

ГЕМАТОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.155.392.2-036.12-07:616-018.74-078.33

Жевак Т.Н., Чеснокова Н.П., Шелехова Т.В.

ПОКАЗАТЕЛИ ИЗМЕНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СОСУДИСТОЙ СТЕНКИ КАК НОВЫЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ РАЗВИТИЯ НАЧАЛЬНЫХ СТАДИЙ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА

ГБОУ ВПО «Саратовский ГМУ им. В.И. Разумовского» Минздрава России, Б. Казачья ул., д. 112, г. Саратов, 410012

До настоящего момента не изучена роль эндотелиальной дисфункции в патогенезе В-клеточного варианта хронического лимфолейкоза (В-ХЛЛ). Между тем обнаружение нарушений функциональной активности сосудистой стенки на начальных стадиях развития этого заболевания позволит расширить существующие диагностические критерии его инициации и соответственно сделать более объективной постановку диагноза. Цель: установить роль эндотелиальной дисфункции в патогенезе начальных стадий (0–I стадий по классификации Rai K. и соавт., 1975) В-клеточного варианта В-ХЛЛ.

В настоящей работе представлены результаты клинико-лабораторного обследования 30 больных с начальными стадиями В-ХЛЛ. Содержание в сыворотке крови классических маркеров эндотелиальной дисфункции определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа однократно в момент поступления пациентов в стационар до начала лечения. В сыворотке крови у больных ХЛЛ выявили повышение уровня E-селектина, ICAM-1, эндотелина-1, метаболитов нитрита азота, ангиотензина II, гомоцистеина, в то же время содержание протеина С снижалось на 0–I стадии указанной патологии. Вывод: в качестве дополнительных диагностических критериев развития паранеопластических расстройств на начальных стадиях ХЛЛ рекомендовано определять содержание в сыворотке крови маркеров эндотелиальной дисфункции: молекул адгезии (E-селектин и ICAM-1), метаболитов нитрита азота, эндотелина-1, протеина С, ангиотензина II, гомоцистеина.

Ключевые слова: В-клеточный вариант хронического лимфолейкоза; паранеопластические расстройства; маркеры эндотелиальной дисфункции.

Jevak T.N., Chesnokova N.P., Shelekhova T.V.

THE INDICATORS OF ALTERATION OF FUNCTIONAL ACTIVITY OF VESSEL WALL AS NEW DIAGNOSTIC CRITERIA OF DEVELOPMENT OF INITIAL STAGES OF CHRONIC LYMPHATIC LEUKEMIA

The V.I. Razumovskii Saratov state medical university of Minzdrav of Russia, 410012, Saratov, Russia

The role of endothelium dysfunction in pathogenesis of B-cell mode of chronic lymphatic leukemia is still uncovered. However, detection of disorders of functional activity of vessel wall at early stages of development of this disease permits to widen actual diagnostic criteria of its initiation and thereafter to make more objective diagnostic itself. The study was targeted to establish the role of endothelium dysfunction in pathogenesis of initial stages (0–I stages according classification Rai K. et al. 1975) of B-cell mode of chronic lymphatic leukemia. The article presents results of clinical laboratory examination of 30 patients with initial stages of B-cell mode of chronic lymphatic leukemia. The content of classic markers of endothelium dysfunction in blood serum were detected using one time solid-phase enzymeimmunoassay at the moment of admission to hospital before initiation of treatment. In patients with chronic lymphatic leukemia blood serum characterized by increasing of level of E-selectin, ICAM-1, endothelin-1, metabolites of nitrogen nitrite, angiotensin II. At the same time, content of protein C decreased at the stage 0–I of mentioned pathology. Hence, it is recommended to apply determining in blood serum the content of markers of endothelium dysfunction as additional diagnostic criteria of development of paraneoplastic disorders at initial stages of chronic lymphatic leukemia. These markers include molecules of adhesion (E-selectin, ICAM-1), metabolites of nitrogen nitrite, endothelin-1, protein C, angiotensin II and homocysteine.

Key words: B-cell mode of chronic lymphatic leukemia; paraneoplastic disorders; markers of endothelium dysfunction.

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) является одним из наиболее распространенных видов гемобластозов. Согласно онкоэпидемиологическим данным, на долю ХЛЛ в общей структуре заболеваемости лейкозами в Европе и Америке приходится 30%, причем возраст более 70% больных ХЛЛ

превышает 60 лет. В России ежегодно регистрируется около 3000 новых случаев, а общее количество больных, нуждающихся в лечении, достигло 6500 [1–3].

