

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИКО-ХИРУРГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ИМЕНИ Н.И.ПИРОГОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИИ**

На правах рукописи

Никитина Анна Михайловна

**ЭНДОТЕЛИАЛЬНАЯ ДИСФУНКЦИЯ В РАЗВИТИИ
ВАРИКОЗНОЙ БОЛЕЗНИ ВЕН НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ И
ВОЗМОЖНОСТИ ЕЕ КОРРЕКЦИИ**

14.01.26 - сердечно-сосудистая хирургия;

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент Гудымович В.Г.

Москва – 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВВЕДЕНИЕ

ГЛАВА I. Эндотелиальная дисфункция: место в современном представлении об этиологии варикозной трансформации и возможности ее коррекции (обзор литературы)

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Клиническая характеристика больных

2.2. Характеристика методов исследования

2.1. Лабораторные исследования

2.2.2. Ультразвуковые методы исследования

2.2.3. Изучение эндотелиальной дисфункции методом проточной иммуноцитометрии

2.2.4. Морфологические методы исследования

2.2.5. Методы статистического анализа

ГЛАВА III. ДИАГНОСТИКА ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ ВАРИКОЗНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ВЕН НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

3.1. Участие форменных элементов крови в повреждении сосудистой стенки вен, изменения в системе гемостаза у пациентов с варикозной болезнью

3.2. Результаты цитоморфологического исследования изменений эндотелия при варикозной трансформации вен

3.3. Сравнительная характеристика маркеров дисфункции эндотелия в зависимости от места забора крови

3.4. Иммуногистохимический анализ функциональной активности эндотелия варикозно расширенных вен нижних конечностей

ГЛАВА IV. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ЛЕЧЕНИЯ НА ДИНАМИКУ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЭНДОТЕЛИЯ

ГЛАВА V. ДИСФУНКЦИЯ ЭНДОТЕЛИЯ И ОСОБЕННОСТИ ЕЕ КОРРЕКЦИИ ПРИ РЕЦИДИВАХ ВАРИКОЗНОЙ БОЛЕЗНИ

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ВЫВОДЫ

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Список сокращений

- БАВ - биологически активных веществ
- ВБВНК - варикозная болезнь вен нижних конечностей
- ВБ - варикозная болезнь
- ВРВ - варикозное расширение вен
- РВРВ – рецидив варикозного расширения вен
- УЗДГ - ультразвуковая доплерография
- УЗАС - ультразвуковое сканирование
- ФБД - фосфатный буфер Дульбекко
- ХВН – хроническая венозная недостаточность
- ХЗВ – хронические заболевания вен
- ЦЭК - циркулирующие эндотелиальные клетки
- ЭД – эндотелиальная дисфункция
- ЭК – эндотелиальные клетки
- ELAM-1 - эндотелиально-лейкоцитарная молекула адгезии
- eNOS - эндотелиальная синтаза оксида азота
- ICAM-1 – InterCellular Adhesion Molecule–1 (молекула межклеточной адгезии–1)
- ICAM-2 - Intercellular adhesion molecule 2 (молекула межклеточной адгезии–2)
- NO - монооксид азота
- PECAM-1 – Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (молекула адгезии тромбоцитов-эндотелиальных клеток-1)
- sVCAM-1 (soluble vascular cellular molecule) – молекула адгезии сосудистого эндотелия 1 типа
- t-РА-тканевой активатор плазминогена

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Хроническая венозная недостаточность (ХВН) нижних конечностей является одним из самых распространенных заболеваний современности. Варикозная болезнь в настоящее время занимает одно из ведущих мест среди сердечно-сосудистых заболеваний и диагностируется более чем у 20% мужчин и 40% женщин (В.С. Савельев с соавт., 2001; А.В.Покровский с соавт., 2006; Ю.Л. Шевченко, 2013; J.J. Bergan, 2007).

Согласно обобщенным данным эпидемиологических исследований, этим заболеванием в разных странах страдают 35–60% трудоспособного населения (А.И. Кириенко, И.А. Золотухин, К.М. Морозов, 2010; F.G. Fowkes, 2001).

В России различные формы ХВН наблюдаются у 40 млн. человек, а их распространенность характеризуется не только ростом числа заболевших, но и тенденцией к омоложению (Г.Д. Константинова с соавт., 2000; В.Д. Люлькин с соавт., 2002, А.И. Шиманко с соавт., 2004; V.Boursier, P.Priollet, 2002). Немаловажным фактором является и то, что подавляющее большинство пациентов молодого возраста отказывается от оперативного лечения, опасаясь на длительный срок стать нетрудоспособными.

Прогрессирование варикозной болезни таит в себе не только косметические неудобства, но и изменение качества жизни больных вследствие нарастания отеков, болей, развития или усугубления трофических расстройств. Предоставленная естественному течению варикозная болезнь почти неминуемо осложняется тромбофлебитами, рожистыми воспалениями, трофическими изменениями кожи и мягких тканей голени вплоть до развития трофических язв (А.Н.Веденский, 1983; А.И. Кириенко, 2001, В.В.Кунгурцев с соавт., 2008, В.С. Савельев с соавт., 2001, F.G. Fowkes, 2001, A.N. Nicolaides, 2000).

Именно поэтому флебология, как одно из направлений сердечно-сосудистой хирургии, на протяжении последних десятилетий претерпела существенные изменения. Хирургические технологии достигли практически вершин, объединяя в себе основную концепцию – нормализацию флебогемодинамики в том или ином сегменте в сочетании с высокой степенью косметичности любого оперативного вмешательства. Такой двунаправленный подход к хирургическому лечению патологии вен нижних конечностей привел к росту хирургической активности с одной стороны и дифференцированному подходу с другой. При этом частота рецидивов варикозной болезни не только не уменьшилась, а в большинстве случаев возросла (В.Ю. Богачев, 2008; Ю.М. Стойко, 2005). При существующих видах хирургического лечения риск рецидива заболевания достигает 50% и более на каждые пять лет после операции (Г.Д. Константинова, 2000, А.В. Покровский, 2004; А.М. Шулутко, 2003; M.R.Boisseau, 2004).

В странах с развитой системой медицинской помощи суммарные затраты на лечение хронических заболеваний вен составляют от 1 до 3 % от общего бюджета здравоохранения (A.Jawien, 2003; C.J.Moffat, 2004; O.Nelzen, 2007). В силу массового характера хронические заболевания вен самым серьезным образом влияют как на состояние отдельных индивидуумов, так и на здоровье общества в целом. Важными аспектами социального значения заболевания являются потери рабочего времени, инвалидность, временная нетрудоспособность, высокие затраты на лечение (А.В.Покровский, С.В. Сапелкин, 2003, Б.Н. Жуков с соавт., 2009; В.Campbell, 2002; J.J.Bergan, 2007).

Современное развитие направлений медицины, связанных с лечением заболеваний системы кровообращения, позволило пересмотреть ряд положений этиологии и патогенеза, которые напрямую могут оказать значимое влияние на диагностику и лечебную тактику и в том числе концепция эндотелиальной дисфункции (ЭД) (Ю.Л. Шевченко, Ю.М.

Стойко, В.Г. Гудымович, 2008; П. Г. Швальб с соавт., 2011; Н.Н. Петрищев, 2001; G. Ciuffetti, 1999, J.J. Bergan, 2007, С. Michiels, 2002). Стройная система лечения варикозной болезни невозможна без понимания сути патологических изменений вен, происходящих на разных уровнях и при различных стадиях заболевания. В этой связи оценка состояния эндотелия может быть ключом в понимании ряда патологических процессов, их оценке и прогнозировании характера и степени патологических изменений. Это привело к пониманию, что эндотелий регулирует не только периферический кровоток, но и другие важные функции. Именно поэтому в последнее время объединяющей стала концепция об эндотелии как о мишени для профилактики и лечения патологических процессов, приводящих или реализующих сердечно-сосудистые заболевания. Это и побудило подвергнуть специальному исследованию вышеперечисленные аспекты.

Цель исследования – улучшить результаты лечения пациентов с варикозной болезнью вен нижних конечностей с учетом особенностей функционального состояния эндотелия и возможностей хирургической и флеботропной коррекции эндотелиальной дисфункции.

Задачи исследования:

1. Уточнить характер изменений функционального состояния эндотелия на основании определения клеточных (ЦЭК, лейкоцитарный пул) и биохимических (эндотелин-1, Р-, Е-селектины, VCAM-1) маркеров ЭД при ВБВНК. Оценить информативность этих показателей в качестве диагностических и прогностических тестов ЭД.
2. Изучить особенности цитоморфологической картины эндотелия вен нижних конечностей при ВБВНК.
3. Определить динамику показателей функциональной активности венозного эндотелия после различных видов хирургической коррекции.

4. Изучить влияние комплексной консервативной терапии на динамику маркеров эндотелиальной дисфункции в лечебной программе варикозной болезни.

5. Оценить особенности клинического течения различных форм рецидивов ВБВНК с учетом показателей ЭД и разработать рекомендации по их профилактике и лечению.

Научная новизна. Впервые на основании анализа содержания клеточных элементов в различных сегментах венозной системы проведена оценка значения лейкоцитарного звена в развитии ЭД при прогрессировании патологической трансформации вен.

Изучены особенности цитоморфологического строения эндотелия вен при варикозной болезни. На основании иммуногистохимических исследований показано наличие экспрессии VCAM-1 на клеточном эндотелии вен при ВБВНК.

Определена концентрация основных биохимических (эндотелина-1, молекул адгезии Р-, Е-селектина, VCAM -1) и клеточных маркеров (ЦЭК) ЭД в пробах, полученных как из варикозно измененных, так и неизмененных вен.

Изучена динамика этих маркеров в до- и послеоперационном периодах после различных вариантов хирургического лечения, а также на фоне консервативной терапии.

На основании анализа динамики маркеров ЭД показана роль флеботропной терапии в профилактике и лечении рецидива ВБВНК.

Практическая значимость. Проведенное исследование позволило уточнить роль ЭД в развитии ВБВНК, оценить гемореологические свойства крови при ВБВНК, определить динамику показателей ЭД и их прогностическую значимость на фоне приема флебопротекторов в до- и послеоперационном периодах при ВБВНК. В исследовании проведено

комплексное изучение показателей функциональной активности эндотелия у больных ВБВНК при различных видах оперативного вмешательства и консервативной терапии. Уточнены механизмы развития ХВН и патогенетически обосновано применение флеботропных препаратов при ВБВНК. Обоснована необходимость применения флебопротекторов в послеоперационном периоде. Показана зависимость динамики маркеров ЭД от характера и травматичности оперативного вмешательства.

Положения, выносимые на защиту.

1. Эндотелиальная дисфункция играет существенную роль в патогенезе ВБВНК. Морфофункциональные изменения эндотелиальной выстилки сосудов могут иметь значение в развитии варикозной трансформации вен, прогрессировании заболевания и развитии его рецидивов.

2. Изменение маркеров ЭД определяет функциональное состояние эндотелия при ВБВНК, зависит от характера оперативных вмешательств на венах нижних конечностей и эффективности флеботропной терапии.

3. Развитие рецидивов ВБВНК может быть опосредованно связано с прогрессированием ЭД и требует определения показателей биохимических маркеров, с учетом проведения профилактической медикаментозной коррекции ЭД.

Реализация результатов исследования. Основные положения диссертации внедрены в учебный процесс, используются в лекциях и практических занятиях на кафедре грудной и сердечнососудистой хирургии с курсом рентгенэндоваскулярной хирургии, в Институте усовершенствования врачей ФГБУ «НМХЦ им. Н.И.Пирогова» Министерства здравоохранения России. Основные результаты работы внедрены в практику Национального центра грудной и сердечнососудистой хирургии им. Св. Георгия ФГБУ «Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения России.

Апробация диссертации

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на конференциях: VI международной практической конференции «Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования» (Витебск, 2010), конференции «Пироговские чтения в Коломне» (Коломна, 2010), VI Санкт-Петербургском венозном форуме (Санкт-Петербург, 2013).

Апробация работы состоялась на межкафедральном заседании института усовершенствования врачей ФГБУ «Национальный медико-хирургический Центр им. Н.И. Пирогова» Минздравсоцразвития России (протокол № 12 от « 17» июля 2014г.).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, одна работа в виде отдельной главы в монографии «Лазерная хирургия варикозной болезни», опубликованная в 2010 г.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 116 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, иллюстрирована 24 рисунками и 9 таблицами. Библиографический указатель включает 70 работ на русском и 168 на иностранных языках.

Глава 1. Эндотелиальная дисфункция: место в современном представлении об этиологии варикозной трансформации и возможности ее коррекции (обзор литературы).

Хроническая венозная недостаточность при варикозной болезни обусловлена нарушением оттока из венозного русла нижних конечностей вследствие патологии механизмов, обеспечивающих его в ортостазе [11,43,56,58,61,76,82, 129,144]. Причиной этих нарушений становится не только гидростатическое давление в венозных магистралах; имеет значение сочетание статического фактора, флебогипертензии и направленности кровотока в различные фазы работы мышечной помпы нижних конечностей, которая организована таким образом, что даже минимальные движения в голеностопном суставе, приводят к выкачиванию крови и снижению венозного давления. Развивается клапанная недостаточность, появляется рефлюкс крови и давление в венах при ходьбе снижается незначительно или, напротив, возрастает. При несостоятельности клапанов в перфорантных венах высокое давление, генерируемое в мышечных венозных синусах и глубокой венозной системе, передается на поверхностные вены и микроциркуляторное русло кожи[4,11,37,43, 75,92,95]. Таким образом, основной гемодинамической характеристикой ХЗВ служит динамическая флебогипертензия [111]. При этом основную роль в развитии хронической венозной недостаточности играет не гидростатическое или гидродинамическое давление, а нарушенный кровоток[1,2,4,43,58,60,75,76,77,120].

Причины ослабления стромальных элементов венозной стенки и самой клапанной недостаточности окончательно не выяснены. Здесь надо отметить, что в основе повреждения клапанного аппарата при ВБНК может лежать врожденная (гипоплазия и агенезия глубоких вен) или приобретенная (травма, ограниченный тромбоз) органическая клапанная недостаточность поверхностных или глубоких вен [69,92]. Патоморфологические изменения

клапанов вен при ХЗВ многообразны [15,43,111]. При микроскопическом исследовании обнаруживают перерастяжение, расщепление, надрывы, истончение и слипание их створок. У пациентов с ВБВНК обнаружено уменьшение количества клапанов на единицу длины вены [113,141,150,151]. В тоже время, большой интерес вызывает непосредственный механизм повреждения венозных клапанов, объяснить который лишь воздействием высокого давления невозможно. Венозные клапаны достаточно прочная анатомическая структура, которая выдерживает давление в 150-200 мм рт. ст., а динамическая венозная гипертензия редко превышает 85-90 мм рт. ст. [11,52,139]. Объяснение кроется в молекулярных и клеточных механизмах повреждения стенки вены и клапанов, изученных в последние годы - появляется много данных, указывающих на то, что важную роль в патогенезе ВБВНК играет воспаление [1,4,7,64,75,81]. Экспериментальные данные и гистологические «находки» позволили сделать вывод о том, что длительное повышение венозного давления только индуцирует клеточные воспалительные реакции, в результате которых и происходит патологическое ремоделирование венозной стенки и клапанов [4,77,91,94,152,153,158,160]. Это, в свою очередь, влияет на межклеточное взаимодействие между эндотелиальным и мышечным слоями венозной стенки, по-видимому, в течение времени приводя к глубоким дистрофическим изменениям гладкомышечного слоя [108,128,142].

Не все механизмы развития воспалительной реакции в венозной стенке и клапанах достаточно изучены. Длительный застой венозной крови приводит к растяжению стенки сосуда и деформации створок клапанов. Возникающий ретроградный кровоток снижает тангенциальное напряжение. Вот почему, даже в отсутствии рефлюкса, венозный стаз вызывает формирование на поверхности эндотелия зон с низкой или нулевой силой сдвига, что в свою очередь приводит к структурным изменениям венозной стенки. Все эти события инициируют воспалительные реакции с участием

лейкоцитов и эндотелиального пласта венозной стенки, с развитием ЭД при ВРВНК.

Предваряя описание этиопатогенеза ЭД, кратко остановимся на анатомических и функциональных характеристиках самого эндотелия.

История изучения эндотелия берет свое начало в XVII веке. Сам термин «эндотелий», или «ложный эпителий» был предложен швейцарским патоморфологом Вильгельмом Гисом (W.His, 1865) [116], который под «эндотелием» подразумевал эпителий, развившийся из среднего зародышевого листка. Осмысленное изучение функции эндотелия фактически берет начало с работ австралийского патолога Г. Флори (1945), послуживших основой сегодняшних представлений об эндотелии — ткани, ответственной за сопряжение множества процессов в системе кровообращения [9, 25].

В настоящее время существующие представления об эндотелии как достаточно функционально активной ткани кардинальным образом отличаются от тех, что имелись ранее. Исследования последних 10-15 лет существенно изменили представление о роли эндотелия сосудов в общем гомеостазе.

Эндотелий представляет собой однослойный пласт клеток, выстилающий все элементы сосудистого русла изнутри [22]. Одной из наиболее ярких отличительных черт эндотелиальной ткани является его морфологическая гетерогенность. Эндотелий представляющий собой динамическую систему, выполняющую целый ряд функций: играет ключевую роль в поддержании гомеостатического баланса «кровь-ткани», включая активный транспорт метаболитических субстанций между кровью и тканями; образует относительный барьер для макромолекул крови; синтезирует медиаторы, которые регулируют реакцию между сосудистой стенкой и кровью и обеспечивают гемостатический гомеостаз; обеспечивает фагоцитарную функцию-удаление из крови высокоактивных биологических веществ, активированных факторов системы гемостаза, комплемента и др.;

выполняет антитромбогенные свойства; участвует в регуляции тонуса сосудов; инициирует ремонтные механизмы клеточной миграции, пролиферации и тромболизиса; участвует в иммунных реакциях [25].

Под ЭД понимают нарушение баланса между продукцией вазодилатирующих, ангиопротективных, ангиопролиферативных факторов, с одной стороны, и вазоконстрикторных, протромботических, пролиферативных продуцентов эндотелия- с другой, вызванное действием различных патогенных факторов [62]. Причиной эндотелиальной дисфункции могут быть различные факторы: ишемия/гипоксия тканей, возрастные изменения, свободнорадикальное повреждение, дислипидемия (гиперхолестеринемия), действие цитокинов, гипергомоцистеинемия, гипергликемия, гипертензия, эндогенные и экзогенные интоксикации [25].

Точные механизмы развития ЭД при ВЗВНК остаются недостаточно изученными [26]. Эндотелий артерий, капилляров и вен различается не только по форме клеток, но и по метаболической активности. Экспрессия тканевого активатора плазминогена t-PA ограничена приблизительно 3% васкулярного эндотелия, в эндотелии вен образуется меньше простациклина, чем в эндотелии артерий. Активность эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) наиболее выражена в эндотелии артериальных сосудов и минимальна в эндотелии капилляров и венозных сосудов. В то же время, молекулы адгезии лейкоцитов (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 и другие) выявляются преимущественно в эндотелии венул и вен и практически не экспрессируются на эндотелии капилляров и артерий. В отличие от артериальных, в венозных сосудах низкий кровоток, в крови содержится мало кислорода и много углекислого газа, тонус венозной стенки низкий, и имеются клапаны. В обычных условиях нормально функционирующие вены потребляют в 2 раза больше кислорода, чем артерии. При ВБ данная потребность увеличивается в 3 раза [130].

При нарушении регионального кровотока напряжение кислорода в венозной крови может снижаться до очень низкого уровня, приводя к гипоксии эндотелия. Соответственно усиливается продукция кислородных радикалов, нарушается трансмембранный обмен электролитов, изменяется электрический потенциал сосудистой стенки, ее проницаемость. Нарушение работы Na^+/K^+ - насоса ведет к увеличению содержания натрия внутри клетки с развитием внутриклеточного отека. Высвобождение кальция из депо изменяет активность Ca^{2+} зависимых ферментов, потенцирует окислительные процессы в митохондриях, запускает механизмы клеточной смерти. Все это приводит к функциональной перестройке эндотелия, которая при воздействии патологических факторов имеет несколько стадий:

I стадия – повышенная синтетическая активность клеток эндотелия; эндотелий работает как «биосинтетическая машина»;

II стадия – нарушение сбалансированной секреции факторов, регулирующих тонус сосудов, систему гемостаза, процессы межклеточного взаимодействия (на этой стадии нарушается естественная барьерная функция эндотелия, повышается его проницаемость для различных компонентов плазмы);

III стадия – истощение эндотелия, сопровождающееся гибелью клеток и замедленными процессами его регенерации [42].

Следует отметить, что в механизмах ЭД роль оксида азота (NO) является ключевой. Помимо влияния на сосудистый тонус, обеспечивая вазодилатацию, NO модулирует освобождение вазоактивных медиаторов, ингибирует адгезию лейкоцитов, ингибирует адгезию тромбоцитов к эндотелию, мало влияя на их агрегацию. Однако NO-продуцирующая функция эндотелия оказывается наиболее ранимой, вследствие высокой нестабильности молекулы NO, являющейся по своей природе свободным радикалом. Синтез монооксида азота может, как увеличиваться, так и уменьшаться. Увеличение синтеза NO происходит при острой гипоксии, снижение происходит при длительном и тяжелом стрессе и соответствует III

стадии функциональной перестройке эндотелия – истощение. Нарушение синтеза NO и развивающееся вследствие этого снижение его биологической активности, возможно, является одной из причин прогрессирования венозной недостаточности [38]. Таким образом, снижение концентрации оксида азота приводит к вазоконстрикции стенок вен, стимуляции агрегации тромбоцитов, адгезии тромбоцитов и лейкоцитов.

В норме активное клеточное взаимодействие лейкоцитов с эндотелиальными клетками происходит в специализированном участке сосудистого русла, а именно в посткапиллярных венулах [86]. Вся последовательность передвижения лейкоцитов из кровеносного русла в субэндотелиальное пространство обусловлена постепенным вовлечением в каскадный механизм специфических молекул клеточной адгезии и их активаторов или хемоаттрактантов. Бактерии и другие воспалительные стимулы индуцируют резидентные макрофаги к секреции ряда цитокинов, которые стимулируют синтез и экспрессию новых белков на люминальной поверхности эндотелиальных клеток. При этом к активированным эндотелиоцитам фиксируется в 20-40 раз больше лейкоцитов, чем к клеткам, не подвергшимся цитокиновому воздействию [86, 127].

Выделяют три класса молекул адгезии, которые обеспечивают взаимодействие лейкоцитов с эндотелием: селектины (P,E,L), молекулы адгезии семейства иммуноглобулинов и интергины. На эндотелии представлены P- и E-селектины, которые связываются с сиалированными гликопротеинами (Sialyl-LewisX) мембраны лейкоцитов. L-селектин, расположенный исключительно на лейкоцитах, связывается с гликопротеинами мембраны эндотелия (GluCAM-1 и CD34).

Другая группа эндотелиальных молекул адгезии - межклеточная молекула адгезии-1(ICAM-1) и сосудисто-клеточная молекула адгезии (VCAM-1)- относятся к суперсемейству иммуноглобулинов и связываются с интегринами мембраны лейкоцитов. Основными рецепторами ICAM-1 на лейкоцитах являются 2-интегрины: антиген функции лейкоцитов-1(LFA-1,

[CD11a/CD18]) и MAC-1 (CD11b/CD18). Главным рецептором VCAM -1 является 1-интегрин VLA-4.

В нормальных условиях на эндотелии представлена в небольшом количестве конститутивная молекула адгезии ICAM-2, посредством которой происходит формирование маргинального пула лейкоцитов желудочно-кишечного тракта, легких и других органах. Стимуляция эндотелия или его повреждение приводят к дополнительной экспрессии адгезивных молекул - селектинов и ICAM-1, VCAM-1, которые обеспечивают различные стадии адгезии лейкоцитов к стенке сосуда.

Первым этапом является обратимое «привязывание» и «катание» лейкоцитов на эндотелии, опосредованное веществами группы селектина эндотелиальных клеток, такими как Е-селектин и Р-селектин, и их лигандами на лейкоцитах. Под действием Р- и Е-селектинов осуществляется начало лейкоциты движутся вдоль сосудистой стенки со скоростью менее 50 мкм/с, лишь иногда касаясь эндотелия, или "прокатываются" по его поверхности. Последний процесс получил название роллинга (от английского rolling). Причем Р-селектин обеспечивает начальную стадию, быстрый роллинг лейкоцитов, скорость которого начинает замедляться при экспрессии Е-селектина.

Второй этап - стойкая адгезия лейкоцитов на эндотелии, опосредуется молекулами адгезии ICAM-1 (межклеточная молекула-1 адгезии) и VCAM-1 (сосудисто-клеточная молекула-1адгезии) на эндотелиальных клетках, и их соответствующими лигандами – антигенами LFA-1(лейкоцитарный функциосвязанный антиген-1) и VFA-4 (очень поздний активированный антиген-4) на лейкоцитах. В результате этого взаимодействия лейкоциты активируются, о чем свидетельствует смена их формы с округлой на распластанную; часть из них агрегирует. В дальнейшем прикрепленные клетки мигрируют через межклеточные соединения эндотелия и передвигаются между эндотелием и базальной мембраной [98,99]. Несмотря на то, что в большинстве случаев эндотелиальный слой в процессе

трансмиграции не повреждается лейкоцитами, в некоторых экспериментах наблюдалось значительное нарушение целостности монослоя эндотелиоцитов или деструкция межклеточных контактов при соотношении лейкоцит: эндотелиальная клетка более 10:1 [72,99].

Интересным является факт селективной миграции клеток крови через эндотелий. Около 50-70% нейтрофилов преимущественно передвигаются в субэндотелиальное пространство в местах контактов трех эндотелиальных клеток. Моноциты предпочтительно трансмигрируют через соединения, образованные двумя клетками [147]. После короткого периода нахождения между эндотелием и базальной мембраной лейкоциты передвигаются в субэндотелиальное пространство, полиморфонуклеары активизируются и начинают высвобождать протеазы и свободные радикалы, приводящие к деградации (гидролизу) нормальных коллагеновых волокон венозной стенки. Развивается асептическое воспаление стенки сосуда, которое в условиях венозной недостаточности носит хронический характер.

Воспалительные или другие патологические процессы в венозном кровотоке активируют эндотелиальные клетки. Наблюдается набухание эндотелия, которое может быть обусловлено повреждением мембран клеток как результат развития внутрисосудистой гипертензии и гипоксии.

При повреждении венозной стенки наблюдается быстрое высвобождение вазоконстриктора эндотелина-1. Эндотелин-1 также увеличивает пролиферацию гладкомышечных клеток.

Гистологические исследования стенок вен позволили выявить при варикозной их трансформации очаговую дезорганизацию интимальной оболочки, набухание соединительной ткани, денудацию клеток эндотелия, преобладание склеротических процессов. В створках клапанов происходит фиброэластоз, склероз и гиалиноз. В средней оболочке обнаруживается гипертрофия мышечных клеток, атрофия эластических волокон, развитие диффузного склероза. Указанные изменения приводят к уменьшению

сократительной способности венозной стенки, что вызывает расширение вены и ее деформацию[13].

При электронной микроскопии выявляются полиморфные изменения, в большей степени затрагивающие створки венозных клапанов. Наблюдается ряд характерных проявлений в виде различной степени выраженности дистрофических расстройств. В эндотелиоцитах створок венозных клапанов появляются локальные нарушения целостности плазматической мембраны, участки отека цитоплазмы, деформация органелл, десквамация цитоплазматических отростков эндотелиоцитов. В некоторых участках поверхность клапана вообще лишена эндотелиального пласта и представлена «обнаженной» базальной мембраной с остатками десквамированного эпителия. Под эндотелиальным слоем вблизи базальной мембраны среди микрофибрилляторного эластина и пучков коллагеновых волокон располагаются немногочисленные гладкомышечные клетки. Их цитоплазма просветлена, в ней резко снижено количество нерегулярно расположенных миофиламентов. Как в центральных, так и в периферических отделах цитоплазмы обнаруживаются цистерны зернистой эндоплазматической сети и другие клеточные органеллы.

