

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РЯЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.П. ПАВЛОВА
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ»

На правах рукописи

Новиков Алексей Николаевич

Экспериментальное моделирование венозной эндотелиальной дисфункции и ее
коррекция препаратом микронизированной очищенной флавоноидной фракции
диосмина

14.01.26 – сердечно-сосудистая хирургия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор Калинин
Роман Евгеньевич

Рязань - 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Эндотелиальная дисфункция и её значение при венозной патологии	11
1.2. Воспроизведение венозной эндотелиальной дисфункции в эксперименте	20
1.3. Применение биофлавоноидов при различных заболеваниях сердечно-сосудистой системы	25
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	30
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ ...	44
3.1. Биохимическая характеристика функционального состояния эндотелия в исследуемых группах до и после применения микронизированной очищенной флавоноидной фракции диосмин	44
3.2. Особенности морфологической картины и ультраструктурных изменений венозной стенки в экспериментальных группах в различные сроки исследования.	64
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	84
ВЫВОДЫ	90
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	91
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	92

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДМА	несимметричный диметиларгинин
АДФ	аденозиндифосфат
АОС	антиоксидантная система
ВТЭО	венозные тромбозмболические осложнения
ГМК	гладкомышечные клетки
ГП	глутатионпероксидаза
ИФА	иммуноферментный анализ
КАТ	каталаза
МДА	малоновый диальдегид
МОФФ	микронизированная очищенная фракция флавоноидов
МЦР	микроциркуляторное русло
ОПВ	общая подвздошная вена
ПОЛ	перекисное окисление липидов
ПТС	посттромботический синдром
СОД	супероксиддисмутаза
ТГВ	тромбофлебит глубоких вен
ТЭЛА	тромбоэмболия легочной артерии
ФНО - α	фактор некроза опухолей α
ФСЭ	функциональное состояние эндотелия
ФЭК	фотоэлектрокалориметр
ХЗВ	хронические заболевания вен
цГМФ	циклический гуанозинмонофосфат
ЦЭК	циркулирующие эндотелиальные клетки
ЭД	эндотелиальная дисфункция
ВН ₄	5,6,7,8 - тетрагидробиоптерин
Ca ²⁺	кальций
FDN	флавинадениндинуклеотид
FeCl ₃	хлорид железа (III)
FMN	флаavinмононуклеотид

GSH	глутатион восстановленный
L-NAME	N-нитро-L-аргинин метиловый эфир
NADPH	никотинамидадениндинуклеотидфосфа
NMMA	t монометил-L-аргинин
NO	оксид азота (II)
NOS	синтаза окиси азота
NOS-1(nNOS)	нейрональная NO синтаза
NOS-2 (iNOS)	индуцибельная NO синтаза
NOS-3 (eNOS)	эндотелиальная NO синтаза
O ₂	молекулярный кислород
OH [•]	гидроксильный радикал
ONOO ⁻	пероксинитрит

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Заболевания венозной системы являются наиболее распространенной патологией периферических сосудов [46]. Варикозное расширение подкожных вен нижних конечностей, венозные тромбозы и их осложнения занимают ведущее место в структуре венозной патологии [46]. Венозные тромбоэмболические осложнения (ВТЭО) являются ведущей причиной смертности и инвалидизации населения в России, Европе и США с ежегодной частотой возникновения в популяции 1-3 случая на 1000 жителей [41, 56, 124, 134, 236]. В общей популяции ежегодно фиксируют 50 – 70 новых случаев заболевания на 100000 населения. В пожилом и старческом возрасте частота тромбоза глубоких вен (ТГВ) увеличивается в несколько раз (до 200 случаев на 100000 населения в год). Тромбоэмболию легочной артерии (ТЭЛА) регистрируют ежегодно с частотой 35-40 на 100000 человек. Экстраполяция этих данных на население Российской Федерации свидетельствует о том, что ежегодно когорта «венозных» пациентов в нашей стране увеличивается на 90 – 100 тыс. [40]. В США ежегодно регистрируется примерно 1 млн. случаев ТГВ, 300 тыс. из которых с подтвержденной ТЭЛА с летальностью до 30% [144, 156]. Lindblad В. с соавторами отмечает малую вариабельность показателя заболеваемости ТЭЛА несмотря на профилактические мероприятия у пациентов хирургических стационаров [145]. Среди причин летальности, по данным Coombes R., ВТЭО занимают третье место, вслед за инфарктом миокарда и инсультом [86]. Посттромботический синдром (ПТС), являясь наряду с постэмболической лёгочной гипертензией основным последствием ВТЭО, регистрируется у пациентов с частотой до 50% [139].

По данным эпидемиологического исследования Vein Consult Program (октябрь 2009 – июль 2011), проходившего в 20 государствах Европы, Латинской Америки, средне- и дальневосточных регионов, распространённость различных стадий хронической венозной недостаточности в общей популяции составила 64% [111]. В России ежегодно более 35 млн. человек с хроническими заболеваниями

венозной системы нижних конечностей нуждаются в специализированной помощи, 1,5 млн. из которых имеют инвалидность, страдая тяжелыми трофическими расстройствами [38].

Социально-экономические издержки из-за ВТЭО в развитых странах составляют от 1 до 3% от общего бюджета системы здравоохранения в год. Так, в США совокупные потери в связи с лечением трудоспособного населения составляют примерно 2 млн. рабочих часов и от 3 до 10 млрд. долларов ежегодно [78, 212]. Таким образом, актуальность проблемы заболеваний венозной системы весьма сложно переоценить.

Не менее остро на сегодняшний день стоит вопрос об этиологии и патогенезе острых и хронических заболеваний вен, в связи с наметившимся переосмыслением взглядов на механизмы развития патологических состояний венозной системы. В частности, в последние годы, все большее количество сторонников получает теория эндотелиальной дисфункции (ЭД) в развитии различных заболеваний сосудов [9, 10, 11, 13, 25, 26, 31, 32, 33, 34, 42]. Рассмотрение роли ЭД в этиологии и патогенезе заболеваний венозной системы ни коим образом не отрицает сформулированных факторов риска ВТЭО и варикозной трансформации вен, однако позволяет трактовать их по-иному, находя новые причинно-следственные связи [43, 99, 128, 185]. Теория дисфункции эндотелия – многогранна, с множеством вероятных механизмов повреждения эндотелиоцитов, таких как активированные лейкоциты, свободные радикалы и продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ), пероксинитрит (NOOO^-), гипопродукция оксида азота (II) (NO) вследствие воздействия различных факторов [13].

На сегодняшний день разработаны различные клинико-диагностические и медикаментозные алгоритмы лечения и профилактики ВТЭО [40, 77,]. В лечении хронических заболеваний вен (ХЗВ) первостепенная роль уделяется снижению симптоматики хронической венозной недостаточности [230].

Биофлавоноиды – наиболее распространенная группа препаратов, применяющихся у пациентов флебологического профиля, с широким спектром

фармакологических эффектов: венотонизирующий, лимфотропный, капилляропротективный, ангиопротективный, противовоспалительный, противоопухолевый и т.д. Все эти эффекты так или иначе обусловлены антиоксидантной активностью биофлавоноидов. Таким образом, данная группа препаратов имеет вполне доказанное и выраженное влияние на ключевой механизм развития эндотелиальной дисфункции – оксидативный стресс, что и обуславливает их успешное применение как при венозной, так и при артериальной патологии. На сегодняшний день биофлавоноиды занимают ведущее место в консервативном лечении венозной патологии [3, 46, 68, 169].

Ряд авторов отмечает высокую степень корреляционной связи между атеросклерозом и ВТЭО. При этом именно дисфункция эндотелия признается фоновым процессом, благоприятствующим развитию патологической перестройки как артериальной, так и венозной стенки [57, 61, 62, 66, 99, 121, 130, 195]. Дисфункция эндотелия может быть самостоятельной причиной нарушения кровообращения в органе, поскольку нередко провоцирует ангиоспазм или тромбоз сосудов, что, в частности, наблюдается при некоторых формах ишемической болезни сердца, с другой стороны, нарушения регионарного кровообращения (ишемия, венозный застой) также могут приводить к дисфункции эндотелия [13].

В настоящее время роль ЭД в развитии атеросклеротического поражении артериального русла признана в широких кругах ученых, однако, до настоящего времени, нарушение функционального состояния эндотелия (ФСЭ) не рассматривалось в качестве вероятных причин развития и прогрессирования венозной патологии. Данный факт послужил предпосылкой к выполнению настоящей работы.

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

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

Исходя из вышесказанного были сформулированы цели и задачи настоящей работы.

Цель исследования

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

Задачи исследования

1. Оценить возможности воспроизведения различных патологических состояний сердечно-сосудистой системы в качестве моделей венозной эндотелиальной дисфункции в эксперименте.
2. Оценить функциональное состояние эндотелия, процессы ПОЛ и активность АОС при экспериментальном воспроизведении различных патологических состояний.
3. Провести оценку морфологических изменений венозной стенки при различных экспериментально индуцированных патологических состояниях сердечно-сосудистой системы.
4. Оценить влияние препарата микронизированной очищенной флавоноидной фракции диосмина на исследуемые в эксперименте параметры.

Научная новизна

В группах лабораторных животных при различных экспериментальных моделях венозной патологии впервые проведена комплексная биохимическая оценка маркеров ФСЭ (NO и индуцибельной синтазы NO (iNOS)), биохимических показателей ПОЛ (малонового диальдегида (МДА)), АОС (супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГП)) и морфологической картины венозного русла. Также проведен анализ влияния препарата очищенной флавоноидной

фракции диосмина (МОФФ) на маркеры оксидативного стресса, дисфункции эндотелия, АОС и морфологические изменения венозной стенки при различных экспериментальных моделях ЭД.

Научно-практическая значимость работы

1. Результаты данной работы позволят определить роль ЭД при венозной патологии как неотъемлемого фонового процесса, лежащего в основе развития и прогрессирования заболеваний, что в практической медицине найдёт своё применение в лечении и профилактики заболеваний вен.
2. Отмечена важность динамического равновесия процессов ПОЛ и АОС в развитии и прогрессировании ЭД и необходимость коррекции его нарушений.
3. Показана эффективность МОФФ – флеботропного препарата выбора при различных экспериментальных моделях венозной патологии с позиции его эндотелиотропных эффектов, оценка которых носила комплексный характер.

Основные положения, выносимые на защиту

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

Внедрение результатов исследования в практику и учебный процесс

Результаты исследования внедрены в лечебную работу отделения сосудистой хирургии ГБУ РО «Областной клинический кардиологический

диспансер» и отделения сосудистой хирургии МУЗ «Коломенская ЦРБ», в учебную работу кафедры ангиологии, сосудистой, оперативной хирургии и топографической анатомии ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.

Апробация работы

Основные результаты работы доложены и обсуждены на XIII международной студенческой конференции «Студенческая медицина XXI века» (Витебск, 2013), Всероссийской научной конференции, посвященной 90-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина (Рязань, 2013), V Международном молодёжном медицинском конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения» (Санкт-Петербург, 2013), XVIII Ежегодной сессии НЦССХ им. А.Н. Бакулева с Всероссийской конференцией молодых ученых (Москва, 2014), VIII Международной научно-практической конференции «Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования», посвящённая памяти профессора А.П. Солодкова (Витебск, 2014), X Юбилейной научно-практической конференции Ассоциации флебологов России (Нижний Новгород, 2014), II Весеннем съезде Европейского общества сосудистых хирургов (Лондон, 2014), XXIX Международной конференции Российского общества ангиологов и сосудистых хирургов «Новые направления и отдалённые результаты открытых и эндоваскулярных вмешательств в лечении сосудистых больных» (Рязань, 2014), XV ежегодном Европейском Венозном Форуме (Париж, 2014).

Публикации

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

Объём и структура диссертации

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

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Эндотелиальная дисфункция и ее значение при венозной патологии

Эндотелий – монослой эпителиальных клеток мезенхимального происхождения, находящийся на границе между кровотоком и более глубокими слоями сосудистой стенки. Помимо барьерной функции, эндотелий выполняет роль мощного паракринного органа, играющего важную роль в поддержании сосудистого гомеостаза, тонуса и анатомической структуры сосудистой стенки [13, 25, 30, 52].

Эндотелиальная дисфункция – дисбаланс между медиаторами, обеспечивающими в норме оптимальное течение всех эндотелийзависимых процессов [13, 22]. В трактовке Endermann D. H., ЭД – патологическое состояние эндотелия, которое сопровождается преобладанием процессов вазоконстрикции и усилением синтеза веществ, обладающих провоспалительными и протромботическими свойствами [98]. В физиологических условиях эндотелий обеспечивает адекватную вазодилатацию, угнетает активацию и адгезию тромбоцитов, снижает прокоагулянтные свойства крови и активность воспалительных процессов, в основе которых лежит активация и адгезия лейкоцитов [105, 159, 162]. Наиболее вероятными механизмами развития ЭД являются: повреждение эндотелиальных клеток (ЭК) в условиях оксидативного стресса и ишемического повреждения, гипергомоцистеинемия, активация локального иммунного ответа, формирование провоспалительного статуса, нарушение процессов вазоконстрикции и вазодилатации вследствие снижения продукции и/или биодоступности NO [25, 30, 98, 100, 118, 151, 154, 179, 197, 204, 216, 226].

По данным Киричук В.Ф. и Глыбочко А.И. ЭД в своём развитии претерпевает следующие стадии [13]:

- ✓ нарушение синтетической функции эндотелия;
- ✓ нарушение баланса между секретируемыми медиаторами с последующими функциональными нарушениями;

- ✓ морфологические изменения, истощение эндотелия, повреждение, гибель эндотелиоцитов, нарушение процессов регенерации клеток.

С целью выявления ЭД в клинической практике используются инструментальные методы диагностики (прямая плетизмография, ультразвуковая диагностика), исследование эндотелий-зависимой вазодилатации с помощью фармакологических проб, пробы с реактивной гиперемией, холодным и ментальным стрессом. Также весьма важным методом оценки ЭД является лабораторная диагностика синтетической активности эндотелия, однако метаболиты обладают неодинаковой диагностической ценностью [12, 13, 14, 8, 37, 30, 15]. По данным Н.Н. Петрищева, важным и специфичным методом диагностики ЭД является определение количества циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) [8, 37, 127]. При этом превостепенная роль в диагностике ЭД отводится биохимическим методам, способным выявить нарушение ФСЭ на начальных стадиях, до потери жизнеспособности и десквамации ЭК [13].

По скорости образования в эндотелии различных факторов, а также по преимущественному направлению их секреции (внутриклеточная или внеклеточная) вещества эндотелиального происхождения можно разделить на следующие группы [7, 13, 25, 37, 52]:

1. факторы, постоянно образующиеся в эндотелии и выделяющиеся из клеток в базолатеральном направлении или в кровь (NO, простаглицлин);
2. факторы, накапливающиеся в эндотелии и выделяющиеся из него при его активации, повреждении и стимуляции (фактор Виллебранда, Р-селектин, тканевой активатор плазминогена);
3. факторы, синтеза которых в нормальных условиях практически не происходит, однако он резко увеличивается при активации эндотелия (эндотелин-1, межклеточная молекула адгезии-1, молекула адгезии сосудистой стенки-1, Е-селектин);
4. факторы, синтезируемые и накапливающиеся в эндотелии (тканевой активатор плазминогена), либо являющиеся мембранными белками (рецепторами)

эндотелия (тромбомодулин, рецептор протеина С).

Несмотря на широкий спектр возможных биохимических маркеров ЭД, большинство авторов возлагает на NO роль интегрального показателя ФСЭ [7, 22, 23, 35, 39, 91, 147, 149, 152, 160, 161, 165, 170, 171, 172, 174, 183, 188, 197, 228]. Оксид азота (II) является одним из универсальных и необходимых регуляторов функций клеточного метаболизма, а его дефицит занимает ведущее место в патогенезе эндотелиальной дисфункции и является основным пусковым фактором всего каскада проявлений и последствий ЭД [7, 13, 22, 23, 25, 26, 157, 161, 165]. NO – восстановленная форма монооксида азота с чрезвычайно коротким сроком жизни (от 2 до 30 сек.), представляющая собой растворимый в воде и жирах газ с уникальными физиологическими свойствами. Оксид азота (II) – короткоживущая молекула с огромным арсеналом физиологических и патофизиологических эффектов. Имея неспаренный электрон, молекула NO является высоко активным радикалом, свободно проникающим через мембраны и активно участвующим в биохимических реакциях, по сути, являясь, локальным тканевым гормоном [7, 13]. При взаимодействии с биологическими субстратами оксид азота (II) окисляется до нитратов и нитритов, по суммарному содержанию которых в сыворотке крови косвенно определяется его содержание в лабораторных условиях [7, 28, 47].

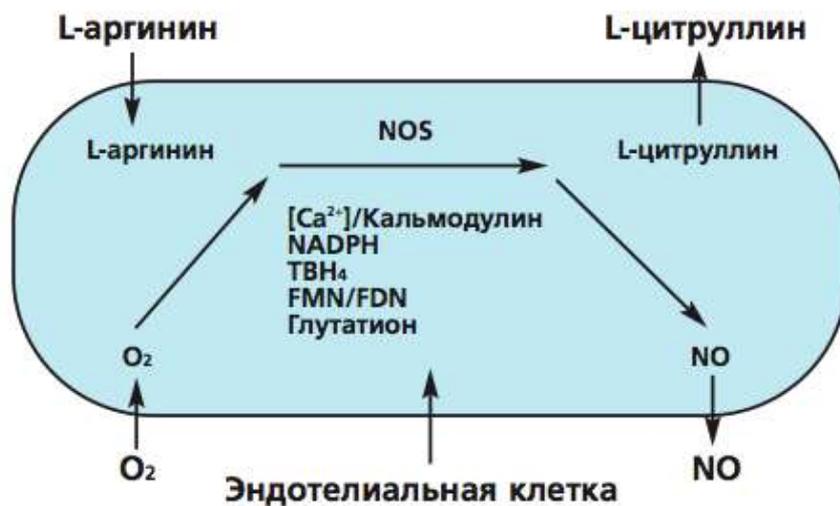


Рис. 1. Схема реакции синтеза оксида азота (II) под действием eNOS [149].