В настоящее время четко определена концепция малигнизации клеток при неоплазиях различной локализации, согласно которой иницирующими патогенетическими факторами канцерогенеза является активация протоонкогенов на фоне подавления активности супрессирующих генов и генов апоптоза [1, 4]. В то же время установлены этиологические факторы активации протоонкогенов под влиянием канцерогенов физической, химической, биологической природы при различных формах онкопатологии. Между тем нет

Для корреспонденции:

Жевак Татьяна Николаевна, канд. мед. наук, доц. каф. патофизиологии

Адрес: 410012, Саратов, ул. Б. Казачья, 112

E-mail: zhevakt@rambler.ru

четких представлений о роли классических канцерогенов в индукции В-клеточного варианта ХЛЛ (В-ХЛЛ), на долю которого приходится 95 % всех случаев ХЛЛ [1, 2]. В ряде работ проанализировано значение наследственного фактора в развитии заболевания, формирующегося на фоне хромосомных aberrаций: делеции длинного плеча хромосом 11 и 13, делеции короткого плеча хромосомы 17, трисомии хромосомы 12 [4]. Очевидна и роль многократной антигенной стимуляции моноцитарно-макрофагальной и лимфоцитарной систем в механизмах индуцированной активации пролиферации и развития дедифференцировки В-системы лимфоцитов при В-ХЛЛ [1, 2, 4]. Как известно, антиген-стимулированные клетки лимфоидной и моноцитарно-макрофагальной систем начинают интенсивно продуцировать различные группы цитокинов с про- и противовоспалительной активностью независимо от специфичности антигенов.

В проведенных ранее клинико-лабораторных обследованиях больных ХЛЛ мы установили патогенетическую взаимосвязь между тяжестью течения заболевания и характером изменения цитокинового профиля крови в виде динамических сдвигов соотношения содержания про- и противовоспалительных цитокинов. Так, на ранних стадиях В-ХЛЛ выявили повышение в сыворотке крови уровня интерлейкина (IL)-4, IL-6, IL-10 и фактора некроза опухоли α (TNF α). На поздних стадиях заболевания содержание IL-6 и IL-10 в крови оставалось стабильно высоким, в то же время содержание IL-4, TNF α прогрессирующе нарастало [5–8].

Как известно, цитокины обеспечивают не только межклеточное взаимодействие в лимфоидной и моноцитарно-макрофагальной системах, но и оказывают выраженное системное действие на структуру и функции сосудистой стенки [9, 10]. В связи с этим очевидно, что мониторинг показателей функциональной активности эндотелия на ранних и поздних стадиях В-ХЛЛ в значительной мере дополнит современ-

ные представления о патогенезе паранеопластических расстройств и расширит спектр традиционных диагностических и прогностических критериев развития указанного заболевания, а также возможности оценки эффективности его терапии.

Цель исследования – изучить характер изменений содержания в крови пациентов с 0–I стадией ХЛЛ классических маркеров эндотелиальной дисфункции (Е-селектин, ICAM-1, эндотелин-1, нитрит азота, ангиотензин II, протеин С, гомоцистеин).

Материалы и методы. В работе представлены результаты собственных исследований и наблюдений клеточного состава периферической крови, показателей функционального состояния эндотелия и общесоматического статуса у больных В-ХЛЛ, находившихся на обследовании и стационарном лечении в клинике профпатологии и гематологии Саратова с 2007 по 2013 г.

Для решения поставленных задач провели комплексное обследование 30 больных (19 мужчин и 11 женщин) в возрасте от 48 до 85 лет с 0–I стадией В-ХЛЛ по классификации К. Rai [1, 2, 4]. В группу контроля вошло 30 доноров без клинических проявлений патологии.

Для оценки степени выраженности пролиферации периферической лимфоидной ткани, а также для выявления гепато- и спленомегалии использовали компьютерную томографию групп лимфатических узлов различной локализации. Клеточный состав периферической крови определяли с помощью гематологического автоматического анализатора «Micros-60» (ABX, Франция). Иммунофенотип В-лимфоцитов устанавливали на проточном цитометре «Facs-Calibur» (BD, 2006, США).

