

На правах рукописи

НОВИКОВ АЛЕКСЕЙ НИКОЛАЕВИЧ

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЕНОЗНОЙ
ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ И ЕЕ КОРРЕКЦИЯ
ПРЕПАРАТОМ МИКРОНИЗИРОВАННОЙ ОЧИЩЕННОЙ
ФЛАВОНОИДНОЙ ФРАКЦИИ ДИОСМИНА**

14.01.26 – сердечно-сосудистая хирургия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Рязань – 2014

Работа выполнена в государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор **Калинин Роман Евгеньевич**

Официальные оппоненты:

Казakov Юрий Иванович, доктор медицинских наук, профессор, ГБОУ ВПО «Тверская государственная медицинская академия» Минздрава России, заведующий кафедрой сердечно-сосудистой хирургии;

Гудымович Виктор Григорьевич, доктор медицинских наук, доцент, ФГБУ «Национальный медико-хирургический Центр им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, профессор кафедры хирургических инфекций.

Ведущая организация:

ФГБУ «Институт хирургии имени А.В.Вишневского» Минздрава России.

Защита диссертации состоится « » 201 г. в «14.00» часов на заседании совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, ученой степени доктора наук Д 208.123.01 при ФГБУ «НМХЦ им. Н.И.Пирогова» Минздрава России по адресу: 105203, Москва, Нижняя Первомайская, 70.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИУВ ФГБУ «Национальный медико-хирургический Центр им. Н.И.Пирогова» (105203, Москва, Нижняя Первомайская, 65) и на сайте www.pirogov-center.ru.

Автореферат разослан « » 2014 г.

Учёный секретарь совета по защите
диссертаций на соискание ученой степени
кандидата наук, ученой степени доктора наук
доктор медицинских наук, профессор

Матвеев С.А

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы:

Заболевания венозной системы являются наиболее распространенной патологией периферических сосудов. Варикозное расширение подкожных вен нижних конечностей, венозные тромбозы и их осложнения занимают ведущее место в структуре венозной патологии [В.С. Савельев и др. 2001].

Социально-экономические издержки из-за венозных тромбоэмболических осложнений (ВТЭО) в развитых странах составляют от 1 до 3% от общего бюджета системы здравоохранения в год. Так, в США совокупные потери в связи с лечением трудоспособного населения составляют примерно 2 млн. рабочих часов и от 3 до 10 млрд. долларов ежегодно [J.J. Bergan, 2006; R. van den Oever, 1998]. Таким образом, актуальность проблемы заболеваний венозной системы весьма сложно переоценить.

Не менее остро на сегодняшний день стоит вопрос об этиологии и патогенезе острых и хронических заболеваний вен, в связи с наметившимся переосмыслением взглядов на механизмы развития патологических состояний венозной системы. В частности, в последние годы, все большее количество сторонников получает теория эндотелиальной дисфункции (ЭД) в развитии различных заболеваний сосудов [Ю.М. Стойко и др., 2004; Ю.С. Небылицин и др., 2008; В.Ф. Киричук и др., 2008; Х.М. Марков, 2005; Ю.Л. Шевченко и др., 2011]. Рассмотрение роли ЭД в этиологии и патогенезе заболеваний венозной системы ни коим образом не отрицает сформулированных факторов риска ВТЭО и варикозной трансформации вен, однако позволяет трактовать их по-иному, находя новые причинно-следственные связи [Ю.М. Стойко, 2006; M. Myšliviec, 2004; A.G. Holst, 2010; A.K. Nightingale, 2001].

В настоящее время роль ЭД в развитии атеросклеротического поражении артериального русла признана в широких кругах ученых, однако, до настоящего времени, нарушение функционального состояния эндотелия

(ФСЭ) не рассматривалось в качестве вероятных причин развития и прогрессирования венозной патологии. Данный факт послужил предпосылкой к выполнению настоящей работы.

На сегодняшний день биофлавоноиды занимают ведущее место в консервативном лечении венозной патологии. Данная группа препаратов имеет вполне доказанное и выраженное влияние на ключевой механизм развития эндотелиальной дисфункции – оксидативный стресс, что и обуславливает их успешное применение как при венозной, так и при артериальной патологии [В.Ю. Богачев, 2013; В.С. Савельев и др., 2001; J.J. Bergan, 2005; A.N. Nicolaidis, 2003].

В литературе представлено большое количество работ, посвященных экспериментальному моделированию венозного тромбоза и, соответственно, посттромботического синдрома, однако малое количество работ рассматривает данные модели с позиции ФСЭ венозной стенки и его нарушений, факторов влияющих на него и возможные пути коррекции имеющихся его расстройств.

Таким образом, экспериментальное воспроизведение нарушений ФСЭ при различных патологических состояниях венозной системы и изучение влияния флеботропного препарата на основные маркеры ЭД и оксидативного стресса являются перспективными объектами изучения.

Исходя из вышесказанного были сформулированы цели и задачи настоящей работы.

Цель исследования

Улучшение результатов лечения заболеваний венозной системы, совершенствование их диагностики и прогнозирования с позиции оценки функционального состояния эндотелия.

Задачи исследования

1. Оценить возможности воспроизведения различных патологических состояний сердечно-сосудистой системы в качестве моделей венозной эндотелиальной дисфункции в эксперименте.

2. Оценить функциональное состояние эндотелия, процессы ПОЛ и активность АОС при экспериментальном воспроизведении различных патологических состояний.

3. Провести оценку морфологических изменений венозной стенки при различных экспериментально индуцированных патологических состояниях сердечно-сосудистой системы.

4. Оценить влияние препарата микронизированной очищенной флавоноидной фракции диосмина на исследуемые в эксперименте параметры.

Научная новизна

В группах лабораторных животных при различных экспериментальных моделях венозной патологии впервые проведена комплексная биохимическая оценка маркеров ФСЭ (NO и индуцибельной синтазы NO (iNOS)), биохимических показателей ПОЛ (малонового диальдегида (МДА)), АОС (супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГП)) и морфологической картины венозного русла. Также проведен анализ влияния препарата очищенной флавоноидной фракции диосмина (МОФФ) на маркеры оксидативного стресса, дисфункции эндотелия, АОС и морфологические изменения венозной стенки при различных экспериментальных моделях ЭД.

Научно-практическая значимость работы

Результаты данной работы позволят определить роль ЭД при венозной патологии как неотъемлемого фонового процесса, лежащего в основе развития и прогрессирования заболеваний, что в практической медицине найдёт своё применение в лечении и профилактики заболеваний вен.

Отмечена важность динамического равновесия процессов ПОЛ и АОС в развитии и прогрессировании ЭД и необходимость коррекции его нарушений.