Таким образом, процессы дисфункции и дисрегуляции эндотелия, повреждения структуры венозной стенки продуктами метаболизма активированных лейкоцитов, гипертрофии венозной стенки в результате фенотипической модуляции гладкомышечных клеток являются основными звеньями патогенеза варикозной трансформации вен [75,90,100,121,123,130,137,144,151,152,154,159,162].

Рецидив варикозного расширения вен (РВБВ) нижних конечностей оказывается достаточно «удачной» моделью, отчасти объясняющей развитие варикозной болезни. Чем это обусловлено. Если отбросить «истинные», т.е. связанные с погрешностями выполнения операций рецидивы, то другая группа рецидивов – «ложные» - всецело связана с прогрессированием данного заболевания. Именно эта группа может являться уникальной и

наиболее точной демонстрацией основных процессов на уровне как макро-, так и микроциркуляции, происходящих при варикозной трансформации поверхностной венозной системы нижних конечностей[36,40,54]. Существует гипотеза, что РВРВ нижних конечностей может возникнуть вследствие дальнейшего прогрессирования заболевания и при отсутствии погрешностей в оперативной технике. В частности, А.Н. Косинец и В.И. Петухов (2002) считают, что все послеоперационные рецидивы обусловлены прогрессирующим течением заболевания [29].

Патогенез таких рецидивов во многом еще не изучен. Не до конца остаются выясненными методы профилактики РВРВ нижних конечностей. Основную роль в нем, вероятно, играют сохраняющиеся нарушения физиологических взаимоотношений между структурными элементами венозной стенки, возникающие под действием гипоксии, ишемии, расстройств венозной гемодинамики [43,55]. Несомненным остается факт участия пула лейкоцитов в запуске и поддержании каскада воспалительных реакций.

Косвенным свидетельством участия лейкоцитов в патогенезе ВБВНК было обнаружение при гистологическом исследовании во фрагментах варикозных вен инфильтратов, состоящих из моноцитов и макрофагов. Данный феномен наблюдался у всех больных с варикозной болезнью и отсутствовал у здоровых людей. При микроскопическом исследовании было обнаружено, что створки недостаточных венозных клапанов обильно инфильтрированы лейкоцитами [81,142,151,153]. Эти факты послужили основой для лейкоцитарной теории повреждения венозной стенки при ВБВНК.

В 1987 г. С. Moyses с соавторами [125] при сравнении проб крови, забранных из большой подкожной вены у здоровых добровольцев до и после 40 минутной статической нагрузки (сидя на велосипеде с опущенными вниз ногами) показали, что при повышении давления в венах нижних конечностей здорового человека в микроциркуляторном русле начинают задерживаться

лейкоциты. Описывая результаты, автор отметил, что 25% лейкоцитов были потеряны из циркуляторного русла. Р. Thomas с соавторами (1988) [153] повторили это исследование, аналогичным способом смоделировав венозный стаз, провели сравнительное исследование количества лейкоцитов в периферической венозной крови и крови здоровых людей и пациентов с венозными язвами. Ими было отмечено, что после пребывания в положении сидя в течение 60 минут количество лейкоцитов в крови, взятой из большой подкожной вены у больных хронической венозной недостаточностью возросло на 30%, а у здоровых только на 7%.

Несколько позже Coleridge Smith с соавторами (1988г.) представили убедительные данные, свидетельствующие о достоверном снижении абсолютного количества лейкоцитов в крови, оттекающей из дистальных отделов нижних конечностей после длительной статической нагрузки. Это явление автором в англоязычной литературе получило название «white cell trapping» или лейкоцитарная ловушка [95].

Однако ряд российских авторов ставят под сомнение «воспалительную» теорию происхождения ВБВНК. Швальб П.Г. и Ухов Ю.И. (2009) провели исследование [61]. Производился одновременный забор крови из кубитальной вены и варикозной вены в зоне язвенных поражений, подсчет количества лейкоцитов, также была проведена проба с «ловушкой» (забор крови из варикозно измененной вены после 30 минутного сидения с согнутой в колене конечностью) и сравнение количества лейкоцитов с количеством в крови из кубитальной вены. Авторы не обнаружили существенных различий. Это вступает в противоречие с многочисленными исследованиями последних лет зарубежными учеными. Так Saharayu и соавт. в своей работе [141,142] указывают, что при венозной недостаточности отмечается снижение антигенов в крови воспалительных клеток (нейтрофилов, моноцитов), определяемых с помощью флуоцитометра. На основании полученных данных можно предположить, что часть этих клеток адгезировалась к эндотелию при ВБВНК.

По данным A.Weyl и соавт. [159], при гистологическом исследовании 27 биопсий участков липодерматосклеротической кожи, окружающей венозную трофическую язву, иммуногистохимически при помощи моноклональных антител против молекул адгезии VCAM-1, ICAM-1 отмечено повышение их экспрессии. Появление этих молекул адгезии на эндотелиальных клетках была связана с появлением периваскулярной инфильтрации лейкоцитов, что приводит к повреждению кожи и формированию трофической язвы.

Таким образом, в исследованиях, проведенных как *in vitro*, так и *in vivo*, подтверждается ключевая роль активированных лейкоцитов и макрофагов, как основных факторов повреждения венозной стенки и клапанов, а также паравазальных тканей при различных формах ХЗВНК [76,91,94,112,129].

К запуску лейкоцитарной агрессии на эндотелий вен и цепи воспалительных реакций приводит воздействие физических факторов - давление, которое оказывает ламинарный поток крови на стенку вены [43,75,81].

На сосудистую стенку постоянно действует сила трения протекающей мимо крови, которая максимально воздействует на ее внутреннюю поверхность. Этот феномен и получил название «*shear*»-стресса, или стресс «среза», суть которого заключается в поверхностном влиянии движущейся крови, «трущей» стенку сосуда [81]. Интенсивность «*shear*»-стресса зависит от скорости кровотока, пропульсивного и внутрисосудистого давления, площади поверхности сосуда, его диаметра и является важным фактором в регуляции функций сосудистой стенки. Венозная система характеризуется наиболее низкими показателями протективного «*shear*»-стресса (1-10 дин/см²) [43]. При снижении этого показателя и без того «ранимая» венозная стенка оказывается лишенной защитных свойств нормального кровотока. Особая роль «*shear*»-стресса принадлежит в регуляции «поведения» лейкоцитов в микроциркуляторном русле [111,132].

В настоящее время понятие о «shear»-стрессе несколько видоизменилось и претерпело метаморфозы, ученые и исследователи подошли к данной проблеме с другой стороны и ввели понятие «сила сдвига» или «тангенциальное напряжение». В целом оба понятия несут одинаковую смысловую нагрузку.

В 2003 году Lurie F. с соавт. [115] исследовали изменение скорости и направления интегрального потока крови при его прохождении через створки венозного клапана с использованием B-flow ультразвукографии. Они подробно изучили работу венозного клапана интактной вены. Створки открытого венозного клапана представили в качестве своеобразной форсунки реактивного двигателя. Lurie F. с соавт. убедительно доказали, что при пульсирующем прохождении потока крови между створками венозного клапана существует аксиальный (центростремительный) кровоток, проходящий по оси сосуда, и вихревой, который загибается в клапанные синусы. Причем последний предупреждает стаз крови в синусах клапана и создает относительно постоянное тангенциальное напряжение на стенку вены и створки клапана. Клапан закрывается тогда, когда давление, создаваемое вихревым потоком, превышает давление в просвете вены. Движение в голеностопном суставе увеличивают скорость аксиального потока крови и снижают давление в просвете вены. Это, соответственно, приводит к закрытию створок клапана. Возникающий на этапе закрытия створок клапана, кратковременный (физиологический) рефлюкс, не оказывает, какого либо негативного воздействия на венозную стенку.

Bergan J. с соавторами [75, 76, 77] подробно изучили состояние эндотелия в зависимости от величины тангенциального напряжения. Они установили, что изменение силы сдвига вызывает разнообразные реакции со стороны эндотелия, в частности, регулирует экспрессию различных генов. Низкий уровень молекул воспаления и свободных радикалов отмечен при нормальных значениях силы сдвига. Ее снижение в результате турбулентного, в особенности ретроградного потока крови, может

спровоцировать появление воспалительных и тромбогенных фенотипов эндотелиоцитов, которые приобретают способность фиксировать на своей поверхности как форменные элементы крови (лейкоциты, тромбоциты), так и белковые молекулы. Нормализация силы сдвига приводит к быстрому восстановлению формы активированных лейкоцитов.

Огромное влияние на уровень силы сдвига оказывает гликокаликс, покрывающий эндотелий [126]. Гликокаликс моделирует и передает все механические воздействия со стороны просвета вены на эндотелий, нейтрализует молекулы клеточной адгезии и предотвращает фиксацию лейкоцитов. В результате воспалительной реакции или механической травмы происходит нарушение его свойств, соответственно изменяется характер тангенциального напряжения.

В настоящее время происходит активный поиск маркеров патологической перестройки вен. Есть отдельные публикации, в которых по уровню маркеров оцениваются результаты фармакотерапии, ведется поиск новых лекарственных средств. Учитывая ключевую роль дисфункции эндотелия в патогенезе варикозной трансформации вен, выявление маркеров его повреждения представляется особенно актуальными [148].

Венозная недостаточность сопровождается ЭД, которая характеризуется повреждением его целостности, нарушением функциональной активности, развитием окислительного и нитрозилирующего стресса и изменением синтеза NO. Гипоксия вызывает недостаточность натрий-калиевого насоса и функции ионных каналов. Данные изменения приводят к изменению физиологических трансмембранных ионных градиентов и избыточному входному току натрия и воды в клетку и набуханию эндотелия. Кроме того, подлежащие слои вен становятся доступными для клеток крови и других веществ, что ведет к повреждению структуры венозной стенки продуктами метаболизма активированных лейкоцитов, гипертрофии венозной стенки в результате фенотипической модуляции гладкомышечных клеток.

Изменения эндотелия вен на ранних стадиях заболевания являются тонкими и селективными. Следует четко представлять, что патологические нарушения на молекулярном, клеточном и микроциркуляторном уровнях при ВБВНК развиваются задолго до морфологических изменений венозного русла, которые могут быть выявлены при рутинном клиническом и инструментальном обследовании. Этот факт, в свою очередь, делает необходимым разработку диагностических тестов, способных выявлять чувствительные изменения со стороны эндотелия, что приведет к формированию групп риска больных с данной патологией и позволит разработать или вовремя применить препараты, оказывающие влияние на функцию эндотелия или подобрать миниинвазивное хирургическое вмешательство.

В настоящее время широко распространен и используется многими авторами количество циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК), десквамированных от сосудистой стенки и циркулирующих в периферической крови, как критерий повреждения эндотелия при венозном стазе. В норме гибель и попадание в кровеносное русло эндотелиальных клеток происходит в определенном «физиологическом» количестве. По данным литературы, нормативными значениями числа ЦЭК в венозной крови являются $0-4 \times 10^4$ клеток в литре крови [45,46,109]. Повышенная концентрация эндотелиальных клеток в крови наблюдается вследствие повреждения эндотелия при том или ином патологическом процессе.

S. Schuller-Petrovic и соавт. [145] определяли уровень вазоактивных медиаторов, вырабатываемых культивированными эндотелиальными клетками, взятыми из подкожных вен у больных варикозной болезнью и здоровых добровольцев. При исследовании уровень эндотелина-1 у пациентов с ХВН и здоровых добровольцев не отличался. Уровень ц-ГМФ в плазме и внутри клетки в ответ на введение гистамина был значительно ниже у больных с варикозной болезнью. Возможно это указывает на дисрегуляцию

у пациентов ХВН системы NO-ц-ГМФ. В конечном итоге это может вызывать развитие первичного варикоза.

R.A.Mangiafiko и соавт. [119] исследовали содержание эндотелина-1 при помощи иммуноферментного анализа в крови, взятой из подкожной варикозно-расширенной вены у медиальной лодыжки, и сравнили с образцами крови, взятой у здоровых добровольцев. Данные исследования показали повышенную концентрацию эндотелина-1 в крови у больных с ХВН в сравнении с данными контрольной группой. Вместе с тем, при искусственном создании венозной гипертензии в обеих группах отмечалось повышение концентрации эндотелина-1 по сравнению с исходным. Однако у пациентов с ХВН этот показатель резко увеличивался, что позволяет говорить о нарастании ДЭ по мере прогрессирования заболевания. По мнению авторов, повышенная концентрация эндотелина-1 в крови у больных с ХВН могла противодействовать релаксации варикозно-расширенных вен.

В качестве маркеров гипертрофии стенок вен можно использовать уровень сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF), активно участвующий в морфологических изменениях капилляров при липодерматосклерозе кожи, способствует увеличению проницаемости капилляров. При определении в плазме его базального уровня у больных с варикозной болезнью, в результате создания искусственной гипертензии, отмечалось повышение на 21%, а в контрольной группе на 15%. Уровень VEGF в плазме прямо пропорционален тяжести ХВН и достигает максимума у больных с трофическими язвами. Другая частая форма поражения кожи, связанная с ХВН, - фиброз мягких тканей. Этот процесс инициирует и регулирует цитокин TGF-бетта1, которые выделяется лейкоцитами и фибробластами. При ХВН уровень активного TGF-бетта1 в измененной коже значительно выше, чем в интактной. Вероятно, активированные лейкоциты, стимулируют выработку коллагена фибробластами дермы. Результатом этого процесса является фиброз. Цитокины также способны индуцировать острофазные реакции, обладая, таким образом, не только локальным, но и

системным эффектом. Привлеченные моноциты и Т-лимфоциты проникают через эндотелиальный барьер в субэндотелиальное пространство, где значительная часть моноцитов дифференцируется в макрофаги. Активированные макрофаги могут высвобождать значительное количество воспалительных цитокинов, гидролитических ферментов, прокоагулянтных субстанций, включая тканевой фактор. Это приводит к дальнейшему повреждению эндотелия. Секреция биологически активных веществ макрофагами, включая хемотоксины, митогены и факторы роста стимулируют миграцию из меди и в интиму гладкомышечных клеток и фибробластов, а также их пролиферацию, и репликацию. В результате увеличивается пролиферативная активность гладкомышечных клеток и происходит их фенотипическая модуляция [122, 123].

Кроме того, определялось повышение медиаторов воспаления TNF- α (альфа) и IL-1(бетта) у пациентов с ХВН, особенно ярко дисбаланс между провоспалительными и противовоспалительными в сторону первых выявлялся при создании гипертензии (окклюзия манжетки до 60 мм рт. ст. в течение 25 мин.) [87].

Наибольшее внимание исследователей последних лет было привлечено к выявлению молекул адгезии-антигенов на поверхности эндотелия и их соответствующих лигандов на воспалительных клетках, непосредственно участвующих в процессах адгезии и миграции последних в венозную стенку и периваскулярные ткани. Процесс адгезии лейкоцитов к эндотелию и их проникновение через венозную стенку имеет большое значение как в патологической перестройке вен, так и в образовании трофических изменений и язв при ХВН. Измерялись уровни ICAM-1(межклеточная молекула адгезии), VCAM-1(сосудисто-клеточная молекула адгезии), ELAM-1 (эндотелиально-лейкоцитарная молекула адгезии) и фактора Вилебранда у пациентов с варикозной болезнью с трофическими расстройствами и без них, а также контрольной группы добровольцев при кратковременной венозной гипертензии [141,142]. При этом имелось значительное повышение

указанных молекул адгезии во всех группах в ответ на венозную гипертензию. Базальные уровни в плазме крови VCAM-1 и фактора Виллебранда, а также величина повышения VCAM-1 при венозной гипертензии были выше у пациентов с трофическими расстройствами по сравнению с пациентами без таковых.

Некоторые из продуктов ПОЛ - ДК и малоновый диальдегид - являются маркерами активности этого процесса при острой и хронической венозной недостаточности, уровень которых увеличивается при данной патологии. Кроме того, отмечается изменение содержания в плазме крови продуктов деградации монооксида азота-нитратов и нитритов [26, 39]. Указанные изменения служат показателем нарушения целостности эндотелиального слоя венозной стенки при острой и хронической венозной недостаточности.

Таким образом, в качестве маркеров венозного стаза, клеточного повреждения и патологической перестройки вен потенциально могут рассматриваться следующие показатели: оксид азота, нитриты и нитраты; вазоактивные субстанции (эндотелин-1, простациклин); молекулы адгезии (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 и другие); селектины (Е-, Р- и L-селектин); факторы роста (TGF, FGF, VEGF); ЦЭК; воспалительные медиаторы (PAF, факторы некроза опухолей, интерлейкины 1 и 6, тромбоксан A₂); антигены воспалительных клеток CD11b, CD62L, LFA-1, VLA-4 и другие.

Маркеры эндотелия, изменение концентрации которых в крови является признаком ЭД и по данным литературы последних лет является наиболее высокой в концентрациях при различных формах ХЗВ относятся: десквамированные эндотелиальные клетки, Е-и Р-селектины, ICAM-1, VCAM-1, тромбомодулин, рецепторы к протеину С, тканевой активатор плазминогена t-РА, фактор Виллебранда (vWF), ингибитор тканевого фактора (TFPI), протеин S, оксид азота (NO), нитриты и нитраты, тканевой фактор (TF).

Диагностика ЭД является чрезвычайно важной и ответственной задачей, от которой зависит составление программы лечения. Анализ

мировой литературы свидетельствует об отсутствии в настоящее время оптимальной методологии изучения различных аспектов ЭД, включая диагностические критерии, не разработана стандартизация проведения исследований [20,32]. Тем не менее, в настоящее время диагностика и коррекция ЭД являются приоритетными направлениями в развитии патофизиологии. С целью оценки ЭД определяют эндотелийзависимую мобильность сосудов как прямыми, так и непрямыми методами [25]. Методы оценки функции эндотелия делят на лабораторные (прямые) и инструментальные (непрямые) [18,32].

К инструментальным методам оценки ЭД относят: ультразвуковые методы (проба с реактивной гиперемией, метод ультразвуковой оценки с использованием функции цветного доплеровского картирования) [31]; фотоплетизмография; видеобиомикроскопию; лазерную доплеровскую флоуметрию.

К лабораторным методам оценки относят определение [21,25,41,79]: фактора Виллебранда, тканевого активатора плазминогена, ингибитора активатора плазминогена 1 типа, антитромбогенной активности эндотелия, метаболитов окиси азота, оксида азота, ЦЭК, концентрации молекул адгезии, концентрации эндотелина-1, концентрации P-,S-, E-селектинов, концентрации гомоцистеина, цитокинов (IL-1b, IL-8, TNF).

В клинической практике функциональную активность эндотелия оценивают преимущественно с помощью инструментальных методов. Для регистрации динамики изменения кровотока в различных сосудистых бассейнах используют, главным образом, ультразвуковую доплерографию (УЗДГ). Для оценки динамики тканевой перфузии применяют высокочастотную УЗДГ или лазерную доплерографию. Иногда при исследовании эндотелий-зависимой реакции используют метод окклюзионной плетизмографии.

Другим методом оценки выраженности ЭД является лабораторная диагностика - оценка содержания в крови различных веществ, образующихся

в эндотелии. В настоящее время существуют методики определения в крови практически всех известных веществ, образующихся в эндотелии, однако не все показатели имеют одинаковую диагностическую ценность, поскольку значительная часть маркеров ЭД образуется не только в ЭК, но и в других клетках.

По скорости образования в эндотелии различных факторов (что связано во многом и с их структурой), а также по преимущественному направлению секреции этих веществ (внутриклеточная или внеклеточная) можно разделить вещества эндотелиального происхождения на следующие группы.

1. Факторы, постоянно образующиеся в ЭК и выделяющиеся из клеток в базолатеральном направлении или в кровь (NO, простациклин). Скорость образования этих факторов связана с быстро меняющимися условиями регуляции, в частности, с изменением напряжения сдвига или действием вазоактивных веществ. Почти любое повреждение эндотелия сопровождается либо нарушением синтеза, либо биодоступности этой группы веществ. В то же время образование NO и простациклина может увеличиваться при действии на эндотелий липополисахарида и цитокинов. При этом в эндотелии образуется индуцируемые синтаза оксида азота и циклооксигеназа-2, что приводит к значительному повышению выработки NO, простациклина: эти изменения могут свидетельствовать об активации эндотелия.

2. Факторы, накапливающиеся в эндотелии и выделяющиеся из него при стимуляции (фактор Виллебранда, Р-селектин, тканевой активатор плазминогена(t-РА)). При действии биологически активных веществ, таких как гистамин, тромбин, активированные фрагменты системы комплемента, цитокины и др., происходит высвобождение фактора Виллебранда и t-РА в кровь и перемещение на мембрану эндотелиоцита Р-селектина с незначительным поступлением его в кровь (растворенный Р-селектин). Эти факторы могут попадать в кровь не только при стимуляции эндотелия, но и при его активации и повреждении.

3. Факторы, синтез которых в нормальных условиях практически не происходит, однако резко увеличивается при активации эндотелия (эндотелин-1, ICAM-1, VCAM-1, Е-селектин, PAI-1). Эти факторы либо экспрессируются на эндотелиоцитах (ICAM-1, VCAM-1, Е-селектин) и частично выделяются в кровь (растворенные ICAM-1, VCAM-1, Е-селектин), либо преимущественно секретируются и поступают в кровь (эндотелин-1, PAI-1). Эндотелин-1 является мощным вазоконстриктором со сложной системой регуляции. Гладкомышечные клетки и эндотелий имеют два типа рецепторов к эндотелину-1: α и β . При действии эндотелина-1 на α - и β -рецепторы - происходит выброс оксида азота и простациклина, что приводит к вазодилатации. Эндотелин-1 также является прямым активатором лейкоцитов. Он увеличивает пролиферацию гладкомышечных клеток посредством увеличения в 3-10 раз освобождения митогенных факторов (PDGF- фактор роста тромбоцитарного происхождения; FGF- фактор роста фибробластов и др.), а также слабого митогенного действия. Влияние эндотелина на тромбоциты опосредовано через уменьшение синтеза вазорелаксантов окиси азота и простациклина, а также путем увеличения освобождения тканевого активатора плазминогена, фактора активации тромбоцитов. Эндотелин-1 считается одним из медиаторов патологических состояний [43,44,45,46].

4. Факторы, синтезируемые и накапливающиеся в эндотелии (тканевой фактор, t-PA) либо являющиеся мембранными белками (рецепторами) эндотелия (тромбомодулин, рецептор протеина C). Высвобождение этих факторов в кровь наблюдается при повреждении эндотелия.

Таким образом, можно выделить несколько вариантов изменения функциональной активности эндотелия:

- дисфункция эндотелия (уменьшение синтеза факторов первой группы):
- стимуляция эндотелия (повышение содержания в крови факторов второй группы).

- активация эндотелия (повышение содержания в крови факторов 1-3 групп:
- повреждение эндотелиоцитов (повышение содержания в крови факторов четвертой и второй групп, а также циркулирующих (десквамированных) эндотелиоцитов).

Еще одним методом косвенной оценки состояния эндотелия является исследование содержания в крови факторов, повреждающих эндотелий, уровень которых коррелирует с выраженностью ЭД. К таким факторам (медиаторам повреждения эндотелия) относятся гипергомоцистеинемия, асимметричный диметиларгинин (ADMA), липопротеин, ксантиноксидаза, цитокины (ИЛ-1 β , α -ФНО. ИЛ-8 и др.).

Как правило, в конкретной клинической ситуации имеется сразу несколько вариантов изменения функциональной активности ЭК, поэтому в крови присутствуют различные эндотелиальные факторы. Решающую роль в патологических изменениях сосудов при ХВН Р.Е. Chabrier [101] отводит факторам роста - полипептидным химическим агентам, вырабатываемым *in situ*- клетками стенки сосуда (эндотелиальными, гладкомышечными клетками) и клетками крови (тромбоцитами, лейкоцитами).

Многочисленные события, происходящие в манифестации ХЗВ, можно разделить на две большие группы: изменение венозного оттока и хроническое воспаление. Традиционная лечебная программа ставит своей основной задачей снижение венозной гипертензии путем уменьшения или прекращения патологического рефлюкса крови. Для этого широко используют средства компрессионной терапии (бинты, трикотаж). В ряде случаев прибегают к хирургическому устранению рефлюксов крови и удалению варикозных вен, что позволяет значительно улучшить венозный отток и в короткие сроки закрыть трофические язвы [5].

Углубление наших представлений о молекулярных и клеточных механизмах формирования ВБВНК позволяет выявить новые цели для проведения различных видов лечения, включая фармакотерапию [3].

Консервативное лечение при ВБ, как правило, направляется на патогенетически значимые звенья развития заболевания и должно учитывать стадию венозной недостаточности, преобладающие синдромы, функциональный резерв микроциркуляторного русла и наличие осложнений. В предоперационной подготовке и послеоперационной реабилитации у больных ВБВНК придается большое значение методам консервативной терапии, оказывающим положительное воздействие на нормализацию микроциркуляторных процессов в тканях, флеботонизирующее и ангиопротективное действие, нормализующих проницаемость капилляров, укрепляющих сосудистую стенку, уменьшающих агрегацию тромбоцитов. Иными словами, основными задачами фармакологической коррекции венозной недостаточности являются: повышение тонуса венозной стенки, улучшение лимфооттока, устранение микроциркуляторных расстройств, коррекция гемореологических нарушений, купирование воспалительных явлений [16].

Эндотелий является важной мишенью при лечении ХЗВ нижних конечностей. Состояние, возникающее при венозной недостаточности, усугубляет дисфункцию эндотелиальных клеток. Поэтому лечение данной патологии без нормализации функции ЭК не может считаться успешно решенной клинической задачей. Вместе с тем, количество работ, в которых изучалась фармакологическая коррекция функционального состояния эндотелия при ВЗВНК, крайне мало.

Одним из направлений лечения венозной недостаточности является коррекция гемодинамических нарушений с помощью препаратов, обладающих свойствами антиоксидантов, мембранопротекторов и ингибиторов лизосомальных ферментов [8]. Функцию эндотелия улучшает ряд лекарственных средств: антиоксиданты, антигипоксанты (актовегин), фолиевая кислота в сочетании с витамином В₆, селен, комплексные препараты (НО-аспирин), L-аргинин [8,20,23]. Повышая функциональную активность микрососудистого эндотелия, они оказывают влияние на

вазомоторную функцию микрососудов, повышают устойчивость тканей к гипоксии, стимулируют потребление кислорода, что приводит к стабилизации плазматических мембран клеток и снижает образование лактата.

С учетом важной роли свободно-радикальных процессов в развитии ЭД существует необходимость принимать препараты, обладающие антиоксидантным действием и способных улучшать функциональное состояние эндотелия за счет влияния на продукты окислительного стресса [8,20,23,30].

Терапия данными средствами приводит к достоверному улучшению субъективных симптомов: судороги, ощущение тяжести, распирающая усталость, нивелирование отека нижних конечностей [8,20,23,30].

