

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЕНОЗНОЙ СТЕНКИ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ВЕНОЗНОГО ТРОМБОЗА И ПРИМЕНЕНИИ МИКРОНИЗИРОВАННОЙ ОЧИЩЕННОЙ ФРАКЦИИ ФЛАВОНОИДОВ

Р. Е. Калинин, М. В. Мнихович, И. А. Сучков, А. Н. Новиков

*Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова,
Научно-исследовательский институт морфологии человека РАМН, Москва*

Проведено исследование влияния микронизированной очищенной фракции флавоноидов на функциональное состояние эндотелия и морфологию венозной стенки при экспериментальном венозном тромбозе. Выявлено положительное влияние препарата на функцию эндотелия и процессы репарации венозной стенки.

Ключевые слова: эндотелиальная дисфункция, микронизированная очищенная фракция флавоноидов, венозный тромбоз, оксид азота (II).

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ESTIMATION OF A VENOUS WALL IN SIMULATED DEEP VEIN THROMBOSIS AND WHEN CORRECTED WITH A MICRONIZED PURIFIED FRACTION OF FLAVONOIDS

R. E. Kalinin, M. V. Mnihovich, I. A. Suchkov, A. N. Novikov

The influence of purified micronized fraction of flavonoids on the functional condition of endothelium of a venous wall and its structure in experimentally simulated deep venous thrombosis was estimated. The study revealed a positive effect of the drug on endothelial function and reparative processes in a venous wall.

Key words: endothelial dysfunction, purified micronized fraction of flavonoids, venous thrombosis, nitric oxide (II).

Тромбоз глубоких вен (ТГВ) нижних конечностей и его осложнения являются ведущей причиной смертности и инвалидизации в развитых странах [9]. В настоящее время, в качестве наиболее вероятного фонового процесса, лежащего в основе развития каскада патологических изменений структуры и функции венозной стенки, приводящих к формированию тромба, рассматривается эндотелиальная дисфункция (ЭД) [5, 6, 10]. В основе ЭД лежит повреждение эндотелиоцитов различными факторами, среди которых наиболее вероятными являются активированные лейкоциты, свободные радикалы и продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) [2, 3]. Микронизированная очищенная фракция флавоноидов (МОФФ) является представителем флебопротекторов — препаратов группы выбора при различных заболеваниях вен, с доказанными антиоксидантными свойствами [1, 7, 8, 11]. Таким образом, влияние МОФФ на функциональное состояние эндотелия (ФСЭ) и морфологические изменения венозной стенки при ТГВ является перспективным аспектом применения данного препарата и требует детального изучения.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оценить функциональное состояние эндотелия и морфологические особенности венозной стенки при экспериментальном венозном тромбозе на фоне применения препарата микронизированной очищенной фракции флавоноидов.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на 70 крысах линии Wistar массой 250—350 г. Все манипуляции проводили

в одно и то же время суток, во второй половине дня с соблюдением принципов, изложенных в «Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986) и приказом Минздрава СССР № 742 от 13.11.1984 г. Животные были разделены на 2 группы.

В группе 1 (контрольная) животным ($n = 35$) под наркозом после срединной лапаротомии выполнялась перевязка правой общей подвздошной вены и введение дистальнее лигатуры 0,3 мл подогретого до 37—37,5 °С раствора тромбина (40 ЕД/кг). Гистологическое исследование венозной стенки, определение биохимических показателей ФСЭ и антиоксидантного статуса осуществлялись на 10-е сут., 1, 2, 3 и 6 месяцы с момента оперативного вмешательства.

В группе 2 (экспериментальный тромбоз глубоких вен) животным ($n = 35$) под наркозом после срединной лапаротомии выполнялась перевязка правой общей подвздошной вены и введение дистальнее лигатуры 0,3 мл подогретого до 37—37,5 °С раствора тромбина (40 ЕД/кг). Начиная с 11 сут. от момента оперативного вмешательства, и на протяжении 6 месяцев животным энтеральным путем вводилась водная суспензия микронизированной очищенной фракции флавоноидов в дозе 100 мг/кг/сут. Гистологическое исследование венозной стенки, определение биохимических показателей ФСЭ и антиоксидантного статуса осуществлялись на 10-е сут., 1, 2, 3 и 6 месяцы с момента оперативного вмешательства.