В норме, NO образуется в клетках эндотелия из L-аргинина под действием кальций-/кальмодулинзависимой изоформы фермента NO-синтазы (NOS) при участии ко-факторов никотинамидадениндинуклеотида восстановленного (NADPH), 5,6,7,8 - тетрагидробиоптерина(BH₄), флавиномононуклеотида/флавинадениндинуклеотида (FMN/FDN) и глутатиона восстановленного (GSH). Субстратами реакции служат L – аргинин и молекулярный кислород (O₂), а её продуктами являются оксид азота (NO) и L – цитруллин (рисунок 1) [7, 13, 26, 52]. Выделяют 3 изоформы NOS: NOS-1 – нейрональная (nNOS); NOS-2 – индуцибельная (iNOS); NOS-3 - эндотелиальная (eNOS) [7, 13, 52, 63, 122, 137, 153, 173, 234, 237]. В физиологических условиях основной вклад в синтез NO вносит эндотелиальная синтаза оксида азота (II). Она локализована в кавеолах (лакунообразных участках эндотелиальных клеток плазматической мембраны), где соединена с кавеолином. В подобном комплексе её активность резко снижена. Под влиянием ряда рецепторзависимых стимулов (ацетилхолин, брадикинин, серотонин, тромбин, глутамат, аденозиндифосфат (АДФ), субстанция Р), вызывающих смещение (вытеснение) eNOS из комплекса кавеолин – eNOS и повышающих концентрацию кальция в эндотелиальных клетках (ЭК), происходит высвобождение eNOS из плазматической мембраны, её активация кальцием-кальмодулином, окисление L-аргинина и синтез NO [26, 153, 161].

Активность nNOS и eNOS напрямую зависит от концентрации кальция (Ca²⁺) и кальмодулина в клетке и мало подвергается внешней коррекции [7, 13, 52]. Индуцибельная синтаза оксида азота (II) может образовываться в больших количествах под действием различных факторов и в основном выявляется в эндотелиальных клетках и скелетных мышцах. Именно iNOS обуславливает гиперпродукцию NO при различных патологических состояниях [7, 13, 58, 152]. В физиологических условиях наиболее значимым стимулом для выработки NO эндотелием является напряжение сдвига (shear stress) - интенсивность воздействия потока крови на сосудистую стенку [7, 13, 28].

A.J. De Belder с соавторами отмечает участие iNOS в патологических процессах при дилатационной кардиомиопатии, миокардите, при этом активность фермента примерно в 10 раз превышала аналогичный показатель его конститутивных форм [166]. Диаметрально противоположное мнение имеет группа ученых во главе с J. Wu, которые сделали заключение о влиянии высокой активности iNOS на продолжительность функционирования аутовенозного трансплантата вследствие высокого уровня NO и, соответственно, снижении интенсивности процесса интимальной гиперплазии [238].

Стимулируя гуанилатциклазу, NO увеличивает образование циклического ГМФ (цГМФ), что обуславливает расслабление сосудов, в связи с чем он получил второе своё название - эндотелиальный фактор релаксации [7, 13]. Характерными физиологическими эффектами оксида азота (II) являются регуляторное влияние на проницаемость сосудов, нейротрансмиссию, бронходилатацию, систему противоопухолевого иммунитета, функцию почек, ингибирование пролиферации гладкомышечных клеток, снижение активности тромбоцитов и макрофагов. NO имеет антиоксидантную активность, ингибирует адгезию лейкоцитов и защищает от токсического действия фактора некроза опухолей α (ФНО - α) [7, 13, 228].

Центральное место в патофизиологических эффектах NO занимает его участие в процессах свободно-радикального окисления, а именно – его взаимодействие с активными формами кислорода, приводящее к образованию пероксинитрита и в итоге – к образованию цитотоксического продукта их распада – гидроксильный радикал (OH^\bullet). Подобный эффект приводит к повреждению различного рода макромолекул – белков, липидов, нуклеиновых кислот. Как супероксид-анион, так и NO являются свободными радикалами кислорода. Их взаимодействие протекает с крайне высокой скоростью ($6,7 \times 10^9$ моль/л⁹с⁻¹), которая в 3 раза выше скорости реакции супероксид-аниона с супероксиддисмутазой. В физиологических условиях антиоксидантная система минимизирует это взаимодействие и поддерживает некий баланс NO и супероксид-аниона [161, 174, 181].

Свободно-радикальное окисление, или перекисное окисление липидов, имеет важное биологическое значение – регуляцию клеточной активности. Физиологическое влияние ПОЛ характеризуется обновлением липидного состава и обеспечением функциональных свойств биомембран, участие в энергетических процессах, клеточном делении, синтезе биологически активных веществ. Однако, при избыточном накоплении свободно-радикальных форм кислорода самоускоряющийся процесс ПОЛ приводит к окислению ненасыщенных липидов, нарушениям структуры и функции белков, нуклеиновых кислот и других молекул [20].

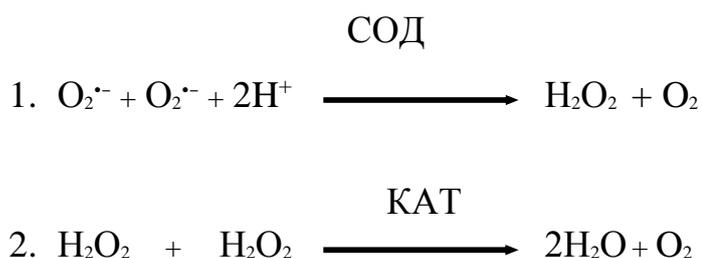
Конечным продуктом ПОЛ является малоновый диальдегид, по количественному содержанию которого можно судить об активности процессов свободно-радикального окисления [19]. МДА сам по себе является агрессивным метаболитом в отношении биологических мембран, вызывая «сшивание» липидов в их составе и, тем самым, снижая их эластичность [18, 19].

В процессе эволюции в клетках аэробов образовались и генетически закрепились антирадикальные защитные механизмы, главную роль среди которых играют ферменты, способные к их каталитической нейтрализации.

Ведущую роль среди данных ферментов занимают:

- 1) Супероксиддисмутаза, катализирующая превращения супероксид-аниона в перекись водорода и молекулярный кислород;
- 2) Каталаза (КАТ), катализирующая распад H_2O_2 до H_2O и O_2 ;
- 3) Пероксидазы, восстанавливающие H_2O_2 до H_2O с использованием различных восстановителей, например, глутатионпероксидаза (ГП) [18].

Перечисленные реакции могут быть представлены следующим образом [18]:





Среди имеющегося спектра регуляторных энзимов аэробов отсутствуют ферменты, способные обезвреживать гидроксильные радикалы, однако, эффективное удаление супероксид-аниона и H_2O_2 делает невозможным образование OH^- . Таким образом, реализация положительных эффектов NO во многом зависит от состояния антиоксидантной системы организма, так как даже при гиперпродукции NO, нормальное функционирование АОС исключает возможность образования агрессивных в отношении биологических систем факторов.

Таким образом, недостаточность антиоксидантной системы приводит к накоплению продуктов ПОЛ, которые обладают повреждающим действием на биологические мембраны, в том числе и на эндотелиоциты, что, по сути, приводит к их дисфункции. Именно повреждающее действие различных факторов на эндотелиоциты лежит в основе развития ЭД, и в первую очередь нарушается ультраструктура эндотелиоцитов, а уже затем - их функциональная активность и последующие гистологические изменения. Учитывая высокую активность свободных радикалов в отношении эндотелиоцитов, ряд авторов рассматривает нарушения функции ферментов АОС наиболее вероятный механизм, способствующий развитию ЭД и являющимся фактором риска развития заболеваний сосудистого русла [82, 96, 101, 106, 107, 110, 119, 164, 175, 201]. Таким образом, только биохимические методы исследования функций эндотелия позволяют выявить их нарушение уже на стадии их инициирования. Метод определения циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) весьма информативен, однако, увеличение уровня ЦЭК определяется, когда каскад биохимических изменений функций эндотелия достигает своего пика [8, 127].

В процессе своего развития и прогрессирования ЭД приводит к формированию протромботических условий: активации тромбоцитарного звена гемостаза, точнее – снижению ингибирующего воздействия NO на тромбоциты,

нарушению целостности эндотелиального монослоя и аномалиям кровотока, в связи с локальными сменами его ламинарного характера на турбулентный на фоне преобладания процессов вазоконстрикции. Совокупность подобных патофизиологических процессов лежит в основе формирования основного предиктора тромбообразования - «триады Virхова» [49, 146].

На сегодняшний день роль ЭД в развитии атеросклероза не вызывает сомнений [67, 71, 79, 102, 143, 202, 203, 209], при этом, Prandoni и соавторы выявили четкую положительную корреляционную связь между атеросклеротическим поражением артериальной стенки и частотой возникновения венозных тромбозов, что не может не свидетельствовать об общих механизмах возникновения и развития этих совершенно разных заболеваний [2, 61, 121, 138, 195, 130, 66, 99, 62]. Эндотелиальная дисфункция признается одним из основных подобных механизмов [66, 87, 103, 104, 138, 232].

Безусловно, значение «триады Virхова» в развитии венозных тромбозов неоспоримо (рисунок 2) [187]. Однако, учение об ЭД позволяет рассмотреть гиперкоагуляцию, патологическое изменение характера кровотока, и повреждение сосудистой стенки как последующие стадии нарушения функции эндотелиоцитов, ибо все эти явления имеют ту или иную зависимость от факторов синтезируемых эндотелием [61, 121, 146, 213, 219].

Одной из наиболее частых локализаций венозных тромбозов является подклапанное пространство. Характер кровотока в местах прилегания венозных клапанов наиболее часто является турбулентным. Таким образом, не только замедление кровотока, но и изменение его характера играет роль в формировании тромбоза и/или венозного рефлюкса [55, 187]. Дефицит NO в венозном русле также имеет своё влияние на характер кровотока – локальные спазмы отдельных гладкомышечных клеток (ГМК) могут являться одной из предпосылок для формирования турбулентного кровотока на определенном участке венозного русла. Учитывая антиагрегантные свойства NO и его игибирующее воздействие на активированные лейкоциты, можно сделать вывод о важной роли данного

метаболита в поддержании равновесия между про- и антикоагулянтными процессами венозного русла.



Рис. 2 Компоненты триады Вирхова

В настоящее время все больше затрагивается вопрос о роли эндотелиальной дисфункции при варикозном расширении подкожных вен нижних конечностей. Однако доминирующая роль в развитии структурных изменений венозной стенки все же отводится феномену «лейкоцитарной агрессии» [114, 168, 208, 218]. Ряд авторов отмечают вторичный характер интенсификации лейкоцитарной адгезии к эндотелию на фоне оксидативного стресса, что говорит о роли последнего, как пускового механизма в цепи патологических процессов [180, 217]. При этом, остается открытым вопрос о первичности поражения эндотелиоцитов при венозной патологии активированными лейкоцитами, либо свободными радикалами.

Шевченко Ю.Л. и соавторы выявили прямую корреляционную связь между количеством ЦЭК и стадиями варикозной болезни, а также о снижении уровня ЦЭК после венэктомии, что говорит о варикозно трансформированной вене как об источнике ЦЭК, т.е. сосуде с органическим поражением, вследствие ЭД [42, 51]. Небылицин Ю.С. и соавторы также описывают повышение уровня ЦЭК и продуктов ПОЛ при тромбофлебитах глубоких вен с одновременным

повышением метаболитов NO, что также характеризует данную патологию с позиции ЭД [31, 32, 33, 34].

Большое внимание в литературе уделяется роли гипоксии в развитии ЭД – как процессу характеризующемуся нарушением перфузионно-реперфузионных отношений между кровотоком и сосудистой стенкой и, тем самым провоцирующим нарушение равновесия между ПОЛ и АОС в сторону интенсификации образования свободных радикалов [163, 184, 217]. Таким образом, при венозной патологии, в частности при ТГВ, создаются необходимые условия для прогрессирования ЭД, что требует поиска новых подходов к данной проблеме с позиции коррекции эндотелиальной дисфункции.

Suzuki H. с соавторами предложил оценивать риск развития венозного тромбоза путем исследования реактивной гиперемии – типичного скрининг-теста нарушений ФСЭ, тем самым уделяя большое внимание роли ЭД в развитии ВТЭО [227].

Эндотелиальной дисфункции венозной системы на начальных стадиях развития свойственны не только функциональные и биохимические сдвиги, но и минимальные ультраструктурные нарушения, которые приводят к нарушению синтетической активности ЭК. Прасол В.А. и соавторы рассматривают митохондриальную недостаточность эндотелиоцитов в качестве иницирующего фактора развития дефицита биоэнергетического обеспечения внутриклеточных синтетических реакций и репаративных процессов. Также отмечается важность субмикроскопической организации базальных мембран, которая является существенным фактором возможности восстановления поврежденного слоя эндотелия, так как пролиферация ЭК в отсутствие базальной мембраны не возможна [45].

1.2. Воспроизведение венозной эндотелиальной дисфункции в эксперименте

По литературным данным, существует два возможных варианта воспроизведения дисфункции эндотелия венозной стенки в эксперименте: моделирование венозной патологии как таковой, либо воспроизведение

системной ЭД, которая в равной степени возникает как в артериальном, так и в венозном русле [1, 24, 29, 32, 44, 48, 50, 112].

Описаны различные способы получения экспериментальных тромбозов у животных. Большинство из них основывается на использовании ведущих факторов, способствующих тромбообразованию (нарушения структуры сосудистой стенки, скорости кровотока, активации компонентов свертывающей системы крови и депрессий противосвертывающих механизмов и т.д.) Важность сочетания этих факторов тромбообразования была доказана многими авторами [29, 48]. Простое лигирование сосуда не вызывает развития тромбоза. Однако, наличие гематомы в окружности выключенного участка сосуда обуславливает образование тромба [29].

В настоящее время все способы получения экспериментального тромбоза можно подразделить на [29]:

- 1) Механические (перевязка, уколы, поколачивание стенки сосуда и введение инородного тела);
- 2) Химические и биохимические (введение в сосудистое русло 1,5% хлористого железа, раствора Люголя, концентрированных солевых растворов, эфира, хлорэтила, хлороформа, скипидара, 30% раствора солициловокислого натрия, токсинов);
- 3) Биофизические (применение постоянного электрического тока различного напряжения);
- 4) Иммунологические (введение в полость кровеносного сосуда сенсibilизированного организма разрешающей дозы сывороток различных видов).

Существенным недостатком такого типа моделирования венозной дисфункции эндотелия можно назвать нарушение истинной хронологии развития сосудистой патологии, т.е. вначале возникает органическое нарушение, а уже затем изменяется содержание продуктов синтеза эндотелия, что противоречит теории эндотелиальной дисфункции, однако, позволяет изучить содержание все

тех же метаболитов уже при развернутой клинической картине венозного тромбоза и, соответственно, посттромботического синдрома.

В литературе дается описание множества методик воспроизведения венозного тромбоза и посттромботического синдрома в эксперименте.

J. Zhou и соавторы осуществляли перевязку нижней полой вены на время от 15 до 60 минут с последующим изучением массы полученных тромбов. Иммуногистохимический анализ показал экспрессию тканевого фактора эндотелиальными клетками и лейкоцитами [135].

P. Pottier и соавторы создали модель, в которой венозный стаз может быть откалиброван путем изменения степени стеноза нижней полой вены в условиях предварительного тромботического состояния за счет частичной перевязки нижней полой вены [88].

Y. Saito и соавторы использовали модель фотодинамического венозного тромбоза под действием зеленого аргонового лазера [113].

Doutremeuich F. и соавторы для формирования венозного тромбоза, после предварительного повреждения эндотелия лазером вводили фибриноген в различных дозах, при этом отмечена прямая корреляционная связь между повышением концентрации фибриногена в плазме крови и риском тромбозомболических осложнений [116].

Ungersböck K. и соавторы применяли медленную инфузию суспензии каолин-кефалин в саггитальный синус крыс после предварительной передней и задней его перевязки [229].

Reyers I. и соавторы перевязывали нижнюю полую вену хлопковой нитью дистальнее левой почечной вены. Через 2 часа дистальный участок нижней полой вены иссекали с последующим измерением массы полученного тромба [199].

Millet J. и соавторы сочетали солевые промывки вен с последующей их перевязкой. Было доказано, что воздействие гипертонического солевого раствора индицирует дискретные эндотелиальные повреждения [155].

Nagai M. и соавторы использовали в своих экспериментах методики с применением хлорида железа (III) (FeCl_3) и фотоактивацией флюоресцеина [200].

Gorman P. и соавторы воспроизводили тромбозы кожных сосудов у крыс путем создания ожога с поражением на всю толщину на спине с помощью латунного бруска [97].

Herbert J. и соавторы вызывали венозный тромбоз перевязкой нижней половой вены у крыс с предварительным внутривенным введением тканевого тромбoplastина [125].

Андреев С.В. и соавторы в 1968 г. описали электролитический метод получения стандартных венозных тромбов с целью изучения различных тромболитических веществ [29].

Самым простым, самым воспроизводимым и наименее травматичным способом воспроизведения экспериментального венозного тромбоза является метод Wessler S. и соавторов: сочетание венозного застоя (лигирования вены) и гиперкоагуляции, за счет введения в сосуд активированного фактора свертывания (например, тромбина) [50, 88, 222, 235].

Модели системной эндотелиальной дисфункции, безусловно, в подавляющем большинстве случаев используются с целью воспроизведения артериальной патологии, однако, с успехом могут применяться и для дисфункции эндотелия вен, ввиду системности своего воздействия на сосудистое русло.

Walker H.A. и соавторы в 2001 г. описали дисфункцию эндотелия на фоне дефицита эстрогенов, вследствие двусторонней овариэктомии у крыс [225].

Paganelli M.O. и соавторы описали никотин-индуцированной ЭД у крыс на фоне введения никотина в течение 4 недель в дозе 2 мг/кг/сут [59].

Young J.S. и соавторы в 1991 г. и Myers P.R. и соавторы в 1995 г. описали модель эндотелиальной дисфункции на фоне эндотоксинемии: лабораторным крысам однократно внутривенно вводился эндотоксин E. Coli в дозе 15 мг/кг [196, 239].

Kumagi Y. описана модель ЭД на фоне применения для водопоя животных водных растворов солей мышьяка с концентрацией 5 мг/л в течение 18 недель [140].

Witting P.K. и соавторы в 2005 г. описали модель дисфункции эндотелия у кроликов путем однократного энтерального введения водного раствора, содержащего 400 мкмоль хлорноватистой кислоты, в течение 2 часов [186].

Forgione M.A. и соавторы в 2002 г. применили на лабораторных мышах модель ЭД, вследствие дефицита глутатионпероксидазы [75].

Широкое распространение в настоящее время получает модель дисфункции эндотелия на фоне гиперурикемии. Chen G.L. и соавторы в 2006 г. получили ЭД на фоне гиперурикемии энтеральным введением крысам экстракта дрожжей в дозе 20-30 мг/кг/сут. в течение 7 суток [76].

Henderson K.K. и соавторы в 2004 г. в качестве модели ЭД применили у свиней гиперхолестериновую диету, включавшую 2% холестерина, 17,1% кокосового масла, 20,3% кукурузного масла и 0,7% холата натрия [108].

Zulli A. и соавторы в 2003 г. воспроизводили ту же модель у кроликов с применением 1% метионина и 0,5% холестерина [126].