Препаратами выбора для лечения ВБВНК являются флеботропные препараты. Только они на сегодняшний день способны блокировать «лейкоцитарную агрессию» на уровне эндотелия венозной стенки. Takase S. в 2004 году [152] на экспериментальной модели венозной гипертензии, продемонстрировал как флеботропный препарат дозозависимо ингибирует активацию лейкоцитов и значительно замедляет скорость венозного рефлюкса. Рядом зарубежных авторов, также предоставлены данные, полученные на экспериментальных моделях, подтвержденные в клинических исследованиях - у пациентов с хроническими заболеваниями вен (класс C2-C4 по классификации CEAP) через 2 месяца флебопротектор достоверно снижает концентрацию Р-селектина, ICAM-1, VCAM-1 и уровень VEGF.

Флеботропные препараты являются базисными в лечении ВБВНК. Исходя из особенностей патогенеза варикозной трансформации вен первоочередной задачей флеботропной терапии, становится улучшение флебогемодинамики, в частности нормализация процессов фильтрации и реабсорбции жидкости на уровне микроциркуляторного русла, а также активизация лимфатического дренажа.

Нормализация венозного кровотока осуществляется путем антигипоксического действия на эндотелий венозной стенки, подавления адгезии лейкоцитов, повышение тонуса вен за счет потенцирования тропности венозной стенки к норадреналину или подавления механизма инактивации норадреналина. На уровне капиллярно русла флеботропные препараты уменьшают проницаемость стенок, подавляют лейкоцитарную адгезию, увеличивают подвижность эритроцитов, увеличивают количество функционирующих лимфатических капилляров. На молекулярном уровне флеботропные препараты подавляют активность свободных радикалов, эластазы и гиалуронидазы, прерывая повреждение здоровых клеток [57]. Кроме того, флеботропные лекарственные препараты улучшают функцию митохондрий и защищают ЭК от повреждения в условиях гипоксии и реоксигенации [129].

Современные флебоактивные препараты включают ряд групп: γ -бензопироны, рутозиды, пикногенолы, сапонины, производные спорыньи и другие. Среди флеботропных препаратов наибольшее распространение приобрели производные флавоноидов – диосмины [6].

Одним из перспективных препаратов для лечения больных ХВННК являются γ -бензопироны. Они заняли лидирующее положение. Компоненты препарата, в составе которых находятся изокверцетин, кемпферол-3-О-бетта-Д-глюкозид, кверцетин-3-О-бетта-Д-глюкокуронид, обеспечивают компонентное действие, объединяющее в себе эндотелиопротективный, противовоспалительный, противоотечный эффекты, что в конечном счете влечет за собой нормализацию структуры и функции сосудов микроциркуляторного русла.

Существует две точки зрения на механизм физиологического действия кверцетина, на сосудистую стенку: через эндокринные железы, а также путем воздействия на некоторые ферментные системы и участия в тканевом дыхании.

Проведенные в 2003 г. исследования Nees S. и соавт. [131] показали, что при ВБВНК страдает барьерная функция эндотелия. Эндотелиальные клетки деформируются, раздвигаются с формированием межклеточных каналов, по которым выходит в интерстициальное пространство жидкость. Применение *in vitro* компонентов экстракта красных листьев винограда (кверцетина глюкоронида и кемпферола глюкоронида) приводит к регрессу этих патологических изменений. Эндотелиальные клетки раздвигаются и округляются под действием медиаторов воспаления, образуются просветы и каналы, по которым может проходить жидкость.

Приведенные данные позволяют сделать вывод, что препараты данной группы, могут влиять на сосудистую проницаемость, воздействуя на систему гиалуроновая кислота - гиалуронидаза. Ингибирующее влияние компонентов препарата проявляется и по отношению к гистидиндекарбоксилазе, сукцинатдегидрогеназе, ксантиноксидазе, холинацетилазе. Механизм ингибирующего действия на указанные ферменты, по-видимому, заключается в том, что при окислении флавоноидов образуются свободные радикалы, которые могут воздействовать на ферментные процессы.

Многочисленные данные указывают также на возможность участия кверцетина, изокверцетина и кемпферола в обмене коллагеновых веществ, что может иметь значение для формирования соединительной ткани [165, 166].

Существенное значение имеет способность этих биофлавоноидов предохранять аскорбиновую кислоту от окисления, а также восстанавливать дегидроаскорбиновую кислоту в аскорбиновую при участии глутатиона. Вероятно, они способствуют восстановлению образующейся в организме дегидроаскорбиновой в аскорбиновую и таким путем предохраняют организм от повышенного расхода витамина С.

Таким образом, представленные факты позволяют рассматривать ХЗВ не только как следствие генетически детерминированной слабости соединительной ткани, когда в качестве основных лечебно-

профилактических методов рекомендуется компрессия пораженной конечности, хирургическое устранение рефлюкса крови и удаление измененных вен, а в качестве полиэтиологического приобретенного заболевания, в патогенезе которого одним из важных механизмов выступает эндотелиально-лейкоцитарная воспалительная реакция. Подавление «лейкоцитарной агрессии» необходимо и возможно благодаря своевременному использованию современных лекарственных препаратов с доказанными и изученными механизмами действия и является ключом к успешному лечению и профилактике хронических заболеваний вен.

Последующие исследования, посвященные выявлению наиболее ценных маркеров патологических процессов венозной стенки, предшествующих появлению ее необратимой трансформации, должны способствовать совершенствованию системы профилактики заболеваний вен и повышению качества лечения больных хронической венозной недостаточностью. Изучение патогенеза ВБВНК, несомненно, далеко от своего завершения. Не до конца выясненными остаются еще многие вопросы. В какой момент срабатывает адаптационный механизм, заканчивающийся патологической перестройкой вен, обратимы ли эти изменения, и в какой момент? Именно эти вопросы и побудили к проведению настоящего исследования.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Клиническая характеристика больных.

В диссертационном исследовании проведено комплексное обследование и последующее лечение 180 пациентов, находившихся в хирургической клинике ФГБУ «Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения России с 2009 по июнь 2013 года. Из них 128 больных обратились за медицинской помощью по поводу первичных случаев варикозной болезни, 52 (29%) пациента – по поводу послеоперационных рецидивов заболевания. Основным критерием включения являлось отсутствие значимых тактических ошибок при лечении данных пациентов на предыдущих этапах лечения.

Возраст больных варьировал от 21 до 74 лет (средний 41 ± 13 лет). Из них мужчин было 74 (41%), женщин – 106 (59%), соотношение мужчин и женщин - 1:1,5. При сравнении обследуемых групп в качестве контроля исследовали 30 практически здоровых добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту с пациентами исследуемых групп.

Распределение больных по возрасту и полу представлено в таблице 1. Большую часть составили пациенты в возрасте от 18 до 45 лет (54%). Длительность заболевания составляла от 2 до 35 лет. Среди факторов риска развития заболевания наиболее часто встречались длительные динамические и (или) статические нагрузки (46%, 82 пациента), беременность, длительный родовой период в анамнезе (19%, 35 пациентов), наследственное изменение структуры соединительной ткани (35%, 63 пациента, из них по материнской линии - 68%, 43 пациента и по отцовской линии - 24%, 15 пациентов, по двум линиям – 8 %, 5 пациентов).

Таблица 1.

Распределение пациентов основной группы по возрасту и полу.

Пол	Возраст			Всего
	18-45	46-60	61-75	
Больные с ВБВНК				
Мужчины	23	14	1	40
Женщины	28	24	2	52
Всего	51	38	3	92
Больные с РВРВ				
Мужчины	10	8	2	20
Женщины	15	13	4	32
Всего	25	21	6	52
Больные с сегментарным варикозом				
Мужчины	3	7	4	14
Женщины	10	7	5	22
Всего	13	14	9	36
Итого:	89	73	18	180

При анализе клинических наблюдений использовалась классификация Международного объединенного совета сосудистых хирургов хронических заболеваний вен нижних конечностей - CEAP, разрешенная к применению на совещании экспертов России в 2000 году. Данная классификация создана с учетом клиники (C – clinic), этиологии (E - etiology), анатомии (A - anatomy) и патофизиологических расстройств (P - pathophysiology).

Согласно этой классификации в исследование включены только больные конечности клинического класса II (CEAP).

Критериями исключения в выборе пациентов стали: воспалительные заболевания в стадии обострения, злокачественные новообразования, беременность, варикозное расширение вен малого таза у женщин, варикоцеле у мужчин, системная дисплазия соединительной ткани, тромбозы, сопутствующая артериальная патология, прием гормональных препаратов при контрацепции или в качестве заместительной терапии.

2.2. Характеристика методов исследования.

Пациентам проводились традиционные этапы клинического обследования, включающего сбор и анализ жалоб, сбор анамнеза заболевания и жизни, клинический осмотр. Выясняли начало и длительность заболевания, характер его течения, вид и результаты ранее проводимого лечения. Оценивали следующие субъективные симптомы заболевания: тяжесть, боли, ночные судороги в икроножных мышцах, ощущение отека конечности и их выраженность (умеренная, сильная). При осмотре нижних конечностей определяли наличие или отсутствие объективных признаков ХВН: варикозного расширения вен, телеангиэктазий, внутрикожного сетчатого (ретикулярного) варикоза, отека дистальных отделов конечности, гиперпигментации кожи, липодерматосклероза (уплотнения) подкожной клетчатки, трофической язвы (зажившей или открытой).

2.2.1. Лабораторные исследования.

Всем больным помимо общеклинического обследования исследовали гемореологические свойства крови. Эндотелиальную дисфункцию оценивали путем определения уровня маркеров эндотелиальной дисфункции: Р-селектина, Е-селектина, тканевого активатора плазминогена, эндотелина-1, молекулы адгезии сосудистого эндотелия 1 типа (sVCAM-1-soluble vascular cellular molecula), циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК). Данные показатели исследовались у всех 92 пациентов (за 1 день до операции, а затем на 8-9-й день после оперативного лечения и спустя 2 месяца после комплексного лечения), у 52 пациентов с «ложными» рецидивами (при первичном обращении и спустя $9\pm 1,8$ мес. и $15\pm 3,5$ мес. после комбинированного лечения). Кроме того, такие же показатели крови изучались у 30 пациентов, взятых в экспериментальное исследование для оценки ЭД и подтверждения гипотезы о «лейкоцитарной ловушке». У

последних интраоперационно производили забор крови путем пункции кубитальной вены предплечья и ствола варикозно-расширенной большой подкожной вены, отступая от сафено-фemorального соустья на расположенной в области внутренней поверхности средней трети голени 2 см одновременно. Кровь отбирали в две пробирки «S- Monovette» 5 ml и 4 ml Sarstedt AG and Co (Германия).

Для определения ЦЭК мы пользовались методикой ее автора J. Hladovec в интерпретации Н.Н. Петрищева и соавт. (2001). Забор крови осуществляли в утренние часы, натощак, путем пункции кубитальной вены предплечья. Кровь отбирали в пробирку «S- Monovette» 5 ml Sarstedt AG & Co (Германия).

Метод основан на изоляции клеток эндотелия вместе с тромбоцитами с последующим осаждением тромбоцитов с помощью аденозиндифосфата (АДФ). Для получения богатой тромбоцитами плазмы сразу после взятия кровь центрифугировали 10 мин со скоростью 1000 оборотов в минуту, затем 1 мл плазмы смешивали с 0,23 мл натриевой соли аденозиндифосфата в концентрации 1 мг/мл. Полученную смесь механически перемешивали на шейкере «ELMI-S3» в течение 10 мин со скоростью 100 оборотов в минуту. Свободный от тромбоцитов супернатант переносили в другую емкость и центрифугировали при 9000 оборотах в минуту в течение 10 мин для осаждения эндотелиальных клеток. Затем надсадочную плазму аккуратно удаляли, а полученный осадок суспендировали в 0,1 мл 0,9% раствора натрия хлорида и перемешивали одноразовым наконечником. Готовой суспензией заполняли камеру Горяева. Количество клеток эндотелия подсчитывали в 2 сетках камеры методом фазово-контрастной микроскопии («Биомед 5», Россия) и делили на 2 для получения среднего результата в двух камерах. Учитывая соотношение между количеством клеток в сетке и объемом Горяева, объемом полученной суспензии и объемом плазмы, при подсчете количества эндотелиальных клеток умножали на 10^4 л. При нормальной функции эндотелия количество ЦЭК находится в пределах $0-4 \times 10^4$ л (рис.1)

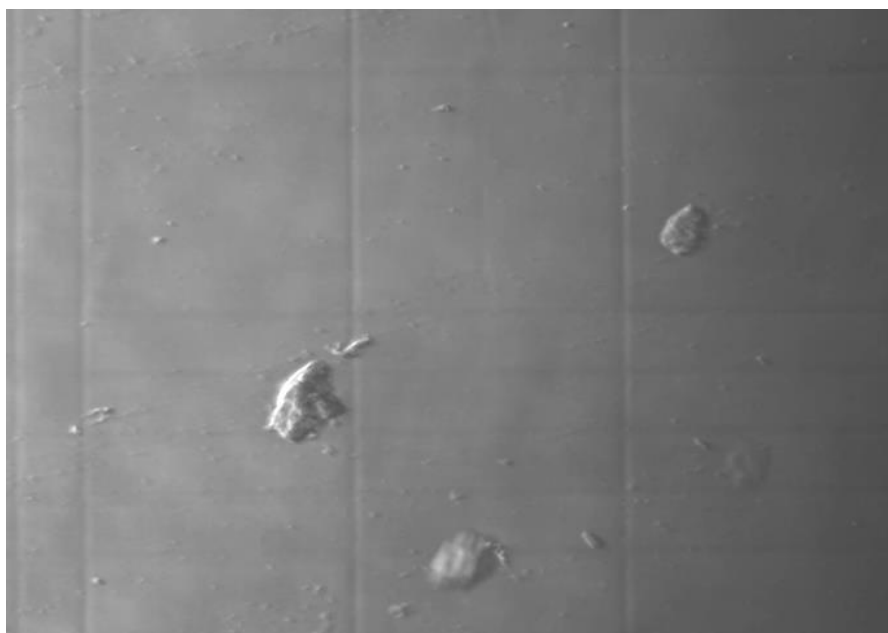


Рис. 1. Эндотелиальные клетки в камере Горяева (фазово-контрастная микроскопия, x160).

Для проведения определения маркеров эндотелиальной дисфункции - Р-селектина, Е-селектина, тканевого активатора плазминогена (t-РА), эндотелина-1, молекулы адгезии сосудистого эндотелия 1 типа (sVCAM-1-soluble vascular cellular molecula) - производили забор крови утром натощак в положении лежа, путем пункции локтевой вены в объеме 7,5 мл в пробирку «S- Monovette» 7,5 ml Sarstedt AG & Co (Германия). Кровь хранили при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ для накопления требуемого для каждого набора количества образцов.

Концентрации Р-селектина, Е-селектина, тканевого активатора плазминогена, молекулы адгезии сосудистого эндотелия 1 типа (sVCAM-1-soluble vascular cellular molecula) определяли с использованием наборов фирмы «Bender MedSystems» (Австрия) для иммуноферментного анализа (ИФА) согласно инструкции производителя.

Концентрацию эндотелина -1 устанавливали с использованием наборов фирмы «Biomedica» (Канада) для ИФА согласно инструкции производителя. Оценка реакции проводилась на микропланшетном полуавтоматическом фотометре SUNRISE («Тесан», Австрия) с помощью промывочной станции Hydroflex («Тесан», Австрия), что позволяло стандартизировать эти методы.

В результате реакции с соответствующим хромогенным субстратом образовывался окрашенный продукт, количество которого определяли спектрофотометрически.

Клинический анализ крови, включающий определение абсолютных значений и процентного состава форменных элементов, выполняли на автоматическом гематологическом анализаторе серии XS-1000i («Sysmex Corporation», Кобе, Япония).

Количественное и качественное измерение состояния свертывающей системы крови проводили на анализаторе гемостаза тромбоэластографе TEG® 5000 («Haemoscope Corporation», США). Этот метод интегральной оценки системы гемостаза позволил оценить состояние как плазменного, так и тромбоцитарного звеньев свертывающей системы крови, измерить фибринолитическую активность плазмы крови. Преимуществом избранного метода является автоматическое занесение всех результатов исследования в компьютерную базу данных, что позволило в любой момент выполнить сравнение с предыдущими исследованиями и получить расшифровку данных компьютером.

Определение малонового диальдегида (МДА) определяли спектрофотометрически (спектрофотометр «Beckman DU-7»). Концентрацию МДА выражали в нмоль/мл плазмы.

2.2.2. Ультразвуковые методы исследования.

Ультразвуковое исследование проводилось всем пациентам в до- и послеоперационном периоде. Проводилась оценка состояния венозной системы нижних конечностей. Использовалась ультразвуковая система экспертного класса «Voluson E8» (производство «GE», США) с линейным датчиком мощностью 8-12 МГц. Использовались следующие режимы ультрасонографического исследования: ангиосканирование в реальном масштабе времени, цветное доплеровское кодирование (ЦДК) (в том числе, энергетический доплер) и сканирование в дуплексном и триплексном режимах.

2.2.3. Изучение ЭД методом проточной иммуноцитометрии.

Оценка локализации и степени экспрессии белковых антигенов на поверхности и внутри клеток проводилась методом проточной иммуноцитометрии на проточном цитометре FACS Calibur с программным обеспечением CellQuest (Becton Dickinson). Метод основан на сэндвич-модификации с использованием моно- и поликлональных антител, иммунофлуоресцентной и авидин-биотиновой техники. Исследование проводили совместно с ФГБУ Российского кардиологического научно-производственного комплекса» МЗ РФ.

Забор материала производили в операционной, *in vivo* во время оперативного вмешательства (АКШ, комбинированной флебэктомии). Исследовано 10 образцов вен, забранных во время сафенэктомии. Контрольные образцы в количестве 5 здоровых вен были набраны во время аортокоронарного шунтирования. Забор вены во время типичной флебэктомии производили щадящим для эндотелия способом: после разреза по паховой складке около 7 см, края раны разводились крючками Фарабефа, после выделения и взятия на зажимы большой подкожной вены, отсекали кусок вены протяженностью около 10-15 см. Далее материал помещали в стерильную емкость с фосфатным буфером Дульбекко (ФБД). Забор большой подкожной вены при АКШ производили обычным способом из разреза Маделунга.

Использовали антитела и среды: среду 199, фосфатный буфер Дульбекко (ФБД) фирмы GIBCO (США), Диспаза (нейтральная протеаза из *V. Polymyxa*), мышинные моноклональные антитела против VCAM-1 фирмы Becton Dickinson, бычий сывороточный альбумин (БСА) – произведены фирмой Sigma (США). Для проточной цитофлуориметрии были использованы ФИТЦ-меченные антитела лошади против иммуноглобулинов мыши (Vector Laboratories).

Для получения эндотелиальных клеток вены человека применяли метод Gimbrone et al. [1974] в модификации А.С.Антонова и соавт. [1981]. Выделение клеток проводили в стерильных условиях. После обработки спиртом, в вену с 2-х сторон вставляли канюли и фиксировали лигатурами. Затем сосуд многократно промывали от крови раствором Эрла до получения чистого раствора. В зависимости от длины вены вводилось 15-40 мл 0,15% раствора диспазы на среде 199, с последующим наложением зажимов. Продолжительность ферментативной обработки составляла 25-30 минут при температуре +37°C. По окончании инкубации исследуемую вену промывали раствором Эрла; полученную суспензию клеток центрифугировали в течение 10 минут при 600g. Затем к 200 мкл содержимого пробирки после центрифуги добавили мышинные моноклональные антитела к 45 FIC, CD 146 и CD106 (VCAM-1) (Sigma-Aldrich) и оставили в темноте на 20 минут. Далее клетки отмывали центрифугированием (10 минут при 600g) в ФБД-БСА и инкубировали с ФИТЦ-мечеными козьими антителами к иммуноглобулинам мыши (Sigma-Aldrich) в течение 30 минут. После повторной отмывки ФБД-БСА клетки ресуспендировали в растворе FACS 54 Flow, фиксировали раствором CellFix (Becton Dickinson) анализировали на проточном цитометре FACS Calibur с использованием программного обеспечения CellQuest (Becton Dickinson). Гистограммы строили, анализируя 10^3 в каждом образце.

2.2.4.Морфологические методы исследования.

Материалом для морфологического исследования служили интактные и варикозно-расширенные вены 15 пациентов. Забор производили *in vivo* в стерильных условиях во время аортокоронарного шунтирования (АКШ) (в качестве контроля и количестве 5 штук) и при комбинированной флебэктомии нижней конечности – 10 образцов. Материал помещали в специальную щадящую среду-фосфатный буфер Дульбекко (ФБД). Окраску осуществляли в условиях ФГБУ «Российского кардиологического научно-

производственного комплекса» МЗ РФ, фиксацию на предметное стекло с последующим фотографированием производили в отделении патологической анатомии ФГБУ «Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова Минздрава России».

Используемые химические реактивы: глутаровый альдегид гистологической чистоты, 25 % водный раствор какодилат натрия, нитрат серебра, одно- и двузамещенный фосфат натрия – Merck (Германия); среда 199 и раствор Эрла – НИИ Полиомиелита (Россия); фотографический проявитель и нейтральный фиксаж готовили по рецептуре D19 и D105 (Kodak) из реактивов отечественного производства (Реахим).

Импregnация межклеточных контактов: после забора вен у пациента, материал отмывали от крови средой 199. Сосуд разрезали вдоль. После дополнительной отмывки средой 199 сосуд фиксировали в течение 10 минут 2,5 % раствором глутаральдегида (ГА) на 0.1 М какодилатном буфере pH 7.2–7.4. Окрашивание межклеточных контактов проводили 0.1 % водным раствором нитрата серебра. Избыток красителя удаляли быстрой промывкой дистиллированной водой, после чего препарат заливали раствором ГА еще на 15-30 минут. Для визуализации "серебряных линий" применяли фотографическую обработку: препарат обрабатывали фотографическим проявителем (1-2 минуты), отмывали проточной водой и фиксировали в нейтральном фиксаже (5-10 минут). После отмывки, препарат вновь заливали раствором ГА (на фосфатном буфере) и оставляли на 2-3 часа для дофиксации.

Затем с препарата сосуда отделяли адвентицию с остатками соединительной ткани. Для приготовления постоянного гистологического препарата целый сосуд или его отдельные фрагменты монтировали эндотелием вниз на предметное стекло, заключали в синтетическую монтирующую среду Bio Mount серии 05BM500 фирмы Bio-Optica (Италия), накрывали покровным стеклом и помещали под груз до полного застывания

заливочной среды. Полученные препараты хранили при +4°C (без видимой потери качества изображения до 10-15 лет).

Оценка морфологических изменений проводилась на световом оптическом уровне при увеличении $\times 100$, на микроскопе Axio Scope.A1 Carl Zeiss с камерой AxioCam ERc 5s с полным использованием диапазонов их разрешающей способности. Используемая методика приготовления данных препаратов обладает рядом преимуществ: применением фотографической обработки для визуализации изображения практически вдвое сокращает время изготовления препаратов, позволяет получить высокий контраст межклеточных контактов, исследовать точную локализацию и ориентацию выбранного участка, достаточное быстрое фотографирование и изготовление иллюстративного материала, в том числе, для последующего морфометрического анализа.

2.2.5. Методы статистического анализа.

Результаты клинических и лабораторных исследований выражали в размерности Международной системы единиц и вносили в базу данных. Статистический анализ цифрового материала проводили на персональном компьютере с помощью пакета программ «Statistica for Windows» 6.0 и Microsoft Office Excel с использованием парного двухвыборочного t-теста для средних. Статистически значимыми различия считались при $p < 0,05$. Данные представлены в виде M – среднее значение, m – стандартная ошибка.

ГЛАВА 3. ДИАГНОСТИКА ЭД ПРИ ВАРИКОЗНОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ ВЕН НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ.

3.1. Участие форменных элементов крови в повреждении сосудистой стенки вен, изменения в системе гемостаза у пациентов с варикозной болезнью.

Морфологический состав крови в различных сосудах не одинаков. Однако нормальное сосудистое русло представляет собой стабильную и стресс-устойчивую систему. У здорового человека при гематологическом исследовании крови верхних и нижних конечностей не должно быть выраженных различий по количественному и качественному составу.

Нарушение кровотока, наличие флебогипертензии при ХВН ведет к гипоксии, а, следовательно, к ЭД, проявляющееся в экспрессии на его поверхности специфических адгезивных молекул с последующей активацией лейкоцитов и запуску целого каскада реакций. Снижение количества лейкоцитов в крови, полученной из варикозных вен, является одним из объективных признаков лейкоцитарно-эндотелиального взаимодействия (рис. 2).

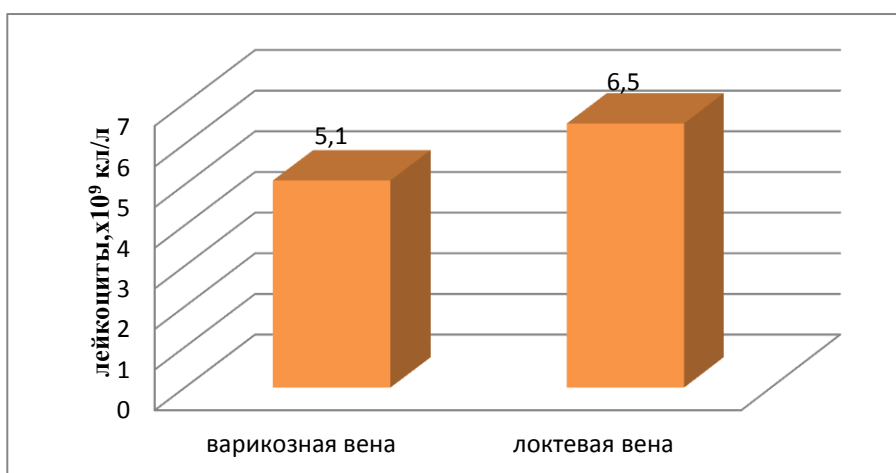


Рис. 2. Количество лейкоцитов в образцах крови из варикозной (n=30) и локтевой вен (n=30) ($p < 0,05$).

Отмечено, что у 95% пациентов выявлено превышение количества лейкоцитов в крови, полученной из кубитальной вены. Разница составила $1,4 \pm 0,11 \times 10^9/\text{л}$ лейкоцитов ($M \pm m$) ($p < 0,05$). При соотношении этого количества с уровнем лейкоцитов в периферической крови из кубитальной вены, разница составила $9,1 \pm 1,9\%$ ($M \pm m$) ($p < 0,05$).

Около 75% всего лейкоцитарного пула составляют нейтрофилы. При повреждении тканей, уже в течение нескольких минут нейтрофилы активируются, фиксируются к эндотелию сосудов и выходят в паравасальное пространство. В нашем исследовании количество нейтрофилов в образцах крови, забранной из варикозной вены, оказалось меньше $54,9 \pm 7,8\%$ ($M \pm m$), по сравнению с образцом крови из локтевой вены $56 \pm 8,4\%$ ($M \pm m$) ($p < 0,05$) (рис.3). Это можно объяснить тем, что в условиях гипоксии в варикозной вене происходит хемотаксис нейтрофильных лейкоцитов из крови к ЭК в пристеночное и паравасальное пространство с помощью селектинов, располагающихся, как на поверхности нейтрофилов, так и ЭК. Далее, после перемещения нейтрофилы прочно фиксируются к эндотелию с помощью интегринов, контактируя с эндотелием, активированные нейтрофилы секретируют множество биологически активных субстанций, возникает сокращение эндотелиальных клеток с образованием между ними промежутков. Вследствие этого осуществляется миграция нейтрофилов из сосудистого русла в периваскулярное (интерстициальное) пространство. Перемещённые лейкоциты становятся главным клеточным компонентом острой воспалительной реакции венозной стенки. Лейкоцитарно-эндотелиальная реакция может приводить к нарушению регионального кровообращения и микроциркуляции.