Забор комплекса брюшная аорта — нижняя полая вена у животных осуществлялся после релапаро-

томии под наркозом. Выведение животных из эксперимента в количестве 7 особей производилось в конкретные для каждой группы сроки, путем передозировкой диэтилового эфира.

Цельная кровь центрифугировалась при 3000 об./мин в течение 15 мин. Эритроциты гемолизировали разбавлением дистиллированной водой в соотношении 1:10. Активность супероксиддисмутазы (СОД) определялась в гемолизате по методу, основанному на реакции окисления кверцетина. Содержание малонового диальдегида (МДА) в гемолизате определяли по методу, основанному на реакции с тиобарбитуровой кислотой. Определение СОД и МДА выполнено фотокалориметрическим методом. Содержание метаболитов NO определяли в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа по методике В. А. Метельской [4].

Для проведения гистологического исследования материал фиксировали в забуференном нейтральном 10%-м формалине на протяжении 24 ч с дальнейшей проводкой по батарею спиртов возрастающей концентрации, заливки в гомогенизированный парафин. Изготавливали серийные срезы толщиной 5—7 мкм с дальнейшим монтированием на обезжиренные и поли-L-лизиновые стекла. Были выбраны следующие методы окраски: гематоксилин-эозин (обзорная методика), по Ван Гизону (для выявления соединительнотканной стромы и более четкой визуализации сосудов).

Значения определяемых показателей представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее значение, а

m — стандартная ошибка среднего. В случае нормального закона распределения достоверность различий показателей определяли при помощи t -критерия Стьюдента. Если закон распределения исследуемых числовых показателей отличался от нормального, достоверность различий проверяли при помощи U -критерия Манна — Уитни (попарные сравнения независимых совокупностей показателей), W -критерия Уилкоксона (попарные сравнения зависимых совокупностей показателей), H -критерия Краскала-Уоллиса (множественные сравнения независимых совокупностей данных). Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Для определения существования корреляций между параметрами вычисляли коэффициент корреляции r Пирсона, который считали достоверным при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследуемые показатели в различные сроки эксперимента представлены в табл. 1—2.

Как видно из таблиц, колебания основных биохимических показателей ФСЭ, определяемых в исследовании, позволяет говорить о том, что развитие ТГВ влияет на ФСЭ. Во всех группах после воспроизведения венозного тромбоза отмечаются сопоставимые в количественном отношении результаты. Наблюдается достоверное снижение метаболитов оксида азота (II), повышение уровня МДА и, как следствие, компенсаторная активация антиоксидантной системы, проявляющейся в увеличении уровня СОД. Применение пре-

Таблица 1

Значение исследуемых показателей в различные сроки после операции в группе экспериментального тромбоза глубоких вен ($M \pm m$)

Показатели	NO, мкмоль/мл	СОД, у.е./мг Hb	МДА, нмоль/г Hb
Исходные	29,314 ± 3,124	0,287 ± 0,092	5,398 ± 0,962
На момент постановки модели	12,342 ± 2,060	0,768 ± 0,144	12,09 ± 4,31
1 месяц	66,58 ± 7,58	0,157 ± 0,084	5,928 ± 0,661
2 месяца	55,67 ± 12,05	0,234 ± 0,074	6,000 ± 1,152
3 месяца	54,36 ± 12,49	0,148 ± 0,077	5,74 ± 1,47
6 месяцев	50,60 ± 19,08	0,138 ± 0,098	5,02 ± 1,75

*Значимое отличие от уровня на момент постановки модели ($p < 0,05$).