Модель гипергомоцистеинемии как ЭД воспроизводилась Shah D.I. в 2007 г. у крыс на фоне энтерального введения L-метионина в течение 4 недель [207]. Тот же автор воспроизвёл в 2006 г. модель дисфункции эндотелия при сахарном диабете, путем применения у крыс стрептозоцина в дозе 55 мг/кг однократно [206].

Так же хорошо зарекомендовала себя модель дисфункции эндотелия на фоне гипертензии, воспроизводимой различными способами.

Share L. и соавторы в 1982 г. воспроизвели вазоренальную гипертензию путем одно- и двустороннего клипирования почечных артерий у крыс [177].

Gout V. и соавторы в 1999 г. воспроизводили гипертензию путем однократного введения крысам монокротанина в дозе 40 мг/кг [131].

Особое место среди моделей эндотелиальной дисфункции занимает L-NAME – индуцированный дефицит оксида азота (II), обуславливающий ингибирование eNOS – ключевого фермента в синтезе NO. Именно данная модель позволяет воспроизвести ЭД *in vivo* в чистом виде, т.е. без затрагивания других систем организма лабораторного животного [141].

В отличие от экспериментальных моделей первой группы к недостаткам данной группы моделей относится отсутствие воспроизведения изучаемого заболевания как такового. Таким образом, проецируя данные модели на венозную патологию, функциональные нарушения в воспроизведенных моделях системной ЭД с малой долей вероятности достигнут органических изменений с последующим тромбозом, хотя именно это интересует нас как клиницистов.

Обобщая обзор перечисленных экспериментальных моделей эндотелиальной дисфункции напрашивается вывод, что для детального и подробного изучения, системного понимания роли дисфункции эндотелия в развитии заболеваний венозной системы, в эксперименте необходимо использовать как модели данных заболеваний, так и системной ЭД, особенно, когда речь идет о медикаментозной ее коррекции.

1.3. Применение биофлавоноидов при различных заболеваниях сердечно-сосудистой системы.

Впервые, термин «флавоноиды» появился в середине 20 века. В 1937 г. А. Сент-Дьерди выделил из лимона и красного перца вещество, способствовавшее укреплению капилляров и повышавшее противогинготную активность аскорбиновой кислоты. Данная субстанция была названа витамином Р (англ. permeability - проницаемость). Её положительное влияние на сосудистую стенку получило название Р-витаминной активности. Позже было выяснено, что данные органические соединения представляют собой широкую группу и встречаются во многих растениях. Все эти соединения имеют различное строение, однако, наличие в их структуре ароматического цикла является их общим признаком. Эти вещества были названы флавоноидами (лат. flavus - жёлтый).

Флавоноиды – группа водорастворимых и липофильных природных фенольных соединений преимущественно оранжевого, красного и жёлтого цветов. В настоящее время известно около 6000 флавоноидов. Все они делятся на несколько подгрупп: халконы, дигидрохалконы, антоцианы, катехины, лейкоантоцианы, производные флавонола, флавонона, флавонола и изофлавонона.

Организм млекопитающих и, в частности, человека не способен синтезировать флавоноиды, в связи с чем, последние – незаменимые компоненты пищи человека и животных. Приблизительная суточная потребность человека во флавоноидах примерно 50-100 мг.

Основными источниками для фармакологического производства флавоноидов служат гречиха, цедра цитрусовых и софора японская.

Биологическая активность флавоноидов обусловлена способностью тормозить окисление аскорбиновой кислоты и ПОЛ, а также связывать ионы тяжёлых металлов, путём образования с ними хелатных комплексов [3].

Основными клиническими эффектами биофлавоноидов, обуславливающими их применение в медицинской практике, являются капилляропротекция и снижение проницаемости сосудистой стенки. Также они выступают в качестве мощных антиоксидантов за счёт повышения абсорбции витамина С и стимуляции окислительных процессов в тканях благодаря ускорению восстановления дегидроаскорбиновой кислоты в высокоактивную аскорбиновую кислоту [81, 83, 93]. Ряд авторов отмечают эндотелиотропные свойства биофлавоноидов, которые обуславливают широчайший спектр клинического применения данных веществ. Подобные эффекты препаратов данной группы по мнению большинства авторов связаны с их антиоксидантными свойствами, либо с прямым активирующим действием на eNOS [60, 64, 65, 109, 115, 120, 123, 132, 133, 136, 150, 190, 194, 198, 205, 223].

Несмотря на широкий спектр терапевтических эффектов флавоноидов, в подавляющем большинстве случаев они применяются у пациентов флебологического профиля. На сегодняшний день, в качестве флебопротекторов, за небольшим исключением, используются только биофлавоноиды и их комбинации [27]. Клиническим эффектом, общим для всех флеботропных препаратов является способность уменьшать выраженность симптомов, обусловленных ХЗВ [193].

Основными механизмами реализации терапевтических эффектов флеботропных препаратов являются:

1. Увеличение венозного тонуса в результате нормализации тока крови, снижения агрегации эритроцитов и лучшей оксигенации эндотелиоцитов;
2. Противоотечный эффект за счёт нормализации проницаемости капиллярной стенки и улучшения лимфатического оттока;
3. Ингибирование адгезии лейкоцитов к эндотелию и их миграции через венозную стенку в паравазальные ткани;
4. Усиление фибринолиза и улучшение реологических свойств крови.

МОФФ – наиболее изученный из известных на сегодняшний день флавоноидов с выраженной флеботропной активностью, представляющий собой диосмин подверженный микронизации, наряду с капилляропротективным действием, обладающий антиоксидантным и антимуtagenными свойствами [4, 80, 84, 85, 89, 90, 93, 94, 95, 142, 169, 176, 178, 189, 191, 192, 210, 211, 214, 215, 220, 221, 224, 231].

Диосмин экстрагируют из различных растений (цедры цитрусовых, цветов мелкозернистой софоры и бобовых) или получают путём расщепления другого биофлавоноида – гесперидина.

В желудочно-кишечном тракте диосмин всасывается после конвертацией микрофлорой в агликон-диосметин, растворимый в липидах. Диосметрин быстро перераспределяется и его период полувыведения может колебаться от 26 до 43 часов.

Концентрация диосметина в плазме демонстрирует линейную зависимость от количества принятого диосмина. Биодоступность последнего повышает ультразвуковая микронизация – технология, в результате которой частицы с 36,5 мкм (нативный диосмин) размельчаются до 1,75 мкм. Благодаря микронизации, абсорбция диосмина в желудочно-кишечном тракте увеличивается с 32 до 58%.

К.А. Lyseng-Williamson с соавторами в 2003 г. привели подробную классификацию различных эффектов МОФФ [148]:

1. Венотонизирующий. Основан на пролонгировании вазоконстрикторного эффекта норадrenalина и снижении венозного стаза, увеличении механического

расширения вены, повышении чувствительности гладкомышечных элементов венозной стенки к Ca^{2+} , снижении адгезии эритроцитов, гематокрита и концентрации протеинов плазмы в венах нижних конечностей в ортостазе.

2. Улучшение микроциркуляции. Основан на ингибировании экспрессии молекулы межклеточной адгезии 1, подавлении адгезии и миграции лейкоцитов, а также синтезов свободных радикалов, простагландинов E_1 , F_2 и тромбоксана A_2 , снижении проницаемости капилляров, индуцированной брадикинином и гистамином, увеличении плотности и реактивности сосудов микроциркуляторного русла, уменьшении апоптоза паренхиматозных клеток, ингибировании агрегации тромбоцитов.

3. Лимфотропный. Основан на повышении сократимости и увеличении частоты спонтанных сокращений лимфатических сосудов, улучшении лимфатического дренажа, снижении концентрации протеинов и фибробластов в паравазальных тканях.

МОФФ, благодаря плеiotропности, служит универсальным фармакологическим средством, демонстрируя высокую клиническую эффективность у больных со всеми формами и стадиями хронических заболеваний вен [80].

Эффективность МОФФ регистрируется не только при хронических заболеваниях вен. Так, Крылов А.Ю. с соавторами описывают эффективность применения ударных доз препарата при лечении острого варикотромбофлебита. Доза препарата составляла 3 г/сутки [21].

Наставшева О.Д. с соавторами описывают эффективность применения МОФФ в стандартных дозировках у больных с облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей [53].

Потенциальная эффективность препарата МОФФ при нарушениях ФСЭ может быть связана с его антиоксидантными свойствами, путём снижения количества свободных радикалов, имеющих высокое сродство к NO с образованием пероксинитрита или же прямое их повреждающее действие на биологические мембраны [72, 90, 148, 167, 178, 210, 221]. Также весьма важным

свойством МОФФ является ингибирование iNOS при различных патологических состояниях [152, 167]. Данный механизм описывается как снижение воздействия активных форм кислорода и продуктов ПОЛ на эндотелиоциты, за счет чего и обеспечивается физиологическое течение эндотелий-зависимых процессов. Также уделяется внимание и снижению вероятности взаимодействия NO со свободными радикалами на фоне нормализации процессов ПОЛ, за счет чего нивелируется риск образования пероксинитрита. Другая группа исследователей придерживается мнения о том, что биофлавоноиды, стимулируя эндогенные механизмы синтеза NO за счет eNOS, приводят к усилению реализации его физиологических эффектов, при этом уделяется внимание и тому факту, что подобные положительные изменения наблюдаются на фоне нормализации активности процессов ПОЛ и АОС [54, 117, 156, 157]. Именно антиоксидантным свойствам флавоноидов отводится ведущая роль в ингибировании фиброзно-склеротических изменений и лейкоцитарной агрессии при ХЗВ [68, 69, 72, 73, 74].

Таким образом, применение препарата МОФФ с целью коррекции ФСЭ при патологии венозного русла весьма оправдано и имеет перспективы дальнейшего изучения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

Эксперимент выполнен на 147 лабораторных крысах линии Wistar массой 250-350 г. Животные разделены на четыре группы. Все исследования проводили в одно и то же время суток во второй половине дня с соблюдением принципов, изложенных в «Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986) и приказом Минздрава СССР № 742 от 13.11.1984г.

Таблица 1

Распределение количества наблюдений по группам

Контрольная группа	Группа экспериментального тромбоза глубоких вен	Группа экспериментального посттромботического синдрома	Группа L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции
N=42 (28,57%)	N=35 (23,81%)	N=35 (23,81%)	N=35 (23,81%)

В качестве экспериментальной модели тромбоза глубоких вен использовалась методика S. Wessler: лигирование магистральной вены с последующим введением активированного фактора свертывания крови ниже лигатуры (рисунки 3-5) [36, 235]. Моделирование посттромботического синдрома (ПТС) выполнялось аналогичным образом, за исключением сроков начала введения микронизированной очищенной фракции флавоноидов (МОФФ): при модели ТГВ – с 10 суток, при ПТС – с 31 суток. Моделирование L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции выполнялось путем внутрибрюшинного введения N-нитро-L-аргинин (L-NAME) метилового эфира в дозе 25 мг/кг/сут. в течение 7 суток. Введение МОФФ лабораторным животным осуществлялось ежедневно на протяжении 6 месяцев энтеральным путем с помощью специального зонда для кормления в дозе 100 мг/кг/сут. Препарат

применялся в виде водной суспензии, полученной путем механического измельчения таблетированной формы содержащей 500 мг флавоноидов (450 мг диосмина и 50 мг гесперидина) при помощи ступки и пестика с последующим добавлением физиологического раствора NaCl 0,9%.

Контрольную группу составили 42 животных, которым под наркозом (таблица 2) после срединной лапаротомии выполнено лигирование правой общей подвздошной вены и введение дистальнее лигатуры 0,3 мл подогретого до 37–37,5°C раствора тромбина (40 ЕД/кг) без введения препарата МОФФ (рисунок 6).

В группу экспериментального ТГВ вошло 35 животных, которым под наркозом (таблица 2) после срединной лапаротомии выполнялась перевязка правой общей подвздошной вены и введение дистальнее лигатуры 0,3 мл подогретого до 37-37,5° С раствора тромбина (40 ЕД/кг). С 11 суток от момента оперативного вмешательства и на протяжении 6 месяцев животным энтеральным путем вводилась водная суспензия МОФФ в дозе 100 мг/кг/сутки. Определение биохимических показателей ФСЭ, оксидативного стресса, антиоксидантного статуса и гистологическое исследование осуществлялись на 10-е сутки от момента оперативного вмешательства, на 1, 2, 3 и 6 месяцы с момента постановки модели (рисунок 6).

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

В группу L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции вошло 35 животных, которым выполнялось внутрибрюшинное введение N-нитро-L-аргинин метилового эфира в дозе 25 мг/кг/сутки в течение 7 суток. С 8 суток от начала

эксперимента и на протяжении 6 месяцев животным энтеральным путем вводилась водная суспензия МОФФ в дозе 100 мг/кг/сутки. Определение биохимических показателей ФСЭ, про- и антиоксидантного статуса и гистологическое исследование осуществлялись на 8-е сутки от момента начала эксперимента, на 1, 2, 3 и 6 месяцы с момента постановки модели (рисунок 6).

Таблица 2

Хронология анестезиологического пособия

Этапы анестезии	Препараты и дозы
I этап - подготовительный	
А) премедикация	Р-р атропина 0,1% – 0,05 мг/кг п/к; через 5 мин. р-р димедрола 1% – 0,4 мг/кг в/м
Через 15-20 мин.	
Б) седация	Р-р ксилазина («Ксило») 1 мг/кг в/м
Через 5 мин.	
II этап – введение в анестезию	Золетил 50 - 15 мг/кг в/м
III этап – поддержание анестезии	Повторное введение Золетила 50 в дозе, не превышающей 1/3-1/2 исходной
IV этап – пробуждение и ближайший послеоперационный период	Преднизолон 0,4 мг/кг в/м однократно Сульфокамфокаин 0,1 мл/кг п/к однократно Анальгин 50% – 30 мг/кг 3 р/д в/м в течение 5 дней Папаверин 2% – 1,5 мг/кг 3 р/д в/м 5 дней Амоксициллин 0,2 мл/кг в/м в течение 4 дней Р-р глюкозы 5% – 20 мл/кг в/в однократно Р-р NaCl 0.9% – 20 мл/кг в/в однократно Гамавит 0,1 мл/кг в/м 3х-кратно в течение 7 дней

Забор крови осуществлялся в условиях операционной под наркозом из нижней полой вены в чистые пробирки без добавления стабилизатора с последующей эвтаназией животного путем внутривенного введения 2 мл 25 % раствора магния сульфата.

Выведение животных на протяжении периода исследования осуществлялось ввиду необходимости для определения исследуемых показателей около 5 мл крови от особи, что само по себе является фатальной кровопотерей для животного.

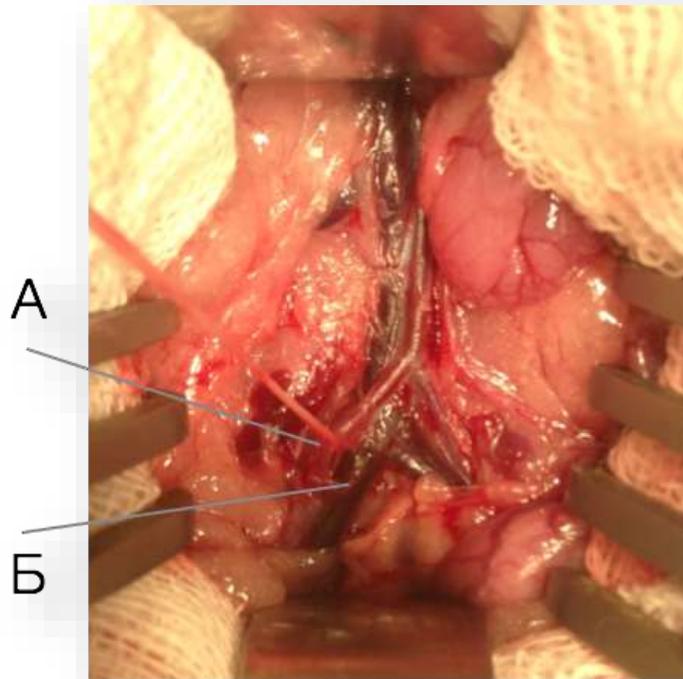


Рис. 3. Раздельное взятие на держалки правой подвздошной артерии и вены:
А – правая общая подвздошная артерия; Б – правая общая подвздошная вена.

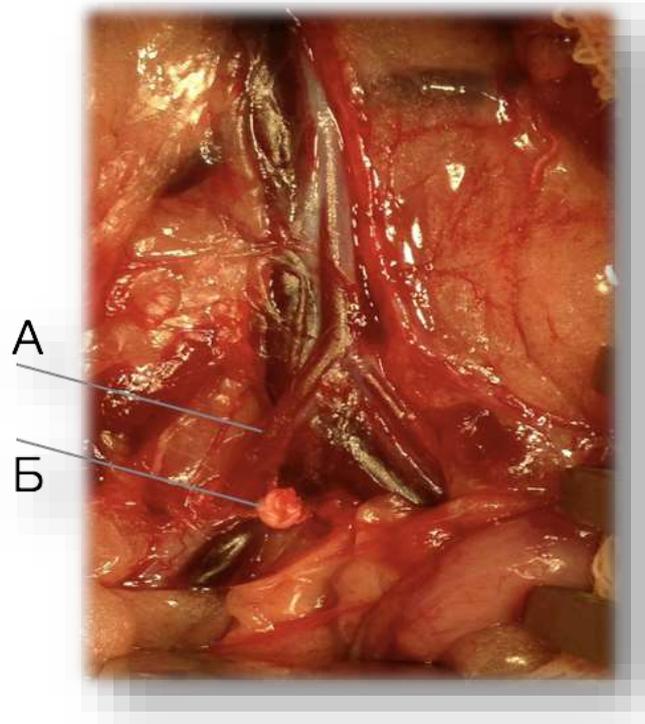


Рис. 4. Изолированное лигирование правой подвздошной вены:
А – правая общая подвздошная артерия; Б – лигатура на правой общей подвздошной вене.

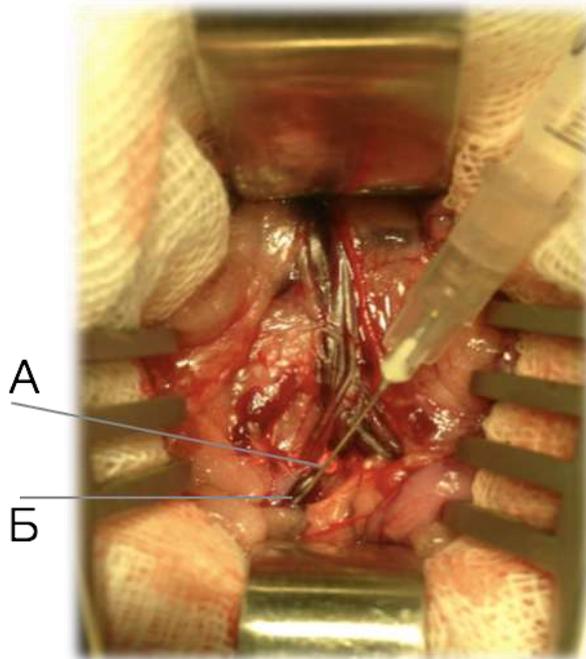


Рис. 5. Введение прокоагулянта в дистальное венозное русло:
А – правая общая подвздошная артерия; Б – лигатура на правой общей подвздошной вене.