Показана эффективность МОФФ – флеботропного препарата выбора при различных экспериментальных моделях венозной патологии с позиции его эндотелиотропных эффектов, оценка которых носила комплексный характер.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Экспериментальные модели L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции, ТГВ и ПТС являются перспективными методами воспроизведения венозной ЭД в эксперименте.
2. Нарушение процессов ПОЛ и АОС является важным звеном в развитии и прогрессировании ЭД и их первостепенная коррекция лежит в основе улучшения ФСЭ.
3. Применение МОФФ оказывает положительное влияние на ФСЭ, снижает показатели оксидативного стресса и выраженность морфологических проявлений острой и хронической венозной патологии в эксперименте.
4. Необходима исходная оценка ФСЭ и его таргетная коррекция в комплексном лечении ХЗВ.

Внедрение результатов исследования в практику и учебный процесс

Результаты исследования внедрены в лечебную работу отделения сосудистой хирургии ГБУ РО «Областной клинический кардиологический диспансер» и отделения сосудистой хирургии МУЗ «Коломенская ЦРБ», в учебную работу кафедры ангиологии, сосудистой, оперативной хирургии и топографической анатомии ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.

Апробация работы

Основные результаты работы доложены и обсуждены на XIII международной студенческой конференции «Студенческая медицина XXI века» (Витебск, 2013), Всероссийской научной конференции, посвященной 90-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина (Рязань, 2013), V Международном молодёжном медицинском конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения» (Санкт-Петербург, 2013), XVIII Ежегодной

сессии НЦССХ им. А.Н. Бакулева с Всероссийской конференцией молодых ученых (Москва, 2014), VIII Международной научно-практической конференции «Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования», посвящённая памяти профессора А.П. Солодкова (Витебск, 2014), X Юбилейной научно-практической конференции Ассоциации флебологов России (Нижний Новгород, 2014), II Весеннем съезде Европейского общества сосудистых хирургов (Лондон, 2014), XXIX Международной конференции Российского общества ангиологов и сосудистых хирургов «Новые направления и отдалённые результаты открытых и эндоваскулярных вмешательств в лечении сосудистых больных» (Рязань, 2014), XV ежегодном Европейском Венозном Форуме (Париж, 2014).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 15 работ, из них 5 в центральной печати.

Объём и структура диссертации

Диссертация изложена на 115 страницах печатного текста и состоит из: введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Диссертация иллюстрирована 52 рисунками и диаграммами, 6 таблицами. Список литературы содержит 53 отечественных и 186 зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Диссертационная работа выполнена в рамках научного плана ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России. По дизайну исследование организовано как открытое, в параллельных группах лабораторных животных.

Эксперимент выполнен на 147 лабораторных крысах линии Wistar массой 250-350 г. Животные разделены на четыре группы. Все исследования

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 13.11.1984г.

В качестве экспериментальной модели тромбоза глубоких вен (ТГВ) использовалась методика S. Wessler: лигирование магистральной вены с последующим введением активированного фактора свертывания крови ниже лигатуры. Моделирование посттромботического синдрома (ПТС) выполнялось аналогичным образом, за исключением сроков начала введения микронизированной очищенной фракции флавоноидов (МОФФ): при модели ТГВ – с 10 суток, при ПТС – с 31 суток. Моделирование L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции выполнялось путем внутрибрюшинного введения N-нитро-L-аргинин (L-NAME) метилового эфира в дозе 25 мг/кг/сут. в течение 7 суток. Введение МОФФ лабораторным животным осуществлялось ежедневно на протяжении 6 месяцев энтеральным путем с помощью специального зонда для кормления в дозе 100 мг/кг/сут. Препарат применялся в виде водной суспензии, полученной путем механического измельчения таблетированной формы содержащей 500 мг флавоноидов (450 мг диосмина и 50 мг гесперидина) при помощи ступки и пестика с последующим добавлением физиологического раствора NaCl 0,9%.

Контрольную группу составили 42 животных, которым под наркозом после срединной лапаротомии выполнено лигирование правой общей подвздошной вены и введение дистальнее лигатуры 0,3 мл подогретого до 37–37,5°C раствора тромбина (40 ЕД/кг) без введения препарата МОФФ.

В группу экспериментального ТГВ вошло 35 животных, которым под наркозом после срединной лапаротомии выполнялась перевязка правой общей подвздошной вены и введение дистальнее лигатуры 0,3 мл подогретого до 37–37,5°C раствора тромбина (40 ЕД/кг). С 11 суток от момента оперативного вмешательства и на протяжении 6 месяцев животным энтеральным путем вводилась водная суспензия МОФФ в дозе 100

мг/кг/сутки. Определение биохимических показателей ФСЭ, оксидативного стресса, антиоксидантного статуса и гистологическое исследование осуществлялись на 10-е сутки от момента оперативного вмешательства, на 1, 2, 3 и 6 месяцы с момента постановки модели.

В группу экспериментального ПТС вошло 35 животных, которым под наркозом после срединной лапаротомии выполнялась перевязка правой общей подвздошной вены и введение дистальнее лигатуры 0,3 мл подогретого до 37-37,5°C раствора тромбина (40 ЕД/кг). С 31 суток от момента оперативного вмешательства и на протяжении 6 месяцев животным энтеральным путем вводилась водная суспензия МОФФ в дозе 100 мг/кг/сутки. Аналогичные биохимические и гистологическое исследования осуществлялись на 30-е сутки от момента оперативного вмешательства, на 1, 2, 3 и 6 месяцы с момента постановки модели.

В группу L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции вошло 35 животных, которым выполнялось внутрибрюшинное введение N-нитро-L-аргинин метилового эфира в дозе 25 мг/кг/сутки в течение 7 суток. С 8 суток от начала эксперимента и на протяжении 6 месяцев животным энтеральным путем вводилась водная суспензия МОФФ в дозе 100 мг/кг/сутки. Определение биохимических показателей ФСЭ, про- и антиоксидантного статуса и гистологическое исследование осуществлялись на 8-е сутки от момента начала эксперимента, на 1, 2, 3 и 6 месяцы с момента постановки модели.

Выделенный сосудистый пучок фиксировали в 10% растворе нейтрального забуференного формалина (фосфатный буфер, pH=7,2–7,4), обезживали в серии этанолов возрастающей концентрации, с применением изопропанола, заливали в парафин. Изготавливали тотальные серии срезов (10 мкм), которые окрашивали гематоксилином и эозином (“Biovitrum”, Россия). Гистологические срезы также окрашивали пикрофуксином по ван Гизону и по методу Маллори по общепринятой методике.

Морфологическое исследование проводили с помощью микроскопа Leica DMI 4000 B с видеозахватом камерой Leica. Для изучения L-NAME индуцированной патологии в дополнение к стандартной световой микроскопии использовали трансмиссионную электронную микроскопию, для чего фрагменты сосудистой стенки фиксировали в 2,5% растворе глutarальдегида ("Fluka", Швейцария) с постфиксацией в 1% растворе OsO₄ ("Fluka", Швейцария). Контрастирование проводили 2,5% спиртовым раствором (70° этиловый спирт) уранила ацетата ("Fluka", Швейцария). Подготовленные кусочки заливали в смесь смол Эпона и Аралдита М ("Fluka", Швейцария). Полутонкие срезы окрашивали азуром II и эозином. Ультратонкие срезы дополнительно контрастировали солями свинца и уранилацетатом по Рейнольдсу. Изучение препаратов проводили на трансмиссионном электронном микроскопе "Libra 120" с автоматическим сканированием изображений ("Carl Zeiss", Германия).

