

## РОЛЬ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ В ПАТОГЕНЕЗЕ ТЕРМИНАЛЬНОЙ СТАДИИ ХРОНИЧЕСКОГО ЛИМФОЛЕЙКОЗА

Жевак Т.Н.<sup>1</sup>, Чеснокова Н.П.<sup>1</sup>, Шелехова Т.В.<sup>1</sup>, Бизенкова М.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Саратовский Государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского Минздрава России», Саратов, e-mail: [zhevakt@rambler.ru](mailto:zhevakt@rambler.ru)

В работе проведена оценка функциональной активности эндотелия у больных с IV стадией В-клеточного варианта хронического лимфолейкоза, находящихся на обследовании и стационарном лечении в клинике профпатологии и гематологии г. Саратова в период с 2007 по 2013 гг. Критериями функциональной активности эндотелия явились содержание в крови растворимых адгезивных молекул (Е-селектина, ICAM-1), метаболита оксида азота – нитрита азота, гомоцистеина и протеина С, определяемых с использованием твердофазного иммуноферментного анализа. Как оказалось, характерной особенностью терминальной стадии хронического лимфолейкоза явилось повышение уровней в сыворотке крови растворимых адгезивных молекул (Е-селектина, ICAM-1), гомоцистеина, увеличение активности NO-синтазной системы при одновременном снижении содержания протеина С. Усиление экспрессии эндотелиально-лейкоцитарных адгезивных молекул является одним из молекулярно-клеточных механизмов развития инфильтративных изменений в различных органах и тканях. Одним из патогенетических факторов нарушения функциональной активности эндотелия можно считать возрастание содержания гомоцистеина, обладающего способностью вызывать дезорганизацию структуры сосудистой стенки.

Выявленные нами признаки эндотелиальной дисфункции могут быть использованы в качестве дополнительных диагностических критериев развития терминальной стадии хронического лимфолейкоза.

Ключевые слова: В-клеточный вариант хронического лимфолейкоза, Е-селектин, ICAM-1, оксид азота, гомоцистеин.

## THE ROLE OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN PATHOGENESIS OF TERMINAL STAGE OF CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

Zhevak T.N.<sup>1</sup>; Chesnokova N.P.<sup>1</sup>; Shelekhova T.V.<sup>1</sup>, Bizenkova M.N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Saratov State Medical University n.a. V.I. Razumovsky, Saratov, Russia (410012, Saratov, street B.Kazachya, 112), e-mail: [zhevakt@rambler.ru](mailto:zhevakt@rambler.ru)

We have done the analysis of endothelial functional activity in patients with stage IV of B-cellular variant of chronic lymphocytic leukemia. Criteria of endothelial functional activity were the levels of adhesive molecules (E-selectin, ICAM-1), nitric oxide metabolites, homocysteine, and protein C which were detected by enzyme multiplied immunoassay method. It has been revealed that characteristic peculiarity of terminal stage of B-cellular variant of chronic lymphocytic leukemia is increased levels of soluble adhesive molecules (E-selectin, ICAM-1), homocysteine in blood serum, elevated activity of NO-synthase system, and decreased level of protein C. Intensified expression of endothelial-leucocytic adhesive molecules is one of the molecular-cellular mechanisms of the lymphocytic infiltration of different organs and tissues. Elevation of homocysteine levels is one of the pathogenic factor of endothelial functional abnormality.

The features of endothelial dysfunction revealed by us may be used as additional diagnostic criteria of the development of terminal stage.

Key words: B-cellular variant of chronic lymphocytic leukemia, E-selectin, ICAM-1, nitric oxide, homocysteine.

Одним из наиболее распространенных видов лейкоза является хронический лимфолейкоз (ХЛЛ), частота встречаемости которого в эпидемиологической структуре заболеваемости лейкозами достигает 25-30%. Причем В-клеточный вариант указанной патологии (В-ХЛЛ) составляет до 95% всех случаев заболевания [2,8,9,11].