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

Морфологическое исследование проводили с помощью микроскопа Leica DMI 4000 B с видеозахватом камерой Leica.

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



Рис. 6. Дизайн исследования в группах лабораторных животных

Определение метаболитов оксида азота (II) в сыворотке крови осуществлялось по оригинальной методике фотоколориметрическим методом, предложенной сотрудниками ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России (рационализаторское предложение (удостоверение № 1317)) [47].

Цельную кровь центрифугировали в течение 15 минут на скорости 3000 об/мин. Сыворотку крови разводили в соотношении 1:2, затем депротеинизировали путем добавления 96% этилового спирта, затем центрифугировали в течение 20 минут на скорости в 3000 об/мин. Раствор Грисса получали при растворении 1 г реактива Грисса в 10 мл 12% уксусной кислоты. Для приготовления раствора ванадия хлорида 400 мг (VCl_3 растворяли в 50 мл 1N соляной кислоты с последующим фильтрованием через бумажный фильтр. В исследовании применялся только свежеприготовленный раствор.

Определение уровня метаболитов оксида азота (II) проводили фотоколориметрическим методом, оценивая развитие окраски в реакции диазотирования нитратом сульфаниламида, который входит в состав реактива Грисса. С помощью иммуноферментного анализатора Stat Fax 3200 («Awareness Technology, Inc.») при длине волны 540 нм определяли интенсивность окраски. При построении калибровочной кривой использовали 1 М раствор $NaNO_2$ в воде, разведенный в 1000 раз и готовили серию разведений для построения кривой. Согласно литературным данным метаболиты оксида азота в сыворотке крови определяются в основном нитратами, поскольку нитриты легко окисляются и практически отсутствуют в крови. Так как реактив Грисса, с помощью которого проводится определение, позволяет детектировать только нитрит-ион, поэтому производился перевод нитратов в нитриты в присутствии реактива VCl_3 , так как нитраты при температуре $37^\circ C$ практически полностью восстанавливаются до нитритов. По интенсивности полученной розовой окраски, которую определяли фотоколориметрически, определяли концентрацию метаболитов NO. К 80 мкл супернатанта добавляли 80 мкл раствора ванадия хлорида и 80 мкл реактива Грисса. Смесь инкубировали в течение 30 мин при $37^\circ C$.

Оптическую плотность раствора измеряли в микропланшете на 96 ячеек с

максимальным объемом 400 мкл при 540 нм. Количество нитрит-иона рассчитывали в мкмольях по калибровочной кривой, построенной по стандартным растворам NaNO_2 .

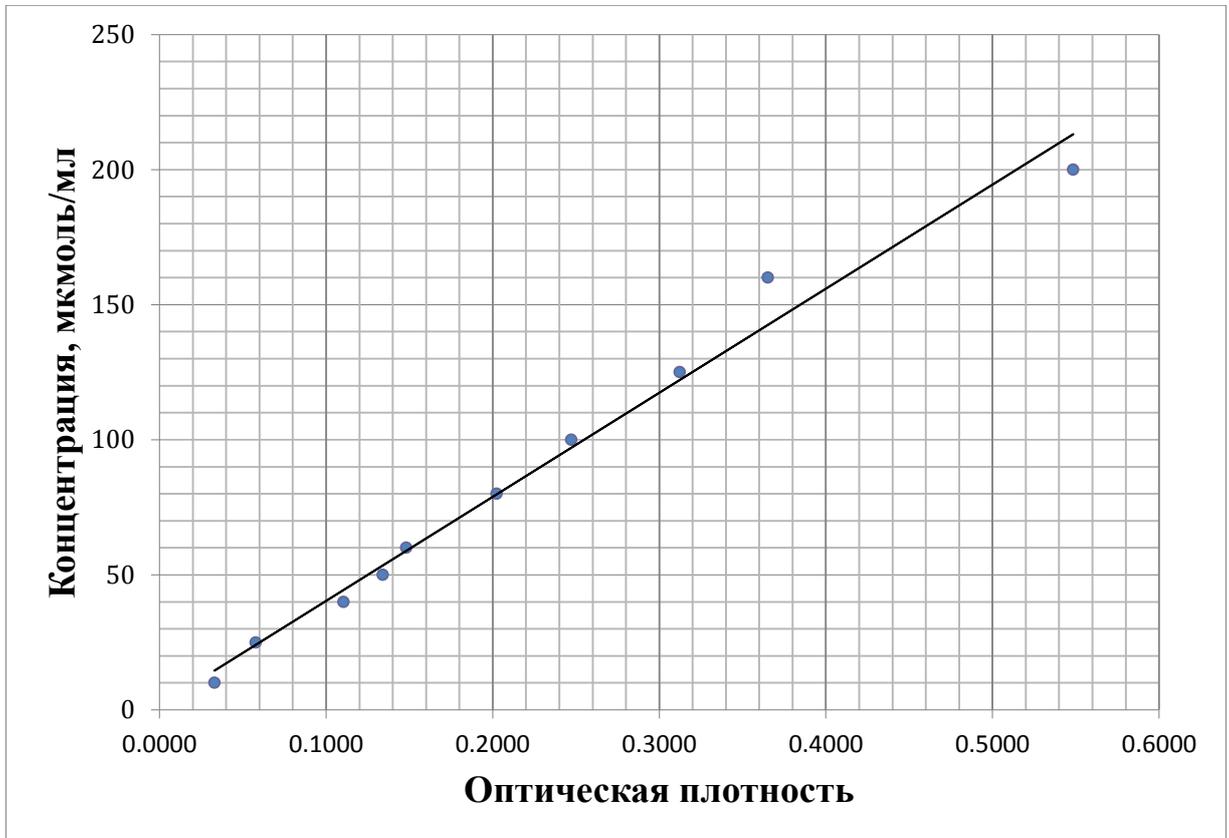


Рис. 7. Калибровочная кривая зависимости оптической плотности от суммарной нитрит-иона

Для измерения концентрации нитрита сыворотку инкубировали с реактивом Грисса без добавления VCl_3 , а концентрацию нитратов рассчитывали, вычитая из уровня суммарных метаболитов содержание нитритов [28, 47].

Ввиду отсутствия специализированных наборов реактивов по определению биохимических показателей ФСЭ для лабораторных животных, нами на экспериментальном этапе применялись мануальные методики для определения уровня СОД, МДА, ГП описанные в литературе. Исследования выполнялись на базе кафедры биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.

Метод определения концентрации малонового диальдегида
в сыворотке крови

Основан на методике, описанной Коробейниковой Э.Н. в 1989 году [16].

Принцип метода: реакция малонового диальдегида с тиобарбитуровой кислотой сопровождается образованием триметилового комплекса, имеющего максимум поглощения при $\lambda=532-535$ нм.

Реактивы: 2% раствор ортофосфорной кислоты; 0,8% раствор ТБК.

Ход определения: к 0,2 мл сыворотки крови добавляли 3,0 мл 2% раствора ортофосфорной кислоты. Пробирки плотно закрывали, центрифугировали при 3000 об/мин 15 минут, добавляли 1,0 мл 0,8% раствора ТБК и ставили в кипящую водяную баню на 45 минут. После охлаждения проводили определение интенсивности развития окраски на спектрофотометре (СФ-46) при $\lambda=532$ нм и $\lambda=580$ нм против контроля, содержащего 0,2 мл дистиллированной H_2O , 3 мл 2% ортофосфорной кислоты и 1 мл 0,8% раствора ТБК. Концентрацию МДА рассчитывали

по формуле: $C = \Delta D_{532-580} \cdot 106 + 0,81$ мкМ/мл.

Спектрофотометрический (кверцетиновый) метод определения активности
супероксиддисмутазы

На основании методики, описанной В.А. Костюк и др. (1990) [17], были внесены изменения, которые заключались в приготовлении рабочей смеси за 10-12 часов до исследования активности СОД. Смесь состояла из равных объёмов 0,1М фосфатного буфера рН 7,8 и 0,5 мМ водного раствора ТЕМЭД (тетраэтилендиамид), включающего 0,08 мМ ЭДТА.

Реактивы: фосфатный буфер 0,1 М рН 7,8; водный раствор 0,5 мМ тетраэтилендиамида и 0,08 мМ ЭДТА; рабочая смесь, состоящая из равных объёмов 1+2; 0,462 мМ раствор кверцетина в диметилформамиде.

Ход определения. Активность СОД определялась с помощью фотоэлектроколориметра (ФЭК) КФК-3-01 «ЗОМЗ». В две пробирки (контрольную и опытную) помещали по 1 мл рабочей смеси. Затем в контрольную

пробирку добавляли 1,9 мл дистиллированной воды, а в опытную 0,05 мл сыворотки крови и 1,85 мл дистиллированной воды. Пробирки с реакционной смесью преинкубировались при температуре 37°C в течение 10 минут. В контрольную и опытную пробирки вносили по 0,1 мл раствора кверцетина. Содержимое пробирок переносили в кюветы, фиксировали исходную величину оптической плотности (D_k' и D_o'). Через 10 минут повторно снимали показатели оптической плотности в контроле (D_k'') и опыте (D_o''). Расчет производили по формуле: $D_k''' = D_k' - D_k''$; $D_o''' = D_o' - D_o''$. Затем определяли процент ингибирования образования пероксида за 10 минут по формуле:

$$\% \text{ ингибирования} = (D_k''' - D_o''' / D_k''') \times 100.$$

50% ингибирование принимается за одну единицу (у.е.)

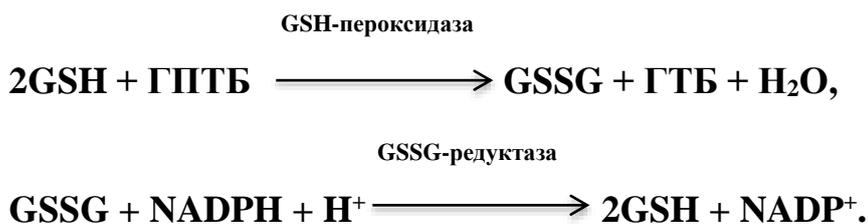
Метод определения активности глутатионпероксидазы

Определение активности фермента проводилось по методике, предложенной D.E. Paglia и W.N. Valentine в модификации В.З. Ланкина [19, 182].

Глутатионпероксидаза (КФ.1.11.1.9) - фермент системы глутатиона, нейтрализующий перекись водорода с участием восстановленного глутатиона:



Принцип метода: кинетическое спектрофотометрическое определение активности фермента глутатионпероксидазы основано на регистрации уменьшения оптической плотности опытного образца при 340 нм (лампа D₃), t – 37°C в результате протекания следующих реакций:



НАДФН₂ служит донором редуцирующих эквивалентов для реакции ферментативного восстановления глутатиона, который окисляется в реакции

ферментативного восстановления гидроперекиси третбутила (гидроперекись третбутила (ГПТБ) – специфический субстрат для действия Se-зависимой глутатионпероксидазы). Чем выше активность глутатионпероксидазы, тем интенсивнее будет окисляться НАДФН₂, что отразится на интенсивности поглощения света с длиной волны 340 нм (она уменьшится).

Ход исследования: 1,9 мл реакционной смеси содержал: 1,2 мл – 0,05 М изотонического фосфатного буфера, pH 7,4; 0,1 мл – 1 мМ ЭДТА; 0,1 мл – 0,12 мМ НАДФН; 0,2 мл – 1,85 мМ раствора восстановленного глутатиона; 0,5 ЕД глутатионредуктазы; 0,2 мл – 0,2 мМ гидроперекиси трет-бутила и 0,1 мл изучаемого образца. Реакцию начинали добавлением ГПТБ. Реакционную смесь инкубировали при температуре 37°C в течение 3-х минут. Оптическую плотность регистрировали на биохимическом анализаторе Humalaizer 2000 при длине волны 340 нм. За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для окисления 1 мкМ восстановленного глутатиона в минуту, в условиях определения. Результаты активности выражали в нмоль НАДФН₂/мин × мг белка.

Определение содержания индуцибельной синтазы оксида азота (II) в плазме крови методом иммуноферментного анализа

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

Реактивы: покрытый антителами стрипованный микропланшет, 96 лунок, готовый к использованию; стандарты (лиофилизированные, замороженные); детектирующий реагент А 120 мкл; детектирующий реагент В 120 мкл; субстратный раствор 9 мл; буфер для промывок (концентрат 30х) 20 мл; крышка для микропланшета; буфер для разведения стандарта 20 мл; буфер для разведения А (концентрат 2х) 6 мл; буфер для разведения В (концентрат 2х) 6 мл; стоп-раствор 6 мл.

Ход определения: стандартные растворы NOS2 получали последовательным разведением стандартов до концентраций NOS2 10 нг/мл, 5 нг/мл, 2,5 нг/мл, 1,25 нг/мл, 0,625 нг/мл, 0,312 нг/мл, 0,156 нг/мл, 0 нг/мл (буфер для разведения стандарта). В ячейку A1 микропланшета для бланка вносили раствор с концентрацией NOS2 0 нг/мл (буфер для разведения стандарта), в остальные 7 ячеек последовательно вносили стандарты полученных концентраций по 100 мкл каждого. В опытные ячейки вносили по 100 мкл исследуемой плазмы крови животных. Накрывали крышкой и инкубировали микропланшет при температуре 37 °C в течение 2 часов, затем удаляли жидкость из лунок не промывая. Вносили в каждую из лунок по 100 мкл рабочего раствора детектирующего реагента А, закрывали микропланшет с последующей инкубацией в течение 1 часа при 37 °C. Затем аспирировали раствор из лунок и вносили в каждую лунку по 350 мкл готового буфера для промывок и оставляли в этом состоянии в течение 1-2 минут. После удаления жидкости из всех лунок и тщательном их высушивании повторяли подобную процедуру ещё 2 раза. Вносили по 100 мкл рабочего раствора детектирующего реагента В во все лунки, закрывали микропланшет и инкубировали 30 минут при 37 °C. Затем повторяли процедуру аспирации/промывки 5 раз. Вносили по 90 мкл субстратного раствора в каждую лунку, закрывали крышкой и инкубировали 10-15 минут при 37 °C, затем после внесения 50 мкл стоп-раствора в каждую лунку приступали к измерениям на ИФА-анализаторе при длине волны 450 нм.

Количество NOS2 рассчитывали в нг/мл по калибровочной кривой, построенной по стандартным растворам NOS2.

Обработка и хранение материалов диссертации проводились на персональном компьютере Intel Celeron, использован текстовый редактор Microsoft Word из пакета офисных программ Microsoft Office 2010, для статистической обработки использован пакет офисных программ Statistica 6.0 и Microsoft Excel 2010.

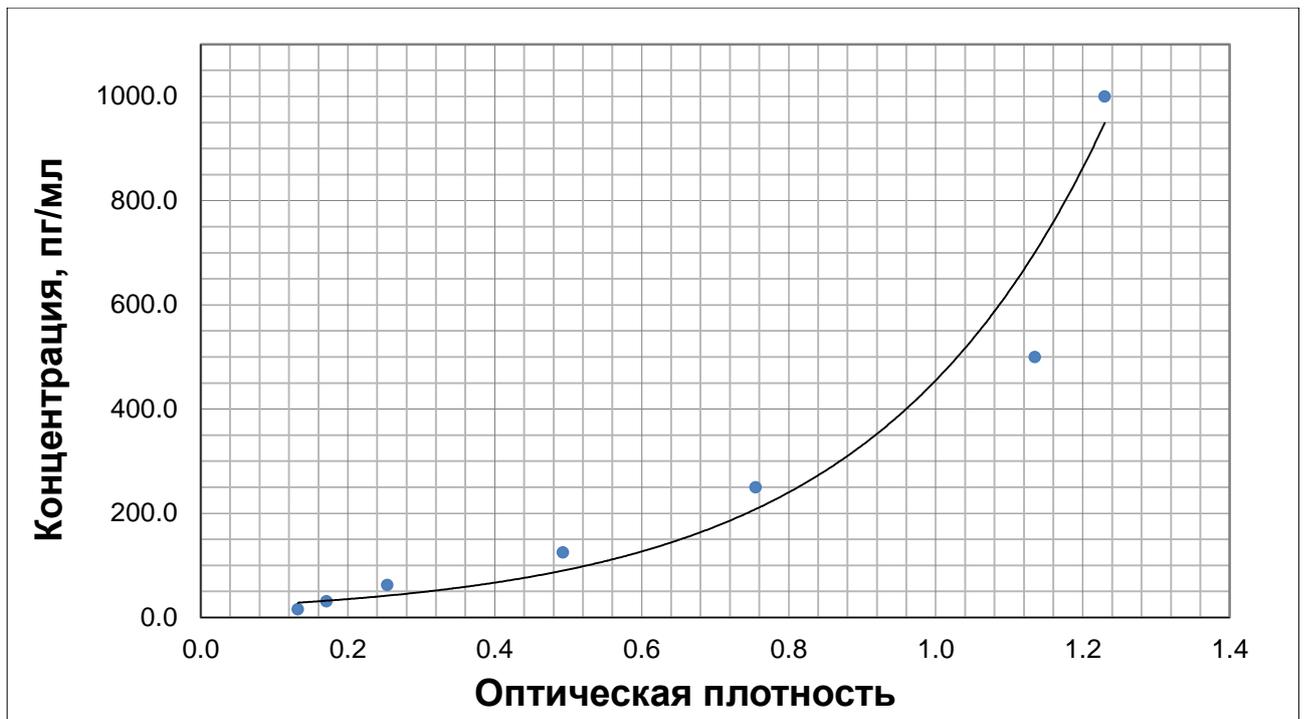


Рис. 8. Калибровочная кривая зависимости оптической плотности от концентрации NOS2.

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

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

Для данных, имеющих нормальное распределение, рассчитывали среднее арифметическое значение (M) и стандартную ошибку среднего результата (m). Для данных, имеющих распределение отличное от нормального, рассчитывали медиану (Me), верхний (Q_{75}) и нижний квартиль (Q_{25}) [6].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

Эндотелий и его адекватное функционирование имеют первостепенное значение в регуляции гомеостаза сердечно-сосудистой системы. Реализация данного процесса обеспечивается путем синтеза и высвобождения эндотелием различных биологически активных веществ с высоким аффинитетом к сосудистой стенке как артериального, так и венозного русла.