Содержание в крови пациентов с 0–I стадией В-ХЛЛ маркеров эндотелиальной дисфункции определяли однократно до применения комплексной полихимиотерапии. Уровень в крови Е-селектина, ICAM-1, эндотелина-1, нитрита азота, ангиотензина II, протеина С, гомоцистеина

Показатели эндотелиальной дисфункции в контрольной группе и у больных с 0–I стадией В-ХЛЛ

Показатель	Контроль	Больные с 0–I стадией В-ХЛЛ
Е-селектин, нг/мл	7,90 (6,9; 9,8)	77,50 (69,0; 89,0) $Z = 6,65; p < 0,000001$
sICAM, нг/мл	165,05 (147,40; 217,80)	524,00 (465,0; 592,0) $Z = 6,65; p < 0,000001$
Нитрит азота, мкмоль/л	7,60 (5,9; 8,5)	18,25 (14,9; 19,8) $Z = 6,65; p < 0,000001$
Протеин С, %	96,50 (94,0; 105,3)	67,00 (59,0; 75,0) $Z = -6,65; p < 0,000001$
Эндотелин-1, пг/мл	0,865 (0,62; 1,1)	3,10 (3,0; 3,3) $Z = 6,65; p < 0,000001$
Ангиотензин II, пг/мл	10,60 (8,6; 11,7)	12,35 (11,7; 13,8) $Z = 4,70; p = 0,000003$
Гомоцистеин, мкмоль/л	6,60 (5,9; 8,5)	17,90 (14,9; 19,8) $Z = 6,65; p < 0,000001$

Примечание. p, Z – по сравнению с показателями в группе контроля.

определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием иммуноферментных тест-систем («Вектор-Бест», Санкт-Петербург) на иммуноферментном анализаторе «Alfa Prime» фирмы Meredith Diagnostics (Англия, 2006).

Математическую обработку данных выполнили, применяя современные статистические прикладные программы Microsoft Office: пакеты Excel и Microsoft Graf, Statistica 6.0 («Stat Soft Inc.»). Данные в тексте представлены в виде медиан с указанием интерквартильного диапазона (25–75-й процентиль). Для межгруппового сравнения использовали непараметрический *U*-критерий Манна–Уитни, точный *Z*-критерий Фишера и показатель достоверности *p*; оценку различий проводили по общепринятому порогу значимости ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение. При клинико-лабораторном обследовании больных с 0–I стадией В-ХЛЛ установили соответствие клинической картины заболевания классическим признакам данной стадии развития ХЛЛ, описанным в ряде руководств [4, 5]. Так, при изучении картины периферической крови обнаружили развитие умеренного лейкоцитоза ($p = 0,000003$) и абсолютного лимфоцитоза ($p = 0,000003$), относительное снижение содержания гранулоцитов ($p = 0,000003$) и моноцитов ($p = 0,000044$). В то же время количество эритроцитов и тромбоцитов, уровень гематокрита и содержание гемоглобина у данных пациентов не отличались от аналогичных показателей в группе контроля.

Развитие лейкоцитоза и абсолютного лимфоцитоза на I стадии заболевания сочеталось с усилением лейкоцитарно-эндотелиального взаимодействия. Об этом свидетельствовало возрастание в крови уровня молекул адгезии – E-селектина и ICAM-1 (см. таблицу).

Касаясь биологических свойств указанных молекул адгезии, следует отметить, что E-селектин (CD62E, ELAM-1, LECAM-2) является гликопротеином и экспрессируется стимулированными клетками эндотелия. E-селектин является одним из лимфоцитарных хоуминг-рецепторов, который взаимодействует с несколькими лигандами, в частности такими, как E-селектин-лиганд (ESL-1), P-селектин гликопротеиновый лиганд, L-селектин и антиген лейкоцитов кожи CLA. E-селектин обеспечивает роллинг и адгезию клеток к сосудистой стенке [9, 10].

В свою очередь обнаруженное нами повышение содержания в крови растворимых молекул ICAM-1 (CD54a) свидетельствует об усилении взаимодействия лимфоцитов между собой, адгезии лейкоцитов и их миграции через эндотелий. Установили, что ICAM-1 состоит из пяти Ig-подобных внеклеточных доменов, которые распознают разные адгезивные лиганды, в том числе расположенные на В-лимфоцитах β_2 -интегрины: CD11a/CD18, или $\alpha_1\beta_2$, LFA-1, и CD11b/CD18, или Mac-1 [9, 10].

Выявленное нами увеличение экспрессии эндотелиальных и лейкоцитарных адгезивных молекул в определенной степени обусловлено наличием стимуляции эндотелия под влиянием высоких доз IL-6 и TNF α , что отмечено нами ранее [5–8].

