелия приводит к запуску коагуляционного каскада [24, 25], мы рассмотрели основные связанные с ней показатели плазменного гемостаза. Медиана индекса АПТВ не отклонялась от нормы ($p > 0,05$), однако его повышение обнаружено у 22,2% лиц и снижение — также у 22,2% (см. рисунок). Уровень ПТИ был значимо снижен ($p < 0,05$), что указывает на потребление факторов протромбинового комплекса. Его показатели ниже нормы выявлены у 26,3% больных.

Медиана концентрации фибриногена не отклонялась от нормы и составила 3,69 г/л ($p > 0,05$). Гиперфибриногенемия установлена у 31,6% больных; гипофибриногенемия в дебюте заболевания не наблюдалась ни у одного человека.

Таблица 4

Коэффициенты корреляции (r) между показателями коагулограммы и количеством лейкоцитов, бластных клеток, тромбоцитов и содержанием ЛДГ у больных с впервые выявленным ОЛЛ

Показатель	Количество клеток			ЛДГ
	бластные клетки	лейкоциты	тромбоциты	
ТМ	0,562*	0,571*	-0,039	0,100
Эндотелин	-0,086	-0,059	-0,253	-0,143
ФВ:Ag	0,155	0,168	-0,233	0,226
ФVIII	0,118	0,038	0,320	0,171
Индекс АПТВ	-0,147	-0,081	0,088	-0,112
ПТИ	-0,096	-0,273	-0,017	0,021
Фибриноген	-0,232	-0,276	0,179	-0,032
Время XIIa-ЗЭЛ	0,019	-0,080	-0,131	0,190
АПШ	0,341	0,317	-0,356	0,496
ПрС	-0,292	-0,140	0,474	-0,194
Плазминоген	0,304	0,180	-0,485	0,123
РФМК в этаноловом тесте	0,295	0,230	-0,131	0,217
РФМК в орто-фенантролиновом тесте	-0,345	-0,504*	0,088	-0,576*
D-димеры	0,703*	0,687*	-0,254	0,641*
Количество бластных клеток	—	—	-0,504*	0,476*
Количество лейкоцитов	0,881*	—	-0,338	0,573*
Количество тромбоцитов	-0,504*	-0,338	—	-0,249

Примечание. * — $p < 0,05$ — коэффициенты корреляции значимы.

Время XIIa-ЗЭЛ статистически значимо превышало норму; его медиана составила 14 мин ($p < 0,05$). Угнетение общей фибринолитической активности наблюдалось у 68,4% больных, а ее активация — лишь у 10,5%. Одновременно с этим медиана активности плазминогена значимо не отличалась от нормы ($p > 0,05$), однако у 35,7% лиц она была выражено снижена. Снижение последнего показателя можно связать с нарушением его синтеза или активной трансформацией в плазмин в связи с наличием внутрисосудистого микросвертывания; это подтверждается повышенным содержанием D-димеров у всех больных этой группы ($p < 0,05$). Провоспалительные цитокины, тромбин подавляют сосудистую фибринолитическую активность за счет увеличения синтеза и секреции PAI-1 эндотелиоцитами в ответ на повышенное содержание активатора плазминогена тканевого типа [20].

У больных с впервые выявленным ОЛЛ обнаружено увеличение содержания маркеров тромбинеми и активации фибринолиза (РФМК в ортофенантролиновом и этаноловом тестах), статистически значимое по отношению к норме ($p < 0,05$). Физиологические уровни этих показателей найдены лишь у 27,8 и 31,6% больных соответственно. Выявлена положительная корреляция содержания РФМК в ортофенантролиновом тесте и времени XIIa-ЗЭЛ ($r_s = 0,496$; $p < 0,05$). Это дополнительно подтверждает

существование риска микротромбирования у больных ОЛЛ в дебюте заболевания, что может привести к возникновению тромбоемболий. Активность ФVIII была статистически значимо увеличена ($p < 0,05$); это свидетельствует о гиперкоагуляции, которая, по данным литературы [26], характерна для злокачественных заболеваний.

Показатели антикоагулянтной системы не отклонялись от нормы ($p > 0,05$), но их изменения были разнонаправленными. Активность АТIII была повышена у 31,3% и снижена у 12,5% больных, а ПрС — у 6,7% и 20% соответственно. При проведении корреляционного анализа выявлена положительная взаимосвязь активности АТIII с таковой плазминогена и содержанием РФМК в этаноловом тесте ($r_s = 0,596$; $p < 0,05$ и $r_s = 0,639$; $p < 0,05$ соответственно).

Результаты анализа корреляции показателей состояния эндотелия и коагулограммы с количеством бластных клеток, лейкоцитов и тромбоцитов периферической крови, а также с уровнем ЛДГ приведены в **табл. 4**. Выявлена обратная зависимость между количеством тромбоцитов и бластных клеток в периферической крови у пациентов в дебюте ОЛЛ. Обнаружена положительная статистически значимая взаимосвязь количества лейкоцитов и бластных клеток с содержанием ТМ и D-димеров. Это свидетельствует о том, что эти клетки в зависимости от их числа оказывают повреждающее воздействие на эндотелий и интенсивность внутрисосудистого тромбообразования. Корреляция между уровнем ЛДГ и показателями состояния эндотелия не выявлена. Данный показатель коррелировал только с маркерами тромбинемии — РФМК и D-димерами. Это указывает на то, что при разрушении опухолевых клеток (признак этого — повышение уровня ЛДГ) происходит активация внутрисосудистого свертывания крови.