Дисфункция эндотелия – многогранный процесс, с множеством вероятных факторов нарушающих адекватную функцию эндотелиоцитов, среди которых ведущее место занимает повышенная активность процесса свободнорадикального окисления и его продуктов при различных патологических состояниях организма [98, 154]. Нарушение структуры эндотелия, ультраструктуры эндотелиоцитов – неотъемлемые процессы в патогенезе эндотелиальной дисфункции, являющиеся одновременно её причинами и следствиями [45]. Без анализа данных показателей не проходит говорить о системном подходе к анализу состояний, сопровождающихся развитием ЭД.

Ниже будут представлены и обсуждены полученные в ходе данной экспериментальной работы результаты, в ходе которой определялись следующие показатели: NO – как основной показатель ФСЭ, ГП и СОД – как одни из основных элементов АОС, МДА – как интегральный показатель процессов ПОЛ, iNOS (NOS2) – как фермент, участвующий в синтезе NO и ответственный за его гиперпродукцию при различных патологических состояниях, обладающий наибольшей активностью среди всего спектра NO-синтаз, а также морфологическая структура и ультраструктура венозной стенки в различные сроки экспериментальной работы.

В качестве исходных биохимических показателей были взяты образцы крови у интактных животных. Были получены следующие результаты: метаболиты NO $29,314 \pm 3,124$ мкмоль/мл; МДА $5,398 \pm 0,962$ нмоль/г Нв; СОД

$0,287 \pm 0,092$ у.е./мг Hb; ГП 13 НАДФН₂/мин х мг белка; iNOS 26,45 пг/мл.

В контрольной группе животных на 8-10 сутки от момента лигирования магистральной вены отмечалось достоверное снижение содержания метаболитов оксида азота ($11,508 \pm 3,162$ мкмоль/мл) ($p < 0,05$) (рисунок 13, таблица 3) при одновременном повышении уровней ГП ($18,85$ НАДФН₂/мин х мг белка) ($p > 0,05$), СОД ($0,847 \pm 0,523$ у.е./мг Hb) ($p > 0,05$), МДА ($17,395 \pm 3,541$ нмоль/г Hb) ($p < 0,05$) и iNOS (61,1 пг/мл) ($p < 0,05$) (рисунки 9-12, таблица 3). Содержание МДА – интегрального показателя процессов ПОЛ – увеличивается, по-видимому в результате развития оксидативного стресса на фоне острой ишемии венозной стенки. Одновременно отмечается рост основных ферментов АОС – ГП и СОД – который, вероятно обусловлен компенсаторной активацией АОС на фоне увеличения активности процессов ПОЛ. Повышение уровня iNOS обусловлено воспалительной реакцией венозной стенки и окружающих тканей на внешнее воздействие и развитие тромбоза. На фоне роста содержания iNOS – самого активного представителя NO-синтаз, происходит довольно выраженное снижение содержания метаболитов оксида азота (II). Этот факт возможно объяснить тем, что в условиях оксидативного стресса происходит взаимодействие NO с активными формами кислорода с образованием пероксинитрита (ONOO^-), вещества с высокой нитрозилирующей активностью в отношении липопротеидов клеточных мембран. В условиях повышения активности процессов ПОЛ происходит вовлечение NO в каскад патофизиологических реакций, приводящих к нарушению целостности клеточных структур, а также формированию абсолютного дефицита физиологических эффектов NO вследствие его взаимодействия с избытком супероксидных радикалов и образованию ONOO^- .

Таким образом, именно динамическое равновесие между процессами ПОЛ и АОС имеет решающее значение в реализации физиологических эффектов NO, либо его вовлечении в каскад патобиохимических реакций с образованием ONOO^- .

Динамика изучаемых биохимических показателей в контрольной группе

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

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

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

В контрольной группе животных на протяжении последующего периода наблюдения сохранялся аналогичный биохимический статус без статистически значимых изменений, что и на момент постановки модели, что говорит о стойком нарушении ФСЭ при воспроизведении венозного тромбоза (рисунки 9-13, таблица 3).

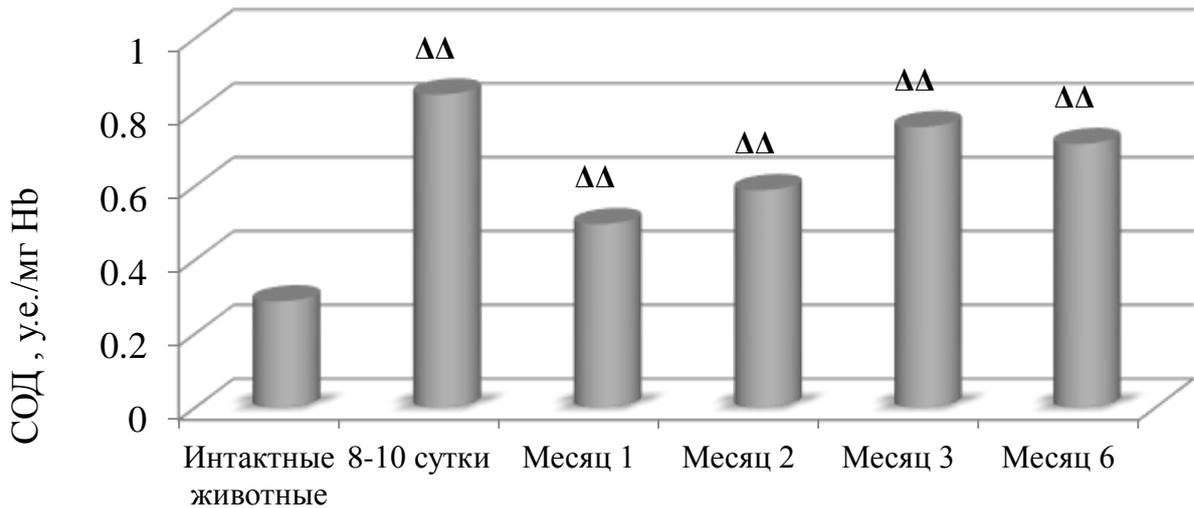


Рис. 9. Динамика уровне СОД в группе контроля

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

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

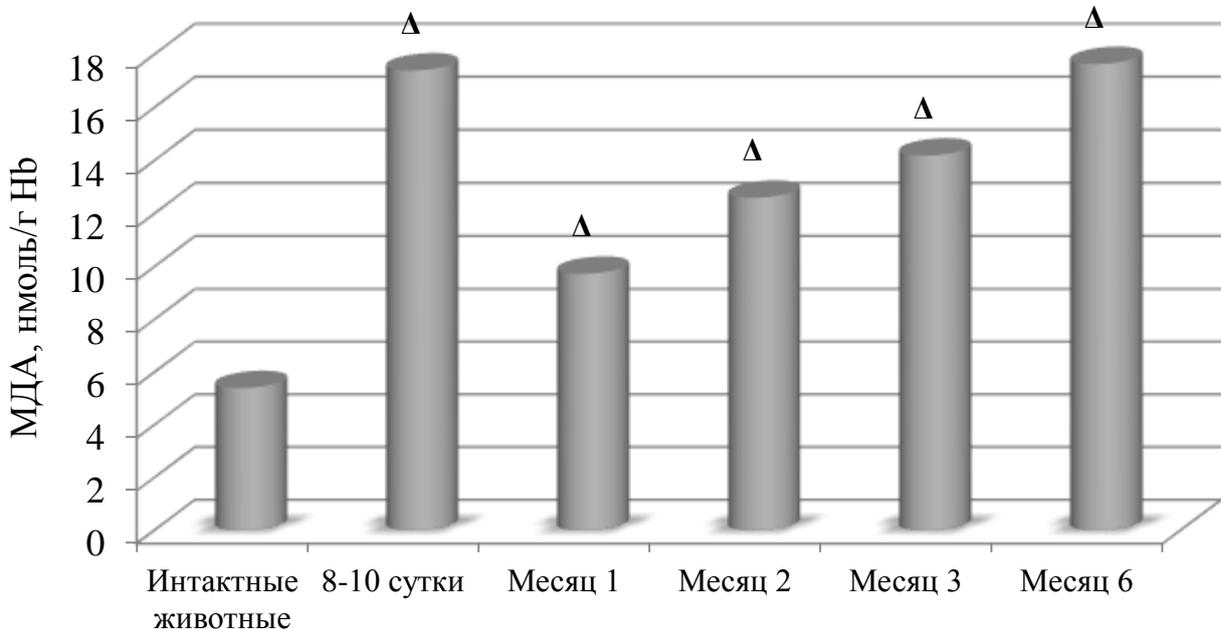


Рис. 10. Динамика уровней МДА в группе контроля

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

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

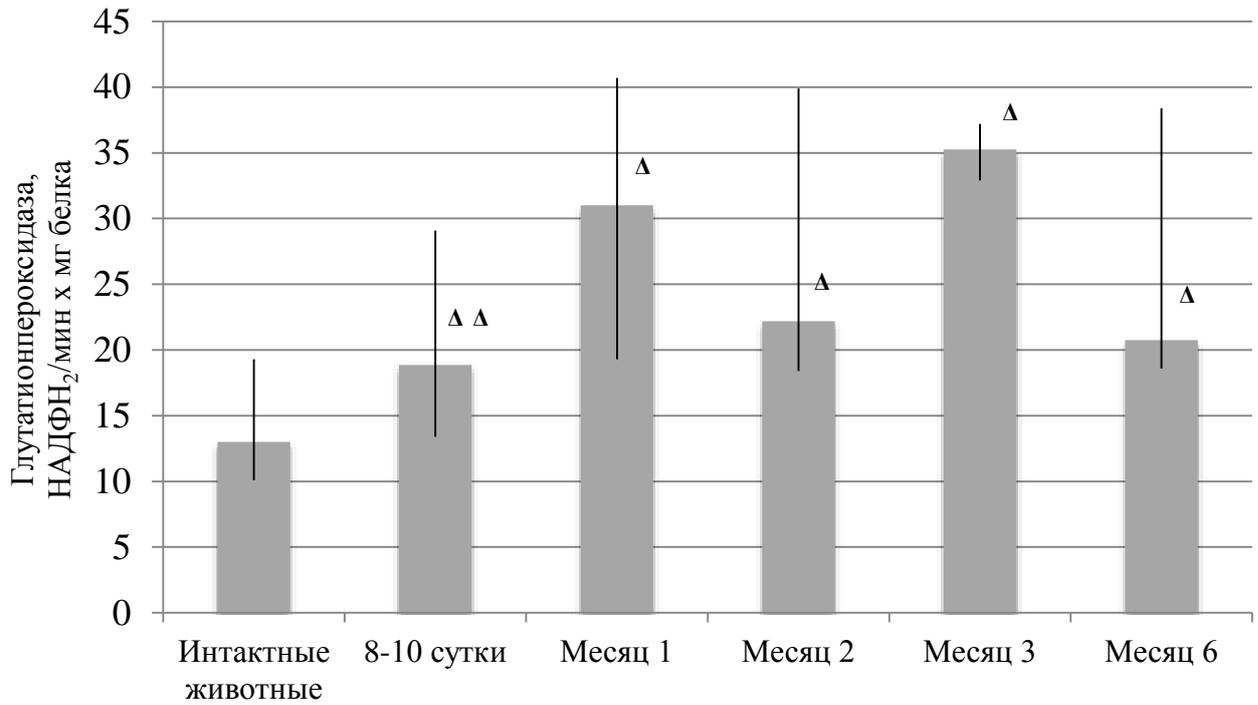


Рис. 11. Динамика уровней ГП в группе контроля.

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

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

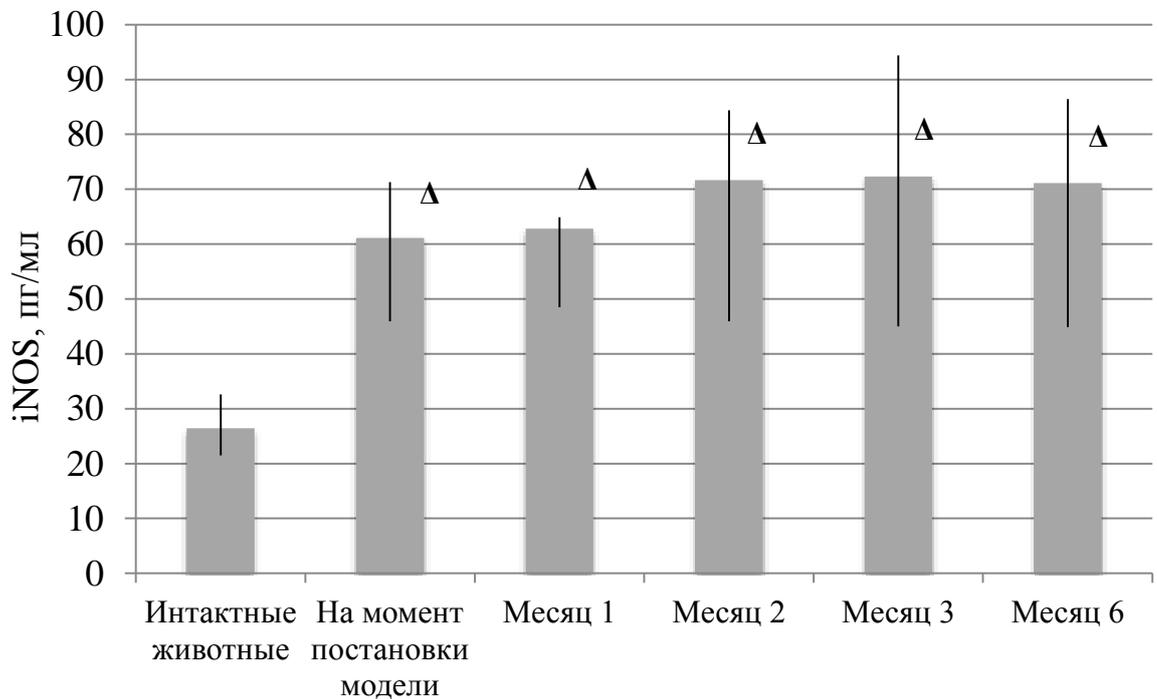


Рис. 12. Динамика уровней iNOS в группе контроля

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

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

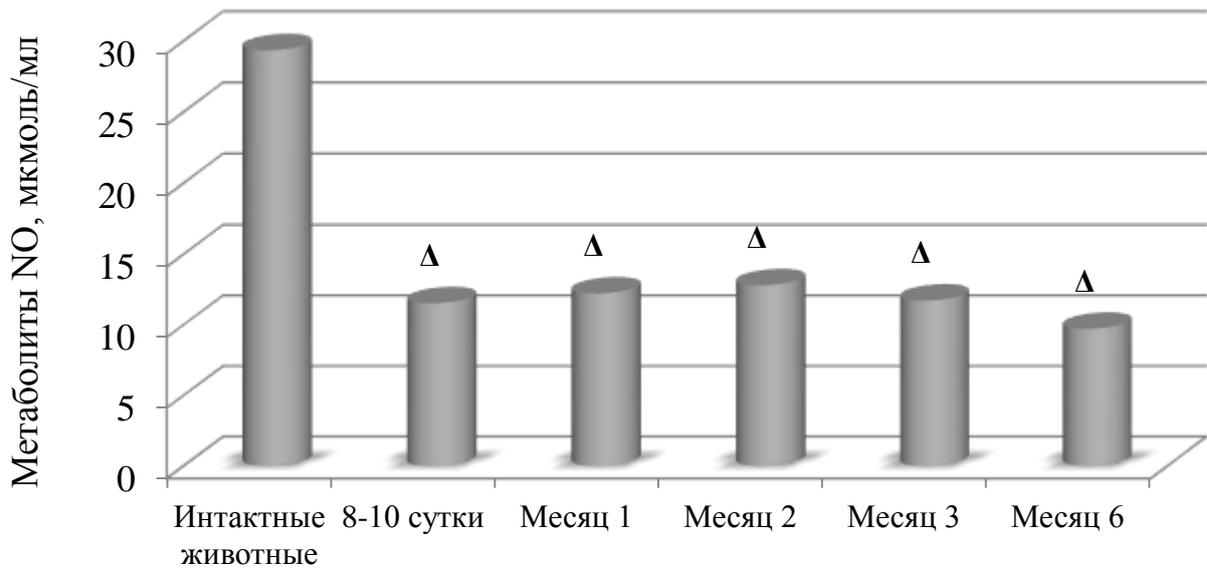


Рис. 13. Динамика метаболитов NO в группе контроля.

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

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

В группе ПТС на момент постановки модели отмечено достоверное ($p < 0,05$) снижение уровня метаболитов NO ($12,47 \pm 2,83$ мкмоль/мл) (рисунок 18, таблица 4) при одновременном повышении уровней МДА ($16,52 \pm 4,28$ нмоль/г Hb) ($p < 0,05$) (рисунок 14, таблица 4), iNOS ($66,2$ пг/мл) ($p < 0,05$) (рисунок 17, таблица 4), СОД ($0,423 \pm 0,168$ у.е./мг Hb) ($p > 0,05$) (рисунок 15, таблица 4) и ГП ($21,25$ НАДФН₂/мин x мг белка) ($p > 0,05$) (рисунок 16, таблица 4). При последующем применении МОФФ, отмечается достоверное повышение содержания метаболитов NO в сыворотке крови ($44,31 \pm 15,11$ мкмоль/мл), при одновременной нормализации маркеров оксидативного стресса: МДА ($4,98 \pm 0,64$ нмоль/г Hb) ($p < 0,05$), СОД ($0,1 \pm 0,044$ у.е./мг Hb) ($p < 0,05$), ГП ($13,35$ НАДФН₂/мин x мг белка) ($p > 0,05$). Уровень iNOS на фоне коррекции МОФФ недостоверно снижается iNOS ($50,85$ пг/мл) ($p > 0,05$), что говорит о влиянии препарата на процессы хронического воспаления венозной стенки на фоне ПТС. Повышение уровня метаболитов NO также объясняется нормализацией процессов ПОЛ под действием флавоноидов. Снижение активности основных ферментов АОС, по-видимому, также вызвано снижением оксидативного стресса на фоне фармакологической коррекции.