Таблица 2

Значение исследуемых показателей в различные сроки после операции в контрольной группе ($M \pm m$)

Показатели	NO, мкмоль/мл	СОД, у.е./мг Hb	МДА, нмоль/г Hb
Исходные	29,314 ± 3,124	0,287 ± 0,092	5,398 ± 0,962
На момент постановки модели	11,508 ± 3,162	0,847 ± 0,523	17,395 ± 3,514
1 месяц	12,200 ± 2,619	0,496 ± 0,183	9,731 ± 2,103
2 месяца	12,780 ± 3,454	0,588 ± 0,235	12,597 ± 1,745
3 месяца	11,702 ± 3,691	0,759 ± 0,434	14,187 ± 3,778
6 месяцев	9,698 ± 1,818	0,713 ± 0,495	17,638 ± 2,869

*Значимое отличие от исходного уровня ($p < 0,05$), ** отличие недостоверно ($p > 0,05$).

парата МОФФ вызывает достоверное ($p < 0,05$) увеличение синтеза NO и снижение уровня МДА и СОД во всех группах на протяжении времени эксперимента, что говорит о наличии у препарата эндотелиотропного эффекта. Изучаемые показатели достигли своих исходных значений к 1 месяцу наблюдения и оставались на этом же уровне на протяжении всего периода исследования. Активность СОД на фоне применения МОФФ снижается, возможно, вследствие уменьшения содержания продуктов ПОЛ, что является предпосылкой для реализации положительных эффектов NO, однако данный показатель достоверен не во всех группах.

При гистологическом исследовании, на 10-е сут. от начала эксперимента, изменения венозной стенки в обеих группах идентичны: представлены выраженными полями экссудативного воспаления вокруг стенки сосуда с явлениями дезорганизации соединительной ткани, в которых преобладали деструктивные процессы, стенка вены неравномерной толщины, с воспалительной инфильтрацией в адвентиции и периваскулярно (рис. 1), в просвете гемолизированные и обесцвеченные эритроциты с фибриновой базофильной сетью, фибриновые массы и стенка вены связаны грануляционной тканью, в последней пролиферация фибробластов и очаги геморрагической инфильтрации.

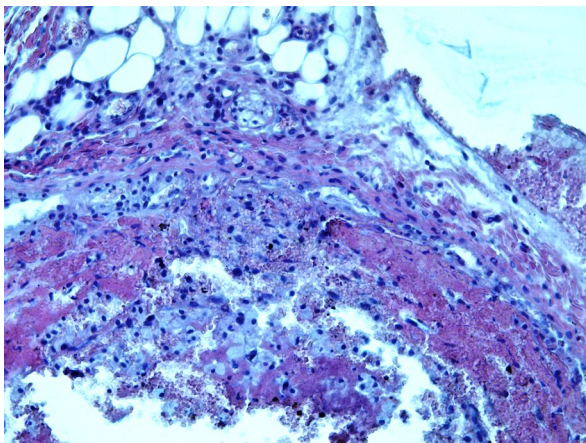


Рис. 1. Морфологическая картина венозной стенки в зоне тромбоза. Выраженное воспаление в стенке вены преимущественно полиморфноклеточного характера, деструкция мышечных волокон. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

Стенка вены утолщена, в просвете организованный тромб с гемосидерозом и лейкоцитарной инфильтрацией, в центре эритроцитарно-фибриновый тромб острого типа (рис. 2), стенка вены не инфильтрирована, окружающая ткань с умеренным отеком.

В обеих группах к 3 месяцу эксперимента в венах в 80 % случаев определялись обтурирующие организованные тромбы с участками ревазуляризации, в теле тромба гемосидерин (рис. 3), стенка вены склерозирована. Имеются очаговые поля периваскулярного склероза, с преобладанием фуксинофильных волокон, в

местах наложения лигатуры эпителиоидно-клеточная реакция и активация клеток рассасывания (рис. 4). В группе ТГВ отмечаются процессы восстановления эластомышечного каркаса вены, с активацией периваскулярного ангионенеза, уменьшением воспалительной инфильтрации, хотя в зоне наложения лигатуры по-прежнему активация макрофагов и клеток рассасывания. В просветах отмечаются тромботические массы с участками ревазуляризации и резорбции гемосидерина.