До настоящего времени остаются не изученными этиологические факторы, факторы риска и иницирующие механизмы развития В-ХЛЛ. Широко используемые в практической медицине диагностические и прогностические критерии развития заболевания основаны на

традиционно сложившихся принципах оценки показателей клеточного состава периферической крови и общесоматического статуса [2,9,11]. Однако последние далеко не всегда определяют возможность объективной оценки состояния больного, эффективности комплексной терапии и, соответственно, оценки прогрессирующего или регрессирующего характера течения заболевания.

Дифференциальная диагностика развития ХЛЛ в ряде случаев представляет трудности, поскольку кровь является чрезвычайно реактогенной системой, и при различных формах патологии формируются стереотипные изменения ее клеточного состава.

Лишь в последние годы в практическую медицину стало внедряться исследование иммунофенотипа неопластического клона лимфоцитов, позволяющее достаточно точно верифицировать диагноз [2,9,11].

В соответствии с данными литературы одной из общих закономерностей развития онкопатологии различной локализации является динамическая смена стадий: малигнизации, промоции и опухолевой прогрессии, что характерно и для В-ХЛЛ. Данные клинических исследований убедительно свидетельствуют о том, что на терминальных стадиях заболевания возникает метастазирование малигнизированных клеток и формирование инфильтратов, в частности, в печени, селезенке и других органах и тканях [2,9,11].

Как известно, одним из начальных этапов метастазирования является обратимая (роллинг), а затем и плотная адгезия лимфоцитов к эндотелию с последующим выходом их за пределы сосудистого русла и интенсивной пролиферацией в местах метастазирования. Указанные процессы обеспечиваются в значительной мере изменением структуры и функциональных свойств эндотелия в динамике опухолевой прогрессии, в частности, усилением экспрессии молекул адгезии, оксида азота, эндотелинов, ангиотензина II, регулирующих в условиях нормы и патологии адгезивно-агрегационную активность сосудистой стенки, ее способность активировать систему гемостаза, фибринолитическую систему, каллекреин-кининовую систему, систему комплемента, оказывать выраженное влияние на проницаемость сосудистой стенки для различных субстратов, в том числе и опухолевых клеток [1,3].

Вышеизложенное определило **цель** исследования: изучить функциональную активность эндотелия на терминальной стадии В-ХЛЛ по следующим показателям Е-селектина, ICAM-1, эндотелина-1, нитрита азота, ангиотензина II, протеина С, гомоцистеина, уточнить современные представления о патогенезе терминальной стадии развития В-ХЛЛ.

#### **Материалы и методы исследования.**

Для решения поставленных в работе цели и задач проведено комплексное обследование 30 больных с IV стадией В-ХЛЛ по классификации Rai K.R., 1975 [2,9,11] в возрасте от 53 до 85

лет, среди которых были 19 мужчины и 11 женщин. В группу контроля вошли 30 доноров без клинических проявлений патологии.

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

Для оценки степени выраженности пролиферации периферической лимфоидной ткани применялась компьютерная томография групп лимфатических узлов различной локализации, а также выявление гепато- и спленомегалии. Клеточный состав периферической крови определялся с помощью гематологического автоматического анализатора «Micros-60» (ABX, Франция). Иммунофенотип В-лимфоцитов устанавливался на проточном цитометре «Facs-Calibur» (BD, США, 2006).

Определение содержания в крови пациентов с IV стадией В-ХЛЛ маркеров эндотелиальной дисфункции проведено однократно до применения комплексной полихимиотерапии. Показатели содержания в крови Е-селектина, ICAM-1, эндотелина-1, нитрита азота, ангиотензина-II, протеина С, гомоцистеина определялись методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием иммуноферментных тест-систем («Вектор-Бест», Санкт-Петербург) на иммуноферментном анализаторе «Alfa Prime» фирмы «Meredith Diagnostics» (Англия, 2006).

Математическая обработка данных выполнена с применением современных статистических прикладных программ 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 процентиля). Для межгруппового сравнения использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни, точный Z-критерий Фишера и показатель достоверности p; оценка различий проводилась по общепринятому порогу значимости ( $p \leq 0,05$ ).