Определение метаболитов оксида азота (II) (NO) в сыворотке крови осуществлялось по методике Метельской В.А. фотоколориметрическим методом, оптимизированной сотрудниками ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России (рационализаторское предложение (удостоверение № 1317)).

Содержание индуцибельной синтазы оксида азота (II) (iNOS) в плазме крови производили методом иммуноферментного анализа на ИФА – анализаторе Stat Fax 3200 («Awareness Technology, Inc.») с использованием иммуноферментного набора для количественного in vitro определения синтазы оксида азота 2 (NOS2) в образцах сыворотки, плазмы крови и других биологических жидкостях (ELISA Kit for Nitric Oxide Synthase 2, Inducible (NOS2), «Cloud-Clone Corp.»).

Определение активности глутатионпероксидазы (ГП) проводилось по методике, предложенной D.E. Paglia и W.N. Valentine в модификации В.З. Ланкина, основанной на кинетическом спектрофотометрическом определении активности фермента при регистрации уменьшения оптической плотности опытного образца при 340 нм.

Определение активности супероксиддисмутазы (СОД) выполнялось

спектрофотометрическим (кверцетиновым) методом, на основании методики, описанной В.А. Костюк и др. (1990).

Определения концентрации малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови выполнялось по методике, описанной Коробейниковой Э.Н. в 1989 году, которая основана на реакции малонового диальдегида с тиобарбитуровой кислотой с образованием триметилового комплекса, имеющего максимум поглощения при $\lambda=532-535$ нм.

Характер распределения данных определяли по критерию Шапиро-Уилка. Для исследования статистической значимости показателей (если сравнивали более чем 2 группы), имеющих нормальное распределение, использовали тест ANOVA, критерий Ньюмена-Кейсла. Для оценки статистической значимости различий при распределении данных, которое отличается от нормального, использовали тест Крускала-Уоллиса, критерий Ньюмена-Кейсла. Для исследования статистической значимости различий показателей между двумя группами, имеющими нормальное распределение, использовали критерий Стьюдента. За уровень достоверности была принята вероятность различия 95% ($p<0,05$).

Для исследования статистической значимости межгрупповых различий показателей, имеющих распределение отличное от нормального, использовали критерий Манна-Уитни.

Для данных, имеющих нормальное распределение, рассчитывали среднее арифметическое значение (M) и стандартную ошибку среднего результата (m). Для данных, имеющих распределение отличное от нормального, рассчитывали медиану (Me), верхний (Q_{75}) и нижний квартиль (Q_{25}).

Биохимическая характеристика функционального состояния эндотелия в исследуемых группах до и после применения микронизированной очищенной флавоноидной фракции диосмина.

В контрольной группе животных на 8-10 сутки от момента лигирования магистральной вены отмечалось достоверное снижение содержания

метаболизм оксида азота ($11,508 \pm 3,162$ мкмоль/мл) ($p < 0,05$) при одновременном повышении уровней ГП ($18,85$ НАДФН₂/мин х мг белка) ($p > 0,05$), СОД ($0,847 \pm 0,523$ у.е./мг Hb) ($p > 0,05$), МДА ($17,395 \pm 3,541$ нмоль/г Hb) ($p < 0,05$) и iNOS ($61,1$ пг/мл) ($p < 0,05$) (таблица 1). Содержание МДА – интегрального показателя процессов ПОЛ – увеличивается, по-видимому в результате развития оксидативного стресса на фоне острой ишемии венозной стенки. Одновременно отмечается рост основных ферментов АОС – ГП и СОД – который, вероятно обусловлен компенсаторной активацией АОС на фоне увеличения активности процессов ПОЛ. Повышение уровня iNOS обусловлено воспалительной реакцией венозной стенки и окружающих тканей на внешнее воздействие и развитие тромбоза. На фоне роста содержания iNOS – самого активного представителя NO-синтаз, происходит довольно выраженное снижение содержания метаболитов оксида азота (II).

Таблица 1.

Динамика изучаемых биохимических показателей в контрольной группе

	СОД, у.е./мг Hb (M±m)	МДА, нмоль/г Hb (M±m)	ГП, НАДФН ₂ / мин х мг белка (Me; Q ₂₅ ; Q ₇₅)	iNOS, пг/мл (Me; Q ₂₅ ; Q ₇₅)	Метаболиты NO, мкмоль/мл (M±m)
Исходные показатели	$0,287 \pm 0,092$	$5,398 \pm 0,962$	13; 10,1; 19,3	26,45; 21,5; 32,6	$29,314 \pm 3,124$
8-10 сутки	$0,847 \pm 0,523^{\Delta\Delta}$	$17,395 \pm 3,541^{\Delta}$	$18,85^{\Delta\Delta}$; 13,4; 29,1	$61,1^{\Delta}$; 45,9; 71,3	$11,508 \pm 3,162^{\Delta}$
Месяц 1	$0,496 \pm 0,183^{\Delta\Delta}$	$9,731 \pm 2,103^{\Delta}$	31^{Δ} ; 19,3; 40,7	$62,8^{\Delta}$; 48,5; 64,9	$12,2 \pm 2,619^{\Delta}$
Месяц 2	$0,588 \pm 0,235^{\Delta\Delta}$	$12,597 \pm 2,745^{\Delta}$	$22,2^{\Delta}$; 18,4; 39,9	$71,65^{\Delta}$; 45,9; 84,4	$12,78 \pm 3,454^{\Delta}$
Месяц 3	$0,759 \pm 0,434^{\Delta\Delta}$	$14,187 \pm 3,778^{\Delta}$	$35,25^{\Delta}$; 32,9; 37,2	$72,3^{\Delta}$; 45,0; 94,4	$11,702 \pm 3,691^{\Delta}$
Месяц 6	$0,713 \pm 0,495^{\Delta\Delta}$	$17,638 \pm 2,869^{\Delta}$	$20,75^{\Delta}$; 18,6; 38,4	$71,1^{\Delta}$; 44,9; 86,4	$9,698 \pm 1,818^{\Delta}$

Примечание: Δ – значимое отличие от уровня у интактных животных ($p < 0,05$);

$\Delta\Delta$ – различия недостоверны в сравнении с уровнем у интактных животных ($p > 0,05$).