К 6 месяцу наблюдения в контрольной группе гистологическая картина была следующей: стенка вены с хорошо развитой мышечной оболочкой, интима утолщена, базальная мембрана широкая, плотная, местами отслоена, в просвете фибриново-эритроцитарный тромб с организацией и ревазуляризацией. В стенке отмечается неравномерная очаговая воспалительная инфильтрация в интима и адвентиции.

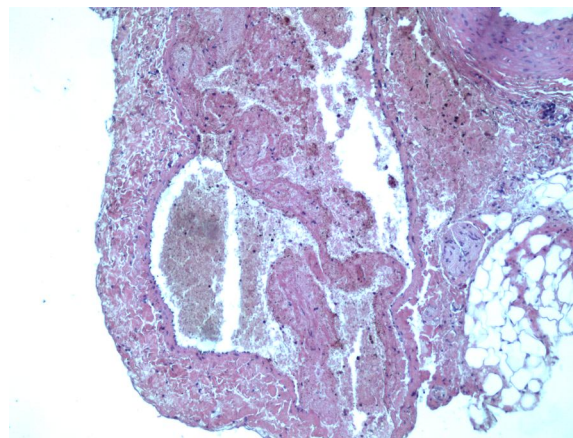


Рис. 2. Морфологическая картина венозной стенки в зоне тромбоза. Неравномерное утолщение венозной стенки с формированием выпячиваний, тромботические массы в просвете вены. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

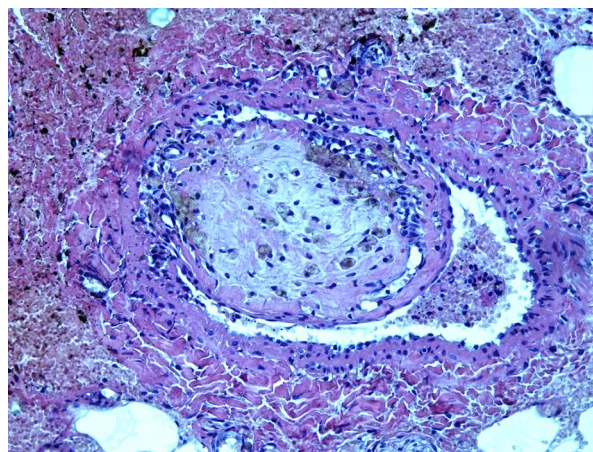


Рис. 3. Морфологическая картина венозной стенки в зоне тромбоза. Сформированный организованный пристеночный, частично обтурирующий просвет тромб с зернами гемосидерина и признаками резорбции. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

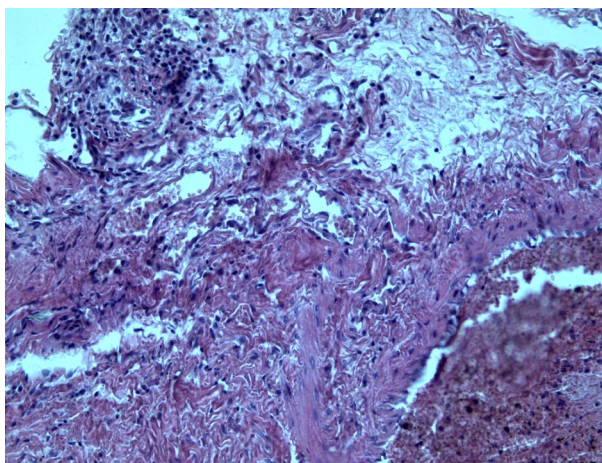


Рис. 4. Морфологическая картина венозной стенки в зоне тромбоза. Поля периваскулярного склероза с явлениями ангиогенеза. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

В адвентиции распределение воспалительного экссудата преимущественно периваскулярно (рис. 5). В артерии отек интимы, мелкие сосуды малокровные. В адвентиции артериального сосуда рыхлая инфильтрация полиморфноядерными лейкоцитами, мелкие сосуды неравномерно полнокровные, окружающая клетчатка умеренно отечная, с ангиоматозом.