#### **Результаты и их обсуждение.**

Комплексное клинико-лабораторное обследование больных с IV стадией ХЛЛ позволило обнаружить классические симптомы заболевания в виде увеличения лимфатических узлов, развития гепато- и спленомегалии, развития лейкоцитоза ( $p=0,000003$ ), абсолютного лимфоцитоза ( $p=0,000053$ ), анемии ( $p=0,0037$ ), а также тромбоцитопении ( $p=0,000003$ ).

В то же время отмечено, что характерной особенностью развития IV стадии заболевания явилось резкое усиление экспрессии молекул адгезии (Е-селектина и ICAM-1) с увеличением их содержания в крови, сочетающееся с развитием лейкоцитоза и абсолютного лимфоцитоза (табл. 1).

Характер изменения содержания растворимых молекул адгезии в крови у больных с IV стадией В-ХЛЛ

Показатель	Группы наблюдения	
	Контрольная группа	IV стадия развития ХЛЛ
Е-селектин, нг/мл	7,90 (6,9; 9,8)	102,40 (95,0; 114,9)  Z=6,65; p<0,000001
sICAM, нг/мл	165,05 (147,40; 217,80)	439,50 (412,0; 478,0)  Z=6,65; p< 0,000001

*Примечание:* p, Z – по сравнению с показателями группы контроля.

Касаясь значимости обнаруженного нами усиления экспрессии адгезивных молекул на поздней стадии развития В-ХЛЛ, следует отметить, что повышение уровня Е-селектина (CD62E, ELAM-1, LECAM2) способствует обратимой адгезии лейкоцитов к эндотелию («роллингу»), в то время как возрастание содержания растворимых молекул адгезии ICAM-1 (CD54a) является одним из патогенетических факторов усиления межклеточного взаимодействия лимфоцитов между собой, образованию стабильных связей лимфоцитов и эндотелиоцитов (плотной адгезии) с последующей инфильтрацией тканей.

Касаясь молекулярно-клеточных механизмов усиления экспрессии адгезивных молекул (Е-селектина и ICAM-1), следует отметить стимулирующее влияние высоких концентраций провоспалительных цитокинов (IL-6 и TNF- $\alpha$ ) на функциональную активность эндотелия, обнаруженных нами ранее [1].

Согласно данным литературы важную роль в обеспечении антиоксидантных свойств эндотелия и его антиадгезивной активности отводится оксиду азота, являющемуся в тоже время и производным синтетической функции эндотелия [3].

До настоящего момента не производилось оценки значения роли оксида азота в патогенезе нарушений адгезивно-агрегационных свойств эндотелия и его участия в развитии метастатических процессов.

В связи с этим далее было проведено определение содержания метаболита оксида азота – нитрита азота – в сыворотке крови пациентов с терминальной стадией В-ХЛЛ. Как оказалось, на терминальной стадии В-ХЛЛ содержание нитрита азота в сыворотке крови было повышено (табл. 2). Таким образом, на IV стадии заболевания сохраняется динамическое равновесие, характеризующееся усилением экспрессии адгезивных молекул и антиадгезивных эффектов оксида азота.

Характер изменения содержания маркеров эндотелиальной дисфункции в крови у  
больных с IV стадией В-ХЛЛ

Показатель	Группы наблюдения	
	Контрольная группа	IV стадия развития ХЛЛ
Нитрит азота, мкмоль/л	7,60 (5,9; 8,5)	21,90 (18,3; 25,1)  Z=6,65; p<0,000001
Протеин С, %	96,50 (94,0; 105,3)	65,00 (61,0; 68,0)  Z=-6,65; p< 0,000001
Гомоцистеин, мкмоль/л	6,60 (5,9; 8,5)	25,25 (18,3; 25,1)  Z=6,65; p< 0,000001

*Примечание:* p, Z – по сравнению с показателями группы контроля.