В группе ПТС на момент постановки модели отмечено достоверное ($p < 0,05$) снижение уровня метаболитов NO ($12,47 \pm 2,83$ мкмоль/мл) при одновременном повышении уровней МДА ($16,52 \pm 4,28$ нмоль/г Hb) ($p < 0,05$), iNOS ($66,2$ пг/мл) ($p < 0,05$), СОД ($0,423 \pm 0,168$ у.е./мг Hb) ($p > 0,05$) и ГП ($21,25$ НАДФН₂/мин х мг белка) ($p > 0,05$) (таблица 2). При последующем применении МОФФ, отмечается достоверное повышение содержания метаболитов NO в сыворотке крови ($44,31 \pm 15,11$ мкмоль/мл), при одновременной нормализации маркеров оксидативного стресса: МДА ($4,98 \pm$

0,64 нмоль/г Hb) ($p < 0,05$), СОД ($0,1 \pm 0,044$ у.е./мг Hb) ($p < 0,05$), ГП (13,35 НАДФН₂/мин х мг белка) ($p > 0,05$). Уровень iNOS на фоне коррекции МОФФ недостоверно снижается iNOS (50,85 пг/мл) ($p > 0,05$), что говорит о влиянии препарата на процессы хронического воспаления венозной стенки на фоне ПТС. Повышение уровня метаболитов NO также объясняется нормализацией процессов ПОЛ под действием флавоноидов. Снижение активности основных ферментов АОС, по-видимому, также вызвано снижением оксидативного стресса на фоне фармакологической коррекции.

Таблица 2.

Динамика изучаемых биохимических показателей в группе экспериментального посттромботического синдрома

	СОД, у.е./мг Hb (M±m)	МДА, нмоль/г Hb (M±m)	ГП, НАДФН ₂ / мин х мг белка (Me; Q ₂₅ ; Q ₇₅)	iNOS, пг/мл (Me; Q ₂₅ ; Q ₇₅)	Метаболиты NO, мкмоль/мл (M±m)
Исходные показатели	0,287 ± 0,092	5,398 ± 0,962	13; 10,1; 19,3	26,45; 21,5; 32,6	29,314 ± 3,124
На момент постановки модели	0,423 ± 0,168 ^{ΔΔ}	16,52 ± 4,28 ^Δ	21,25 ^{ΔΔ} ; 15,2; 32,6	66,2 ^Δ ; 48,0; 86,4	12,47 ± 2,83 ^Δ
Месяц 1	0,1 ± 0,044 [*]	4,98 ± 0,64 [*]	13,35 ^{**} ; 10,6; 18,2	50,85 ^{**} ; 32,6; 72,1	44,31 ± 15,11 [*]
Месяц 2	0,07 ± 0,03 [*]	5,162 ± 0,92 [*]	14,45 [*] ; 10,2; 15,8	40,25 ^{**} ; 29,8; 65,7	45,92 ± 12,07 [*]
Месяц 3	0,1 ± 0,057 [*]	4,69 ± 0,75 [*]	13,5 [*] ; 10,2; 16,3	27,25 [*] ; 23,9; 49,4	48,32 ± 13,17 [*]
Месяц 6	0,184 ± 0,1 ^{**}	5,74 ± 1,86 [*]	15,3 ^{**} ; 12,4; 21,7	27,65 [*] ; 21,9; 48,9	32,076 ± 9,73 [*]

Примечание: ^Δ – значимое отличие от уровня у интактных животных ($p < 0,05$);

^{ΔΔ} – различия недостоверны в сравнении с уровнем у интактных животных ($p > 0,05$);

^{*} – значимое отличие от уровня на момент постановки модели ($p < 0,05$);

^{**} – различия недостоверны в сравнении с уровнем на момент постановки модели ($p > 0,05$).

При постановке модели в группе L-NAME-индуцированной ЭД на отмечено достоверное снижения уровня метаболитов NO (12,022 мкмоль/мл) ($p < 0,05$), вызванное ингибированием eNOS, при этом уровень iNOS (27,85 пг/мл) ($p > 0,05$) не подвергся достоверным изменениям, что говорит о специфичности действия препарата L-NAME. В то же время у животных данной группы выявлено достоверное повышение маркеров оксидативного стресса – МДА ($13,108 \pm 1,371$ нмоль/г Hb) ($p < 0,05$) и увеличения активности СОД ($0,798 \pm 0,276$ у.е./мг Hb) ($p < 0,05$) и ГП (26,15 НАДФН₂/мин х мг белка) ($p > 0,05$) (таблица 3). Подобный эффект объясняется тем, что L-NAME является синтетическим аналогом эндогенных ингибиторов eNOS – несимметричного диметиларгинина (АДМА) и

монометил-L-аргинина (NMMA), которые в физиологических условиях приводят к возникновению оксидативного стресса в ЭК. На фоне применения МОФФ у животных данной группы отмечалось достоверное повышение уровня метаболитов NO, понижение уровня МДА, а также понижение активности СОД на протяжении всего периода наблюдения. При этом не выявлено какого-либо значимого влияния препарата МОФФ на уровень iNOS на протяжении эксперимента.

Таблица 3.

Динамика изучаемых биохимических показателей в группе L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции

	СОД, у.е./мг Hb (M±m)	МДА, нмоль/г Hb (M±m)	ГП, НАДФН ₂ / мин х мг белка (Me; Q ₂₅ ; Q ₇₅)	iNOS, пг/мл (Me; Q ₂₅ ; Q ₇₅)	Метаболиты NO, мкмоль/мл (M±m)
Исходные показатели	0,287 ± 0,092	5,398 ± 0,962	13; 10,1; 19,3	26,45; 21,5; 32,6	29,314 ± 3,124
На момент постановки модели	0,768 ± 0,144 ^Δ	12,09 ± 4,31 ^Δ	25,4 ^{ΔΔ} ; 18,1; 29,3	61,6 ^Δ ; 48,9; 65,4	12,342 ± 2,06 ^Δ
Месяц 1	0,157 ± 0,084 [*]	5,928 ± 0,661 [*]	21,75 ^{**} ; 19,1; 29,4	30,9 [*] ; 21,5; 32,8	66,58 ± 7,58 [*]
Месяц 2	0,234 ± 0,074 [*]	6 ± 1,152 [*]	20,25 ^{**} ; 10,3; 22,3	38,35 [*] ; 26,7; 45,6	55,67 ± 12,05 [*]
Месяц 3	0,148 ± 0,077 [*]	5,74 ± 1,47 [*]	15,0 ^{**} ; 12,4; 20,4	28,85 [*] ; 20,2; 34,7	54,36 ± 12,49 [*]
Месяц 6	0,138 ± 0,098 [*]	5,02 ± 1,75 [*]	15,9 ^{**} ; 13,7; 19,6	25,9 [*] ; 20,7; 36,3	50,6 ± 19,08 [*]

Примечание: ^Δ – значимое отличие от уровня у интактных животных (p < 0,05);

^{ΔΔ} – различия недостоверны в сравнении с уровнем у интактных животных (p > 0,05);

^{*} – значимое отличие от уровня на момент постановки модели (p < 0,05);

^{**} – различия недостоверны в сравнении с уровнем на момент постановки модели (p > 0,05).