Динамика изучаемых биохимических показателей в группе экспериментального посттромботического синдрома

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

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

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

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

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

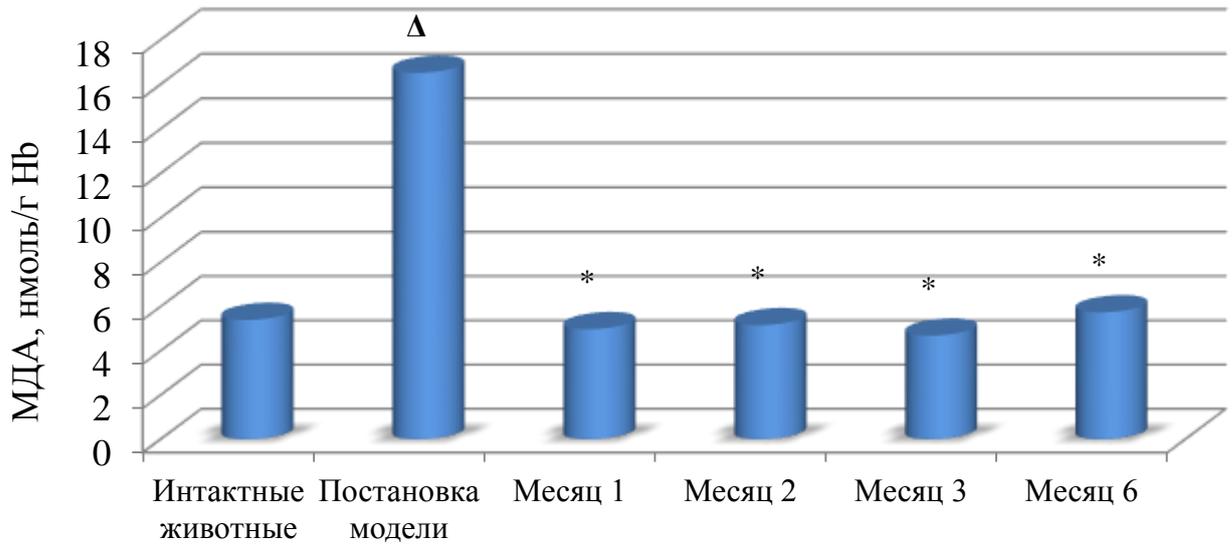


Рис. 14. Динамика уровней МДА в группе ПТС

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

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

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

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

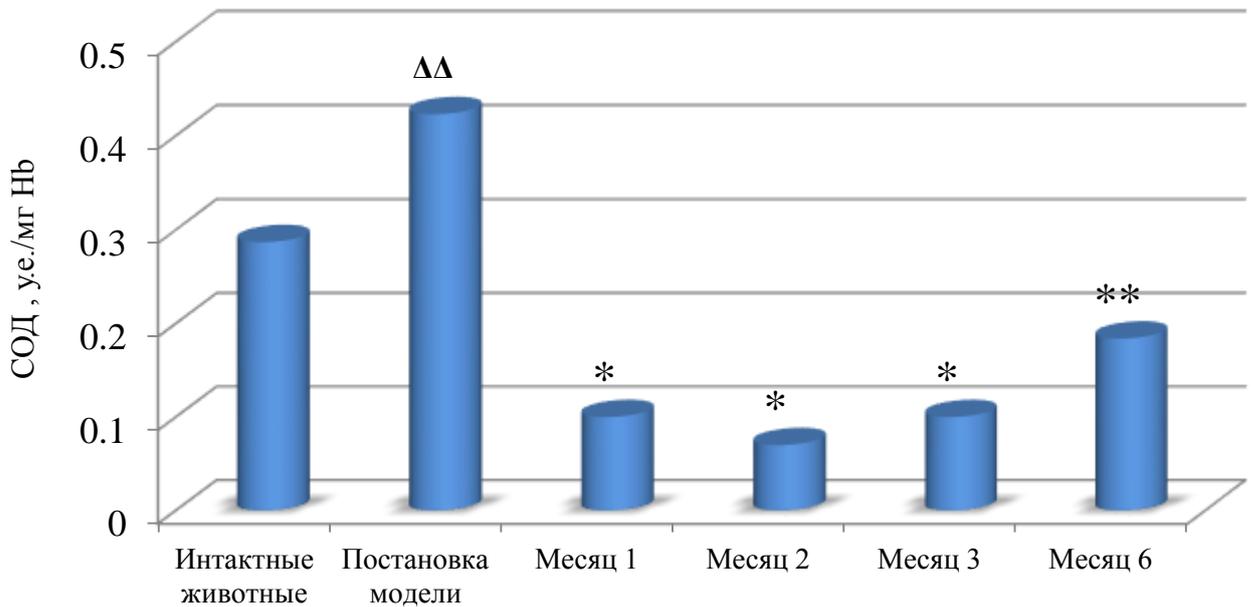


Рис. 15. Динамика уровней СОД в группе ПТС

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

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

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

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

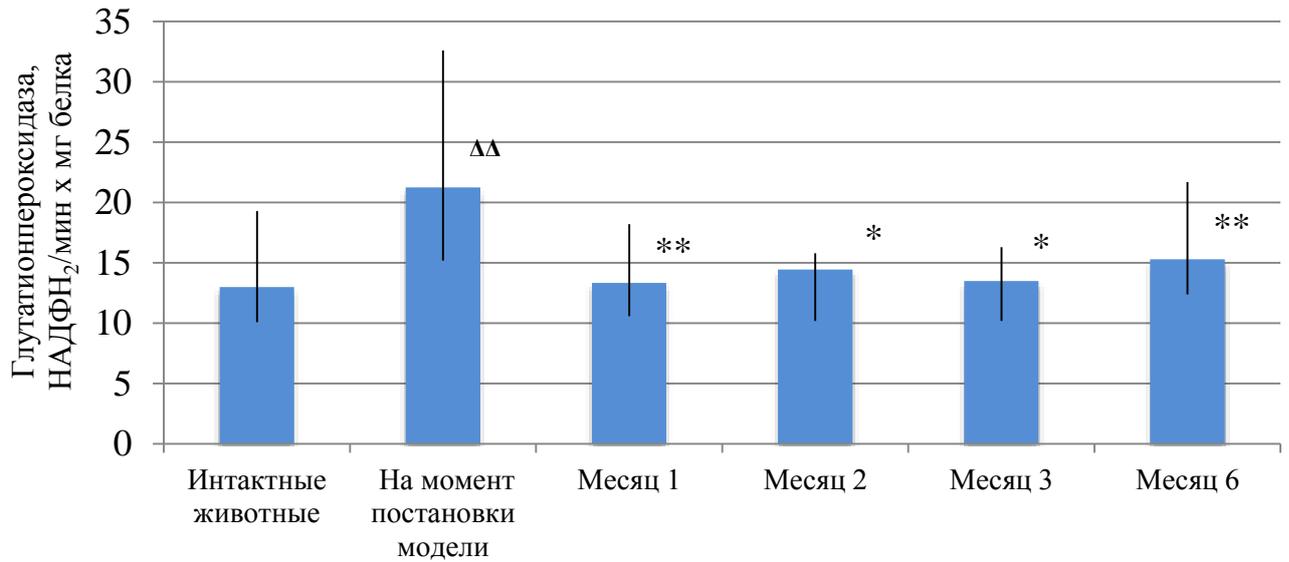


Рис. 16. Динамика уровней ГП в группе ПТС

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

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

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

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

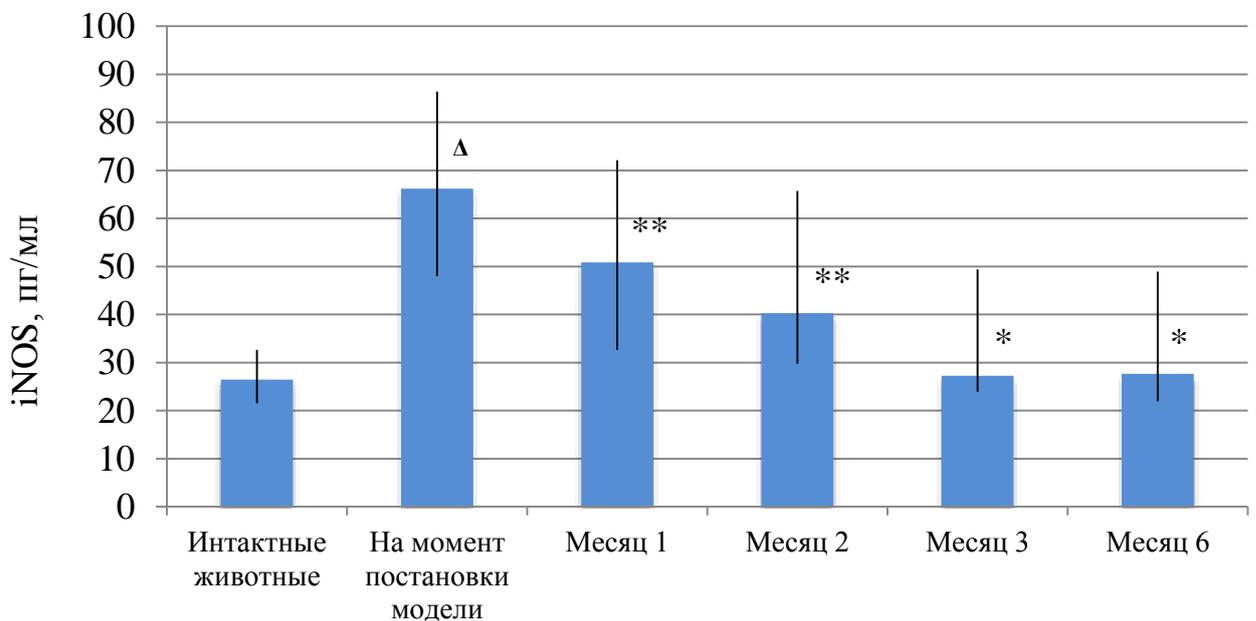


Рис. 17. Динамика уровней iNOS в группе ПТС

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

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

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

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

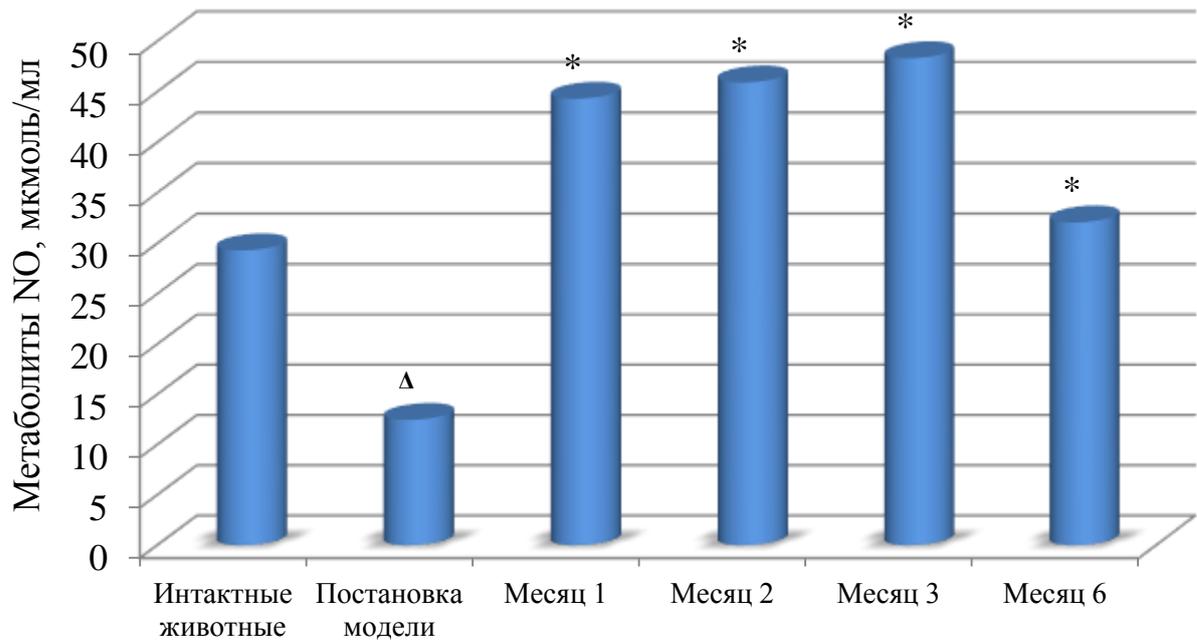


Рис. 18. Динамика метаболитов NO в группе ПТС

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

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

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

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

При постановке модели в группе L-NAME-индуцированной ЭД отмечено достоверное снижения уровня метаболитов NO (12,022 мкмоль/мл) ($p < 0,05$) (рисунок 23, таблица 5), вызванное ингибированием eNOS, при этом уровень iNOS (27,85 пг/мл) ($p > 0,05$) (рисунок 22, таблица 5) не подвергся достоверным изменениям, что говорит о специфичности действия препарата L-NAME. В то же время у животных данной группы выявлено достоверное повышение маркеров оксидативного стресса – МДА ($13,108 \pm 1,371$ нмоль/г Hb) ($p < 0,05$) (рисунок 20, таблица 5) и увеличения активности СОД ($0,798 \pm 0,276$ у.е./мг Hb) ($p < 0,05$) (рисунок 19, таблица 5) и ГП ($26,15$ НАДФН₂/мин х мг белка) ($p > 0,05$) (рисунок 21, таблица 5). Подобный эффект объясняется тем, что L-NAME является синтетическим аналогом эндогенных ингибиторов эндогенных ингибиторов eNOS – несимметричного диметиларгинина (АДМА) и монометил-L-аргинина (NMMA), которые в физиологических условиях приводят к возникновению оксидативного стресса

в ЭК [70]. На фоне применения МОФФ у животных данной группы отмечалось достоверное повышение уровня метаболитов NO, понижение уровня МДА, а также понижение активности СОД на протяжении всего периода наблюдения. При этом не выявлено какого-либо значимого влияния препарата МОФФ на уровень iNOS на протяжении эксперимента.

Таким образом, в данной группе отмечалось снижение уровня метаболитов NO при стабильных показателях iNOS, а также повышение уровня ПОЛ и активация АОС. Применение препарата МОФФ в данной группе привело к повышению уровня метаболитов NO и снижению уровней ГП, СОД и МДА, без достоверного влияния на содержание iNOS в плазме крови.

То есть можно предположить, что препарат МОФФ не имеет прямого влияния на iNOS, а снижение уровня данного фермента на фоне медикаментозной коррекции в группе ПТС и ТГВ связано со снижением процессов воспаления в венозной стенке и окружающих тканях, так как непосредственным процессом, приводящим к активации iNOS, является воспаление.