При исследовании также обнаружена тенденция к более высокому количеству лимфоцитов в системном кровотоке ($35,5 \pm 8,9\%$, ($M \pm m$)) по сравнению с кровью, взятой из варикозной вены голени ($34,03 \pm 7,1\%$, ($M \pm m$)) (рис.3), что явилось статистически достоверным показателем ($p < 0,05$). Полученные результаты, можно объяснить тем, что в воспалительный

процесс при ХВН обязательным компонентом вовлекаются несколько типов иммунокомпетентных клеток, прежде всего, это моноциты, Т- и В-лимфоциты. Вследствие чрезмерной экспрессии на их поверхности молекул адгезии сосудистых клеток (VCAM-1) происходит их прилипание к активированным ЭК. Ключевая роль в воспалении венозной стенки принадлежит моноцитам/макрофагам. Они составляют до 10% всех лейкоцитов, входят в клеточную линию-систему моноклеарных фагоцитов, секретирующих более 100 биологически активных веществ.

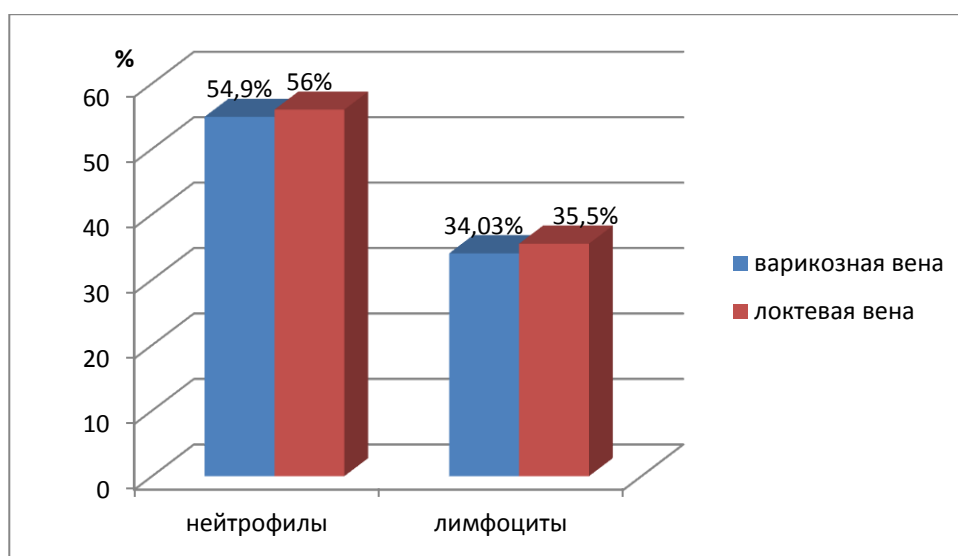


Рис. 3. Распределение клеточных элементов лейкоцитарного пула в образцах крови из варикозной (n=30) и локтевой вен (n=30) ($p < 0,05$).

Мы наблюдали снижение количества моноцитов в крови варикозных вен ($6,3 \pm 2,4\%$, ($M \pm m$)), по сравнению с кровью из локтевой вены ($7,33 \pm 2,2\%$, ($M \pm m$)), ($p < 0,05$) (рис.4). Это может быть обусловлено тем, что при неблагоприятных условиях (гипоксия, ухудшение кровотока и т.д.) эндотелий варикозных вен становится инициатором (или модулятором) многих патологических процессов, приводя в данном случае к сдвигу системы моноцит/макрофаг в сторону усиленной дифференциации моноклеарных фагоцитов с их последующим функциональным перераспределением. Таким образом, эндотелиальные молекулы адгезии, специфически и прочно связываясь с моноцитами и лимфоцитами крови,

являются основой последующей дифференцированной миграции этих клеток под влиянием специфических факторов (MCP-1, фактора некроза опухоли – ФНО-α) в субэндотелиальное пространство сосудов.

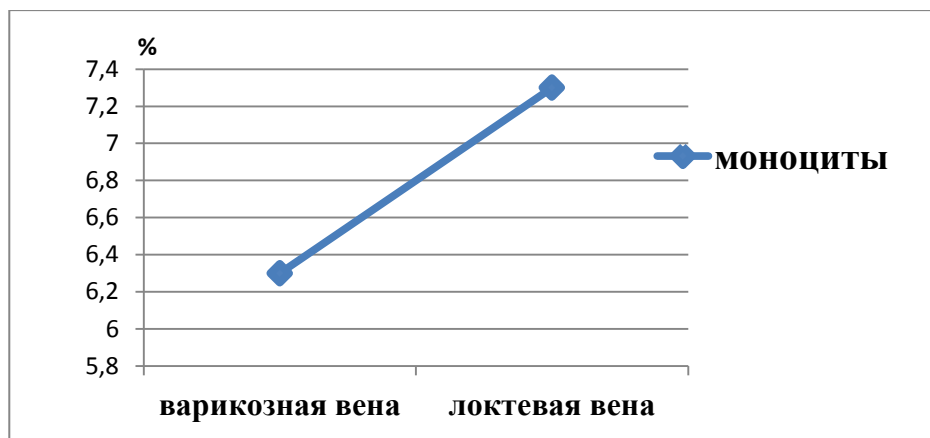


Рис. 4. Распределение моноцитов в образцах крови из варикозной (n=30) и локтевой вен (n=30) ($p > 0,05$).

Количество эозинофилов и базофилов практически не различались в образцах крови, забранной из варикозной и локтевой вен. Полученные результаты оказались статистически не достоверными ($p > 0,05$).

При дальнейшем исследовании полученных образцов крови, забранных из варикозной и локтевой вен, получены следующие результаты. Количество эритроцитов оказалось практически неизменно ($p < 0,05$).

Отмечено снижение концентрации гемоглобина в крови, забранной из варикозной вены ($126,4 \pm 17$ г/л, ($M \pm m$)), по сравнению с кровью из локтевой вены ($132,3 \pm 14,5$ г/л, ($M \pm m$)) (рис.5).

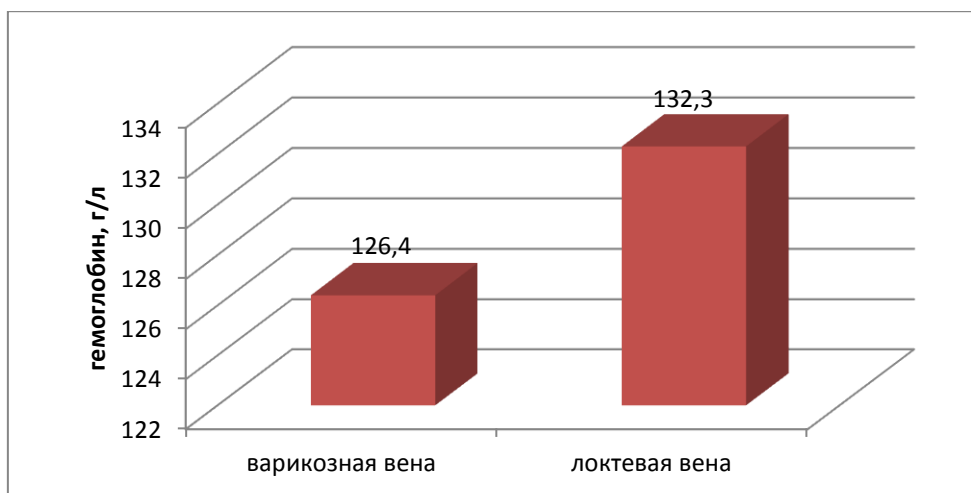


Рис.5. Показатели концентрации гемоглобина в зависимости от места забора (n=30) ($p < 0,05$).

Уровень гематокрита оказался достоверно ниже также в образце крови из варикозной вены (рис. 6). Учитывая, что гематокрит является показателем отношения всех форменных элементов (эритроциты, лейкоциты, тромбоциты) к общему объему крови (в данном случае), полученные результаты можно объяснить тем, что предположительно в варикозной вене лейкоциты и тромбоциты вовлечены в патогенетическую трансформацию стенки сосуда с нарушением функции эндотелия.

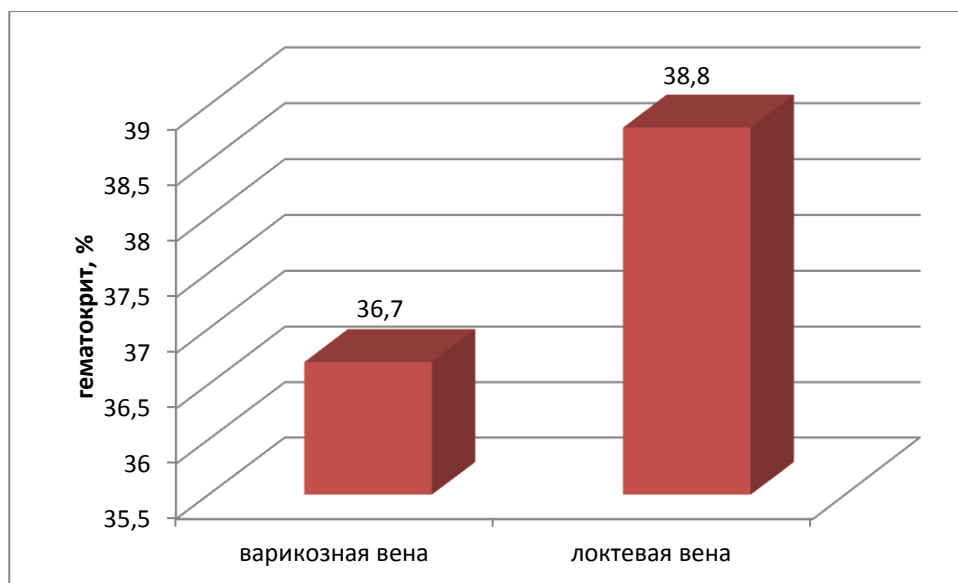


Рис.6. Результат определения содержания гематокрита в периферической крови верхней и нижней конечности (n=30) ($p < 0,05$).

Результаты по исследованию количества тромбоцитов в зависимости от места забора представлены на рис.7.

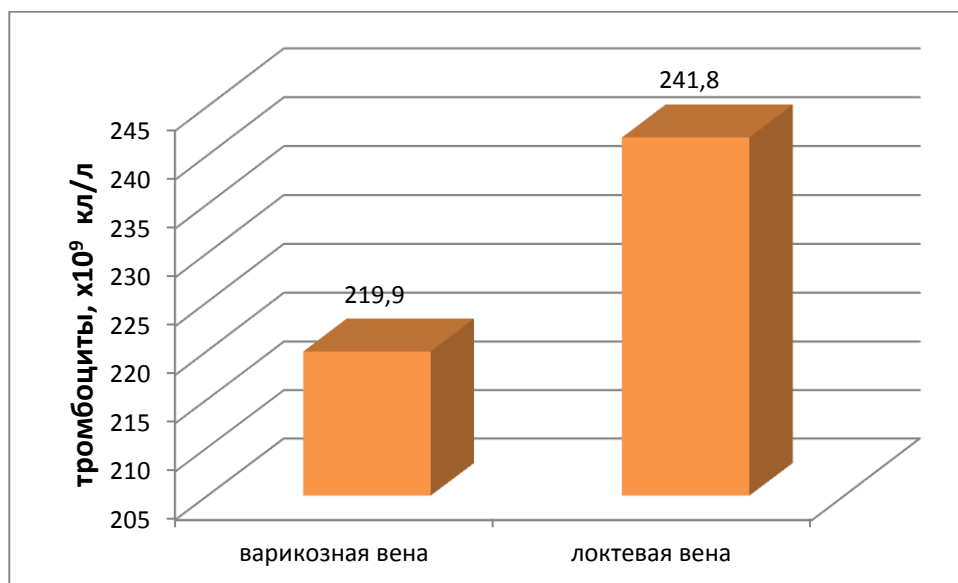


Рис.7. Различия в показателях уровня числа кровяных пластинок в образцах крови из варикозной и локтевой вен ($n=30$) ($p<0,05$).

Из рис.7 видно, что количество тромбоцитов в крови из варикозной вены ($219,9 \pm 68,4 \times 10^9$ кл/л, ($M \pm m$)) оказался также достоверно ниже, чем в крови из кубитальной вены ($241,8 \pm 69,8 \times 10^9$ кл/л, ($M \pm m$)). Вероятно, тромбоциты оказываются вытесненными из потока крови в сосуде и оказываются на его периферии, прилегая к эндотелиальному слою. При нарушении целостности стенки вен, десквамации сосуда обнажается субэндотелиальный слой, тромбоциты первыми получают сигнал. При этом эндотелий для поддержания нормальной структуры и функции стенки вен поглощает тромбоциты, тем самым выполняет эндотелий-поддерживающую функцию. Тромбоциты устраняют дефект, блокируют образование тканевого фактора и возвращают целостность сосуду, изолируя поврежденную часть от кровотока. Кроме того, полученные результаты исследования можно объяснить способностью эндотелия включать адаптационно-компенсаторные механизмы по предотвращению тромбоза. Однако не исключено, что при прогрессировании заболевания тромборезистентность эндотелия ослабевает.

и происходит срыв долговременной адаптации, что ведет к неизбежным тромбофлебитам и тромбозам пораженных вен нижних конечностей.

3.2. Результаты цитоморфологического исследования изменений эндотелия при варикозной трансформации вен.

В морфометрическом отношении в спокойном состоянии эндотелий вен представлен пластом, состоящим из отдельных клеток, границы которых импрегнируются нитратом серебра и напоминает однослойный плоский эпителий (рис. 8).

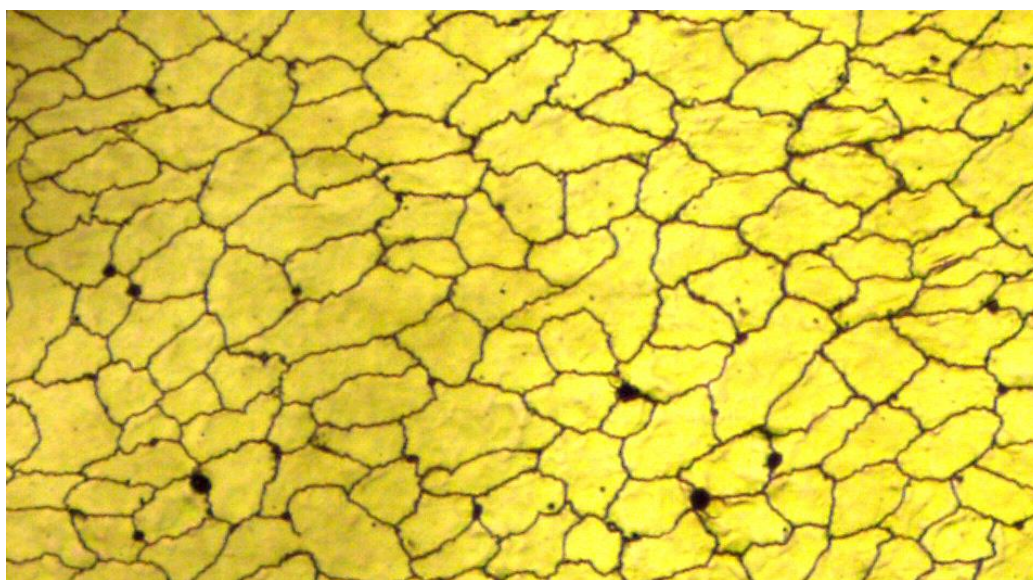


Рис.8. Гистологическая картина венозного эндотелия в норме (ствол БПВ) (окраска нитратом серебра, ув.х100).

По своей форме ЭК имели вид очень тонких пластинок неправильной формы и различной длины. ЭК имели полигональную форму, с сохраняющимися клеточными мембранами в виде септ. Наряду с клетками вытянутыми, веретенообразными с заостренными краями, имелись клетки с закругленными концами. Выявлены также клетки, в которые оказалась окрашена не только цитоплазма, но и ядра в виде шаровидного утолщения контура цитоплазмы.

В ходе дальнейшего электронно-микроскопического исследования, описанного ранее, было установлено, что на фоне выраженных

склеротических изменений венозной стенки эндотелиальный слой претерпевает ряд морфологических изменений. В первую очередь, речь идет о наличии гигантских клеток, специфической реорганизации эндотелиального пласта, его гетерогенности (рис. 9).

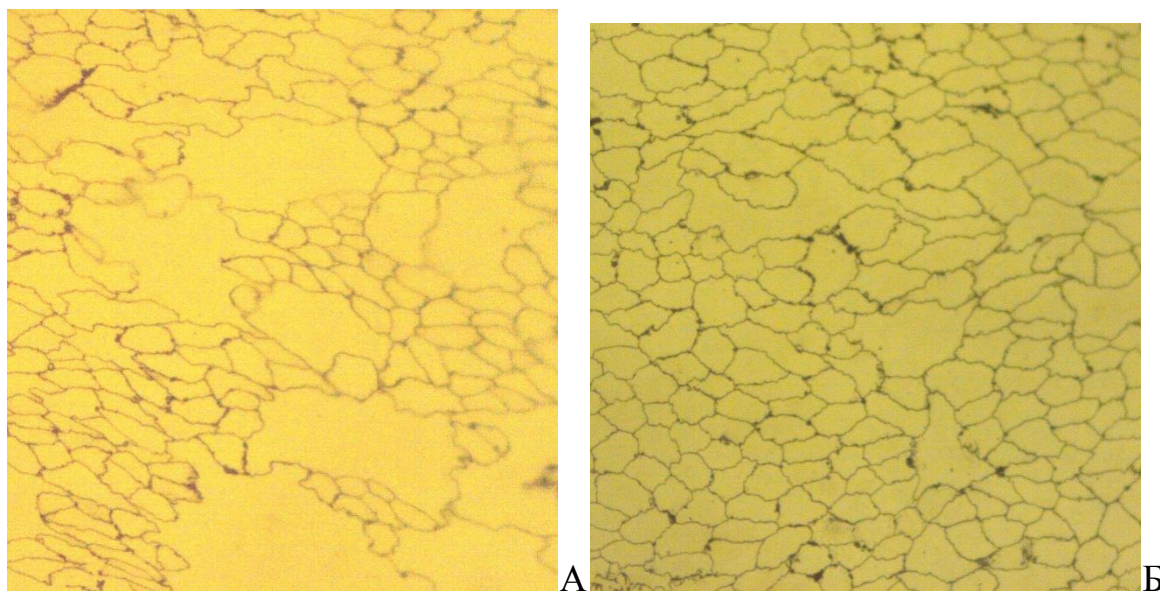


Рис.9. Гигантские активированные эндотелиальные клетки варикозной вены (окраска нитратом серебра, ув.х100). А – в вариксе; Б – стенка вены.

Можно предположить, что данные клетки участвуют регенерации внутренней оболочки сосудов и в фагоцитозе. Причем процентное соотношение гигантских клеток в каждом образце из рассмотренных 30 полей зрения на 220 ± 25 нормальной формы клеток составил 14 ± 5 %. Причем в некоторых полях зрения выявили клетки средней величины (предшественники десквамированных гигантских клеток), контуры которых напоминали «бусины нанизанные на нить» (рис. 10) (вероятнее всего это межклеточные контакты).

Наблюдалась отчетливая картина выпадения ЭК из монослоя, локальная десквамация эндотелиального слоя (рис. 11). Количество отсутствующих эндотелиальных клеток составило $15 \pm 2\%$ на 210 ± 23 клеток эндотелия.

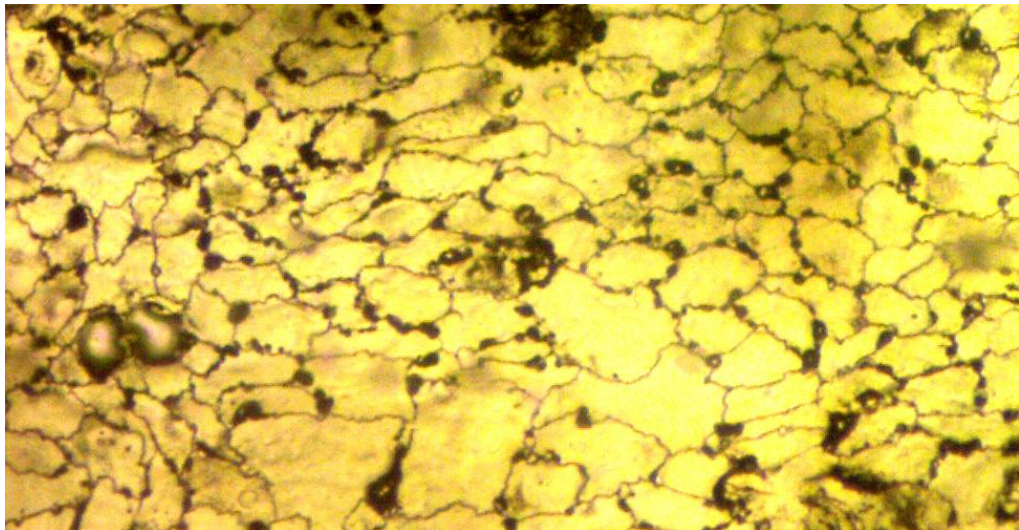


Рис.10. Предшественники десквамированных гигантских клеток венозного эндотелия (окраска нитратом серебра, ув.х100).

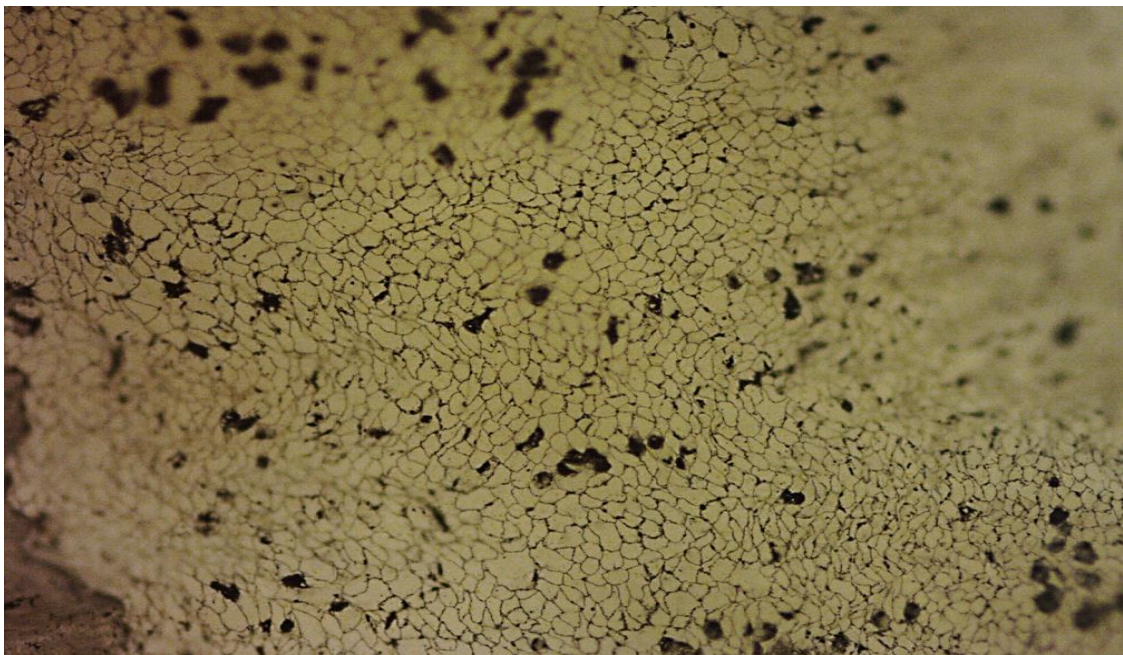


Рис.11. Десквамация эндовенозного эндотелия (окраска нитратом серебра, ув.х100).

Встречались участки десквамированных гигантских клеток(рис.12).

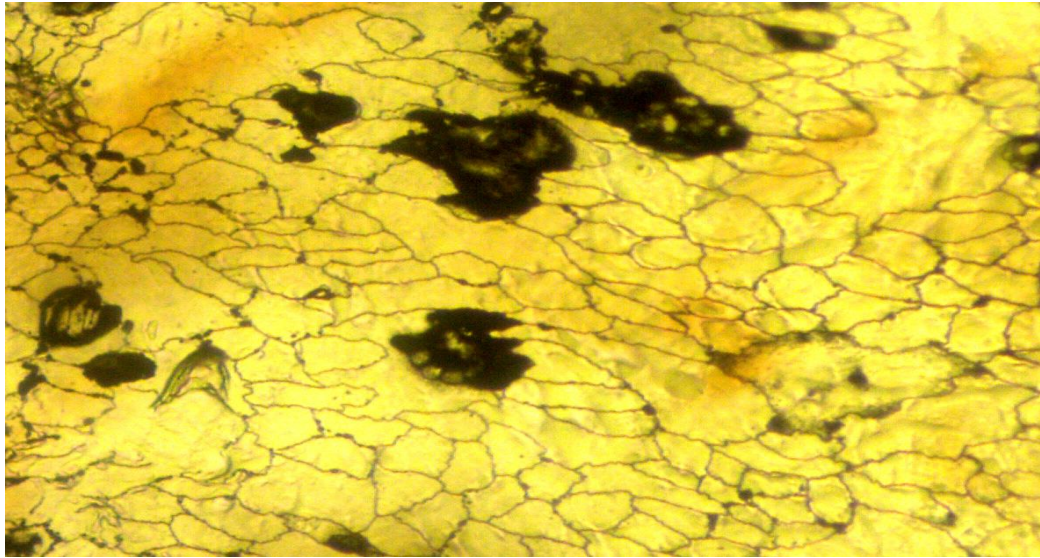
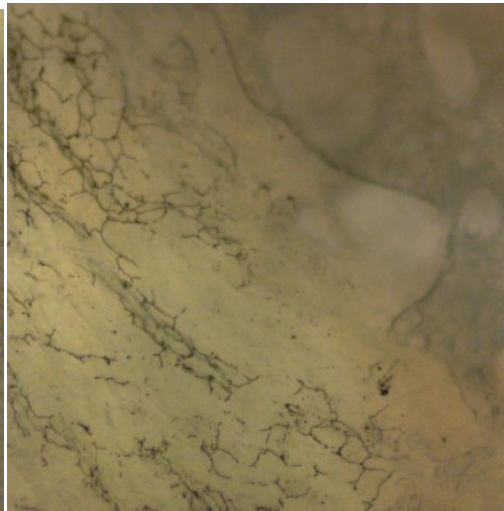


Рис. 12. Десквамация гигантских эндотелиальных клеток (окраска нитратом серебра, ув.х100).

В участках клапана эндотелиальная выстилка местами вообще лишена эндотелиального пласта или представлена остатками разорванных клеток(рис. 13).ЭК, располагающиеся на стенке вен, тот час же за клапанным синусом, имели ветереенообразную вытянутую форму, среди них также встречались гигантские клетки (рис.14).



А



Б

Рис.13. Эндотелий клапана варикозно расширенной вены (окраска нитратом серебра, ув.х100): А-в венозномклапане, Б-при переходе клапанного синуса на стенку вены.