В группе ТГВ выявлено достоверное снижение метаболитов NO на момент постановки модели (12,342 ± 2,06 мкмоль/мл) (p<0,05). В ходе применения МОФФ отмечалось достоверное повышение уровня NO на протяжении всего периода наблюдения (66,58 ± 7,58 мкмоль/мл) (p<0,05), причем его показатель достиг своих исходных значений к первому месяцу наблюдения и не подвергался значимым колебаниям до момента окончания эксперимента. Уровень iNOS на момент постановки модели достоверно увеличился (61,6 пг/мл) (p<0,05) с последующим стойким значимым понижением до исходного уровня (30,9 пг/мл) (p<0,05) на фоне применения МОФФ. Также выявлено значимое повышение МДА (12,09 ± 4,31 нмоль/г Hb) (p<0,05), а также увеличение активности ГП (25,4 НАДФН₂/мин х мг

белка) ($p > 0,05$) и уровня СОД ($0,768 \pm 0,144$ у.е./мг Нб) ($p < 0,05$) на момент постановки модели ТГВ (таблица 4).

Спустя 1 месяц от начала применения МОФФ в группе ТГВ выявлены следующие изменения: уменьшение содержания iNOS (30,9 пг/мл) ($p < 0,05$) и МДА ($5,928 \pm 0,661$ нмоль/г Нб) ($p < 0,05$), а также снижение активности ГП ($21,75$ НАДФН₂/мин х мг белка) ($p > 0,05$) и СОД ($0,157 \pm 0,084$ у.е./мг Нб) ($p < 0,05$). Также отмечено повышение уровня метаболитов NO в сыворотке крови ($66,58 \pm 7,58$ мкмоль/мл). Применение МОФФ в группе ТГВ привело к снижению интенсивности процессов ПОЛ, о чем позволяет судить достоверное уменьшение уровня МДА ($p < 0,05$). На фоне нормализации последнего происходит понижение активности основных ферментов АОС – ГП и СОД ($p < 0,05$). Также наблюдалось повышение уровня метаболитов NO ($p < 0,05$).

В дальнейшем, у животных группы ТГВ на 2, 3 и 6 месяц наблюдения не выявлено достоверных колебаний изучаемых метаболитов, отличных от показателей 1 месяца от начала медикаментозной коррекции.

Таблица 4.

Динамика изучаемых биохимических показателей в группе экспериментального тромбоза глубоких вен

	СОД, у.е./мг Нб ($M \pm m$)	МДА, нмоль/г Нб ($M \pm m$)	ГП, НАДФН ₂ / мин х мг белка ($Me; Q_{25}; Q_{75}$)	iNOS, пг/мл ($Me; Q_{25}; Q_{75}$)	Метаболиты NO, мкмоль/мл ($M \pm m$)
Исходные показатели	$0,287 \pm 0,092$	$5,398 \pm 0,962$	13; 10,1; 19,3	26,45; 21,5; 32,6	$29,314 \pm 3,124$
На момент постановки модели	$0,423 \pm 0,168^{\Delta\Delta}$	$16,52 \pm 4,28^{\Delta}$	$21,25^{\Delta\Delta}$; 15,2; 32,6	$61,6^{\Delta}$; 48,9; 65,4	$12,47 \pm 2,83^{\Delta}$
Месяц 1	$0,1 \pm 0,044^*$	$4,98 \pm 0,64^*$	$13,35^{**}$; 10,6; 18,2	$30,9^*$; 21,5; 32,8	$44,31 \pm 15,11^*$
Месяц 2	$0,07 \pm 0,03^*$	$5,162 \pm 0,92^*$	$14,45^*$; 10,2; 15,8	$38,35^*$; 26,7; 45,6	$45,92 \pm 12,07^*$
Месяц 3	$0,1 \pm 0,057^*$	$4,69 \pm 0,75^*$	$13,5^*$; 10,2; 16,3	$28,85^*$; 20,2; 34,7	$48,32 \pm 13,17^*$
Месяц 6	$0,184 \pm 0,1^{**}$	$5,74 \pm 1,86^*$	$15,3^{**}$; 12,4; 21,7	$25,9^*$; 20,7; 36,3	$32,076 \pm 9,73^*$

Примечание: Δ – значимое отличие от уровня у интактных животных ($p < 0,05$);

$\Delta\Delta$ – различия недостоверны в сравнении с уровнем у интактных животных ($p > 0,05$);

* – значимое отличие от уровня на момент постановки модели ($p < 0,05$);

** – различия недостоверны в сравнении с уровнем на момент постановки модели ($p > 0,05$).

Особенности морфологической картины и ультраструктурных изменений венозной стенки в экспериментальных группах в различные сроки исследования

При гистологическом исследовании, на 10-е сутки от начала эксперимента, в группах контроля и ТГВ (рисунки 1А, 1Б) морфологические изменения были представлены выраженными полями экссудативного воспаления вокруг стенки сосуда с явлениями дезорганизации соединительной ткани, с преобладанием деструктивных процессов. Стенка вены была неравномерной толщины, с воспалительной инфильтрацией в адвентиции, с формированием в просвете тромбов.

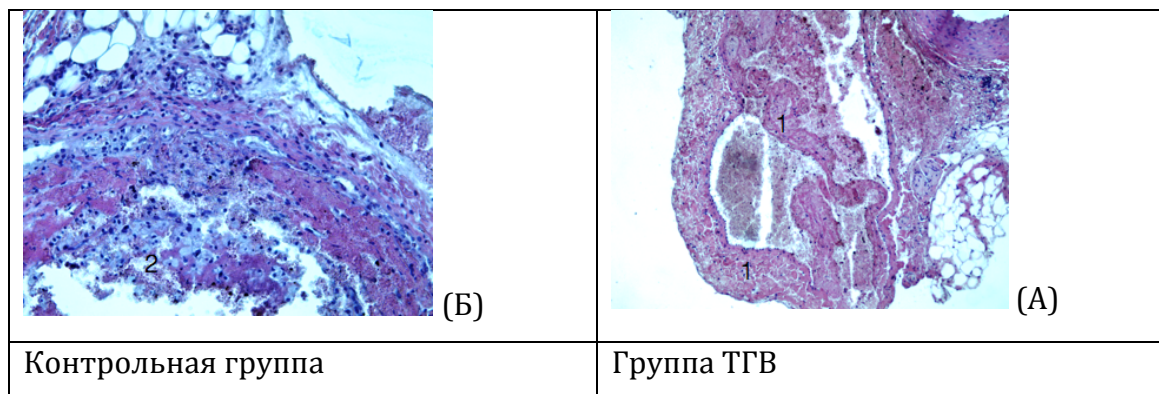


Рис. 1. Морфологическая картина венозной стенки в зоне тромбоза в группах контроля и ТГВ на 10-е сутки от момента операции. А: 1 – неравномерное утолщение венозной стенки; Б: 2 – сформированный организованный пристеночный, частично обтурирующий просвет тромб с зернами гемосидерина и признаками резорбции. Окраска гематоксилином и эозином, x200.