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

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

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

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

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

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

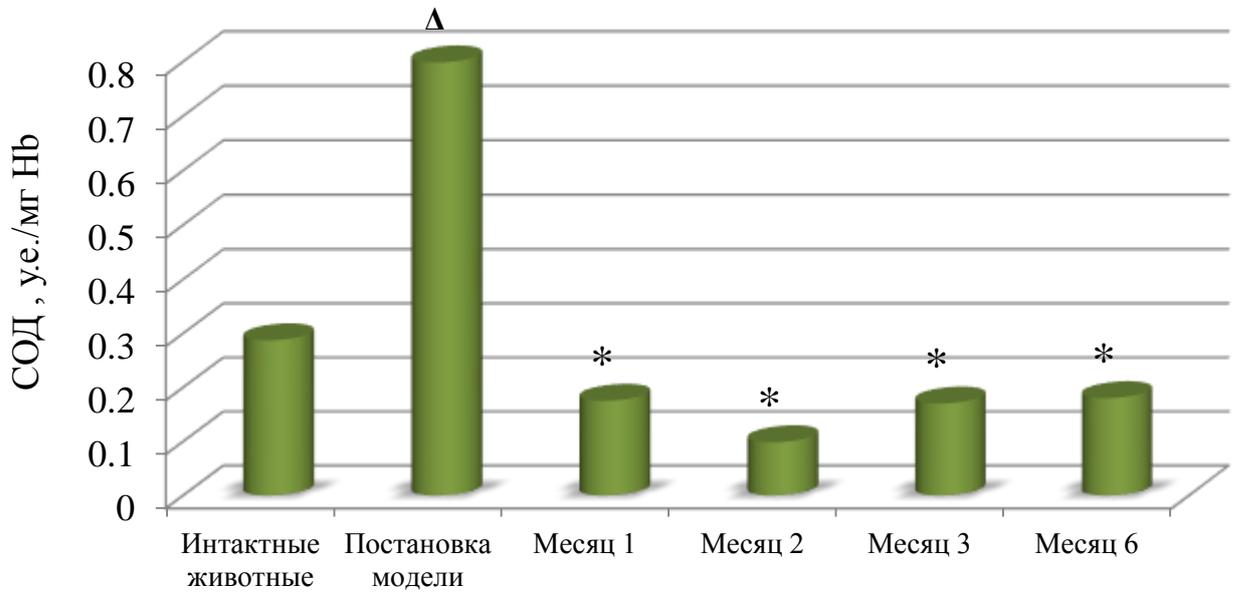


Рис. 19. Динамика уровней СОД в группе L-NAME

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

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

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

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

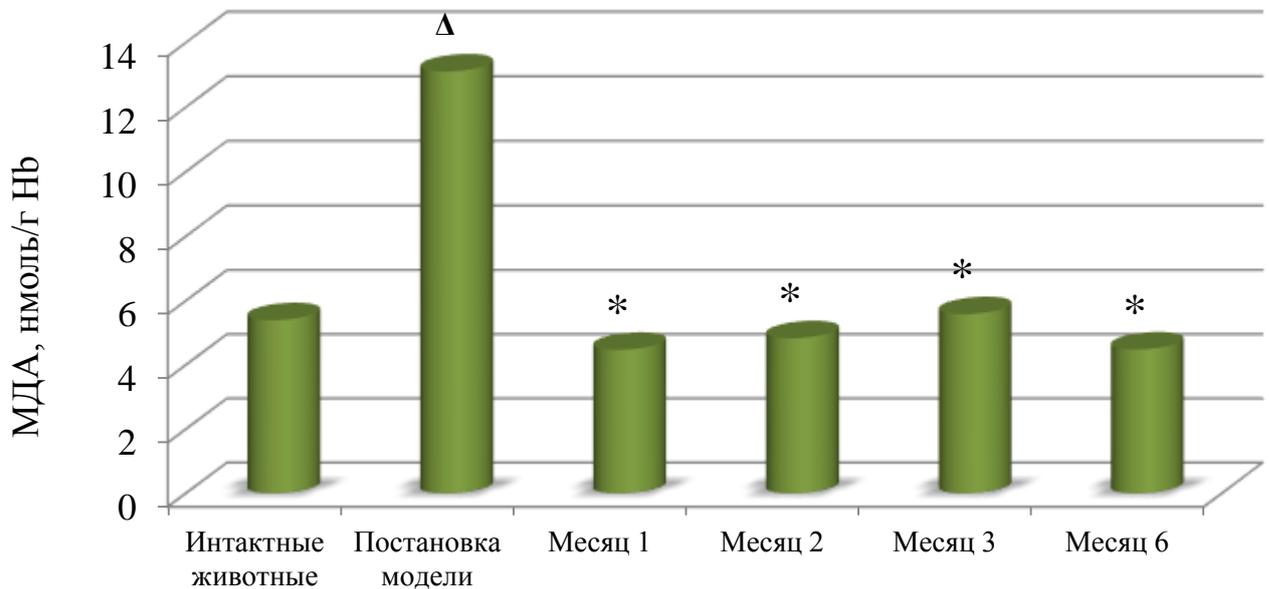


Рис. 20. Динамика уровней МДА в группе L-NAME

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

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

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

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

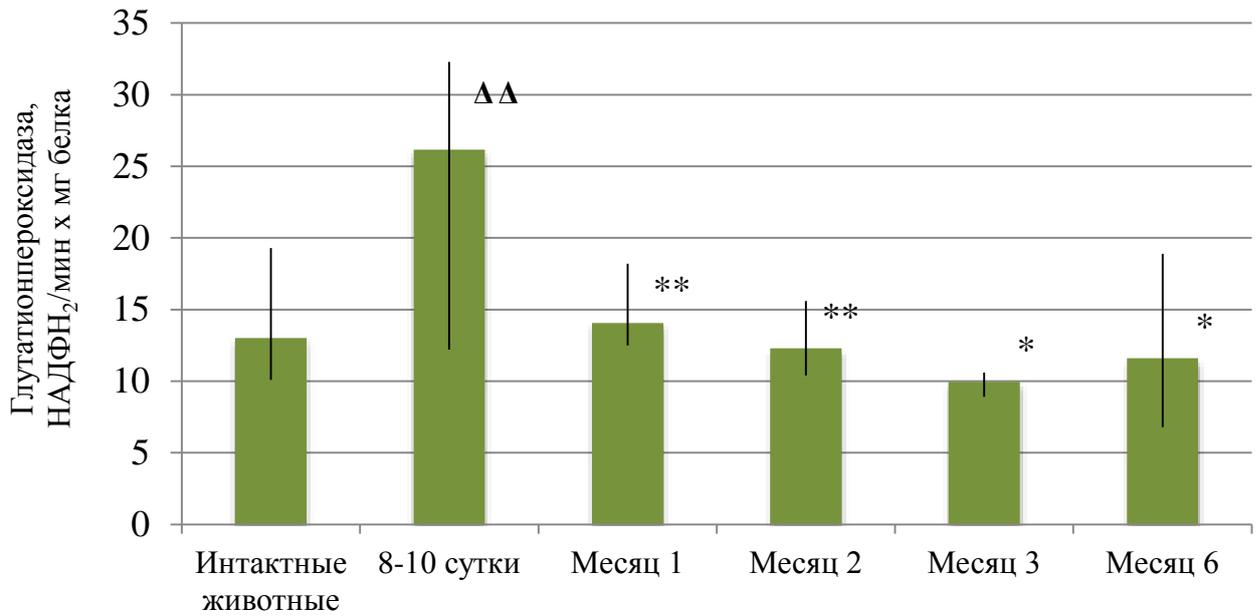


Рис. 21. Динамика уровней ГП в группе L-NAME-индуцированной ЭД

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

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

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

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

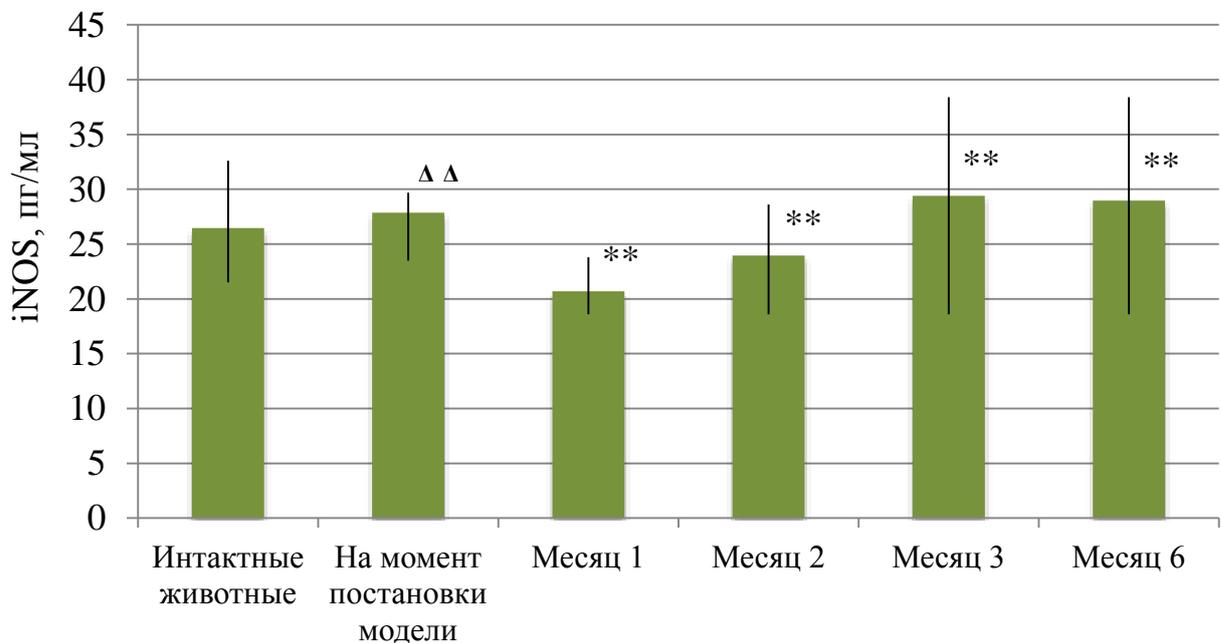


Рис. 22. Динамика уровней iNOS в группе L-NAME-индуцированной ЭД

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

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

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

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

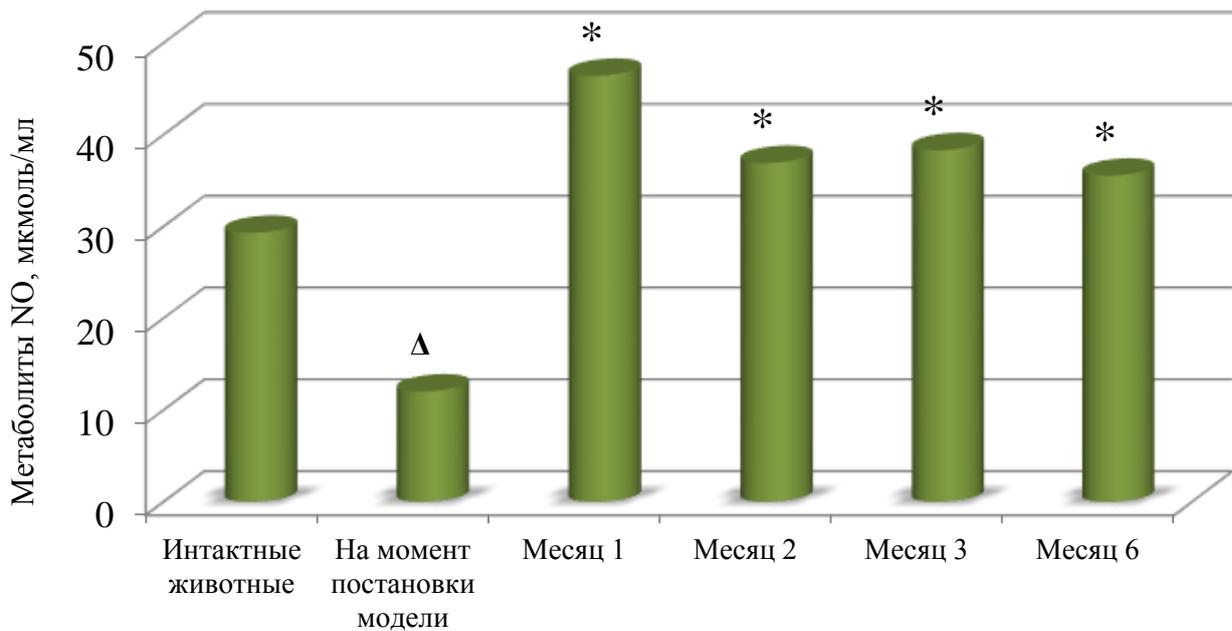


Рис. 23. Динамика метаболитов NO в группе L-NAME

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

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

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

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

В группе ТГВ выявлено достоверное снижение метаболитов NO на момент постановки модели ($12,342 \pm 2,06$ мкмоль/мл) ($p < 0,05$) (рисунок 28, таблица 6). В ходе применения МОФФ отмечалось достоверное повышение уровня NO на протяжении всего периода наблюдения ($66,58 \pm 7,58$ мкмоль/мл) ($p < 0,05$), причем его показатель достиг своих исходных значений к первому месяцу наблюдения и не подвергался значимым колебаниям до момента окончания эксперимента. Уровень iNOS на момент постановки модели достоверно увеличился ($61,6$ пг/мл) ($p < 0,05$) (рисунок 27, таблица 6) с последующим стойким значимым понижением до исходного уровня ($30,9$ пг/мл) ($p < 0,05$) на фоне применения МОФФ, что говорит о косвенном влиянии препарата на данный фермент. Также выявлено значимое повышение МДА ($12,09 \pm 4,31$ нмоль/г Hb) ($p < 0,05$) (рисунок 24, таблица 6), а также увеличение активности ГП ($25,4$ НАДФН₂/мин x мг белка) ($p > 0,05$) (рисунок 26, таблица 6) и уровня СОД ($0,768 \pm 0,144$ у.е./мг Hb) ($p < 0,05$)

(рисунок 25, таблица 6) на момент постановки модели ТГВ. Данные биохимические сдвиги объясняются развитием воспаления и интенсификацией процессов ПОЛ в зоне тромбоза. Стабильность данных изменений, исходя из результатов в контрольной группе, при отсутствии медикаментозной коррекции, сохранялась на протяжении всего периода эксперимента. Выявлено достоверное влияние препарата МОФФ на маркеры оксидативного стресса и АОС. Также отмечен эффект препарата начиная с первого месяца применения и на протяжении всего периода наблюдения, который проявлялся в снижении уровня МДА и, соответственно, понижении активности ферментов АОС, так, активность ГП к 6 месяцу эксперимента составила $15,9 \text{ НАДФН}_2/\text{мин} \times \text{мг белка}$ ($p < 0,05$), уровень СОД на момент окончания эксперимента был $0,138 \pm 0,098 \text{ у.е./мг Hb}$ ($p < 0,05$).

Спустя 1 месяц от начала применения МОФФ в группе ТГВ выявлены следующие изменения: уменьшение содержания iNOS ($30,9 \text{ пг/мл}$) ($p < 0,05$) и МДА ($5,928 \pm 0,661 \text{ нмоль/г Hb}$) ($p < 0,05$), а также снижение активности ГП ($21,75 \text{ НАДФН}_2/\text{мин} \times \text{мг белка}$) ($p > 0,05$) и СОД ($0,157 \pm 0,084 \text{ у.е./мг Hb}$) ($p < 0,05$). Также отмечено повышение уровня метаболитов NO в сыворотке крови ($66,58 \pm 7,58 \text{ мкмоль/мл}$). МОФФ – представитель группы биофлавоноидов с выраженной флеботропной и антиоксидантной активностью. Его применение в группе ТГВ привело к снижению интенсивности процессов ПОЛ, о чем позволяет судить достоверное уменьшение уровня МДА ($p < 0,05$). На фоне нормализации последнего происходит понижение активности основных ферментов АОС – ГП и СОД ($p < 0,05$). Также наблюдалось повышение уровня метаболитов NO ($p < 0,05$). Таким образом, при нормализации уровня процессов ПОЛ на фоне применения МОФФ, происходит достоверный рост метаболитов оксида азота (II) вследствие снижения интенсивности взаимодействия NO с избыточным содержанием супероксид-анионов в условиях оксидативного стресса. То есть создаются предпосылки для реализации физиологических эффектов NO.

В дальнейшем, у животных группы ТГВ на 2, 3 и 6 месяц наблюдения не

Динамика изучаемых биохимических показателей в группе экспериментального тромбоза глубоких вен

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

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

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

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

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

выявлено достоверных колебаний изучаемых метаболитов, отличных от показателей 1 месяца от начала медикаментозной коррекции. Данный факт говорит о стойкой нормализации активности процессов ПОЛ на фоне применения МОФФ и, соответственно, формировании благоприятных условий для реализаций положительных физиологических эффектов NO, снижая риск его взаимодействия с супероксидными анионами, что в нормальных условиях обеспечивается адекватным функционированием АОС.

Таким образом положительное влияние МОФФ на ФСЭ создает благоприятные предпосылки для сохранения структурной целостности эндотелиального монослоя в условиях оксидативного стресса, посредством снижения активности процессов ПОЛ, тем самым препятствуя образованию пероксинитрита – нитрозилирующего агента.

В группах ТГВ и ПТС, на 10 и 31 сутки от момента лигирования вены соответственно отмечаются следующие биохимические сдвиги: снижение метаболитов NO, повышение уровней МДА, СОД, ГП и iNOS. На фоне применения МОФФ происходило стойкое снижение маркеров оксидативного стресса (МДА), при снижении уровней антиоксидантных ферментов (ГП и СОД), что говорит о нормализации процессов ПОЛ под действием препарата. Также отмечено снижение содержания iNOS в плазме крови, при росте уровня метаболитов оксида азота.

В группе L-NAME-индуцированной ЭД отмечается снижение уровня метаболитов NO при стабильных показателях iNOS, а также повышение уровня ПОЛ и активация АОС. Применение препарата МОФФ в данной группе привело к повышению уровня метаболитов NO и снижению уровней ГП, СОД и МДА, без достоверного влияния на содержание iNOS в плазме крови.