Целью дальнейшего наблюдения явилось установление патогенетической взаимосвязи изменения структуры и функции эндотелия. Важнейшим регулятором структуры и функции сосудистой стенки является гомоцистеин, синтезирующийся из метионина и представляющий собой аминокислоту, гомологичную цистеину. Гомоцистеин способен повреждать сосудистую стенку, делая ее поверхность рыхлой, в результате происходит осаждение холестерина и кальция, возможно усиление тромбобразования и, следовательно, нарушение микроциркуляции [3,10].

Проведенные нами далее исследования свидетельствуют о патогенетической взаимосвязи возрастания уровня гомоцистеина в крови со снижением содержания протеина С – сериновой протеазы, продуцируемой гепатоцитами и обладающей антикоагулянтным действием (табл. 2).

**Заключение.** В развитии терминальной стадии В-ХЛЛ, характеризующейся формированием множественных инфильтратов в таких органах и тканях как печень, селезенка и других, важная роль должна быть отведена эндотелиальной дисфункции, проявляющейся экспрессией адгезивных молекул (Е-селектина, ICAM-1), способствующих, соответственно, обратимой и плотной адгезии с последующим усилением миграции лейкозных клеток в ткани. В то же время даже на терминальной стадии патологии сохраняется активность NO-синтазной системы, обеспечивающей достаточно высокий уровень оксида азота, обладающего свойствами

антиоксиданта, мембранопротектора, вазодилататора [3]. Одним из патогенетических факторов нарушения структуры и функции является изменение уровня гомоцистеина.

### Список литературы

1. Белоцкий С.М., Авталион Р.Р. Воспаление. Мобилизация клеток и клинические эффекты. – М.: БИНОМ, 2008. – 240 с.
2. Гематология / Рукавицын О.А., Павлов А.Д., Морщакова Е.Ф. [и др.]; Под ред. О.А. Рукавицына. – СПб.: ООО «Д.П.», 2007. – 912 с.
3. Дисфункция эндотелия. Патогенетическое значение и методы коррекции / Под ред. проф. Н.Н. Петрищева. – СПб.: НИЦ ВМА, 2007. – 296с.
4. Дисфункция эндотелия. Причины, механизмы, фармакологическая коррекция / Под ред. проф. Н.Н. Петрищева. – СПб, 2003.
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. – Саратов, 2012. – Т. 8, N2. – С. 203-209.
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. – М., 2013. – № 2. – С. 33-36.
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. – Тула, 2012. – Т. XIX, N4. – С. 139-143.
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. – С. 65-69.
9. Злокачественные образования в России в 2012 году (заболеваемость и смертность ) / Под ред. Каприна А.Д., В.И., Старинского В.В., Петровой Г.В. – М.: ФГУ «МНИСИ им. П.А. Герцена Росмедтехнологий», 2014. – 250 с.
10. Клиническая онкогематология: руководство для врачей / Под ред. М.А. Волковой (2-е изд.). – М.: ОАО Изд-во Медицина, 2007. – 1120 с.

11. Метисов М.В. Тканеспецифичные особенности экспрессии генов, ассоциированных со стрессом эндоплазматического ретикулума под действием гомоцистеина. Автореф. дис. ...канд. биол. наук. – М., 2012.
12. Петрищев Н.Н., Власов Т.Д. Типовые формы дисфункции эндотелия // Клиническая патофизиология: курс лекций / Под ред. В.А. Черешнева, П.Ф. Литвицкого, В.Н. Цыгана.- СПб.: СпецЛит, 2012. – С. 166-179.
13. Руководство по гематологии / Под ред. А.И. Воробьева (4-е изд.). – М: Ньюдиамед, 2007. – 1275 с.
14. Aird W.C. Spatial and temporal dynamic of the endothelium // J. Thromb. Haemost. – 2005. - №3(7). - P. 1392-1406.

**Рецензенты:**

Понукалина Е.В., д.м.н., профессор, профессор кафедры нормальной физиологии им. И.А. Чувского ГБОУ ВПО «Саратовский Государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского Минздрава России», г. Саратов.

Брилль Г.Е., д.м.н., профессор, профессор кафедры патологической физиологии им. акад. А.А. Богомольца ГБОУ ВПО «Саратовский Государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского Минздрава России», г. Саратов.