Адгезивные свойства эндотелия зависят не только от экспрессии лейкоцитарно-эндотелиальных молекул адгезии, но и от уровня продукции антиадгезивных субстанций. К последним, в частности, относится оксид азота. Поэтому далее определяли содержание нитрита азота в сыворотке крови, являющегося метаболитом оксида азота. Как оказалось, на I стадии В-ХЛЛ содержание нитрита азота в сыворотке крови было повышенным (см. таблицу), что стало косвенным показателем усиления продукции и оксида азота при участии NO-синтазы эндотелия.

Согласно данным литературы, оксид азота обладает не только антиадгезивным свойством, но и оказывает антиагрегантное, антикоагулянтное, вазодилаторное влияние [9, 10]. В связи с этим далее представляло интерес выявить, возникает ли модификация антикоагулянтных свойств сосудистой стенки при В-ХЛЛ, связанная с изменением уровня протеина С – сериновой протеазы, продуцируемой гепатоцитами и оказывающей антикоагулянтное действие [9]. Данные исследования свидетельствовали о снижении содержания в крови указанного антикоагулянта (см. таблицу).

Таким образом, результаты проведенных нами исследований свидетельствуют о разнонаправленности изменений антикоагулянтных механизмов уже на начальной стадии В-ХЛЛ при одновременном усилении экспрессии эндотелиальных и лейкоцитарных адгезивных молекул.

Как известно, одним из показателей функциональной активности эндотелия является содержание в крови эндотелина-1 – биологически активного вещества с выраженным вазоконстрикторным действием. В результате проведенных исследований мы обнаружили значительное повышение содержания эндотелина-1 при одновременном возрастании уровня ангиотензина II в сыворотке крови уже на начальной стадии лимфопролиферативного процесса (см. таблицу).

Необходимо было установить патогенетическую взаимосвязь выявленных нами признаков эндотелиальной дисфункции с возможными структурными изменениями сосудистой стенки при В-ХЛЛ, поэтому наши дальнейшие исследования касались определения содержания гомоцистеина в сыворотке крови – фактора, способного вызывать повреждение эндотелия. Гомоцистеин вызывает дезорганизацию структуры клеток сосудов, стимулирует их пролиферацию, а также активирует ряд факторов коагуляционного каскада (XII и V факторы, тканевый фактор) и ингибирует активность естественных антикоагулянтов и антиагрегантов (протеин С, антитромбин III, тромбомодулин) [9, 11].

Результаты исследований свидетельствовали о резком возрастании уровня гомоцистеина уже на I стадии развития В-ХЛЛ (см. таблицу).

Таким образом, мы впервые обнаружили новые закономерности развития системных паранеопластических расстройств на начальных стадиях В-ХЛЛ, характеризующиеся изменением функциональной активности сосудистой стенки в виде усиления экспрессии антигенстимулированными клетками эндотелия и лейкоцитами молекул адгезии (E-селектин и ICAM-1) и увеличения продукции антиадгезивной субстанции – оксида азота. В то же время вазодилатирующий и антитромбогенный эффекты оксида азота на I стадии В-ХЛЛ сочетались с антагонизирующим возрастанием уровня в сыворотке крови вазоконстрикторных субстанций – эндотелина-1 и ангиотензина II. Изменение функциональной активности эндотелия четко коррелирует с возрастанием уровня гомоцистеина в сыворотке крови, что в значительной мере обуславливает деградацию структуры сосудистой стенки [9, 11].

Выводы. 1. Закономерным проявлением паранеопластических расстройств на начальной стадии В-ХЛЛ является эндотелиальная дисфункция в виде дисрегуляции адгезивно-агрегационных свойств сосудистой стенки, ее антитромбогенной активности и нарушения влияния на сосудистый тонус, на что указывают антигенстимулированное увеличение экспрессии E-селектина и ICAM-1, метаболитов оксида азота, эндотелина-1, ангиотензина II, гомоцистеина и снижение уровня протеина С.

2. Одним из патогенетических факторов эндотелиальной дисфункции является возрастание содержания гомоцистеина в сыворотке крови, что оказывает атерогенное и тромбофи-

лическое действие, дестабилизирует структуру и функции сосудистой стенки.