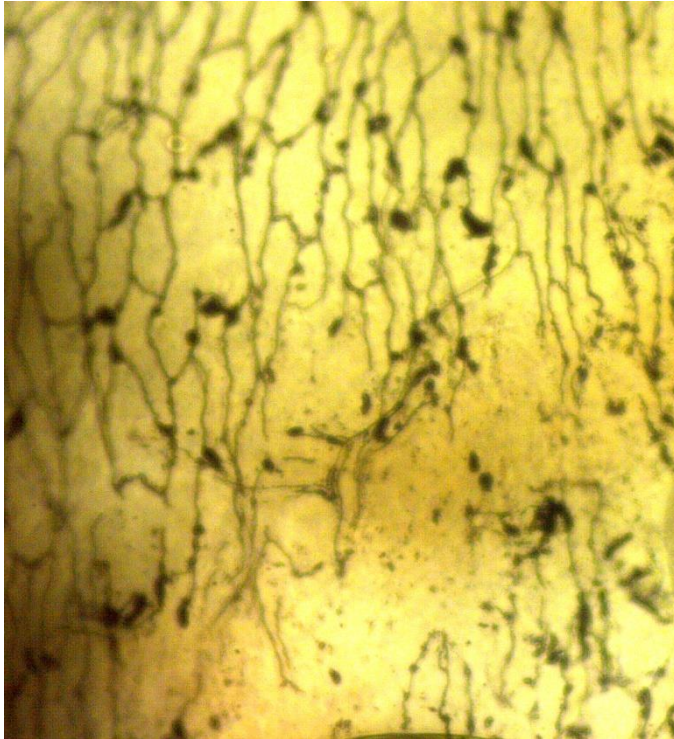


Рис.14. Ветеренообразные ЭК венозной стенки, располагающиеся под клапанном синусом (окраска нитратом серебра, ув.х100).

Удалось запечатлеть архитектуру выстраивания ЭК в зависимости от тока крови и клапанных структур (рис.15).

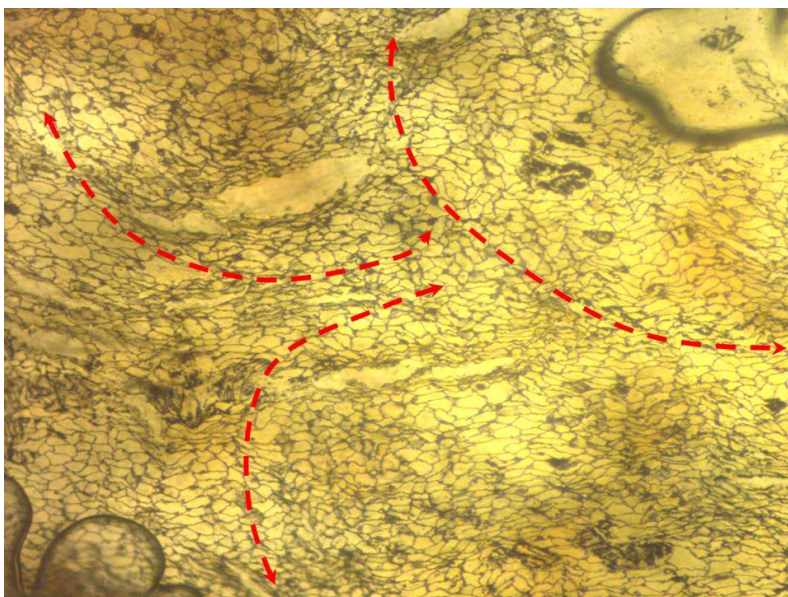


Рис.15. Направления расположения и выстраивания ЭК в зависимости от тока крови и клапанных структур (окраска нитратом серебра, ув.х100).

Нарушение целостности эндотелиального пласта, отсутствие клеток или наличие их следов, продемонстрированное в исследовании можно объяснить особенностями патогенеза ВБВНК, а именно: воздействием гипертензии, которая ведет к растяжению как стенки вен, так и венозных клапанов; возникновением рефлюкса с последующим его быстрым возрастанием, приводящим к патоморфологической деформации створок клапанов; нарушением кровотока; нарастанием флебогипертензии; вовлечением в процесс каскада воспалительных реакций, что неизбежно приводит к гибели ЭК, как локализующихся на венозных клапанах (в первую очередь), так и на стенке вен.

3.3. Сравнительная характеристика маркеров дисфункции эндотелия в зависимости от места забора крови.

В физиологических условиях в свертывающей системе крови уравновешены процессы активации и торможения, в результате сохраняется жидкое состояние крови. При патологии происходит активизация всех этих процессов, уменьшение продукции гепарина и активаторов фибринолиза, что приводит к снижению активности антисвертывающей системы гемостаза с образованием тромбов в просвете вен.

Дисфункция эндотелия при варикозной болезни вен нижних конечностей нарушает способность клетки к адекватному участию в процессах свертывания и фибринолиза.

Результаты исследования образцов крови, забранных из варикозной и кубитальной вен, полученных на анализаторе TEG® 5000 представлены в табл.1.

По результатам исследования все показатели тромбоэластограммы были в пределах нормы. При этом максимальная амплитуда (МА),

характеризующая максимум динамических свойств соединения фибрина и тромбоцитов, в образце крови из варикозной вены была ниже, чем в из локтевой вены. Для объяснения этого факта следует отметить, что эндотелий сосудов обладает высокой тромборезистентностью и играет важную роль в поддержании жидкого состояния крови и предупреждении тромбогенных осложнений при различных заболеваниях. Это обеспечивается способностью эндотелия синтезировать мощный ингибитор агрегации тромбоцитов – простациклин, основной физиологический антикоагулянт – антитромбин III, ингибитор фибринолиза – активатор тканевого типа, а также удалять из кровотока активированные факторы свертывания, их комплексы и продукты их протеолиза. Вследствие ЭД при ВБВНК происходит нарушение этих процессов и защитная функция эндотелия ослабевает. Нами наглядно показано, что локально в варикозной вене включены все компенсаторные механизмы эндотелия и функциональная активность эндотелия выше, чем в кубитальной вене. Интерпретируя полученный результат, оказалось, что показатели агрегации тромбоцитов и количество образовавшегося фибрина достоверно ниже в варикозной вене. Время с момента начала образования сгустка до достижения фиксированного уровня прочности свертка (K) хотя и выше в варикозной вене, но процесс растворения кровяного сгустка (лизис) оказывается быстрее по времени идет в пораженной вене, что доказывает компенсаторную активность эндотелия вены.

Таблица 1.

Характеристики свертывающей системы из различных образцов крови (варикозной и локтевых вен) по результатам тромбоэластограммы.

n=30	<i>Варикозная вена</i>	<i>Локтевая вена</i>	<i>Норма</i>
R(min)	5,35±1,6	4,87±1,66	2-8
MA(mm)	63,4±4,4*	65,11±5,4*	50-69
LY30(%)	0,3±0,1	0,48±0,2	0-8
K(min)	1,81±0,7*	1,33±0,45*	1-3
Angle(del)	69,42±4,46*	64,44±4,7*	55-78

*-p<0,05

Анализируя результаты исследования, выявлено увеличение скорости роста фибриновой сети и повышенный уровень фибриногена в плазме(Angle)в варикозно-расширенной вене. Это достаточно патогномично для генерализованного воспалительного процесса, происходящего в пораженной вене у пациентов с ВБВНК. Данный факт доказывает увеличенное время с момента, когда образец был помещен в анализатор до момента образования первых нитей фибрина(R), в варикозной вене. Это еще раз подтверждает нарушение функциональной активности эндотелия и наличие очага воспаления в ней.

В ходе исследования также проведена работа по сравнению биохимических маркеров непосредственно в варикозной и локтевой венах одного кровеносного русла. Результаты представлены в табл.2

Существенных различий в концентрациях Р-и Е-селектинов, молекулы межклеточного взаимодействия VCAM-1, тканевого плазминогена и эндотелина-1обнаружено не было. Количество циркулирующих эндотелиальных клеток в пораженной вене нижней конечности оказалось выше по сравнению с локтевой, что еще раз подтверждает выраженность локального патологического процесса при варикозной трансформации вен и доказывает высокую значимость данного маркера эндотелиальной дисфункции. Однако, как оказалось, забор образцов крови для исследования дисфункции эндотелия не является принципиальным.

Таблица 2.

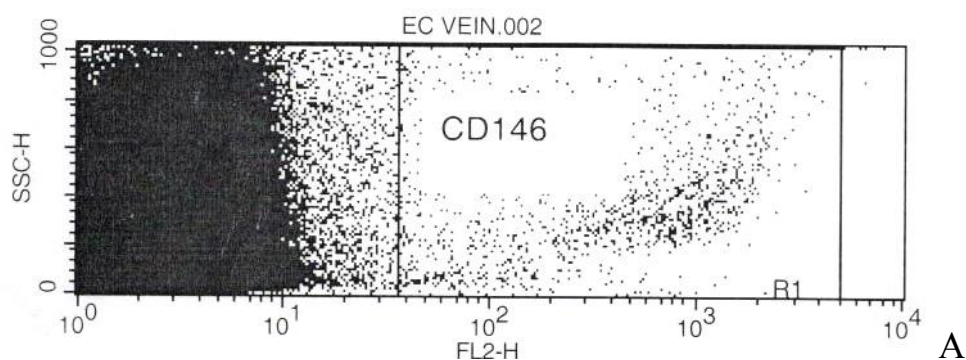
Биохимические маркеры ЭД до лечения в образцах крови из варикозной и локтевой вен у больных ВБВНК (n=42).

n=42	Варикозная вена	Локтевая вена
ЦЭК, клеток $\times 10^4/\text{л}$	11,6 $\pm$ 5,2*	8,2 $\pm$ 3,4*
Р-селектин, нг/мл	214,6 $\pm$ 61,2*	207,9 $\pm$ 57,8*
Е-селектин, нг/мл	55,6 $\pm$ 11,9*	52,9 $\pm$ 13,3*
VCAM-1, нг/мл	383,62 $\pm$ 119,6	379,1 $\pm$ 164,9
t-РА, нг/мл	3,7 $\pm$ 1,3	3,18 $\pm$ 1,24
Эндотелин-1, fmol/ml	2,86 $\pm$ 0,9	2,08 $\pm$ 1,12

*- $p < 0.05$

3.4. Иммуногистохимический анализ функциональной активности эндотелия варикозно расширенных вен нижних конечностей.

Известно, что основными участниками нарушения взаимодействия эндотелиоцитов с клетками периферической крови являются молекулы клеточной адгезии, а отличительной особенностью неактивированного эндотелия является их отсутствие (за исключением ICAM-1, -2, PECAM-1) на клеточной поверхности. В нашем исследовании был проведен анализ экспрессии молекулы клеточной адгезии VCAM-1. Было установлено, что контрольные образцы не содержали клеток, экспрессирующих на своей поверхности VCAM-1. При иммуногистохимическом анализе исследуемой вен, пораженных варикозной болезнью, было отмечено появление клеток, экспрессирующих на поверхности молекулу клеточной адгезии семейств иммуноглобулинов VCAM-1. Результаты гистохимического окрашивания были подтверждены методом проточной цитометрии (рис. 16).



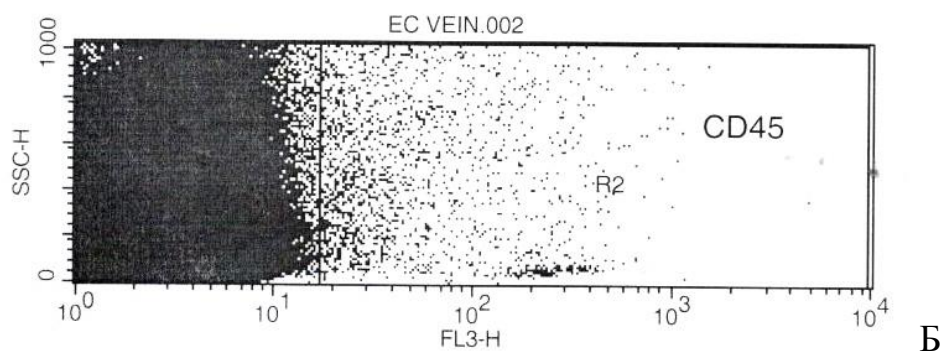


Рис.16. Результаты проточной цитометрии в варикозной вене. А- распределение эндотелиоцитов (маркер CD146); Б- распределение лейкоцитов (маркер CD 45).

Маркер CD146 характеризует нормальное распределение эндотелиоцитов, CD 45 распределение лейкоцитов.

Таким образом, наблюдаемая адгезивность эндотелия пораженной вены, выявленная экспрессия молекулы клеточной адгезии, является еще одним доказательством наличие воспалительного момента в патогенетическом формировании ХВННК(Рис.17).

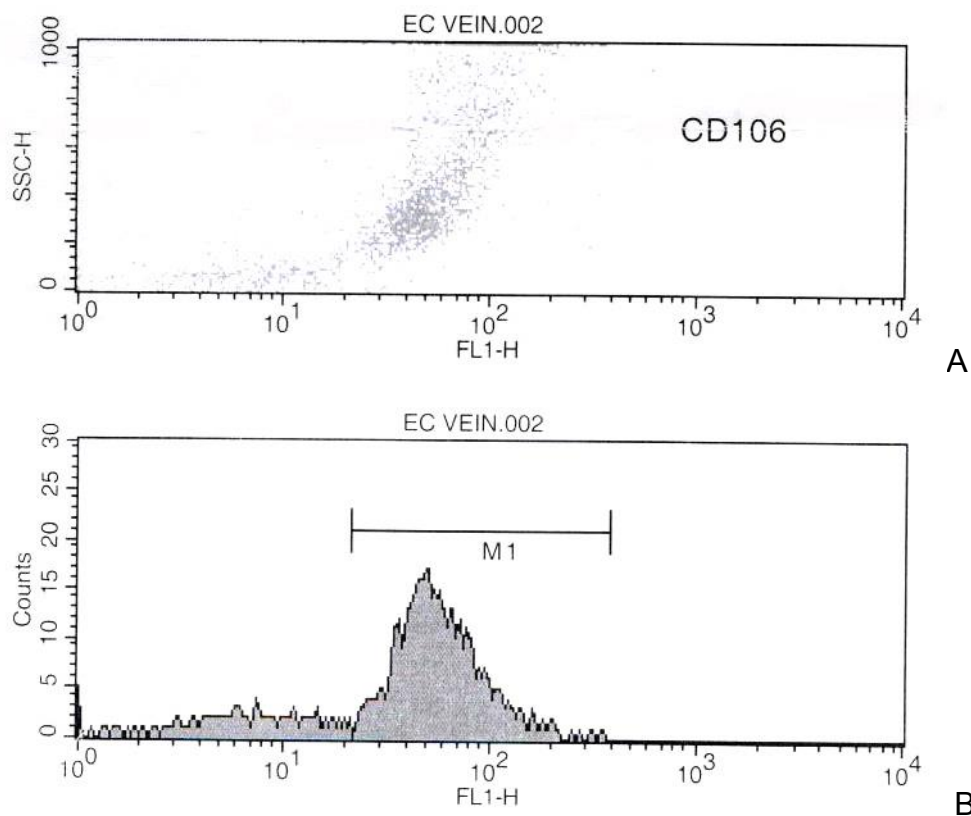


Рис.17. Содержание молекулы межклеточной адгезии (VCAM-1) (маркер CD 106): А-распределение клеток цитометром; Б- графическое изображение.

Маркер CD 106 характеризует распределение межклеточной молекулы адгезии VCAM-1 и показывает наличие воспалительного процесса в активированном эндотелии.

Таким образом, анализ современных публикаций, посвященных проблеме ВРВНК, в сопоставлении с результатами нашего исследования показывают, что патогенетические механизмы развития заболевания затрагивают многие аспекты межклеточных взаимодействий. Между тем, основные участники варикозной трансформации на уровне сосудистой стенки остаются неизменными. Это ЭК, гладкомышечные клетки и клетки гематогенного происхождения. Именно они определяют нормальное функционирование сосудистой стенки и развития патологического процесса в ней.

Полученные результаты свидетельствуют о подтверждении гипотезы о возможном участии лейкоцитарного звена в патогенезе варикозной трансформации венозной стенки у больных ВБВНК и формировании т.н. «лейкоцитарной ловушки» на уровне варикозно измененных венозных сегментов. Результаты цитоморфологического исследования демонстрируют «поломку» в системе эндотелиальной выстилки вены. Экспрессия молекулы адгезии VCAM-1 индуцируется в области воспаления и обеспечивает точную настройку миграции лейкоцитов сквозь эндотелий. Это доказывает, что в развитии ВБВНК ключевую роль играет воспаление на фоне функционально измененного и активированного эндотелия.

Глава 4. ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ЛЕЧЕНИЯ НА ДИНАМИКУ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЭНДОТЕЛИЯ.

Исследование эффективности влияния комплексного лечения на функциональное состояние эндотелия проведено у 92 больных с ВБВНК. Эти пациенты сформировали группу больных, перенесших хирургическое вмешательство по поводу ВБВНК. В зависимости от вида оперативного вмешательства больные были разделены на две подгруппы. В 1 подгруппу (n=50) включили пациентов, перенесших комбинированную флебэктомию (ФЭ), во 2-ю (n=42) пациентов – эндовенозную лазерную облитерацию (ЭВЛО) поверхностных вен нижних конечностей. Количество здоровых добровольцев составило 30 человек (контрольная группа). В до- и послеоперационном периодах все пациенты получали медикаментозную терапию из группы флавоноидов, основным составляющим компонентом которых были кверцетин-глюкуронид и изокверцетин. Сравнительная характеристика биохимических показателей ЭД в до- и послеоперационном периодах представлены в табл. 3.

При анализе полученных результатов выявлено существенное изначальное повышение уровня ЦЭК до $7,89 \pm 2,7$ клеток $\times 10^4/\text{л}$ ($M \pm m$) и $7,2 \pm 2,1$ клеток $\times 10^4/\text{л}$ ($M \pm m$) в двух подгруппах соответственно. После оперативного вмешательства на 8-9 сутки наблюдали возрастание этого

показателя до $10,8 \pm 4,3$ клеток $\times 10^4/\text{л}$ ($M \pm m$) в 1 подгруппе и $9,6 \pm 3,2$ клеток $\times 10^4/\text{л}$ ($M \pm m$) во 2 подгруппе ($p > 0,05$). Достоверные различия между подгруппами отсутствуют. Возрастание ЦЭК после операции, очевидно, связано с повреждением целостности эндотелиального пласта клеток, распространяющегося на другие вены.

Таблица 3.

Результаты определения биохимических маркеров ЭД у больных ВБВНК и обследуемых контрольной группы.

Сроки определения маркеров	Группа после хирургического лечения		Контрольная группа
	I подгруппа (ФЭ)	II подгруппа (ЭВЛО)	
ЦЭК, клеток $\times 10^4/\text{л}$			
Первичное определение	7.89 $\pm$ 2.7**	7,2 $\pm$ 2,1**	4,6 $\pm$ 1,1*
8-9 сут. после операции	10,8 $\pm$ 4,3**	9,6 $\pm$ 3,2**	
2 мес. после операции	5,02 $\pm$ 1,8**	4,3 $\pm$ 0,5**	
VCAM-I, нг/мл			
Первичное определение	367,2 $\pm$ 76,2**	357,6 $\pm$ 66,3**	249,2 $\pm$ 64,8*
8-9 сут. после операции	460,9 $\pm$ 74*,**	477,7 $\pm$ 77,4*,**	
2 мес. после операции	299,6 $\pm$ 83,8*,**	251,8 $\pm$ 86,9*,**	
P-селектин, нг/мл			
Первичное определение	191,9 $\pm$ 35,7**	187.7 $\pm$ 31.7**	159,9 $\pm$ 23,3*
8-9 сут. после операции	179,6 $\pm$ 19,9**	179,6 $\pm$ 19,9**	
2 мес. после операции	158,9 $\pm$ 32,3**	155,3 $\pm$ 17,4**	
E-селектин, нг/мл			
Первичное определение	48,5 $\pm$ 10,8**	46,5 $\pm$ 9,8**	40,5 $\pm$ 10,9*
8-9 сут. после операции	37,8 $\pm$ 3,6**	32,1 $\pm$ 2,9**	
2 мес. после операции	27,5 $\pm$ 4,2**	25,2 $\pm$ 3,8**	
t-PA, нг/мл			

Первичное определение	2,9±0,9	2,4±0,8	3,2±1,04*
8-9 сут. после операции	3,3±1,04	2,6±0,3	
2 мес. после операции	4±1,7	4,2±1,1	
Эндотелин-1, fmol/ml			
Первичное определение	1,9±1,24	1,7±1,3	2.27±0.6
8-9 сут. после операции	2,9±0,9	2,8±0,3	
2 мес. после операции	2,53±1,1	2,4±0,7	

*) $p < 0,05$ отличия между группами; **) $p < 0,05$ отличия в группе.

После проведенной консервативной терапии спустя 2 месяца количество ЦЭК практически соответствовало норме, отмечалось снижение данного показателя до $5,02 \pm 1,8$ клеток $\times 10^4/\text{л}$ в 1 группе и $4,3 \pm 0,5$ клеток $\times 10^4/\text{л}$ ($M \pm m$) ($p < 0,05$) (рис.18). Уровень эндотелемии по данным числа ЦЭК оказалось незначительно больше после ФЭ ($p > 0,05$), что можно объяснить техникой выполнения, травматизацией эндотелия при проведении зонда, слушивание ЭК и их дальнейшую свободную циркуляцию в кровеносном русле.

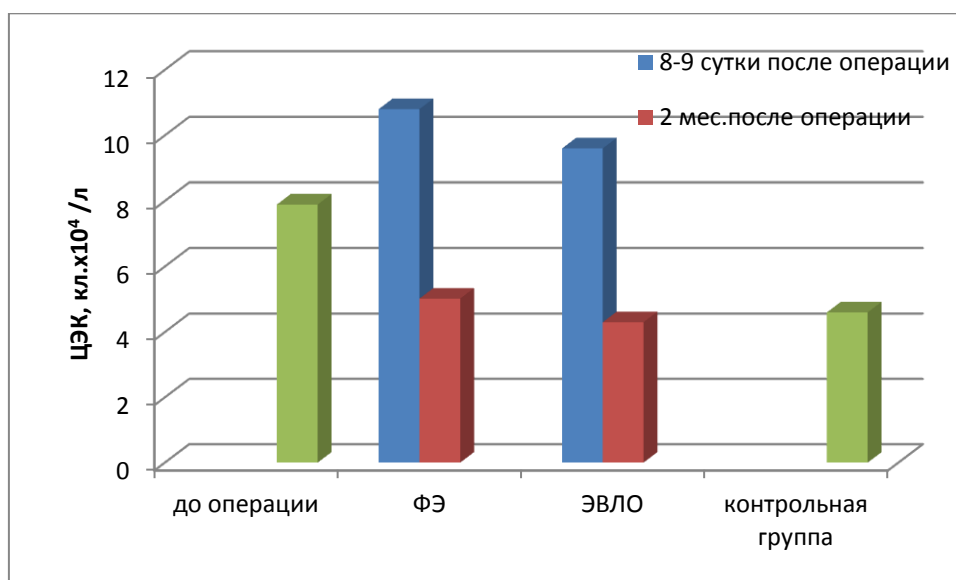


Рис. 18. Динамика ЦЭК у пациентов (n=92) ВБВНК в до- и послеоперационном периодах ($p < 0,05$).

Аналогичная картина наблюдалась в обеих группах с концентрацией VCAM-1. При изначально повышенном уровне $367,2 \pm 76,2$ нг/мл ($M \pm m$) в 1 подгруппе и $357,6 \pm 66,3$ нг/мл ($M \pm m$) во 2 подгруппе, после оперативного вмешательства обнаружен выраженный всплеск концентрации VCAM-1. После ФЭ до $460,9 \pm 74$ нг/мл ($M \pm m$) и после ЭВЛО – до $477,7 \pm 77,4$ нг/мл ($M \pm m$). Воспалительная реакция оказалась менее выражена после миниинвазивной операции, о чем говорят статистически достоверные более низкие показатели VCAM-1. Это делает лазерную облитерацию операцией выбора и доказывает ее преимущества над типичной комбинированной флебэктомией. Повышенная концентрация данного маркера после оперативного вмешательства также свидетельствует об усилении адгезии лейкоцитов на ЭК и является отражением послеоперационных изменений вследствие обширной травмы сосудистого русла. Спустя 2 месяца после проведенного комплексного лечения, включающего прием флеботропных препаратов показатели VCAM-1 в 2-х подгруппах значительно снизились, приблизились к значениям контрольной группы ($p < 0,05$). Следует отметить, что концентрация VCAM-1 у пациентов после ЭВЛО (2-я подгруппа) были достоверно ниже ($251,8 \pm 86,9$ нг/мл ($M \pm m$)), что еще раз подтверждает эффективность выбранного оперативного вмешательства (рис.19).

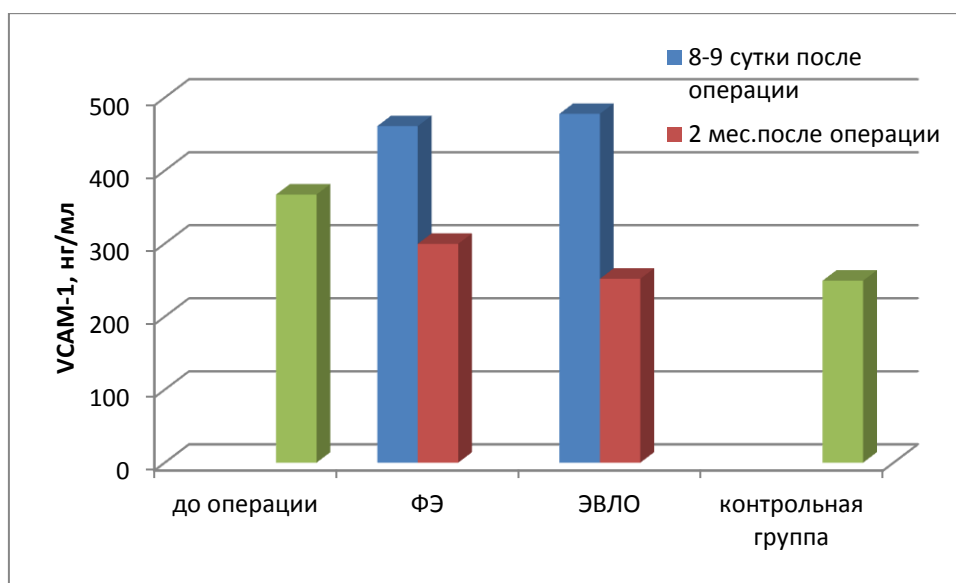


Рис. 19. Динамика концентрации VCAM-1 у пациентов ВБВНК(n=92) в до- и послеоперационном периодах ($p<0,05$) .

Концентрации Р- и Е- селектинов до лечения были изначально завышены по сравнению с контрольной группой ($p<0,05$). После проведенного оперативного вмешательства наблюдалась тенденция к снижению данных показателей. Статистически значимые различия между группами отсутствовали. Через 2 месяца консервативной терапии отмечалось снижение Р-селектина до значений контрольной группы и заниженные концентрации Е-селектина, что явилось хорошим прогностическим признаком (рис.20, 21).