Во группе ТГВ через 6 мес. при гистологическом исследовании: стенка с хорошо развитым мышечным 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 реваскуляризации (рисунок 2А). 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.

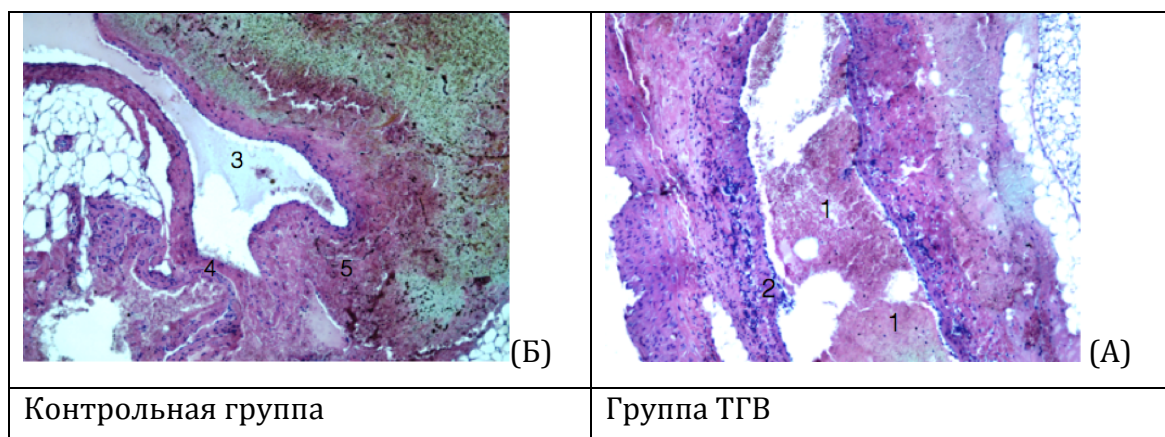


Рис. 2. Морфологическая картина венозной стенки в зоне тромбоза в группах контроля и ТГВ на 6 месяц от момента постановки модели. А: 1 – фибриново-эритроцитарный тромб в просвете вены; 2 – признаки пролиферативной активности эндотелия; Б: 3 – фибринозно-эритроцитарный тромб с пристеночной организацией и реваскуляризацией; 4 – локальное отслоение базальной мембраны; 5 – воспалительная инфильтрация венозной стенки. Окраска гематоксилином и эозином, x100.

В контрольной группе (рисунок 2Б) стенка вены с хорошо развитой мышечной оболочкой, интима утолщена, базальная мембрана широкая, плотная, местами отслоена, в просвете фибринозно-эритроцитарный тромб с пристеночной организацией и реваскуляризацией, в стенке неравномерная воспалительная инфильтрация в интима и адвентиции. В адвентиции рыхлая инфильтрация полиморфноядерными лейкоцитами, мелкие сосуды неравномерно полнокровные, окружающая клетчатка с ангиоматозом. В группе ТГВ морфологическая картина (рисунок 3А) в момент создания модели до медикаментозной поддержки сопоставима с данными группы контроля в аналогичный срок.

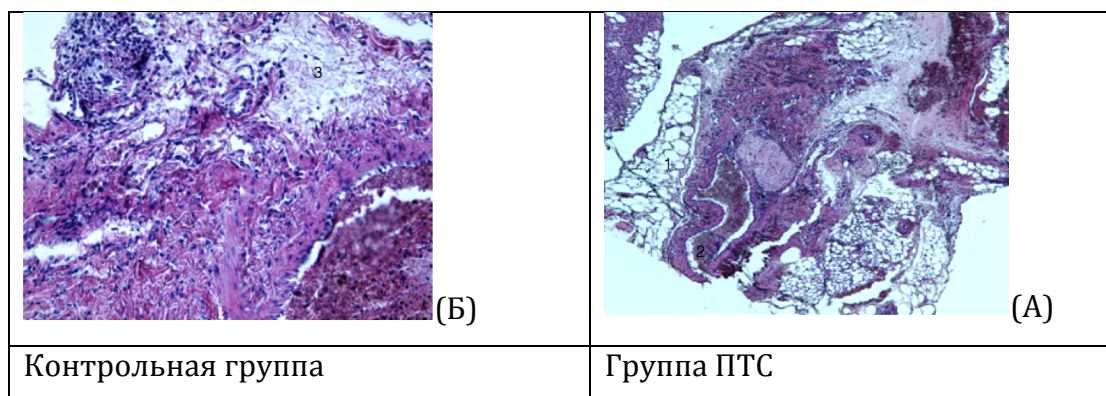


Рис. 3. Морфологическая картина венозной стенки в зоне тромбоза в контрольной и группе ПТС на момент постановки модели. А: 1 – интерстициальный периваскулярный отек; 2 – эритроцитарно-фибриновый тромб в просвете вены; Б: 3 – участок фибриноидного пропитывания с очагом фибриноидного некроза. Окраска гематоксилином и эозином, x100.

Выявлена периваскулярно расположенная очагово-диффузная воспалительная инфильтрация, с преобладанием мононуклеаров в экссудате. Стенка вены неравномерной толщины, с очаговой воспалительной инфильтрацией в адвентиции, в просвете гемолизированные и обесцвеченные эритроциты с фибриновой базофильной сетью, фибриноидные массы. В просвете вен видны организованные эритроцитарно-фибриновые тромбы преимущественно с частичной обтурацией просвета.

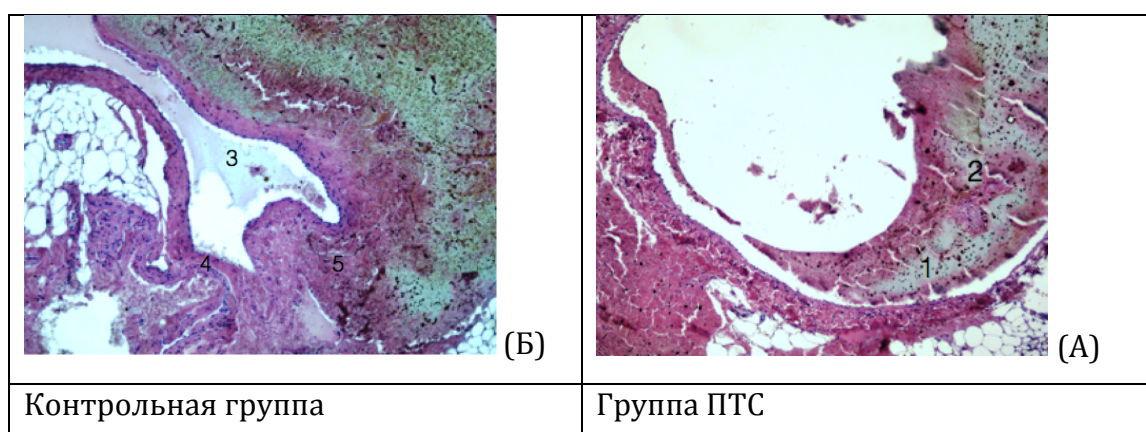


Рис. 4. Морфологическая картина венозной стенки в зоне тромбоза в контрольной и группе ПТС на 6 месяц от момента постановки модели. А: 1 – пристеночный тромб; 2 – очаги реваскуляризации; Б: 3 – фибринозно-эритроцитарный тромб с пристеночной организацией и реваскуляризацией; 4 – локальное отслоение базальной мембраны; 5 – воспалительная инфильтрация венозной стенки. Окраска гематоксилином и эозином, x100.