3. В качестве дополнительных диагностических критериев развития паранеопластических расстройств на начальной стадии В-ХЛЛ целесообразно определять содержание в сыворотке крови молекул адгезии (Е-селектин и ICAM-1), метаболитов оксида азота (нитрит азота), эндотелина-1, ангиотензина II, уровень которых закономерно возрастает при инициации указанной онкопатологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьев А.И., ред. *Руководство по гематологии*. 4-е изд. т. 3. М.: Ньюдиамед; 2007.
2. Рукавицын О.А., ред. *Гематология*. СПб.: ООО «Д.П.»; 2007.
3. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В., ред. *Злокачественные образования в России в 2012 году (заболеваемость и смертность)*. М.: ФГУ «МНИСИ им. П.А. Герцена Росмедтехнологий»; 2014.
4. Волкова М.А., ред. *Клиническая онкогематология: руководство для врачей*. 2-е изд. М., Медицина; 2007.
5. Жевак Т.Н., Чеснокова Н.П., Шелехова Т.В. Закономерности изменений цитокинового статуса при хроническом лимфолейкозе и их роль в патогенезе прогрессирующих форм заболевания. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2012; 8 (2): 203–9.
6. Жевак Т.Н., Чеснокова Н.П., Шелехова Т.В. Диагностическое и прогностическое значение увеличения содержания в крови провоспалительных и противовоспалительных цитокинов при хроническом лимфолейкозе. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 2: 33–6.
7. Жевак Т.Н., Чеснокова Н.П., Шелехова Т.В., Царева О.Е. О патогенетической взаимосвязи динамических сдвигов клеточного состава белой крови и цитокинового статуса на различных стадиях хронического лимфолейкоза, их диагностическое и прогностическое значение. *Вестник новых медицинских технологий*. 2012; 19 (4): 139–43.
8. Жевак Т.Н., Чеснокова Н.П., Шелехова Т.В., Царева О.Е. Закономерности изменения цитокинового профиля крови при хроническом лимфолейкозе различной степени тяжести. *Фундаментальные исследования*. 2011; 10: 65–9.
9. Петрищев Н.Н., ред. *Дисфункция эндотелия. Патогенетическое значение и методы коррекции*. СПб.: ИИЦ ВМА; 2007.
10. Белоцкий С.М., Авталион Р.Р. *Воспаление. Мобилизация клеток и клинические эффекты*. М.: БИНОМ; 2008.
11. Метисов М.В. *Тканеспецифичные особенности экспрессии генов, ассоциированных со стрессом эндоплазматического ретикулума под действием гомоцистеина*. Дис. Москва; 2012.

REFERENCES

1. Vorob'ev A.I., ed. *Handbook on hematology*. 4th ed. V. 3. Moscow: N'judiamed; 2007. (in Russian)
2. Rukavicyn O.A., ed. *Hematology*. St. Petersburg: OOO«D.P.»; 2007. (in Russian)
3. Kaprin A.D., Starinskij V.V., Petrova G.V., ed. *Malignant neoplasms in Russia in 2012 year (morbidity and mortality)*. Moscow: FGU«MNISI imeni P.A. Gertsena Rosmedtehnologii»; 2014. (in Russian)
4. Volkova M.A., ed. *Clinical oncohematology: handbook for doctors*. 2th ed. Moscow: Meditsina; 2007. (in Russian)
5. Zhevak T.N., Chesnokova N.P., Shelekhova T.V. Regularities of cytokine status changes in chronic lymphocytic leukaemia and their role in pathogenesis of progressive forms of disease. *Saratovskii nauchno-meditsinsky zhurnal*. 2012; 8 (2): 203–9. (in Russian)
6. Zhevak T.N., Chesnokova N.P., Shelekhova T.V. Role of dynamic shifts of tumor necrosis factor and interleukine-10 levels in blood in pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; 2: 33–6. (in Russian)
7. Zhevak T.N., Chesnokova N.P., Shelekhova T.V., Careva O.E. Role of dynamic shifts of tumor necrosis factor and interleukine-10 levels in blood in pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Vestnik novykh meditsinskih tehnologii*. 2012; 19 (4): 139–43. (in Russian)
8. Zhevak T.N., Chesnokova N.P., Shelekhova T.V., Careva O.E. Regularity of blood cytokine profile change in chronic lymphocytic leukaemia of different severity. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2011; 10: 65–9. (in Russian)
9. Petrishhev N.N., ed. *Endothelial dysfunction*. Pathogenetic evaluation and methods of correction. St. Petersburg: IIC VMA; 2007. (in Russian)
10. Belockij S.M., Avtalion R.R. *Inflammation. Mobilization of cells and clinical effects*. Moscow: BINOM; 2008. (in Russian)
11. Metisov M.V. *Tissue-specific peculiarities of gene expression associated with stress of endoplasmic reticulum under the influence of homocysteine*. Dis. Moscow; 2012. (in Russian)

Поступила 11.08.14

Received 11.08.14