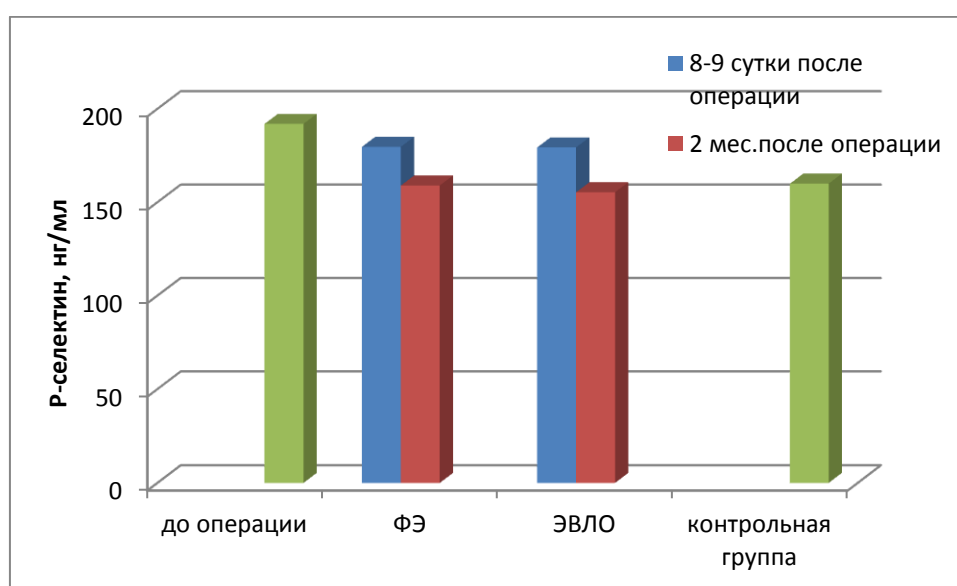


Рис.20. Изменение концентрации Р-селектина (нг/мл) у пациентов ВБВНК(n=92) в до- и послеоперационном периодах ($p<0,05$)

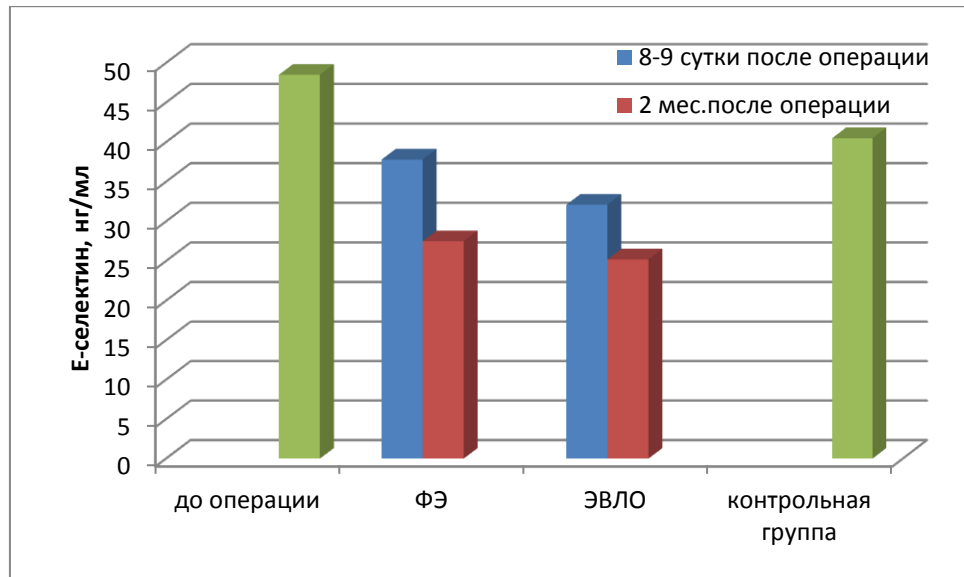


Рис.21. Изменение концентрации Е-селектина у пациентов ВБВНК(n=92) в до- и послеоперационном периодах ($p<0,05$).

Появление Р- и Е-селектинов на поверхности эндотелия происходит очень быстро, и также быстро снижается его уровень до базального в короткое время после стимуляции. Обеспечив начальную стадию каскада воспалительных реакций в эндотелии вен, как при самой варикозной болезни, так и в ответ на оперативное вмешательство, их количество снижается и начинается 2 фаза стойкой адгезии лейкоцитов, что произошло на 8-9 сутки после операции. Полученные результаты свидетельствуют о существенных изменениях, происходящих в эндотелиоцитах сосудистого русла при хирургической коррекции флебогемодинамики.

Разница в концентрациях эндотелина-1 и тканевого плазминогена (t-РА) в до- и послеоперационный периоды была не существенной ($p>0,05$). Однако их концентрации при первичном определении в обеих подгруппах оказались занижены по сравнению с контрольной группой. Это свидетельствует о сниженной функциональной активности эндотелия, угнетении активности свертывающей системы и преобладание механизмов вазодилатации над вазоконстрикцией.

Полученные в исследовании результаты проиллюстрированы в клинических примерах №1 и №2.

Клинический пример №1.

Больной К., 48 лет (и/б №1878), поступила в отделение сосудистой хирургии НМХЦ им.Н.И.Пирогова 09.02.10г., с жалобами на варикозно-расширенные вены на правой нижней конечности, боли, отеки правой нижней конечности, усиливающиеся к вечеру.

Считает себя больно около 17 лет, когда впервые отметил появление варикозно расширенных вен на правой нижней конечности. За медицинской помощью не обращалась, лечилась самостоятельно. Принимала флеботропные препараты, носил компрессионный трикотаж. Со временем последние 2 года отметила прогрессирование заболевания, появились отеки, боли в правой нижней конечности, количество варикозно расширенных вен увеличилось.

При поступлении общее состояние удовлетворительное. Диагноз подтвержден на основании физикальных данных и инструментального исследования. Пациентке выполнено ультразвуковое дуплексное сканирование вен нижних конечностей, на котором зафиксирован распространенный рефлюкс по БПВ правой нижней конечности (диаметр БПВ составил 1,5 см) (рис.22).

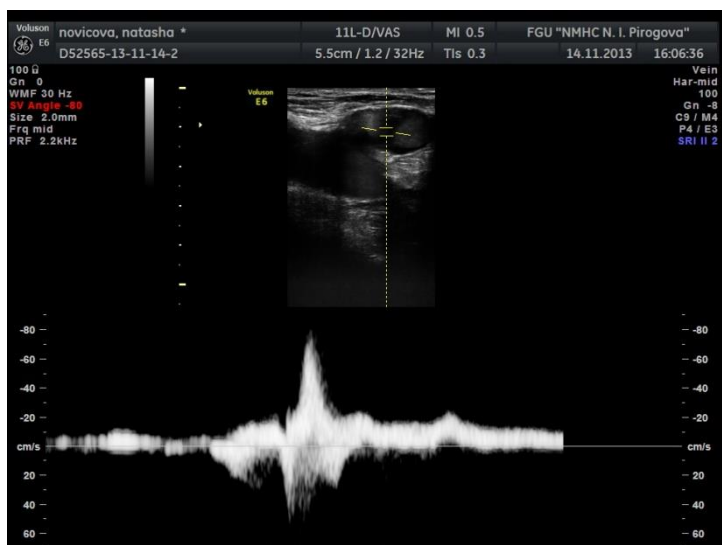


Рис.22 Ретроградный кровоток в большой подкожной вене в импульсном режиме.

При осмотре по внутренней поверхности бедра и голени визуализировались варикозно расширенные вены в бассейне БПВ на правой нижней конечности, ретикулярные вены в области внутренней поверхности н/З голени (рис.23).



Рис.23

10.02.10г выполнена операция – комбинированная флебэктомия в бассейне БПВ на правой нижней конечности. В до- и послеоперационном периодах выполнено лабораторное обследование на предмет оценки функционального состояния эндотелия. Результаты отражены в таб.4.

Таблица 4. Динамика ЦЭК и биохимических маркеров в до- и послеоперационных периодах (после ФЭ) у пациента с ВБВНК.

	До операции	8-9 сут. после операции	2 мес. после комплексного лечения
<i>ЦЭК, клеток $\times 10^4$/л</i>	12	17	5
<i>VCAM-1, нг/мл</i>	437	720	297
<i>P-селектин, нг/мл</i>	201	179	145
<i>E-селектин, нг/мл</i>	48	32	26

t-PA, нг/мл	2.6	2.7	3.2
Эндотелин-1, fmol/ml	2,1	3,1	2,8

Изначально наблюдалось повышенный уровень ЦЭК, VCAM-1, P- и E-селектинов, свидетельствующий о наличии ЭД венозного эндотелия. После операции наблюдался выраженный всплеск ЦЭК и VCAM-1, то есть вследствие травматизации и без того активированного эндотелиального пласта клеток, воспалительная реакция получила продолжение с новой силой. Это также привело к повышенному спазму сосудов, судя по повышению концентрации эндотелина-1 и угрозе тромбообразования (уровень тканевого плазминогена также повысился). В отдаленном периоде, спустя 2 месяца, после проведенной консервативной терапии и ношении компрессионного трикотажа 2 класса компрессии все показатели, кроме t-PA, вернулись к нормативным показателям, хотя риск тромбообразования сохранялся, что побудило нас дополнительно назначить дезагреганты.

Клинический пример №2.

Больной Г., 31 год (и/б №4728), поступила в отделение сосудистой хирургии НМХЦ им.Н.И.Пирогова 05.03.13г., с жалобами на варикозно-расширенные вен на правой нижней конечности, чувство тяжести, дискомфорта, зуд, отеки в правой нижней конечности.

Считает себя больной около 5 лет, когда впервые во время беременности отметила варикозно расширенные вены на левой голени. Заболевание прогрессировало, варикозная деформация на левой нижней конечности усилилась, появились варикозно расширенные вены на правой нижней конечности. Пациентка обратилась за медицинской помощью к хирургу-флебологу. Выполнена ЭВЛО БПВ на левой нижней конечности в сентябре 2012г. БПВ на правой нижней конечности признана состоятельной, показаний к операции не было. От склерозирования варикозно расширенных вен на правой н/к пациентка отказалась. В

последнее время стала отмечать ухудшение со стороны правой нижней конечности. Обратилась за медицинской помощью.

При поступлении общее состояние удовлетворительное. Выполнено УЗАС обеих нижних конечностей. Выявлен субтотальный рефлюкс по БПВ правой нижней конечности, несостоятельные перфорантные вены бедра и голени, варикозно расширенные притоки на внутренней поверхности голени. На основании физикальных данных, анамнеза и инструментального обследования установлен диагноз: Варикозная болезнь. Варикозное расширение вен в бассейне БПВ правой нижней конечности. СЕАР: С 2, S, Ec, As, p, Pr, 3, 17, 18, LI.

05.03.13г. выполнена операция: ЭВЛО БПВ правой нижней конечности, минифлебэктомия расширенных притоков, разобщение несостоятельных перфорантов бедра и голени.

В до- и послеоперационном периодах производили лабораторную оценку маркеров ЭД (ЦЭК, VCAM-1, P- и E-селектинов, t-PA и эндотелина-1).

Результаты продемонстрированы в табл.5.

Таблица 5. Маркеры ЭД у пациента с ВБВНК в до – и послеоперационном периодах (после ЭВЛО).

	До операции	8-9 сут. после операции	2 мес. после комплексного лечения
ЦЭК, клеток $\times 10^4$ /л	10	15	4
VCAM-1, нг/мл	338	637	257
P-селектин, нг/мл	197	178	155
E-селектин, нг/мл	49,3	38	27,5
t-PA, нг/мл	3,1	4,6	5,7
Эндотелин-1,	1,8	2,5	2,2

fmol/ml			
---------	--	--	--

Результаты оказались аналогичны результатам полученным в клиническом примере №2, однако нормализация функциональной активности эндотелия в данном случае судя по показателям, представленным в таб... произошла в лучшем виде. Все показатели были более приближены к нормативным значениям. Это же доминировало при оценке субъективных симптомов пациентки.

Проведенные исследования показали, что по степени выраженности рассмотренных маркеров можно судить об активности процессов варикозной трансформации вен, что позволяет своевременной проводить корректирующие мероприятия. У больных ВБВНК в послеоперационном и отдаленном периоде целесообразно проводить определение ЦЭК, VCAM-1, Р- и Е-селектинов, t-РА и эндотелина-1 с целью диагностики функционального состояния эндотелия, выраженности воспалительных процессов при варикозной болезни. Показатели ЭД перспективно использовать для контроля эффективности различных видов консервативного лечения ХВН.

Коррекция ЭД путем хирургического вмешательства в комплексе с эндотелиотропными препаратами вполне соизмеримо с оценкой основных маркеров ЭД.

Глава 5. ДИСФУНКЦИЯ ЭНДОТЕЛИЯ И ОСОБЕННОСТИ ЕЕ КОРРЕКЦИИ ПРИ РЕЦИДИВАХ ВАРИКОЗНОЙ БОЛЕЗНИ.

В рамках данного исследования было обследовано 52 пациента с «ложным» рецидивом ВБВНК, которые были подразделены на 2 подгруппы. В 1-ю подгруппу (n=32) вошли пациенты, которым были назначены лечебные и профилактические мероприятия, при этом большинство из них повторно оперированы в объеме минифлебэктомии, ЭВЛО или

склерооблитерации варикозно расширенных сегментов. Также эта категория пациентов продолжала ношение компрессионного трикотажа (2 класс компрессии) и курсовой прием флебопротектора. За пациентами, составляющими 2-ю подгруппу ($n=20$), также проводилось динамическое наблюдение (в этой группе повторное оперативное вмешательство не предпринималось в связи с нежеланием пациента, больные продолжали использование компрессионного трикотажа 2 степени, проводилась медикаментозная флеботропная терапия). С течением времени ($15\pm 3,5$ мес.) прогрессирование внутрикожного и подкожного варикоза произошло у 3 (9,4%) пациентов 1-ой и у 10 (50%) пациентов 2-ой подгруппы. Следует отметить достоверное нарастание ЦЭК во 2-й подгруппе, в то время как 1-й подгруппе на фоне флеботропной терапии этот показатель приблизился к нормативным значениям (табл.6).

Табл.6. Показатели ЦЭК в подгруппах с «ложным» рецидивом ВБВНК.

<i>Сроки определения ЦЭК, (клеток $\times 10^4$/мл)</i>	<i>I подгруппа</i>	<i>II подгруппа</i>	<i>Контрольная группа</i>
Первичное определение	$8,6\pm 1,1$	$7\pm 1,2$	$4,6\pm 1,1^*$
$9\pm 1,8$ мес.	$7,2\pm 1,3^*$	$11,5\pm 1,4^*$	
$15\pm 3,5$ мес.	$5,1\pm 1,4^*$	$10,5\pm 1,7^*$	

*) $p<0,05$

Полученные результаты позволили считать, что уровень эндотелемии по данным числа ЦЭК в периферической крови может использоваться как маркер дисфункции эндотелия у больных с рецидивом варикозной болезни.

Проведенные исследования показали, что лишь превышение этого показателя свыше 5×10^4 клеток/л крови следует считать достоверным проявлением повреждения эндотелия при заболеваниях периферических вен. По степени выраженности эндотелемии можно судить об активности процессов варикозной трансформации вен, что позволяет своевременно проводить лечебные корригирующие мероприятия. Показатель ЭД перспективно использовать для контроля эффективности лечения хронической венозной недостаточности и в частности, при рецидиве ВБВНК.

Всем пациентам данной группы с РВРВНК также было проведено исследование биохимических маркеров ЭД в различные сроки их лечения и динамического наблюдения. Сравнительная характеристика полученных результатов представленных маркеров исследуемых у пациентов с контрольной группой представлено в табл.7.

При анализе полученных результатов в двух подгруппах при первичном определении отмечено изначальное превышение уровня VCAM-1 ($488,6 \pm 27,4$ нг/мл ($M \pm m$) и $398,5 \pm 34,4$ нг/мл ($M \pm m$) в обеих группах соответственно ($p < 0,05$)) по сравнению с контрольной группой. Повышенная концентрация VCAM-1 свидетельствует о наличии воспалительного момента в стенке вен и активированных ЭК. При последующих определениях VCAM-1 спустя $9 \pm 1,8$ мес. ($M \pm m$) обнаружено снижение этого показателя в 1 подгруппе на фоне консервативной терапии ($p < 0,05$) и прирост в концентрации данного маркера во 2 подгруппе. Сохраняющийся высокий уровень VCAM-1 во 2 подгруппе является маркером прогрессирования ВБВНК и продолжающейся ЭД. С течением времени (через $15 \pm 3,5$ мес. ($M \pm m$)) прослеживалась аналогичная тенденция относительно этого биохимического показателя, причем в 1 подгруппе его концентрация составила $274,6 \pm 44,5$ нг/мл ($M \pm m$), что приблизилось к значению контрольной группы ($p < 0,05$).

Уровень Р-селектина в подгруппах по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$) аналогичным образом был завышен. Спустя время $9 \pm 1,8$ мес. и $15 \pm 3,5$ мес. ($M \pm m$) в 1 подгруппе наступало плавное снижение Р-селектина, что свидетельствует о восстановлении функциональной активности эндотелия. Во 2 второй группе данный показатель незначительно снизился спустя $9 \pm 1,8$ мес. ($M \pm m$) ($p > 0,05$) и опять увеличился через $15 \pm 3,5$ мес. ($M \pm m$), что говорит о наличии стойкого воспалительного очага в пораженной вене, ведущее к прогрессированию РВРВНК.

Уровень Е-селектина в плазме в этих подгруппах был, наоборот, ниже. Возможно, это обусловлено отсутствием полной активации эндотелия в условиях его повреждения и, как следствие, эндотелемии. Спустя $9 \pm 1,8$ мес. ($M \pm m$) и $15 \pm 3,5$ мес. ($M \pm m$) уровень исследуемого показателя оказался сопоставимым с контрольной группой. Как и Р-селектин, Е-селектин возникает в зоне воспаления, максимальная экспрессия возникает быстрее – через 4-6 часов и менее пролонгирована. После стимуляции, обеспечив начальную фазу адгезивного взаимодействия, Е-селектин протеолитически высщепляется с поверхности нейтрофилов. Именно поэтому концентрация этого трудно распознаваемого маркера в нашем исследовании оставалась практически неизменной.

Таблица 7.

Показатели биохимических маркеров эндотелиальной дисфункции в исследуемых подгруппах.

Сроки определения	I подгруппа	II подгруппа	Контрольная группа
VCAM-1, нг/мл			
Первичное определение	488,6±27,4 ^{***}	398,5±34,4 ^{***}	249,2±64,8 [*]
9±1,8 мес.	427,2±29,1 ^{**}	436,3±21,8 ^{**}	
15±3,5 мес.	274,6±44,5 ^{**}	411,2±33,4	
P-селектин, нг/мл			
Первичное определение	248,5±19,1 [*]	215,3±21,3 [*]	159,9±23,3 [*]
9±1,8 мес.	206,4±26,5 ^{**}	196,5±28,3	
15±3,5 мес.	165,3±16,6 ^{**}	201,8±27,3 [*]	

Е-селектин, нг/мл			
Первичное определение	39,2±6,9	37,9±8,8	40,5±10,9
9±1,8 мес.	39,1±8,2	39,2±9,7	
15±3,5 мес.	40,3±10,3	39,1±13,4	
t-РА, нг/мл			
Первичное определение	6,7±1,3	8,3±1,2 [*]	3,2±1,04
9±1,8 мес.	5,7±1,2	9,5±1,5 [*]	
15±3,5 мес.	4,9±1,4 ^{**}	9,7±1,2 [*]	
Эндотелин-1, fmol/ml			
Первичное определение	4,1±1,3 [*]	3,7±0,8 [*]	2.27±0.6
9±1,8 мес.	3,2±0,7	3,1±1,2	
15±3,5 мес.	2,3±0,7 ^{**}	3,8±0,6 ^{**}	

^{*}) p<0,05 отличия между группами

^{**}) p<0,05 отличия в группе

Как следует из представленной таблицы, выявлен также достоверно более высокий уровень тканевого плазминогена и эндотелина-1 как в 1-й, так и во 2-й подгруппах. Причем, значение tPA (тканевого плазминогена) было достоверно выше во 2-й подгруппе, что свидетельствует о повышенной опасности тромбообразования у пациентов этой подгруппы. В отдаленном периоде у пациентов 1 подгруппы наблюдалось достоверное снижение концентрации тканевого плазминогена и эндотелина-1, через 15±3,5 мес. (M±m) уровень tPA составил 4,9±1,4нг/мл (M±m) (p<0,05), концентрация эндотелина-1 приблизилась к значениям контрольной группы и составила 2,3±0,7fmol/ml (M±m). Содержание указанных маркеров ЭД во 2 подгруппе оказалась противоположной – наблюдалось умеренное негрубое их нарастание, что обусловлено приемом флебопротекторов и ношением компрессионного трикотажа.

Полученные в исследовании результаты проиллюстрированы в клинических примерах №3 и №4.

Клинический пример №3.

Больная Д., 46 лет (и/б №18912) госпитализирована в отделение сосудистой хирургии НМХЦ им.Н.И.Пирогова 23.12.09г. с жалобами на наличие «сосудистых сеточек», поверхностных расширенных вен, отеки, распирающие боли на правой нижней конечности.

Из анамнеза стало известно, что пациент страдает ВБВНК 20 лет, когда впервые стал отмечать проявление заболевания. Наследственностьотягощена (все по отцовской линии в семье страдали ВБВНК). В 2007 г. перенес комбинированную флебэктомию справа. Систематически принимал флеботропные препараты, носил профилактический компрессионный трикотаж.

При осмотре определялись послеоперационные рубцы в паховой области, в нижней трети бедра, верхней трети голени, рубец в области медиальной лодыжки правой голени. На бедре и голени – телеангиоэктазии и ретикулярные вены. При УЗАС установлено, что на передней поверхности бедра и медиальной поверхности голени имеются несостоятельные перфорантные вены диаметром до 0,8 см (рис.24).

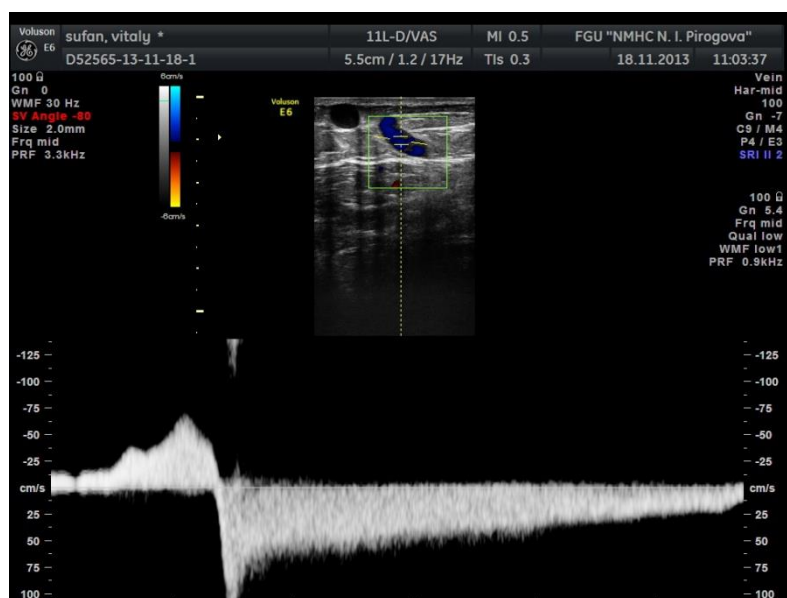


Рис.24 Ретроградный кровоток в перфорантной вене при компрессии окроножной мышцы.

Установлен диагноз: варикозная болезнь правой нижней конечности, рецидив заболевания. Состояние после операции: комбинированной флебэктомии справа (2007г.).CEAP: C 1,2,S, Ec, As, p, Pr, 1,18, LI .

24.12.09г. пациент оперирован. Под контролем УЗИ выполнена маркировка перфорантных вен. Под местной инфильтрационной анестезией выполнена минифлебэктомия расширенных притоков через отдельные проколы на бедре и голени, также произведена перевязка несостоятельных перфорантов надфасциально. Оставшиеся мелкие ретикулярные вены и телеангиоэктазии склерозированы в 2 этапа.

Послеоперационный период протекал без осложнений. Больная на 2-е сутки после операции выписана домой для дальнейшего амбулаторного наблюдения. Было рекомендовано ношение компрессионного трикотажа 2 класса компрессии в дневное время 2 недели и прием флебопротекторов в течение 2-х месяцев.

У данного пациента был произведен забор крови для определения ЦЭК и биохимических маркеров (VCAM-1, P- и E-селектинов, t-PA и эндотелина-1) в различные сроки: до операции, спустя 10 и 16 месяцев после проведенного лечения. Результаты представлены в табл.8.

Таб.8 Динамика ЦЭК и биохимических маркеров ЭД при РВРВНК на фоне комплексного лечения в различные сроки.

Маркеры ЭД	Первичное определение	10 мес. после операции	16 мес. после комплексного лечения
ЦЭК, клеток $\times 10^4$ /л	10	8	5
VCAM-1, нг/мл	437	412	302
P-селектин, нг/мл	285	179	155

<i>Е-селектин, нг/мл</i>	50	39	29
<i>t-РА, нг/мл</i>	5,8	4,6	2,5
<i>Эндотелин-1, fmol/ml</i>	4,2	3,9	2,6

При анализе биохимических маркеров ЭД отмечено превышение их уровня по всем показателям. Как видно из таблицы, применение комплексного подхода к лечению данной пациентки привело к нормализации функционального состояния эндотелия, которое выразалось в нормализации уровня ЦЭК и всех биохимических маркеров. На коррекцию ЭД несомненно положительный эффект оказало курсовое назначение эндотелиотропной терапии после хирургического вмешательства. Кроме того, при опросе и оценки субъективных признаков значительно повысилось качество жизни пациентки.

Клинический пример №4.

Пациентка П., 29 лет (амб.карта №518/4) консультирована в НМХЦ им.Н.И.Пирогова 12.03.13г. Пациентка предъявляла жалобы на наличие «сосудистых звездочек» на обеих нижних конечностях, судороги икроножных мышц в ночное время.

Из анамнеза стало известно, что пациент страдает ВБВНК 10 лет, когда впервые после вторых родов стала отмечать проявление заболевания. В 2002 г. перенесла эндовенозную лазерную облитерацию (ЭВЛО) БПВ обеих нижних конечностей. В 2005г. произведена под местной инфильтрационной анестезией перевязка несостоятельных перфорантных вен обеих голени. Систематически принимала флеботропные препараты, носила профилактический компрессионный трикотаж при физической нагрузке.

При осмотре на бедре и голени обеих нижних конечностей визуализировались телеангиоэктазии и ретикулярные вены в небольшом количестве.

На УЗАС ствол БПВ обеих нижних конечностей практически не дифференцировался от окружающих тканей, был полностью окклюзирован до верхней трети голени.

Установлен диагноз: Варикозная болезнь. Ретикулярный варикоз обеих нижних конечностей. СЕАР: С 1,А, Ес, АРn, LI.

От предложенного лечения в виде склерозирования телеангиоэктазий и пенной склерооблитерации ретикулярных вен пациентка воздержалась. Было рекомендовано ношение компрессионного трикотажа I класс компрессии и курсовой прием флебопротекторов.

При первичном приеме, а также спустя 8 и 15 месяцев производили динамическое наблюдение за состоянием венозной системы нижних конечностей при помощи ультразвукового исследования и забор крови из локтевой вены с целью определения ЦЭК и биохимических маркеров (табл.9).

Уровень ЦЭК и биохимических показателей изначально превышал нормативные значения. На фоне лечения спустя 8 месяцев наблюдался незначительный прирост в концентрации исследуемых маркеров ЭД. Уровень ЦЭК, VCAM-1, Р- и Е-селектина через 15 месяцев остались практически неизменными благодаря эндотелиотропному действию препарата.

Таблица 9. Динамика основных маркеров ЭД на фоне приема флебопротекторов.

	До лечения	Через 8 месяцев	Через 15 месяцев
ЦЭК, клеток $\times 10^4$ /л	7	11	10
VCAM-1, нг/мл	370	403	400
Р-селектин, нг/мл	205	198	197

<i>E-селектин,</i> <i>нг/мл</i>	38	39	37
<i>t-РА, нг/мл</i>	8,3	9,1	9,7
<i>Эндотелин-1,</i> <i>fmol/ml</i>	2,2	3,1	3,6

Прирост наблюдался лишь в концентрациях t-РА и эндотелина-1, что свидетельствует о нарушении в системе свертывания и опасности образования тромбов в венозной системе. Повышающийся уровень эндотелина-1 свидетельствует о нарушении равновесия между вазоконстрикторами и вазодилататорами, происходит спазм, повышение тонуса сосуда, истощение и извращение компенсаторной «дилатирующей» способности эндотелия. Это является свидетельством нарушения функциональной активности эндотелия, развивающейся ЭД, требующей дополнительного дообследования пациента и необходимости выполнения корригирующих мероприятий профилактики развития осложнений ВБВНК.