Таким образом, лейкозный процесс в дебюте ОЛЛ за счет мембраноагрессивного действия опухолевых прокоагулянтов бластных клеток вызывает повреждение и дисфункцию эндотелия (отмечено высокое содержание ТМ и ФВ:Аг в плазме крови). При этом снижается функциональная активность системы ТМ и усиливаются прокоагулянтные свойства эндотелия. Эндотелин при манифестации заболевания не был информативен в качестве маркера повреждения ЭК. Дисфункция последних стимулирует активацию внутрисосудистого свертывания и может служить непосредственной причиной тромбгеморрагий. Одновременно с этим содержание естественных антикоагулянтов остается в пределах нормы. Подобное состояние следует охарактеризовать как "зыбкое равновесие", которое может разрушить любой неблагоприятный фактор: инфекция, воздействие антрациклиновых антибиотиков, глюкокортикоидных средств и цитостатических препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдулкадыров К.М., Чуданова Т.В. Диагностика и лечение бактериальных и микотических инфекций у больных гемобластозами. Вестник гематологии. 2005; 3: 5—13.

2. Момот А.П., Шойхет Я.Н. Роль гемостатических и воспалительных реакций в формировании очагов гнойной деструкции органов и тканей. Тромбоз, гемостаз и реология. 2009; 1: 23—39.
3. Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г., Исаев В.Г., Соколов А.Н., Куликов С.М., Клясова Г.А. и др. Итоги многоцентрового рандомизированного исследования по лечению острых миелоидных лейкозов взрослых. Терапевтический архив. 2007; 7: 14—9.
4. Клясова Г.А. Профилактика и лечение инфекционных осложнений. В кн.: Воробьев А.И., ред. Руководство по гематологии. М.: Ньюдиамед; 2002; т.2: 210—30.
5. Черепанова В.В., Перевалова Н.Н., Тарасова Л.Н., Платонова Г.К., Владимиров С.Г. Нарушения гемостаза у больных острым миелобластным лейкозом в процессе полихимиотерапии. Гематология и трансфузиология. 2004; 5: 27—33.
6. Черепанова В.В., Тарасова Л.Н., Андриухин В.И. Нарушения свертывающей системы крови при острых лейкозах взрослых. Киров; 2011.
7. Червоццева А.М., Романов Ю.А., Савченко В.Г. Влияние цитарабина на экспрессию молекул клеточной адгезии и взаимодействие эндотелий-лейкоцит *in vitro*. Терапевтический архив. 2006; 7: 67—72.
8. Баркаган З.С., Момот А.П. ДВС-синдром и тромботическая тромбоцитопеническая пурпура при онкогематологических заболеваниях. Проблемы клинической медицины. 2005; 1: 22—4.
9. Лысикова М., Вальд М., Масиновски З. Механизмы воспалительной реакции и взаимодействие на них с помощью протеолитических энзимов. Цитокины и воспаление. 2004; 3: 48—52.
10. Симбирцев А.С. Цитокины — новая система защитных реакций организма. Цитокины и воспаление. 2002; 3: 9—17.
11. Кузник Б.И., Цибилов Н.Н., Витковский Ю.А. Единая клеточно-гуморальная система защиты организма. Тромбоз, гемостаз и реология. 2005; 2: 3—16.
12. Еделев Д.А., Витковский Ю.А., Кузник Б.И. Влияние интерлейкинов 4 и 10 на свертывание крови и фибринолиз. Тромбоз, гемостаз и реология. 2002; 3: 33—4.
13. Libby P., Simon D.I. Inflammation and thrombosis: The clot thickens. Circulation. 2001; 111(7): 1718—20.
14. Di Nisio M., Middeldorp S., Buller H.R. Direct thrombin inhibitors. N. Engl. J. Med. 2005; 353(10): 1028—40.
15. Furie B., Furie B.C. Mechanisms of thrombus. N. Engl. J. Med. 2008; 359(9): 938—49.
16. Belting M., Dorrell M.I., Sandgren S., Aguilar E., Ahamed J., Dorfleutner A., et al. Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling. Nat. Med. 2004; 10(5): 502—9.
17. Wada H., Kumeda Y., Ogasawara Z., Ohiwa M., Kaneko T., Tamaki S., et al. Plasminogen activators and their inhibitors in leukemic cell homogenates. Am. J. Hematol. 1993; 42(2): 166—70.
18. Дабберха Н. Обеспечение компонентами крови больных острыми лейкозами: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М.; 1992.
19. Долгов В.В., Авдеева Н.А., Щетникович К.А. Методы исследования гемостаза: Пособие для врачей клинической лабораторной диагностики. М.; 1996: 20—1.
20. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. М.: Ньюдиамед; 2001.
21. Меньшиков В.В., ред. Клиническая лабораторная аналитика. т.2. Частные аналитические технологии в клинической лаборатории. М.: Лабпресс; 2000.
22. Kwaan H.C. Double hazard of thrombophilia and bleeding in leukemia. Hematology. 2007; 1: 151—8.
23. Петрищев Н.Н., Папаян Л.П., ред. Гемостаз. Физиологические механизмы, принципы диагностики основных форм геморрагических заболеваний. СПб.: СПбГМУ; 1999.
24. Балуда В.П., ред. Претромботическое состояние: Тромбоз и его профилактика. В.П. Балуда, М.В. Балуда, А.П. Гольдберг и др. М.: Зеркало-М; 1999.

Поступила 09.06.12