Морфологическая картина в группе L-NAME индуцированной ЭД (рисунок 5А) при световой микроскопии не отличается какими-либо патогномоничными изменениями, характерными для данной модели. Имеются поля массивного интерстициального отека, выраженные поля дезорганизации эндотелия, заключающиеся в слущивании эндотелия, увеличение межэндотелиальных промежутков, и очаги фибриноидного надухания и некроза, утолщение стенки и коллагенолизис. Эксудативное воспаление в данной группе носило преимущественно серозный или интерстициальный характер с распределением экссудата в адвентиции.

В результате коррекции L-NAME индуцированной патологии МОФФ (рисунок 6А) происходит восстановление целостности эндотелия, некоторые эндотелиоциты с картиной пролиферативной активности, периваскулярный

отеки и изменения соединительнотканного и коллагенового каркаса претерпевают ряд изменений, направленных на восстановление поврежденного волокнистого каркаса, поля ангиогенеза, преимущественно в адвентиции, полнокровие сосудов окружающей клетчатки.

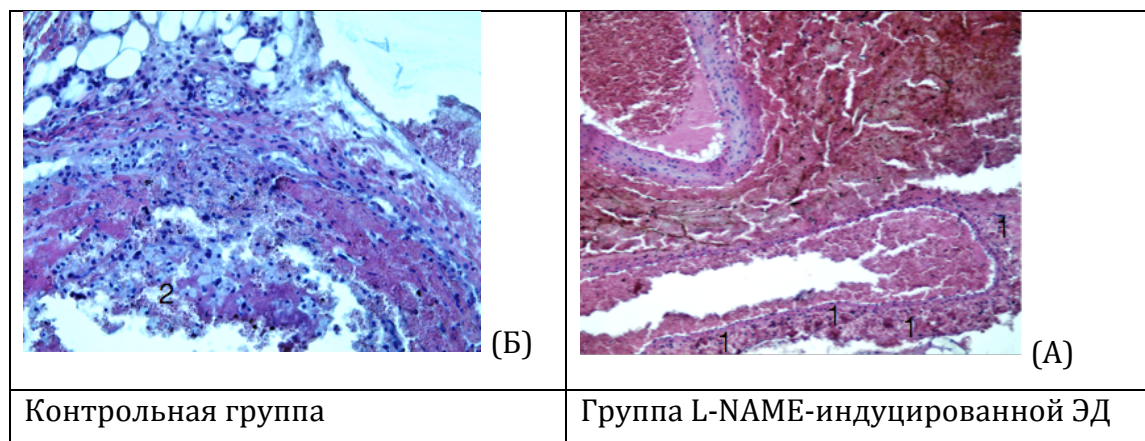


Рис. 5. Морфологическая картина венозной стенки в группах контроля и L-NAME-индуцированной ЭД на момент постановки модели А: 1 – очаги коллагенолизиса; Б: 2 – сформированный организованный пристеночный, частично обтурирующий просвет тромб с зернами гемосидерина и признаками резорбции. Окраска гематоксилином и эозином, x100. Окраска гематоксилином и эозином, x100.

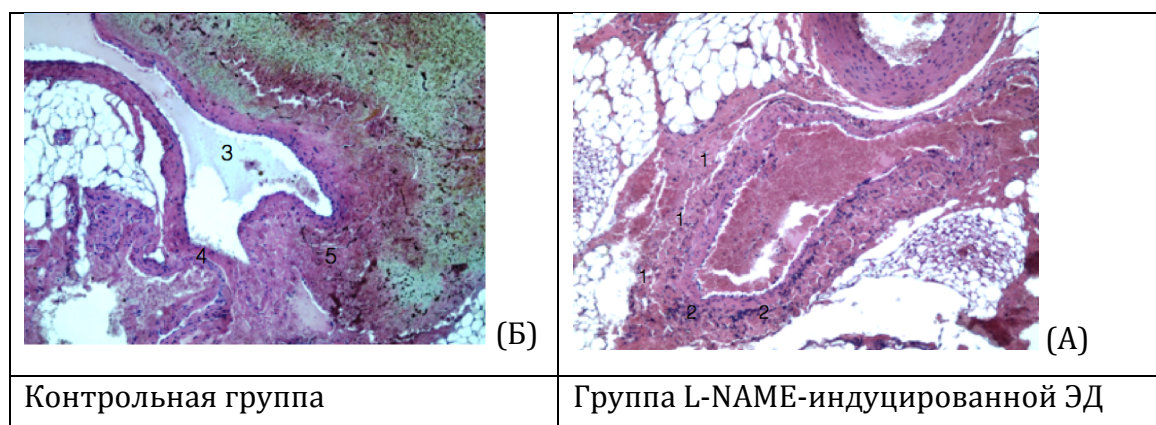


Рис. 6. Морфологическая картина венозной стенки в группах контроля и L-NAME-индуцированной ЭД на 6 месяц от момента постановки модели. А: 1 – частичное восстановление соединительно-тканного каркаса венозной стенки; 2 – поля ангиогенеза; Б: 3 – фибринозно-эритроцитарный тромб с пристеночной организацией и реваккуляризацией; 4 – локальное отслоение базальной мембраны; 5 – воспалительная инфильтрация венозной стенки. Окраска гематоксилином и эозином, x100. Окраска гематоксилином и эозином, x100.

Положительные эффекты МОФФ на морфологическую картину заключаются в снижении интерстициального отека, уменьшении лейкоцитарной инфильтрации, частичном регрессе склеротического процесса и восстановлении ГМК. Однако степень выраженности подобного структурного регресса варьирует среди всех групп животных. В группе контроля, где МОФФ не применяли, процессы репарации выражены в

наименьшей степени. В группе L-NAME-индуцированной ЭД структурные изменения венозной стенки были незначительными, однако и у животных этой группы было выявлено положительное действие МОФФ.

ВЫВОДЫ.

1. Используемые в работе экспериментальные модели характеризуются функциональными сдвигами в эндотелии, увеличением интенсивности процессов ПОЛ, органическими нарушениями сосудистой стенки, что позволяет говорить об их применимости для воспроизведения венозной эндотелиальной дисфункции *in vivo*.