Таким образом, анализ динамики биохимических маркеров у пациентов обеих групп убедительно показал, что профилактика и лечение РВРВ – комплексная проблема, не решаемая только одним хирургическим вмешательством или только консервативной терапией. Основной задачей становится четкое своевременное выявление локальных патологических изменений и минимально инвазивная их коррекция, возможно, неоднократная, но не сопровождающаяся длительным стационарным лечением, серьезными послеоперационными осложнениями и длительной нетрудоспособностью. И если выбираемый метод хирургического лечения должен определяться формой и стадией рецидива заболевания, то флеботропная терапия может быть использована вне зависимости от этих

критериев.

Проведенный анализ динамики маркеров ЭД (ЦЭК, VCAM-1, P-селектин, E-селектин, t-РА, эндотелин-1) в различные сроки у пациентов с РВРВНК свидетельствует о степени выраженности ЭД и может служить оценочным маркером активности процессов варикозной трансформации вен при хроническом течении заболевания. Это позволяет своевременно проводить лечебные корригирующие мероприятия с использованием флеботропных препаратов, обладающих поливалентным действием. Использование ключевых компонентов препарата – кверцетина и изокверцетина - доказывает эффективность позиции активного использования алгоритма фармакологической коррекции эндотелиальной дисфункции. Полученные результаты во 2 подгруппе убедительно показали как с помощью только консервативного метода лечения функциональная активность эндотелия хоть и была снижена, но не приобрела распространения и оставалось в одной поре значительное время. Своевременный анализ указанных маркеров в биохимическом исследовании позволяет прогнозировать прогрессирование ВВВНК, улучшить результаты лечения, а также эффективно профилактировать развитие рецидивов варикозной болезни на «доклинической» стадии, тем самым значительно повысить качество жизни у данной категории пациентов.

У 36 пациентов с сегментарным варикозом проведено исследование влияния консервативной терапии с использованием кверцетина на динамику эндотелиальной дисфункции, оцениваемую по количеству ЦЭК в периферической крови. Исходно в исследуемой группе пациентов этот показатель составил $5,8 \pm 0,71 \times 10^4$ клеток/мл. На фоне приема кверцетина в течение 3 мес в дозировке 360 мг/сутки достоверно ($p < 0,05$) уменьшалось количество ЦЭК. После окончания курса приема этого препарата этот показатель составил $3,4 \pm 0,82 \times 10^4$ клеток/мл, фактически приближаясь к норме. Нормализация показателя ЦЭК сопровождалась выраженным

улучшением субъективных ощущений (уменьшение боли, частоты возникновения судорог, тяжести в ногах).

Учитывая предполагаемую антиокислительную активность кверцетина и изокверцетина, и, как следствие, эндотелиопротективный механизм их действия, 15 пациентам проведено исследование уровня малонового диальдегида (МДА) на фоне лечения. На фоне проводимой терапии уровень МДА снизился по сравнению с исходным с $93,6 \pm 14,72$ нмоль/мл до $75,4 \pm 18,35$ нмоль/мл. Это свидетельствует об умеренной антиокислительной активности кверцетина и изокверцетина глюкуронида и, вследствие этого, об одном патогенетических обоснований эндотелиопротективного воздействия кверцетина и изокверцетина глюкуронида у пациентов с ХВН.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Варикозная болезнь в настоящее время занимает 3-4-е место среди сердечно-сосудистых заболеваний и диагностируется более чем у 20% мужчин и 40% женщин. Однако, современная медицина не обладает средствами радикальной профилактики ХЗВ, а несвоевременная диагностика и лечение приводят к большому числу запущенных форм в пожилом

возрасте. Недостаточное знание врачами данной патологии, кажущаяся простота ее диагностики и лечения зачастую становятся причиной безуспешности консервативной терапии и рецидивов заболевания после хирургического лечения.

В настоящее время в отечественной и зарубежной литературе происходит переосмысление классических взглядов на многие вопросы этиологии и патогенеза, которые напрямую могут оказать значимое влияние на диагностику и лечебную тактику. Результаты современных исследований в области патофизиологии венозных нарушений убедительно показывают ключевое значение клеточной дисфункции в развитии и прогрессировании варикозной болезни. Нарушение функций эндотелия сосудистой стенки, ее повреждение продуктами метаболизма активированных лейкоцитов, постепенная трансформация репаративных процессов, сопровождающаяся стойким изменением структуры и функции гладкомышечных клеток являются основными звеньями патогенеза нарушений венозного оттока[.]

Все вышеизложенное послужило основанием для проведения настоящего исследования, целью которого явилось улучшить результаты лечения пациентов с ВБВНК, совершенствовать диагностику и прогнозирование развития ВБВНК на основании комплексного изучения функционального состояния эндотелия. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Уточнить характер изменений функционального состояния эндотелия на основании определения клеточных (ЦЭК, лейкоцитарный пул) и биохимических (эндотелин-1, Р-, Е-селектины, VCAM-1) маркеров ЭД при ВБВНК. Оценить информативность этих показателей в качестве диагностических и прогностических тестов ЭД.

2. Изучить особенности цитоморфологической картины эндотелия вен нижних конечностей при ВБВНК.

3. Определить динамику показателей функциональной активности венозного эндотелия после различных видов хирургической коррекции.

4. Изучить влияние комплексной консервативной терапии на динамику маркеров эндотелиальной дисфункции в лечебной программе варикозной болезни.

5. Оценить особенности клинического течения различных форм рецидивов ВБВНК с учетом показателей ЭД и разработать рекомендации по их профилактике и лечению.

Нами проведено комплексное обследование и последующее лечение 180 пациентов. Из них 128 больных обратились за медицинской помощью по поводу первичных случаев варикозной болезни, 52 (29%) пациента – по поводу послеоперационных рецидивов заболевания. Основным критерием включения являлось отсутствие значимых тактических ошибок при лечении данных пациентов на предыдущих этапах лечения.

Возраст больных варьировал от 21 до 74 лет (средний 41 ± 13 лет). Из них мужчин было 74 (41%), женщин – 106 (59%), соотношение мужчин и женщин - 1:1,5. При сравнении обследуемых групп в качестве контроля исследовали 30 практически здоровых добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту с пациентами исследуемых групп.

Большую часть составили пациенты в возрасте от 18 до 45 лет (54%). Длительность заболевания составляла от 2 до 35 лет. Среди факторов риска развития заболевания наиболее часто встречались длительные динамические и (или) статические нагрузки (46%, 82 пациента), беременность, длительный родовой период в анамнезе (19%, 35 пациентов), наследственное изменение структуры соединительной ткани (35%, 63 пациента, из них по материнской линии - 68%, 43 пациента и по отцовской линии - 24%, 15 пациентов, по двум линиям – 8 %, 5 пациентов).

При анализе клинических наблюдений использовалась классификация Международного объединенного совета сосудистых хирургов хронических заболеваний вен нижних конечностей - CEAP, разрешенная к применению на

совещании экспертов России в 2000 году. Согласно этой классификации в исследование включены только больные конечности клинического класса II (CEAP).

Пациентам проводились традиционные этапы клинического обследования, включающего сбор и анализ жалоб, сбор анамнеза заболевания и жизни, клинический осмотр. Ультразвуковое исследование проводилось всем пациентам в до- и послеоперационном периоде. Проводилась оценка состояния венозной системы нижних конечностей.

В данное исследование было включено также 30 больных (женщин 65%, мужчин 35 %), поступивших для планового оперативного лечения первичной варикозной болезни вен нижних конечностей (клинического класса II по классификации CEAP). Возраст этой группы больных колебался от 22 до 65 лет и в среднем составил 38 ± 10 лет. Характер поражения был подтвержден результатами клинического осмотра и ультразвукового сканирования. У всех пациентов интраоперационно производили забор крови путем пункции кубитальной вены предплечья и ствола варикозно-расширенной большой подкожной вены, отступая от сафено-фemorального соустья на расположенной в области внутренней поверхности средней трети голени 2 см одновременно. Отмечено, что у 95% пациентов выявлено превышение количества лейкоцитов в крови, полученной из кубитальной вены. Разница составила $1,4 \pm 0,11 \times 10^9/\text{л}$ лейкоцитов ($M \pm m$) ($p < 0,05$). При соотношении этого количества с уровнем лейкоцитов в периферической крови из кубитальной вены, разница составила $9,1 \pm 1,9\%$ ($M \pm m$) ($p < 0,05$). Таким образом, была подтверждена гипотеза о возможном участии лейкоцитарного звена в патогенезе варикозной трансформации венозной стенки у больных ВБВНК и формировании т.н. «лейкоцитарной ловушки» на уровне варикозно измененных венозных сегментов. Кроме того, отмечено снижение концентрации гемоглобина в крови, забранной из варикозной вены ($126,4 \pm 17$ г/л, ($M \pm m$)), по сравнению с кровью из локтевой вены ($132,3 \pm 14,5$

г/л, ($M \pm m$)). Уровень гематокрита оказался достоверно ниже также в образце крови из варикозной вены. Полученные результаты объяснили тем, что предположительно в варикозной вене лейкоциты и тромбоциты вовлечены в патогенетическую трансформацию стенки сосуда с нарушением функции эндотелия. Количество тромбоцитов в крови из варикозной вены ($219,9 \pm 68,4 \times 10^9$ кл/л, ($M \pm m$)) оказался также достоверно ниже, чем в крови из кубитальной вены ($241,8 \pm 69,8 \times 10^9$ кл/л, ($M \pm m$)). Полученные результаты исследования интерпретировали способностью эндотелия включать адаптационно-компенсаторные механизмы по предотвращению тромбоза.

Оценка локализации и степени экспрессии белковых антигенов на поверхности и внутри клеток проводилась методом проточной иммуноцитометрии на проточном цитометре. Материалом для исследования послужили 10 образцов вен, забранных во время сафенэктомии и контрольные образцы в количестве 5 здоровых вен были набраны во время аортокоронарного шунтирования. Выявлен маркер CD 106, характеризующий распределение межклеточной молекулы адгезии (VCAM-1) и показывающий наличие воспалительного процесса в активированном эндотелии. Тем самым доказали, что в развитии ВБВНК ключевую роль играет воспаление на фоне функционально измененного и активированного эндотелия.

С целью выявления цитоморфологических особенностей венозного эндотелия исследован операционный материал от 10 пациентов с ВРВНК и 5 пациентов в качестве контрольной группы. В ходе электронно-микроскопического исследования было выяснено, что на фоне выраженных склеротических изменений венозной стенки эндотелиальный слой претерпевает ряд морфологических изменений. В первую очередь, речь идет о наличии гигантских клеток, специфической реорганизации эндотелиального пласта, его гетерогенности. Процентное соотношение гигантских клеток в каждом образце из рассмотренных 30 полей зрения на

220±25 нормальной формы клеток составил 14±5 %. Причем в некоторых полях зрения выявили клетки средней величины, контуры которых напоминали «бусины нанизанные на нить» (сделано предположение, что это межклеточные контакты, а сами клетки предшественники десквамированных ЭК). Количество отсутствующих эндотелиальных клеток составило 15±2% на 210±23 клеток эндотелия. В участках клапана эндотелиальная выстилка местами вообще оказалась лишена эндотелиального пласта или представлена остатками разорванных клеток. ЭК, располагающиеся на стенке вен, тот час же за клапанным синусом, имели ветеренообразную вытянутую форму, среди них также встречались гигантские клетки.

Исследование эффективности влияния комплексного лечения на функциональное состояние эндотелия проведено у 92 больных с ВБВНК. Эти пациенты сформировали группу больных, перенесших хирургическое вмешательство по поводу ВБВНК (комбинированную флебэктомию (ФЭ), эндовенозную лазерную облитерацию (ЭВЛО) поверхностных вен нижних конечностей). Эндотелиальную дисфункцию оценивали путем определения уровня маркеров эндотелиальной дисфункции: Р-селектина, Е-селектина, тканевого активатора плазминогена, эндотелина-1, молекулы адгезии сосудистого эндотелия 1 типа (sVCAM-1-soluble vascularcellularmolecula), циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК). Уровень указанных маркеров у больных с ВБВНК определялся в пред- и послеоперационном (7-й день, 2 месяц) периоде, а также на фоне консервативного лечения. В до- и послеоперационном периодах все пациенты получали медикаментозную терапию из группы флавоноидов, основным составляющим компонентом которых были кверцетин-глюкуронид и изокверцетин.

При анализе полученных результатов выявлено существенное изначальное повышение уровня ЦЭК, после оперативного вмешательства на 8-9 сутки наблюдали возрастание этого показателя, спустя 2 месяца после проведенной консервативной терапии количество ЦЭК практически

соответствовало норме. Аналогичная картина наблюдалась в обеих группах с концентрацией VCAM-1. Воспалительная реакция оказалась менее выражена после миниинвазивной операции, о чем говорят статистически достоверные более низкие показатели VCAM-1. Концентрации Р- и Е- селектинов до лечения были изначально завышены по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). После проведенного оперативного вмешательства наблюдалась тенденция к снижению данных показателей. Через 2 месяца консервативной терапии отмечалось снижение Р-селектина до значений контрольной группы и заниженные концентрации Е-селектина, что явилось хорошим прогностическим признаком. Разница в концентрациях эндотелина-1 и тканевого плазминогена (t-РА) в до- и послеоперационный периоды была не существенной ($p > 0,05$). Однако их концентрации при первичном определении в обеих подгруппах оказались занижены по сравнению с контрольной группой. Это свидетельствует о сниженной функциональной активности эндотелия, угнетении активности свертывающей системы и преобладание механизмов вазодилатации над вазоконстрикцией. Проведенные исследования показали, что по степени выраженности рассмотренных маркеров можно судить об активности процессов варикозной трансформации вен, что позволяет своевременной проводить корректирующие мероприятия. Показатели ЭД перспективно использовать для контроля эффективности различных видов консервативного лечения ХВН. Коррекция ЭД путем хирургического вмешательства в комплексе с эндотелиотропными препаратами вполне соизмеримо с оценкой основных маркеров ЭД.

В рамках данного исследования было обследовано 52 пациента с «ложным» рецидивом ВБВНК, 32-м из которых были назначены лечебные и профилактические мероприятия, при этом большинство из них повторно оперированы в объеме минифлебэктомии, ЭВЛО или склерооблитерации варикозно расширенных сегментов, также они

продолжали ношение компрессионного трикотажа (2 класс компрессии) и курсовой прием флебопротектора (1 подгруппа). За остальными 20-ю пациентами также проводилось динамическое наблюдение, повторное оперативное вмешательство не предпринималось в связи с нежеланием пациента, больные продолжали использование компрессионного трикотажа 2 степени, проводилась медикаментозная флеботропная терапия (2 подгруппа). С течением времени ($15 \pm 3,5$ мес.) прогрессирование внутрикожного и подкожного варикоза произошло у 3 (9,4%) пациентов 1-ой и у 10 (50%) пациентов 2-ой подгруппы. У всех пациентов отметить достоверное нарастание ЦЭК во 2-й подгруппе, в то время как 1-й подгруппе на фоне флеботропной терапии этот показатель приблизился к нормативным значениям. При анализе уровня VCAM-1 в двух подгруппах при первичном определении отмечено изначальное превышение в обеих группах соответственно ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой. Повышенная концентрация VCAM-1 в 1 подгруппе свидетельствует о наличии воспалительного момента в стенке вен и активированных ЭК. При последующих определениях VCAM-1 спустя $9 \pm 1,8$ мес. ($M \pm m$) обнаружено снижение этого показателя в 1 подгруппе на фоне консервативной терапии ($p < 0,05$) и прирост в концентрации данного маркера во 2 подгруппе. Сохраняющийся высокий уровень VCAM-1 во 2 подгруппе является маркером прогрессирования ВБВНК и продолжающейся ЭД. С течением времени (через $15 \pm 3,5$ мес. ($M \pm m$)) прослеживалась тенденция нормализации этого биохимического показателя в 1 подгруппе. Уровень Р-селектина в подгруппах по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$) аналогичным образом был завышен. Спустя время $9 \pm 1,8$ мес. и $15 \pm 3,5$ мес. ($M \pm m$) в 1 подгруппе наступало плавное снижение Р-селектина, что свидетельствует о восстановлении функциональной активности эндотелия. Во 2 второй группе данный показатель незначительно снизился спустя $9 \pm 1,8$ мес. ($M \pm m$) ($p > 0,05$) и опять увеличился через $15 \pm 3,5$ мес. ($M \pm m$), что говорит о наличии стойкого воспалительного очага в пораженной вене, ведущее к

прогрессировании РВРВНК. Уровень Е-селектина в плазме в этих подгруппах был, наоборот, ниже. Предположили, что это обусловлено отсутствием полной активации эндотелия в условиях его повреждения и, как следствие, эндотелемии. Спустя $9 \pm 1,8$ мес. ($M \pm m$) и $15 \pm 3,5$ мес. ($M \pm m$) уровень исследуемого показателя оказался сопоставимым с контрольной группой. Выявлен также достоверно более высокий уровень тканевого плазминогена и эндотелина-1 как в 1-й, так и во 2-й подгруппах, что свидетельствует о повышенной опасности тромбообразования. В отдаленном периоде у пациентов 1 подгруппы наблюдалось достоверное снижение концентрации тканевого плазминогена и эндотелина-1, через $15 \pm 3,5$ мес. ($M \pm m$) уровень tPA составил $4,9 \pm 1,4$ нг/мл ($M \pm m$) ($p < 0,05$), концентрация эндотелина-1 приблизилась к значениям контрольной группы. Содержание указанных маркеров ЭД во 2 подгруппе оказалась противоположной – наблюдалось умеренное негрубое их нарастание, что обусловлено приемом флебопротекторов и ношением компрессионного трикотажа. Проведенный анализ динамики маркеров ЭД (ЦЭК, VCAM-1, Р-селектин, Е-селектин, t-РА, эндотелин-1) в различные сроки у пациентов с РВРВНК свидетельствует о степени выраженности ЭД и может служить оценочным маркером активности процессов варикозной трансформации вен при хроническом течении заболевания. Это позволяет своевременно проводить лечебные корректирующие мероприятия с использованием флеботропных препаратов, обладающих поливалентным действием и прогнозировать прогрессирование ВВВНК.

Безусловно, многие аспекты патогенеза варикозной трансформации вен остаются до конца невыясненными. Проведенное исследование явилось лишь маленьким шагом к пониманию сути проблемы. Ответы на многие вопросы, а также последующие исследования, посвященные выявлению наиболее веских причин патологических процессов венозной стенки, предшествующих появлению её необратимых изменений, без сомнения, будут способствовать

совершенствованию системы профилактики заболеваний вен и повышению качества лечения больных ХВН. В настоящей работе на большом клинико-лабораторном материале убедительно показана роль воспалительного элемента в возникновении нарушения в функционировании эндотелия вен. Подтверждена гипотеза существования «лейкоцитарной ловушки» на уровне варикозных вен, «поломка» в системе эндотелиальной выстилки на локальном уровне наглядно продемонстрирована на цитоморфологическом материале, экспрессия VCAM-1 доказала активацию эндотелия у пациентов с ВБВНК. Полученные результаты маркеров ЭД на фоне проводимой консервативной терапии флебопротекторами из группы γ -бензопиранов доказана их эффективность по отношению к функции эндотелия, определены сроки их назначения.

ВЫВОДЫ

1. Развитие ЭД при ВБВНК характеризуется повышением количества ЦЭК и уровня биохимических маркеров (VCAM-1, Р- и Е-селектинов). Повышение уровня ЦЭК свыше $5,7 \times 10^4$ /л клеток, VCAM-1- 300 нг/мл, Р-селектина -170 нг/мл и Е-селектина - 50 нг/мл подтверждает развитие ЭД. У пациентов с ВБВНК возможно использование этих маркеров в качестве дополнительного диагностического критерия в оценке функционального состояния эндотелия.

2. Цитоморфологическая картина эндотелия при ВБВНК по сравнению с непораженной венозной стенкой характеризуется полиморфностью и гетерогенностью в сочетании со специфической реорганизацией клеток. Это подтверждается статистически значимым увеличением частоты выявления гигантских ЭК (до $14 \pm 5\%$), а также десквамированных ЭК (до $15 \pm 2\%$).

3. Характер выполняемого оперативного вмешательства при ВБВНК влияет на динамику маркеров ЭД. Более высокая травматичность комбинированной ФЭ по сравнению с ЭВЛО сопровождалась статистически значимым повышением уровня ЦЭК и VCAM-1 и снижением концентрации Р- и Е-селектинов непосредственно после операции с последующей нормализацией этих показателей через 2 мес на фоне проводимой послеоперационной флеботропной терапии.

4. При рецидиве ВБВНК пациентов выявлено повышение уровней ЦЭК, VCAM-1, Р- и Е-селектинов, t-РА, эндотелина-1 сходное с результатами, полученными у оперированных с первичной ВБВНК. При проведении комплексного лечения больным с рецидивом ВБВНК - оперативного вмешательства (минифлебэктомия, ЭВЛО или склерооблитерации варикозно расширенных сегментов) в сочетании с консервативной флеботропной терапией - спустя 9 и 15 мес отмечено снижение значений VCAM-1, Р-селектина, t-РА и эндотелина-1.

5. Флеботропная терапия с использованием γ -бензопиранов (кверцетин, изокверцетин, кемпферол) снижает проявления ЭД, сопровождается уменьшением количества ЦЭК и уровня биохимических маркеров (VCAM-1, Р- и Е-селектинов) ($p < 0,05$), что является отражением эффективности консервативного лечения ХВН.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.

1. Пациентам с ВБВНК целесообразно в комплексное обследование включить исследование числа ЦЭК, концентрации VCAM-1, P- и E-селектинов, t-РА и эндотелина-1 в крови для определения степени выраженности ЭД.
2. Оперативное вмешательство по поводу ВБВНК сопровождается активацией ЭД, поэтому рекомендуется в предоперационном

периоде проводить консервативную флеботропную терапию с целью профилактики прогрессирования ЭД.

3. В ближайшем послеоперационном периоде необходимо проведение консервативной терапии с последующим контролем маркеров ЭД и оценкой вероятности развития рецидивов.
4. В комплексе консервативной терапии у пациентов с подозрением на развитие хронического течения ВБВНК (сегментарный варикоз, прогрессирование заболевания) целесообразно использовать флеботоники из группы γ -бензопиранов (кверцетин, изокверцетин), оказывающие эндотелиопротективный эффект с нормализацией функции эндотелия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Баранов Г.А., Дунаев П.Г. Некоторые аспекты этиопатогенеза и диагностики хронической венозной недостаточности. – Ярославль: Формат-принт, 2003. - 143с.
2. Бауэрзакс Ж., Флеминг И., Буссе Р. Патифизиология хронической венозной недостаточности // Флеболимфология. - 1998. - № 7. – С. 1 – 7.

3. Богачев В.Ю. Фармакотерапия хронической венозной недостаточности нижних конечностей // Consilium Med. - 2003.- Т.5, №1, прилож.- С.22-26.
4. Богачев В.Ю. Новые данные о хронической венозной недостаточности: от эпидемиологии к лечению: Обзор материалов симпозиума на 14 Всемирном Конгрессе международного общества флебологов (Рим, 9-14 сентября, 2001 года) // Ангиология и сосудистая хирургия. - 2002. – Т.8, №2. - С. 119-126.
5. Богачев В.Ю. Новые технологии диагностики и лечения варикозной болезни нижних конечностей: Автореф. дис. ... д - ра мед. наук. – М., 1999. – 32 с.
6. Богачев В.Ю. Консервативное лечение хронической венозной недостаточности нижних конечностей с точки зрения доказательной медицины/ В.Ю.Богачев// Consilium Medicum. – 2005. – Т.7, №5.- С.415-418.
7. Богачев В.Ю., Голованова О.В., Сергеева Н.А., Кузнецов А.Н. Об участии лейкоцитов в патогенезе первичных форм хронических заболеваний вен нижних конечностей // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2011. – Т.17, №3. – С. 71-75
8. Бредихин Р. А. Эффективность препарата «Антистакс» в лечении хронической венозной недостаточности нижних конечностей / Р. А. Бредихин, Е. Е. Фомина, И. М. Игнатьев // Хирургия сердца и сосудов. – 2007. – № 1. – С. 40-42.
9. Бувальцев В.И. Дисфункция эндотелия как новая концепция профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний // Международный медицинский журнал //. – 2001. -№3. – С. 202-209.
10. Веденский А. Н. Варикозная болезнь.- Л.: Медицина, 1983.-207 с.
11. Веденский А.Н. Особенности кровотока и функции венозных клапанов в нижних конечностях // Вестн. хирургии. - 1989. - Т.142, №6.- С. 40-43
12. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах / Ю.А. Владимиров // Соросовский обзор. журн. – 2000. – Т.6, №12. – С.13-1

13. Гансбургский А.Н. Изменения эндотелия вен при остром нарушении гемодинамики / А. Н. Гансбургский // Архив анат. – 1982. – Т. 83, № 10. – С. 53-59.
14. Гребенюк А.Н., Смирнов Н.А., Давыдова Е.В. и др. Цитохимия нейтрофилов / Под ред. А.Н. Гребенюка и Н.А. Смирнова. – СПб., 1999. – 68 с
15. Григорян Р.А., Богачев В.Ю., Золотухин И.А. Варикозная болезнь // Флебология: Руководство для врачей. / Под ред. В.С. Савельева. - М.: Медицина, 2001. - С. 438-489.
16. Дибиров М.Д., Костюченко М.В., Исаев А.И. Современные позиции в лечении хронической венозной недостаточности. / М.Д.Дибиров // Хирургия, приложение к журналу Consilium Medicum. – 2012. – №1.- С.18-23.
17. Дубинина Е. Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состоянии окислительного стресса / Е. Е. Дубинина // Вопросы медицинской химии. – 2001. Т. 47, № 6. – С. 561-581.
18. Затейщикова А.А. Эндотелиальная регуляция сосудистого тонуса: методы исследования и клиническое значение / А.А. Затейщикова, Д.А.Затейщиков // Кардиология. – 1998. - №9. – С. 68-78.
19. Очерки терапевтической флебологии: Под ред. П.Г.Швальба, Ю.М. Стойко. – Рязань: Узорочье, 2011. – 288с.
20. Как защитить эндотелий? / В. В. Сабельников [и др.] // Третий Международный хирургический конгресс: материалы конгр., Москва, 21-24 февр. 2008 г. – С. 252-253.
21. Кательницкий И. И. Применение препарата «Антистакс» в комплексном лечении трофических язв венозной этиологии / И. И. Кательницкий А. В. Куринной И. И. Кательницкий // Хирургия сердца и сосудов. – 2007. – № 1. – С. 43-46.

22. Караганов Я.Л., Алимов Г.А., Миронов А.А. Общая морфология сосудистого эндотелия // В кн. "Сосудистый эндотелий", Киев, "Здоров'я", 1986, с. 78-121
23. Кварцетин и его производные – эффективность в лечении трофических язв венозной этиологии / М. Н. Кудыкин [и др.] // Третий Международный хирургический конгресс: материалы конгр., Москва, 21-24 февр. 2008 г. – С. 269-270.
24. Клиническая ангиология: / Руководство под ред. Покровского А.В. В 2-х томах. М.: Медицина, 2004. – 808 с.
25. Киричук В.Ф. Дисфункция эндотелия / В.Ф.Киричук, П.В. Глыбочко, А.И. Пономарева. – Саратов: Изд-во Саратовского ун-та, 2008. – 129 с.
26. Колобова О. И. Биохимические основы дисфункции эндотелия при варикозной болезни / О. И. Колобова, С. А. Трянкина, И. В. Минаков // Третий Междунар. хирург. конгресс: материалы конгр., Москва, 21-24 февр. 2008 г. – С. 205.
27. Количество циркулирующих эндотелиоцитов и базальный уровень NO кровеносных сосудов у пациентов с хронической венозной недостаточностью / А. Н. Косинец [и др.] // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования: сб. тр. 2 Междунар. науч.-практ. конф. / Витеб. гос. мед. ун-т. – Витебск: ВГМУ, 2002. – С. 175-179.
28. Константинова Г.Д., Зубарев А.Р., Градусов Е.Г. Флебология. – М.: Видар-М, 2000. – 154 с.
29. Косинец А.Н., Петухов В.И. Варикозное расширение вен нижних конечностей. – Витебск, ВГМУ, 2002. – 200 с.
30. Кривошеков Е. П. Применение препарата «Антистакс» у больных хронической венозной недостаточностью после оперативного лечения / Е. П. Кривошеков, И. А. Мигунова // Третий Международный хирургический конгресс: материалы конгр., Москва, 21-24 февр. 2008 г. – С. 221.