Рис. 5. Морфологическая картина венозной стенки в зоне тромбоза. Организованные тромботические массы, гиперплазия интимы. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

В опытной группе к 6 месяцу коррекции, гистологически стенка вены с хорошо развитой мышечной стенкой, интима неравномерно утолщена, выстлана прерывистым эндотелием, нередко его расположение частоклообразное, с признаками пролиферации. В просвете некоторых сосудов определяются остатки фибриново-эритроцитарных тромбов, преимущественно с пристеночным расположением их, очагами ревазуляризации (рис. 6). Адвентиция и

средняя оболочка с неравномерным утолщением и развитием *vasa vasorum*. В адвентиции рыхлая инфильтрация, преобладают пикринофильные волокна, единичные макрофаги с признаками фагоцитарной активности, очаги резорбции гемосидерина. В зоне наложения лигатуры по-прежнему сохраняется макрофагальная и эпителиоидно-клеточная активность, очаговые поля коллагена с преобладанием фуксинофильных волокон, ангиоматоз.

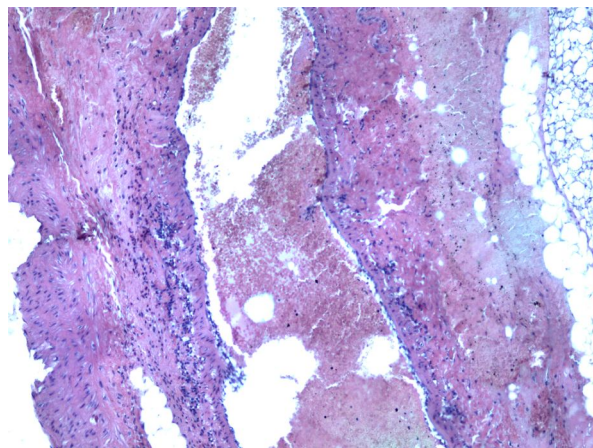


Рис. 6. Морфологическая картина венозной стенки в зоне тромбоза. Адвентиция и средняя оболочка с неравномерным утолщением, рыхлая мононуклеарная инфильтрация, очаги резорбции гемосидерина. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальное воспроизведение венозного тромбоза приводит как к структурной перестройке, так и к нарушению ФСЭ венозной стенки. Применение МОФФ привело к снижению маркеров оксидативного стресса и ФСЭ, а также заметному регрессу морфологической картины воспаления, деструктивных и склеротических процессов и процессов тромбообразования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богачев В. Ю., Голованова О. В., Кузнецов А. Н. и др. // Ангиология и сосудистая хирургия. — 2013. — Т. 19. — № 1. — С. 73—80.
2. Калинин Р. Е. // Российский медико-биологический вестник им. акад. И. П. Павлова. — 2006. — № 3. — С. 84—89.
3. Киричук В. Ф., Глыбочко В. Ф. // Дисфункция эндотелия. — Саратов: Изд-во СГМУ, 2008. — 110 с.
4. Метельская В. А., Гуманова Н. Г. // Клиническая лабораторная диагностика. — 2005. — № 6. — С. 15—18.
5. Прасол В. А., Невзорова О. Ф., Невзоров В. П. и др. // Международный медицинский журнал. — 2011. — №1. — С. 90—94.
6. Шевченко Ю. Л., Стойко Ю. М., Замятин М. Н. и др. // Ангиология и сосудистая хирургия. — 2008. — Т. 14, № 1. — С. 15—20.
7. Bergan J. J. // Angiology. — 2005. — Vol. 56. — Suppl. 1. — P. 21—24.