2. Во всех экспериментальных группах выявлена интенсификация ПОЛ и компенсаторная активация ферментов АОС, что говорит о нарушении физиологического равновесия между данными процессами и формировании благоприятных условий для повреждения эндотелия и нарушения его функционального состояния, что проявляется дефицитом метаболитов оксида азота (II).

3. Во всех экспериментальных группах животных выявлены структурные изменения венозной стенки различной степени, что позволяет говорить о стойкости воспроизводимых нарушений функционального состояния эндотелия.

4. Микронизированная очищенная флавоноидная фракция диосмина обладает выраженным влиянием на эндотелий, проявляющемся в усилении секреции оксида азота (II), снижении образования продуктов перекисного окисления липидов и уменьшении дегенеративно-дисстрофических изменений венозной стенки, что открывает новые перспективы его применения.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Модели тромбоза глубоких вен, посттромботического синдрома и L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции могут применяться *in vivo* для изучения колебаний ключевых индикаторных метаболитов функционального состояния эндотелия.
2. Микронизированная очищенная флавоноидная фракция диосмина обладает противовоспалительным, антиоксидантным эффектами, способствует коррекции нарушений функционального состояния эндотелия.
3. Применение микронизированной очищенной флавоноидной фракции диосмина следует проводить в течение 6 месяцев, с целью максимально эффективной коррекции нарушений функционального состояния эндотелия и процессов перекисного окисления липидов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

А. В изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Новиков А.Н. Коррекция L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции очищенной микронизированной флавоноидной фракцией диосмина // Врач-аспирант. – 2014. – Т.62, №1.2. – С. 283-287.
2. Новиков А.Н., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Пшенников А.С. Моделирование и коррекция венозной эндотелиальной дисфункции в эксперименте // Новости хирургии. – 2014. – Т.22, №2. – С. 150-154.
3. Новиков А.Н., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Мнихович М.В. Структурно-функциональная оценка венозной стенки при моделировании венозного тромбоза и применении микронизированной очищенной фракции флавоноидов // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2014.- Т. 50, вып. 2. – С. 82-85.
4. Новиков А.Н., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Мнихович М.В., Пшенников А.С., Жеребятнева С.Р. Эндотелиотропные эффекты микронизированной очищенной фракции флавоноидов при различных

экспериментальных моделях венозной эндотелиальной дисфункции // Флебология. – 2014.- Т. 8., №4. – С. 25-32.

5. Новиков А.Н., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Пшенников А.С. Варианты экспериментального моделирования венозной эндотелиальной дисфункции: современное состояние проблемы // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П.Павлова. – 2014.- Выпуск 4. – С. 143-147.

Б. В других изданиях:

6. Новиков А.Н. Возможные механизмы эндотелиотропных эффектов микронизированной очищенной фракции флавоноидов // Наука молодых. – 2013. – №3. – С. 86-91.

7. Новиков А.Н. Применение препарата Детралекс® для коррекции эндотелиальной дисфункции при посттромбофлебитическом синдроме в эксперименте // Санкт-Петербургские научные чтения – 2013: сборник тезисов 5 международного молодежного медицинского конгресса.– СПб. – 2013. – С. 266.

8. Новиков А.Н. Использование очищенной микронизированной флавоноидной фракции диосмина для коррекции эндотелиальной дисфункции на модели L-NAME-индуцированного дефицита оксида азота // Студенческая медицинская наука XXI века: сборник научных трудов по материалам XIII Международной студенческой конференции. – Витебск: ВГМУ. – 2013. – С.156-157.

9. Новиков А.Н. Экспериментальный венозный тромбоз как модель состояния эндотелиальной дисфункции и возможности ее использования в экспериментальной фармакологии // Экспериментальная и клиническая фармакология: научные чтения: сборник тезисов по материалам Всероссийской научной конференции, посвященной 90-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина. – Рязань: РИО РязГМУ. – 2013. – С.65-68.

10. Новиков А.Н., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Мнихович М.В., Пшенников А.С. Моделировании тромбоза глубоких вен и коррекция эндотелиальной дисфункции микронизированной очищенной фракцией флавоноидов // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические

исследования: сборник научных трудов по материалам VIII Международной научно – практической конференции, посвященной памяти профессора А.П. Солодкова. – Витебск: ВГМУ. – 2014. – С.80-82.

11. Новиков А.Н., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Пшенников А.С. Использование очищенной микронизированной флавоноидной фракции диосмина для коррекции эндотелиальной дисфункции при моделировании экспериментального венозного тромбоза // Флебология. – 2014.- Т.8, №2.- С. 86.- (Содерж. журн.: Материалы X юбилейной научно – практической конференции ассоциации флебологов России).

12. Новиков А.Н., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Пшенников А.С. Морфо-функциональная оценка эндотелия при различных моделях венозной эндотелиальной дисфункции // Сердечно-сосудистые заболевания. – 2014. – Т. 15, № 3. Приложение: Материалы XVIII Ежегодной сессии научного центра сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева с Всероссийской конференцией молодых ученых. – С. 144.

13. Новиков А.Н., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Пшенников А.С. Экспериментальное моделирование и коррекция эндотелиальной дисфункции при различных заболеваниях вен нижних конечностей // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2014.- Т. 20, №2. Приложение: Материалы XXIX Международной конференции Российского общества ангиологов и сосудистых хирургов «Новые направления и отдаленные результаты открытых и эндоваскулярных вмешательств в лечении сосудистых больных». – С. 157 – 158.

14. Novikov A.N., Kalinin R.E., Suchkov I.A., Mzhavanadze N.D., Pshennikov A.S. Experimental Modelling of Venous Endothelial Dysfunction and its Correction with Micronized Purified Fraction of Flavonoids // The European Journal of Vascular and Endovascular Surgery. – 2014. – Vol. 47, №6. – P. 698.

15. Novikov A.N., Kalinin R.E., Suchkov I.A., Mzhavanadze N.D., Pshennikov A.S. Application of micronized purified fraction of flavonoids in different experimental models of venous endothelial dysfunction // Scientific

programme and book of abstracts. 15th Meeting of the European Venous Forum, Paris, France, 26-28 June 2014. – P. 26.

Научное издание

Новиков Алексей Николаевич

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЕНОЗНОЙ
ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ И ЕЕ КОРРЕКЦИЯ
ПРЕПАРАТОМ МИКРОНИЗИРОВАННОЙ ОЧИЩЕННОЙ
ФЛАВОНОИДНОЙ ФРАКЦИИ ДИОСМИНА**

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Бумага офсетная. Гарнитура Times. Печать офсетная.

Тираж 100 экз. Заказ № .

Отпечатано в РИО УМУ ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России

390026, г. Рязань, ул. Шевченко, д. 34/2