31. Кунгурцев В.В., Назаренко Г.И., Сидоренко В.И., Кучин Г.А. Эндовазальная коагуляция вен высокоэнергетическим лазером (Nd:Yag) в лечении варикозной болезни вен нижних конечностей. // Флебология.- 2008.- Т.2.-№3.- С.10-15.
32. Лавренко С.В., Соколов А.Л., Гудымович В.Г. и др. Ультразвуковое исследование в патологии вен нижних конечностей. – М.:Медпрактика, 2007. – 68с.
33. Лебедев П.А. Диагностика функции сосудистого эндотелия у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями: метод. Указания / П.А.Лебедев [и др.]. – Самара: Изд-во Самарск. Гос. Аэрокосмического ун-та, 2004. - 18с.
34. Левтов В.А. Реология крови / В.А.Левтов, С.А.Регирер, Н.Х.Шадрина. – М.: Медицина, 1982. – 396 с.
35. Луговская С.А. Лабораторная гематология / С.А. Луговская [и др.]. - -М.: ЮНИМЕД-пресс, 2002. – 120с.
36. Lupinskaya Z.A. Эндотелий сосудов – Основной регулятор местного кровотока. // Вестник КРСУ. – 2003. – Т. 3, № 7, – С. 98–107.
37. Лыткин М.И., Веденский А.Н., Стойко Ю.М. Рецидивы варикозного расширения вен // Хирургия. - 1988. - №10. - С. 82-84.
38. Макаева Г.Ф. Морфологические изменения стенки вен нижних конечностей при варикозном расширении вен // Хирургия.- 1956.- №9.- С.66-70.
39. Манухина Е.Б. Роль оксида азота в развитии и предупреждении дисфункции эндотелия / Е.Б.Манухина, И.Ю.Малышев // Вестник ВГМУ. – 2003. - №2. – С.5-17.
40. Концентрация стабильных продуктов деградации NO и число циркулирующих эндотелиоцитов как дополнительный диагностический критерий для оценки тяжести венозной патологии / С. А. Сушков [и др.] // Дисфункция эндотелия. 3 Междунар. науч.-практ. конф. / Витеб. гос. мед. ун-т. – Витебск: ВГМУ, 2004. – С. 247-251.

- 41.Намашко М.В. Послеоперационные рецидивы варикозного расширения подкожных вен нижних конечностей // Вест. хир. им. И.И. Грек. – 1996. – Том 155, №4. – С.63-64.
- 42.Насонов Е.Л. Маркеры активации эндотелия (тромбомодулин, антиген фактора Виллебранда и АПФ): клиническое значение / Е.Л.Насонов, А.А.Баранов, Н.П. Шилкина // Клин.мед. – 1998. - №11. – С. 4-10.
- 43.Небылицин Ю.С., Сушков С.А., Солодков А.П., Дорошенко А.С. Дисфункция эндотелия при острой и хронической венозной недостаточности // Новости Хирургии - 2008. – Том 16, №4. – С.141-153.
- 44.Основы клинической флебологии / Под ред. Ю.Л. Шевченко, Ю.М. Стойко.2-е изд., испр. И доп.-Мю:ЗАО «Шико», 2013.-336 с.
- 45.Петрищев Н.Н. Дисфункция эндотелия. Причины, механизмы, фармакологическая коррекция / Н.Н. Петрищев. – СПб.: СПбГМУ, 2003. – 184с.
- 46.Петрищев Н.Н., Беркович О.А., Власов Т.Д., Волкова Е.В. и др. Диагностическая ценность определения десквамированных эндотелиальных клеток в крови // Клиническая лабораторная диагностика. - 2001. - №1. - С.50-52.
- 47.Петрищев Н.Н. Новые направления научных исследований на кафедре патофизиологии. Учен. Записки СПбГМУ им. Акад. И.П.Павлова. 2007; 2:105-7
- 48.Покровский А.В., Сапелкин С.В. Хроническая венозная недостаточность нижних конечностей — современные проблемы диагностики, классификации, лечения // Ангиология и сосудистая хирургия. - 2003. – Т.9, №1. - С. 53-60.
- 49.Романов Ю.А. Структурно-функциональные особенности эндотелия человека в норме и при атеросклерозе. Дисс. Докт Биол. наук. осква. 2003.
- 50.Романов Ю.А., Ходакова Т.Г., Кабаева Н.В. и колл. Кластерная организация эндотелия аорты человека: возможная роль в атерогенезе. Ангиол. и Сосуд. Хирургия. 1999;5:166-180

- 51.Савельев В.С. Современные направления в хирургическом лечении хронической венозной недостаточности // Флебологическая. - 1996. - №1. - С. 5-7.
- 52.Савельев В.С., Кириенко А.И., Алекперова Т.В. Новые технологии в диагностике и лечении варикозной болезни // Ангиология и сосудистая хирургия. - 1996. – Т.2, №2, (приложение). - С. 96.
- 53.Савельев В.С., Гологорский В.А., Кириенко А.И. и др. Флебология: Руководство для врачей / Под ред. В.С. Савельева. - М.: Медицина, 2001. – 664 с.
- 54.Савельев В.С., Петухов В.А. Эндотелиальная дисфункция: современное состояние вопроса. Хирургия. 2008;1:3-11.
- 55.Стойко Ю.М., Гудымович В.Г. Рецидивы варикозной болезни вен нижних конечностей: современное состояние проблемы // Consilium medicum. – 2005. – Т.7, №6. – С. 500-506.
- 56.Стойко Ю.М. Послеоперационные рецидивы варикозной болезни: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. - Л., 1989. - 39 с.
- 57.Стойко Ю.М., Лыткин М.И., Шайдаков Е.В. Венозная гипертензия в системе полых вен. – СПб., 2002. – 276 с.
- 58.Стойко Ю.М., Мазайшвили К.В. Следует ли относиться с легкостью к «легким» формам хронических заболеваний вен нижних конечностей? // Приложение к Consilium medicum./Хирургия. – 2010. –№2. – С. 47-49.
- 59.Суковатых Б.С., Назаренко П.М., Беликов Л.Н., Родионов О.А., Абрамова С.А., Щербаков А.Н. Значение венозной гипертензии в развитии хронической венозной недостаточности у больных варикозной болезнью // Ангиология и сосудистая хирургия. - 2000. – Т.6, №4. - С. 58-63.
- 60.Царегородцев А.А. Особенности диагностики и тактики в зависимости от причин послеоперационных рецидивов варикозного расширения вен нижних конечностей: дис. ... канд. мед. наук. – Рязань, 2008. – 112 с.

- 61.Швальб П.Г. Повышенное венозное сопротивление – гемодинамическая основа формирования хронической венозной недостаточности нижних конечностей // Флебологическая. – 2001. - №13. – С. 4-7.
- 62.Швальб П.Г., Ухов Ю.И. Патология венозного возврата из нижних конечностей. – Рязань, 2009. – 152с.
- 63.Шебеко В.И. Эндотелий и система комплемента. – Витебск: ВГМУ, 1999. – 149 с.
- 64.Шевченко Ю.Л., Веденский А.Н., Лыткин М.И., Стойко Ю.М., Сабельников В.В. Ошибки, опасности, осложнения в хирургии вен. – СПб.: Питер, 1999. – 308 с.
- 65.Шевченко Ю.Л., Стойко Ю.М., Замятин М.Н. и др. Эндотелиальная дисфункция в патогенезе венозной трансформации. Ангиология и сосудистая хирургия. – 2008. – Т.14, №1. – С. 15-20.
- 66.Шевченко Ю.Л., Стойко Ю.М., Гудымович В.Г. и др. Дисфункция эндотелия у больных варикозной болезнью нижних конечностей и возможности ее коррекции. Ангиология и сосудистая хирургия. – 2010. – Т.16, №4. – С. 99-104.
- 67.Шевченко Ю.Л., Лядов К.В., Стойко Ю.М., Соколов А.Л., Ермаков Н.А., Лавренко С.В., Гудымович В.Г., Беянина Е.О. Особенности хирургической тактики при ранних стадиях варикозной болезни // Анналы хирургии.- 2004.- №4.- С. 18-25.
- 68.Шевченко Ю.Л., Стойко Ю.М., Мазайшвили К.В. Лазерная хирургия варикозной болезни. М., 2010. – 195 с.
- 69.Шулутко А.М., Крылов А.Ю. Варикозная болезнь. Современные принципы лечения. – М.: Миклош, 2003. – 127 с.
- 70.Яблоков Е.Г., Кириенко А.И., Богачев В.Ю. Хроническая венозная недостаточность. – М.: Издат-во «Берег», 1999. – 128 с.
- 71.Albeda S.M., Buck C.A. Integrins and other cell adhesion molecules // FASEB J., 1990, 4: 2868-2880.

72. Albeda S.M., Smith C.W., Ward P.A. Adhesion molecules and inflammatory injury // *FASEB J.*, 1994, 8: 504-512.
73. Allport, J.R., Garcia-Cardena, G., Lim, Y.C., Luscinskas, F.W. Current in vitro models of leukocyte migration - Methods and interpretation. // *METH MOL M*, 56, 2001, pp. 357-365.
74. Arnaout M.A. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18 // *Blood*, 1990, 75: 1037-1050.
75. Beebe-Dimmer JL, Pfeifer JR, Engle JS, Schottenfeld D. The epidemiology of chronic venous insufficiency and varicose veins. *Ann Epidemiol* 2005;15:175–184.
76. Bergan J.J. The vein book. London, 2007. – 617 p.
77. Bergan J.J., Schmid-Schonbein G.W., Coleridge Smith P.D. et al/ Chronic venous disease. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355: 3: 488-496.
78. Bergan J.J., Pascarella L., Schmid-Schonbein G.W. Pathogenesis of primary chronic venous disease: insights from animal models of venous hypertension. *J Vasc Surg* 2008; 47:183–192.
79. Bevilacqua M.P. Endothelial-leukocyte adhesion molecules // *Annu. Rev. Immunol.*, 1993, 11: 767-804.
80. Blan F.D. A reliable marker of endothelial cell dysfunction: does it exist? / A.D. Blan, D/A/ Tarberner // *Brit J Haematol.* – 1995. – 90. – P.244-248.
81. Boisseau MR. Pharmacologie des médicaments veinotoniques: donnees actuelles sur leur mode d'action et les cibles herapeutiques. *Angeiologie* 2000;52:71-7.
82. Boisseau M.R. Пусковые механизмы хронической венозной недостаточности нижних конечностей // *Флеболомфология.* - 2004.- №23.- С.7-11
83. Boursier V., Priollet P. Chronic venous insufficiency. Varicose veins // *Rev. Prat.* – 2002. – Vol.52, №4. – P. 443-449.
84. Bujan J, Gimeno MJ, Jimenez JA, et al. Expression of elastic components in healthy and varicose veins. *World J Surg* 2003; 27:901–905.

85. Burhand K., Abisi S. Microcirculation in chronic venous insufficiency. Venous ulcers. Edited by Bergan J.J., Shortell C.K. Elsevier. 2007; 15-25.
86. Cai H., Harrison D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress // *Circ. Res.* - 2000. - 87 (10). - P. 840-844.
87. Carlos T.M., Harlan J.M. Leukocyte-endothelial adhesion molecules // *Blood.* - 1994. - Oct 1;84(7):2068-10.
88. Cazaubrier, P. E. Facteurs de croissance et paroi vasculaire / P. E. Cazaubrier // *Int. Angiol.* – 2001. – Vol. 20, N 2. – Suppl. 1. – P. 292.
89. Chabrier P.E. Facteurs de croissance et paroi vasculaire // *Phlebologie.*-1995. - Vol.48, №SPECIAL. - P.115-119.
90. Cines D.B., Pollak E.S., Buck C.A. et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders // *Blood.* - 1998. - 91 (10). - P. 3527-3561.
91. Ciuffetti G., Lombardini R., Pasqualini L., et al. Circulating leucocyte adhesion molecules in chronic venous insufficiency // *Vasa.* – 1999. - Vol. 28, № 3. - P. 156-159.
92. Clarke, G.H., Vasdekis, S.N., Hobbs, J.T., Nicolaides, A.N. Venous wall function in the pathogenesis of varicose veins. // *Surgery.* – 1992. - Vol. 111, N. 4. - P. 402-408.
93. Colledre J. Etiology and pathophysiology of varicose vein. Venous and lymphatic diseases. Edited by Labropoulos N. and Stansby G. Taylor and Francis. 2006; 237-243.
94. Coleridge Smith P.D. The microcirculation in venous hypertension. *Vasc Med* 1997; 2: 203-13.
95. Coleridge Smith P.D., Tomas P., Scurr S.H., Dormandy S.A. Causes of venous ulceration: A new hypothesis. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)*. 1988; 296: 1726-1727.
96. Coleridge Smith P.D. *Microcirculation in Venous Disease* (Second edition), Landes Bioscience. 1998; 234, ISBN: 1-57059-476-7.

97. Cooke J.P. Flow activates endothelial potassium channel to release endogenous nitrovasodilator / J.P. Cooke [et al.] // Clin Invest. – 1991. – 88. – P.1663-1671.
98. Cooke J.P., Tsao P.S. Is NO an endogenous antiatherogenic molecule? // Arterioscler. Thromb. – 1994. – Vol. 14, № 3. – P. 653-655.
99. Dejana E. and Del Maschio, A. Molecular organization and functional regulation of cell to cell junctions in the endothelium. // Thromb. Haemost. - 1995. – 74.- P.309-312.
100. Del Maschio, A., Zanetti, A., Corada, M., Rival, Y., Ruco, L., Lampugnani, M. G. and Dejana, E. Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions. // J. Cell Biol. - 1996.- 135. –P.497-510.
101. Dormandy J.A. Influence des cellules sanguines et du flux sanguin sur l'endothelium veineux // Phlebologie.-1995. - Vol.48, №SPECIAL. - P.137-140.
102. Eberhardt RT, Raffetto JD. Chronic venous insufficiency. Circulation 2005;111:2398-409.
103. Eklof B, Rutherford RB, Bergan JJ, et al. Revision of the CEAP classification for chronic venous disorders: consensus statement. J Vasc Surg 2004; 40:1248–1252.
104. Elsharawy MA, Naim MM, Abdelmaguid EM, Al-Mulhim AA. Role of saphenous vein wall in the pathogenesis of primary varicose veins. Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg. 2007; 6:219–224.
105. Fowkes FG, Evans CJ, Lee AJ. Prevalence and risk factors of chronic venous insufficiency. Angiology 2001; 52(suppl 1):S5–S15.
106. Fukuda S., Schmid-Schonbein G.W. Regulation of CD18 expression on neutrophils in response to fluid shear stress. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:13152-7.
107. Fukuda S., Yasu T., Predescu D.N., Schmid-Schonbein G.W. Mechanisms for regulation of fluid shear stress response in circulating leukocytes. Circ Res 2000; 86:E13-E18.

108. Furchgott RF. Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide // *Biosci. Rep.* – 1999. – Vol. 19, № 4. P. 235–51
109. Golledge J., Quigley F. G. Pathogenesis of varicose veins // *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* – 2003, apr; 25 (4): 319–324.
110. Hladovec J. Circulating endothelial cells as a sign of vessel wall lesions. // *Physiol. Bohemoslov.* - 1978. - Vol. 27, N. 2. - P. 140-144.
111. Huk I., Brovkovich V., Nanobashvili I. et al. Bioflavonoids quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischemic-reperfusion injuru: an experimental study. *Br. Heat J.* 1996; 85: 8:1080-1085.
112. Junger M., Steins A., Hahn M., Hafner H.M. Microcirculatory dysfunction in chronic venous insufficiency (CVI) // *Microcirculation.* – 2000. - Vol. 7, № 6, Pt. 2. – S.3-12.
113. Kibbe M.R., Pearce W.H., Yao S.T. *Modern Trends in Vascular Surgeri. Venous Disorders*, People's Medical Publishing House – USA Shelton, Connecticut. 2010; 389, ISBN: 978-1-60795-051-6.
114. Kockx MM, Knaapen MW, Bortier HE, et al. Vascular remodeling in varicose veins. *Angiology* 1998; 49: 871–877.
115. Lim CS, Davies AH. Pathogenesis of primary varicose veins. *Br. J. Surg.* 2009; 96: 1231–1242.
116. Lurie F., Kistner R.L., Eklof B., Kessler D. Mechanism of venous valve closure and role of the valve in circulation: a new concept. *J Vasc. Surg* .2003;38: 955-61.
117. Luscher T.F. Endothelium-derived vasoactive factors and regulation of vascular tone in human blood vessels // *Lung.* – 1990. - Vol. 168, Suppl. – P. 27-34.
118. Luscher T.F. The Endothelium and Cardiovascular Disease - A Complex Relation // *N.E.J.M.* – 1994. - Vol.330, №15. – P. 1081-1083.

119. Lusher T.F., Barton M. Biology of the endothelium // Clin. Cardiol. – 1997. – Vol. 10 (suppl 11). – P. 3-10.
120. Mangiafico R.A., Malatino L.S., Santonocito M., et al. Plasma endothelin-1 release in normal and varicose saphenous veins // Angiology. – 1999. - Vol. 48, № 9. – P. 769-774.
121. Meissner MH, Gloviczki P, Bergan J, et al. Primary chronic venous disorders. J. Vasc. Surg. 2007; 46(suppl. S):54S–67S.
122. Michiels C., Arnould T., Janssens D., et al. Interactions between endothelial cells and smooth muscle cells after their activation by hypoxia. A possible etiology for venous disease // Int. Angiol. – 1996. - Vol. 15, № 2. - P. 124-130.
123. Michiels C., Arnould T., Remacle J. Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions // J. Biochim. Biophys. Acta. – 2000. - Vol. 1497, № 1. – P. 1-10.
124. Michiels C., Bouaziz N., Remacle J. Role of the endothelium and blood stasis in the appearance of varicose veins // Int. Angiol. – 2002. - Vol.21, №1. – P. 1-8.
125. Moazzam F., DeLano F.A., Zweifach B.W., Schmid-Schonbein G.W. The leukocyte response to fluid stress. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 1997; 94: 5338-43.
126. Moyses C, Cederholm-Williams SA, Michel CC. Haemoconcentration and accumulation of white cells in the feet during venous stasis. Int J Microcirc Clin Exp 1987; 5: 311-20.
127. Mulivor A.W., Lipowsky H.H. Role of the glycocalyx in leukocyte-endothelial cell adhesion. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002; 283: H1282-H1291.
128. Müller A.M., Cronen C., Müller K.M., Kirkpatrick C.J. Heterogeneous expression of cell adhesion molecules by endothelial cells in ARDS // J. Pathol. 2002 Oct;198(2):270-5.
129. Naoum JJ, Hunter GC, Woodside KJ, Chen C. Current advances in the pathogenesis of varicose veins. J. Surg. Res. 2007; 141:311–316.

130. Nicolaides A., Allegra C., Bergan J. et al. Management of Chronic Venous Disorders of the Lower Limbs: Guidelines According to Scientific Evidence. *Int. Angiology*. 2008; 27: 1-59.
131. Niebes P. Vessel wall modification in venous pathology. Application to the study of phlebotonic drugs / P. Niebes // *Int. Angiol.* – 1996. – Vol.15. – N2. – P. 88-92.
132. [Nees S](#), [Weiss DR](#), [Reichenbach -Klinke E](#), [Rampp F](#), [Heilmeier B](#), [Kanbach J](#), [Esperester A](#). Protective effects of flavonoids contained in the red vine leaf on venular endothelium against the attack of activated blood components in vitro. [Arzneimittelforschung Forschung](#). 2003; 53(5):330-41.
133. Ohura N, Yamamoto K, Ichioka S, et al. Global analysis of shear stress-responsive genes in vascular endothelial cells. *Jtheroscler Thromb* 2003;10: 304-13.
134. Ono T., Bergan J.J., Schmid-Schönbein G.W., Takase S. Monocyte infiltration into venous valves. *J. Vasc. Surg.* 1998;27:158-66.
135. Pappas P.J., Lal B.K., Ohara N. et al. Regulation of matrix contraction in chronic venous disease. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2009; 38: 518–529.
136. Pascarella L., Schmid-Schonbein G.W., Bergan J. An animal model of venous hypertension: the role of inflammation in venous valve failure. *J. Vasc. Surg.* 2005; 41: 303-11.
137. Perrin M., Bayon J.M., Hiltbrand B., Nicolini P. Deep venous insufficiency and recurrent varicose veins after surgery of superficial venous insufficiency // *J. Mal. Vasc.* – 1997. – Vol. 22, N. 5. – P. 343-347.
138. Peschen M., Lahaye T., Hennig B., et al. Expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, LFA-1 and VLA-4 in the skin is modulated in progressing stages of chronic venous insufficiency // *Acta Dermato-Venereologica*. – 1999. - Vol. 79, № 1. – P. 27-32.
139. Qui Y., Quijano R.C., Wang S.K., Hwang N.H. Fluid dynamics of venous valve closure. *Ann Biomed Eng.* 1995; 23:750–759.

140. Raffetto JD, Khalil RA. Mechanisms of varicose vein formation: valve dysfunction and wall dilation. *Phlebology* 2008; 23:85–98.
141. Recurrent varices after surgery (REVAS), a consensus document / M.R. Perrin [et al] // *Cardiovascular Surg.* – 2000. – Vol. 8, № 4. – P. 233–239.
142. Saharay M., Shields D.A., Georgiannos S., et al. Endothelial activation in patients with chronic venous disease // *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* – 1998. - Vol. 15, № 4. – P. 342-349
143. Saharay M., Shields D.A., Porter J.B., et al. Leukocyte activity in the microcirculation of the leg in patients with chronic venous disease // *J. Vasc. Surg.* – 1997. - Vol. 26, № 2. – P. 265-273.
144. Sayer GL, Smith PD. Immunocytochemical characterisation of the inflammatory cell infiltrate of varicose veins. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2004; 28:479–483.
145. Schmid-Schonbein G.W., Takase S., Bergan J.J. New advances in the understanding of the pathophysiology of chronic venous insufficiency // *Angiology.* – 2001. - Vol. 52, Suppl. 1. – P. S27-34.
146. Schuller-Petrovic, S. Imbalance between the endothelial cell-derived contracting factors prostacyclin and angiotensin II and nitric oxide/cyclic GMP in human primary varicosis / S. Schuller-Petrovic, S. Siedler, T. Kern // *Brit. J. Pharmacol.* – 1997. – Vol. 122, N 4. – P. 772-778.
147. Secomb TW, Hsu R, Pries AR. Effect of the endothelial surface layer on transmission of fluid shear stress to endothelial cells. *Biorheology* 2001;38:143-50.
148. Shaw S.K., Ma S., Kim M.B., et al. Coordinated redistribution of leukocyte LFA-1 and endothelial ICAM-1 accompany neutrophil transmigration. // *J Exp Med.* 2004;200:1571-1580.
149. Shoab S.S., Porter J., Scurr J.H., Coleridge-Smith P.D. Endothelial activation response to oral micronised flavonoid therapy in patients with chronic venous disease--a prospective study // *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* – 1999. - Vol. 17, № 4. – P. 313-318.

150. Takase S., Schmid-Schonbein G., Bergan J.J. Leukocyte activation in patients with venous insufficiency // J. Vasc. Surg. – 1999. - Vol. 30, № 1. – P. 148-156.
151. Takase S., Bergan J.J., Schmid-Schonbein G. Expression of adhesion molecules and cytokines on saphenous veins in chronic venous insufficiency // J. Ann. Vasc. Surg. – 2000. - Vol. 14, № 5. – P. 427-435.
152. Takase S., Pascarella L., Lerond L., Bergan J.J., Schmid-Schonbein G.W. Venous hypertension, inflammation and valve remodeling. Eur J Vasc Endovasc Surg 2004;28: 484-93.
153. Takase S., Pascarella L., Bergan J.J., Schmid-Schonbein G.W. Hypertension-induced venous valve remodeling. J Vasc Surg 2004; 39: 1329-34.
154. Thomas PR, Nash GB, Dormandy JA. White cell accumulation in dependent legs of patients with venous hypertension: a possible mechanism for trophic changes in the skin. Br Med J (Clin Res Ed) 1988; 296: 1693-5.
155. Thulesius O. The venous wall and valvular function in chronic venous insufficiency // Int. Angiol. – 1996. - Vol. 15, № 2. – P. 114-118.
156. Thiery L. Лечение ранних стадий хронической венозной недостаточности нижних конечностей // Флебологическая.- 2003.- №17.- с.3-7.
157. Traub O., Berk B.C. Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. Arterioscler. Thromb .Vasc .Biol .1998; 18 : 677-85.
158. Wali M.A., Sheehan S.J., Colgan M.P., Moore D.J., Shanik G.D. Recurrent varicose veins // East. Afr. Med. J. – 1998. – Vol.75, №.3. – P. 188-191
159. Wali MA, Dewan M, Eid RA. Histopathological changes in the wall of varicose veins. Int Angiol 2003; 22:188–193.
160. Weyl A., Vanscheidt W., Weiss J.M., et al. Expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin and their ligands VLA-4 and LFA-1 in chronic venous leg ulcers // J. Am. Acad. Dermatol. –1996. - Vol. 34, № 3. – P. 418-423.

161. Wilkinson L.S., Bunker C., Edwards J.C. et al. Leukocytes: their role in the etiopathogenesis of skin damage in venous disease // J. Vasc. Surg.— 1993.— 17.— P. 669—675
162. Woywodt A, Bahlmann F, de Groot K, Haller H, Haubitz M. Circulating endothelial cells: Life, death, and repair of the endothelial cell layer. Nephrology, Dialysis, Transplantation 2002; 17: 1728-1730
163. Yamada T, Tomita S, Mori M, et al. Increased mast cell infiltration in varicose veins of the lower limbs: a possible role in the development of varices. Surgery 1996; 119:494–497.
164. Yong K, Khwaja A. Leukocyte cellular adhesion molecules. Blood Rev 1990;4:211-25.
165. Yoshizumi M., Abe J, Tsuchiya K., Berk B.C., Tamaki T. Stress and vascular responses: atheroprotective effect of laminar fluid shear stress in endothelial cells: possible role of mitogen-activated protein kinases. J Pharmacol Sci 2003; 91: 172-6.
166. Young I.S., Woodside J.V. Antioxidants in health and disease. J. Clin. Pathol. 2001; 54: 1: 176-186.
167. Zhang S., Morris M.E. Effect of the Flavonoids Biochanin A, Morin, Phloretin and Silymarin on P-Glycoprotein-Mediated Transport. J. Pharmacol. Experimental Therapeutics. 2003 ; 304: 3:1258-1267.
168. Zhao Y., Chien S., Weinbaum S. Dynamic contact forces on leukocyte microvilli and their penetration of the endothelial glycocalyx. Biophys J 2001; 80: 1124-40.