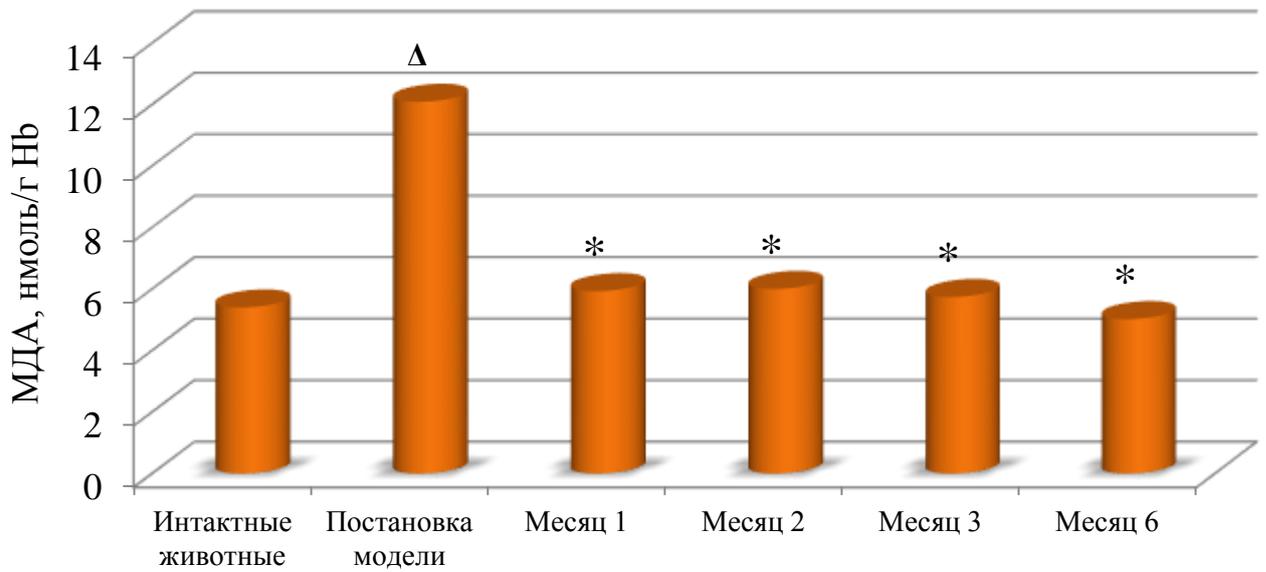


Рис. 24. Динамика уровней МДА в группе ТГВ

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

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

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

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

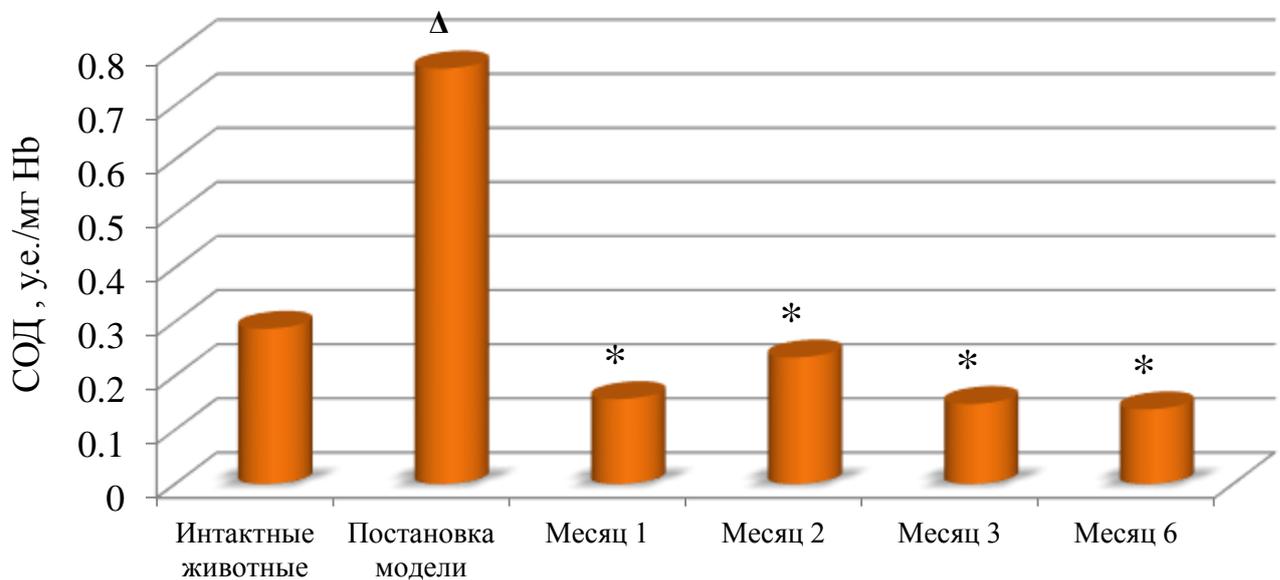


Рис. 25. Динамика уровней СОД в группе ТГВ

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

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

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

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

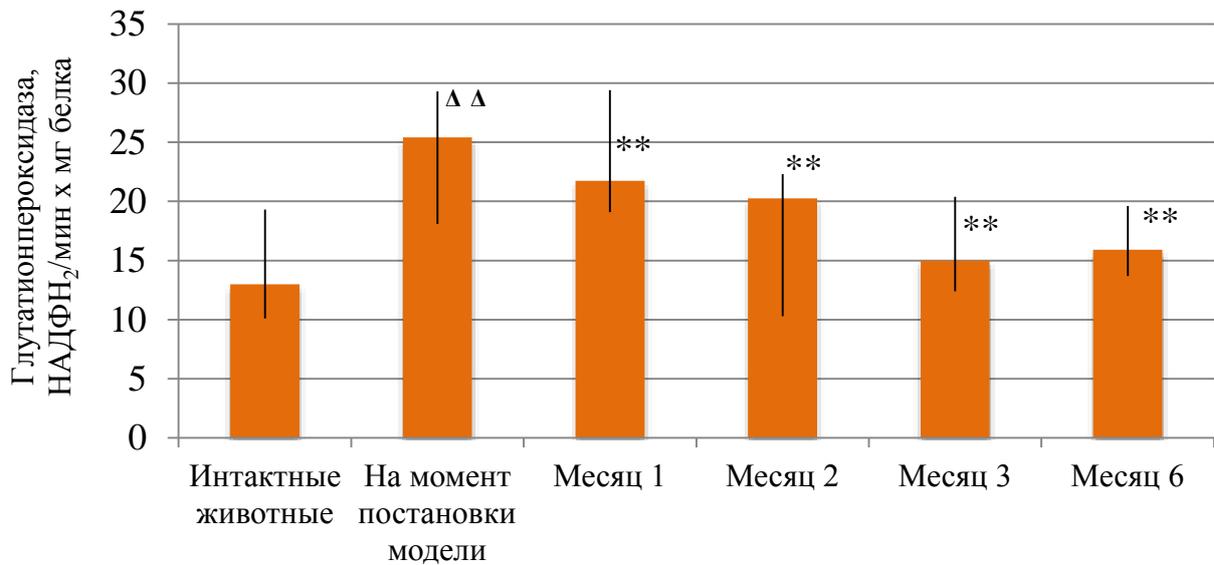


Рис. 26. Динамика уровней ГП в группе ТГВ

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

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

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

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

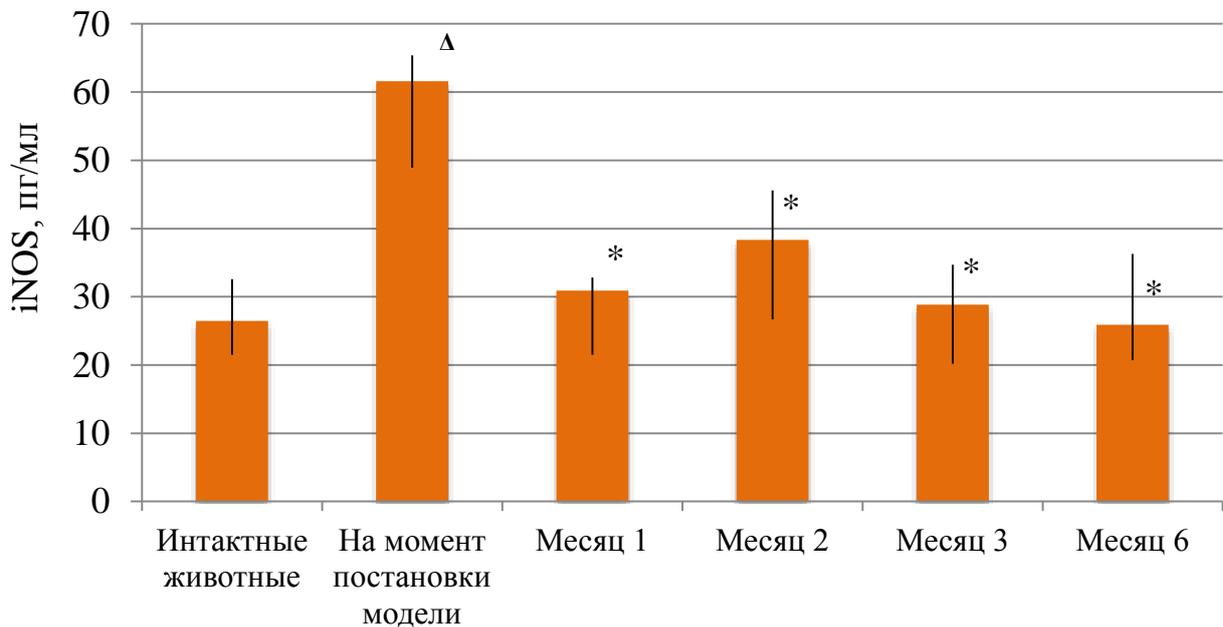


Рис. 27. Динамика уровней iNOS в группе ТГВ

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

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

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

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

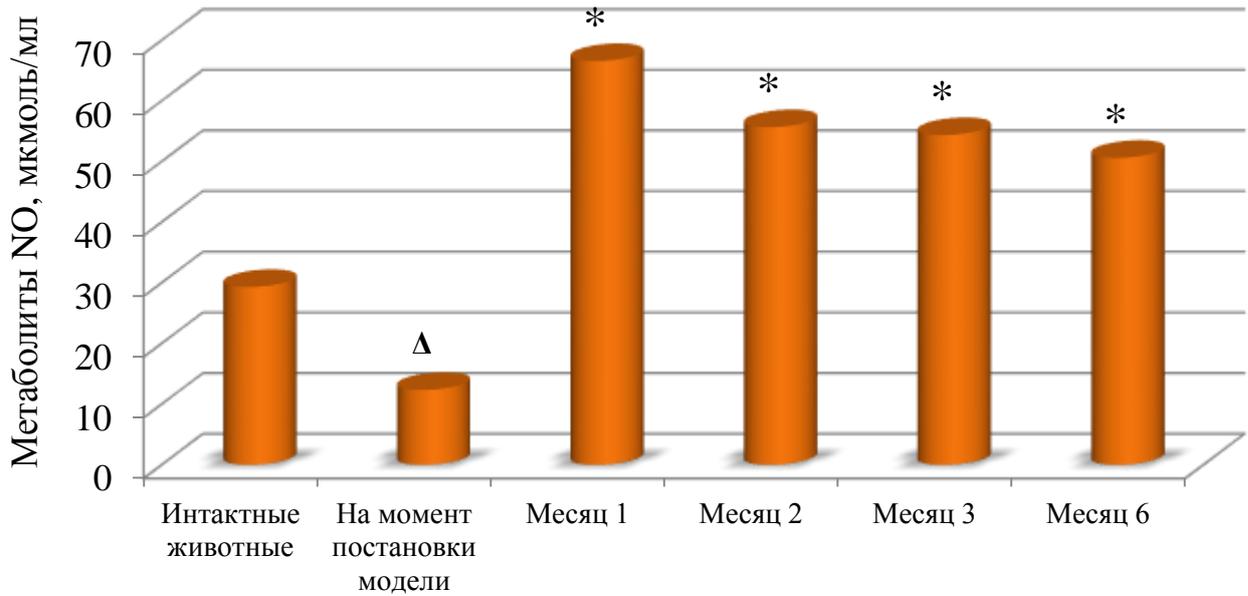


Рис. 28. Динамика метаболитов NO в группе ТГВ

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

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

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

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

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

Причиной развития тромбоза являются 3 фундаментальных постулата: нарушение реологических свойств крови, замедление кровотока, повреждение сосудистой стенки [22, 40]. Последний из которых, является морфологическим субстратом для инициирования процесса тромбообразования. Именно органические изменения венозной стенки, завершая весь каскад функциональных нарушений эндотелия, лежат в основе развития того или иного заболевания. В исследуемых группах лабораторных животных было проведено морфологическое исследование венозной стенки на наличие различного рода повреждений эндотелиального монослоя и нижележащих слоёв.

Материалом исследования служили участки общих подвздошных вен в сроки с 10 суток до 6 месяцев с момента постановки модели экспериментальной патологии и начала медикаментозной коррекции.

Начиная с 10 суток от момента лигирования вены в контрольной и группе ТГВ наблюдалась следующая динамика морфологических изменений

При гистологическом исследовании, на 10-е сутки от начала эксперимента, изменения венозной стенки в обеих группах – идентичны: представлены выраженными полями экссудативного воспаления вокруг стенки сосуда с явлениями дезорганизации соединительной ткани, в которых преобладали деструктивные процессы, стенка вены неравномерной толщины, с воспалительной инфильтрацией в адвентиции и периваскулярно (рисунок 29), в просвете гемолизированные и обесцвеченные эритроциты с фибриновой базофильной сетью, фибриновые массы и стенка вены связаны грануляционной тканью, в последней пролиферация фибробластов и очаги геморрагической инфильтрации. Стенка вены утолщена, в просвете организованный тромб с гемосидерозом и лейкоцитарной инфильтрацией, в центре эритроцитарно-фибриновый тромб острого типа (рисунок 30), стенка вены не инфильтрирована, окружающая ткань с умеренным отеком.

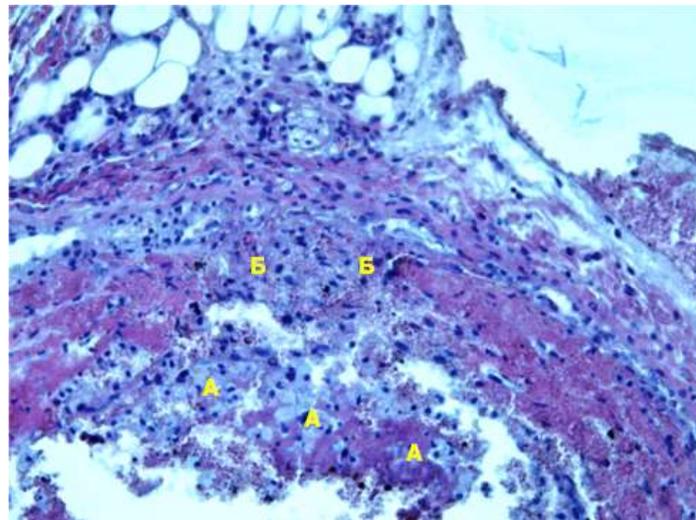


Рис. 29. Морфологическая картина венозной стенки в контрольной группе на 10 сутки от момента операции: А - пристеночные тромботические массы, Б - поля экссудативного воспаления с преобладанием полиморфноклеточного экссудата по всем слоям венозной стенки, десквамация эндотелия. Окраска гематоксилином и эозином, х200.

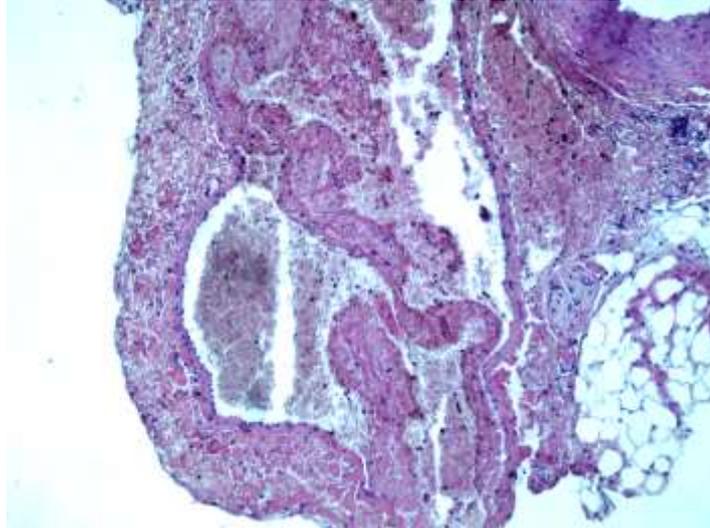


Рис. 30. Морфологическая картина венозной стенки в группе ТГВ на 10 сутки от момента операции: очаги деструкции соединительнотканного каркаса, извитость венозной стенки, пристеночные и облитерирующие тромбы в просвете вены. Окраска гематоксилином и эозином, х 100.

В обеих группах к 3 месяцу эксперимента в венах в 80% случаев определялись обтурирующие организованные тромбы с участками реваскуляризации, в теле тромба гемосидерин (рисунок 31), стенка вены склерозирована. Имеются очаговые поля периваскулярного склероза, с преобладанием фуксинофильных волокон, в местах наложения лигатуры эпителиоидно-клеточная реакция и активация клеток рассасывания (рисунок 32). В группе ТГВ отмечаются процессы восстановления эластомышечного каркаса вены, с активацией периваскулярного ангионенеза, уменьшением воспалительной инфильтрации, хотя, в зоне наложения лигатуры по прежнему активация макрофагов и клеток рассасывания. В просветах исследуемых вен отмечаются тромботические массы с участками реваскуляризации и резорбции гемосидерина. Подобная тенденция морфологической картины свидетельствует о более выраженной интенсивности процессов реканализации у животных в группе ТГВ, что, вероятно, обусловлено положительным влиянием МОФФ на функциональное состояние венозного эндотелия.

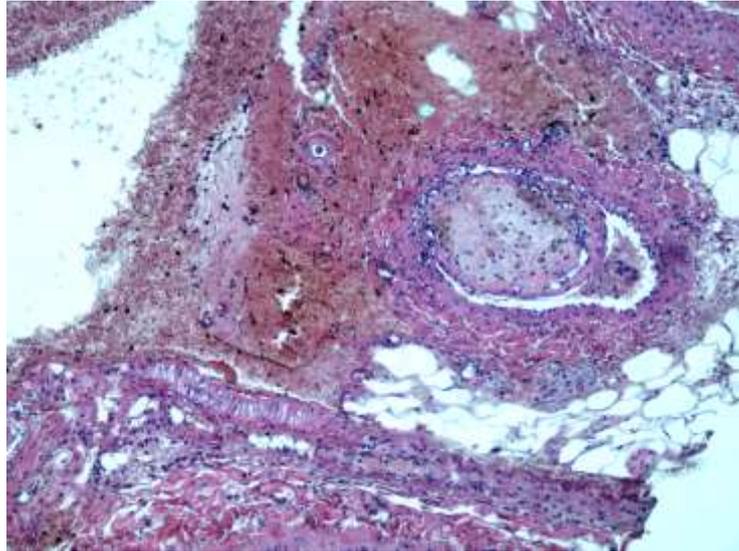


Рис. 31. Морфологическая картина венозной стенки в зоне тромбоза (группа ТГВ, месяц 3). Сформированный организованный пристеночный, частично обтурирующий просвет тромб с зернами гемосидерина и признаками резорбции. Окраска гематоксилином и эозином, x200.

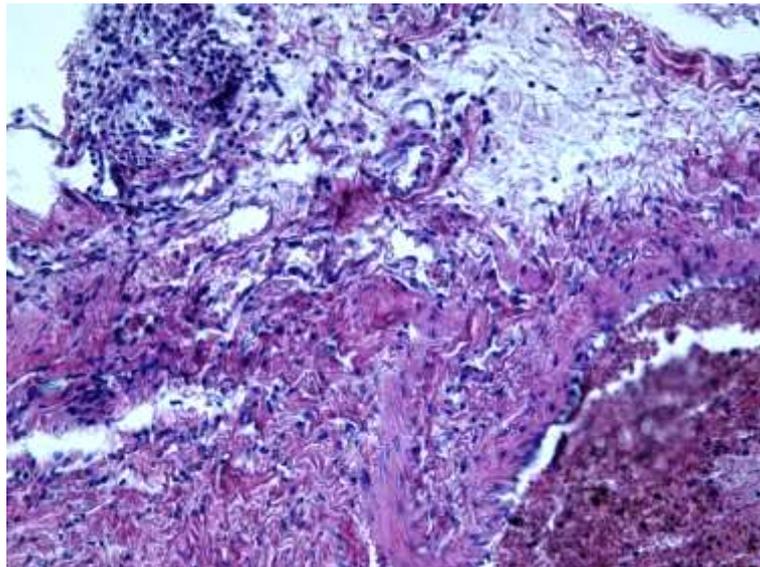


Рис. 32. Морфологическая картина венозной стенки в зоне тромбоза (группа контроля, месяц 3): периваскулярный склероз с очаговой лимфоидной инфильтрации, концентрические структуры фуксинофильных волокон. Окраска гематоксилином и эозином, x200.

В контрольной группе к 6 месяцу стенка вены с хорошо развитой мышечной оболочкой, интима утолщена, базальная мембрана широкая, плотная, местами отслоена, что свидетельствует о низкой вероятности эндотелизации венозной стенки в отдаленном периоде, в просвете фибринозно-эритроцитарный тромб с

пристеночной организацией и реваскуляризацией, в стенке неравномерная воспалительная инфильтрация в интиме и адвентиции, в адвентиции периваскулярно, в артерии отек интимы, мелкие сосуды малокровные. В адвентиции рыхлая инфильтрация полиморфноядерными лейкоцитами, мелкие сосуды неравномерно полнокровные, окружающая клетчатка умеренно отечная, с ангиоматозом.

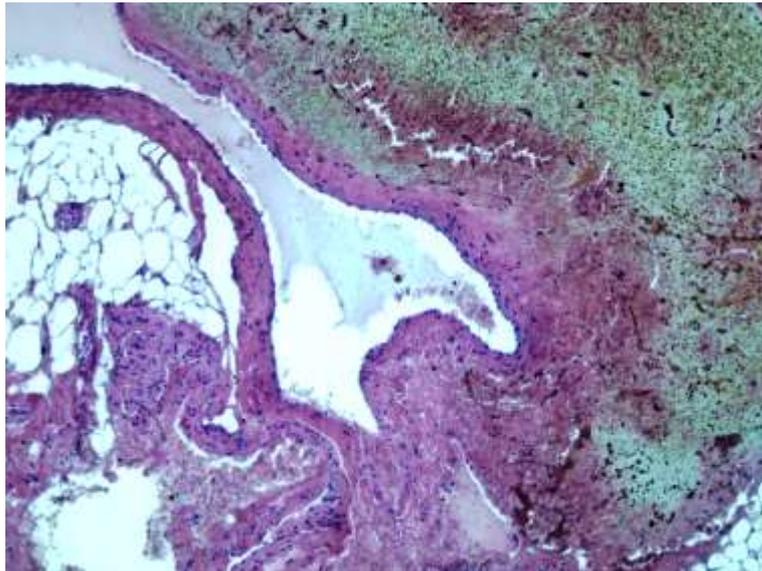


Рис. 33. Морфологическая картина венозной стенки в зоне тромбоза: утолщение алветиции,уплотнение соединительнотканного каркаса стенки вены, извитость базальной мембраны,очаговые пролифераты эндотелия (группа ТГВ, месяц 6). Окраска гематоксилином и эозином, x100.

В опытной группе к 6 месяцу коррекции, гистологически стенка вены с хорошо развитой мышечной стенкой, интима неравномерно утолщена, выстлана прерывистым слоем эндотелием, нередко, его расположение частоклообразное, с признаками пролиферации (рисунок 33). В просвете некоторых сосудов определяются остатки фибриново-эритроцитарных тромбов, преимущественно с пристеночным расположением их, очагами реваскуляризации (рисунок 34). Адвентиция и средняя оболочка с неравномерным утолщением и развитием *vasa vasorum*. В адвентиции рыхлая инфильтрация, преобладают пикринофильные волокна, единичные макрофаги с признаками фагоцитарной активности, очаги

резорбции гемосидерина. В зоне наложения лигатуры по-прежнему сохраняется макрофагальная и эпителиоидно-клеточная активность, очаговые поля коллагена с преобладанием фуксинофильных волокон, ангиоматоз.

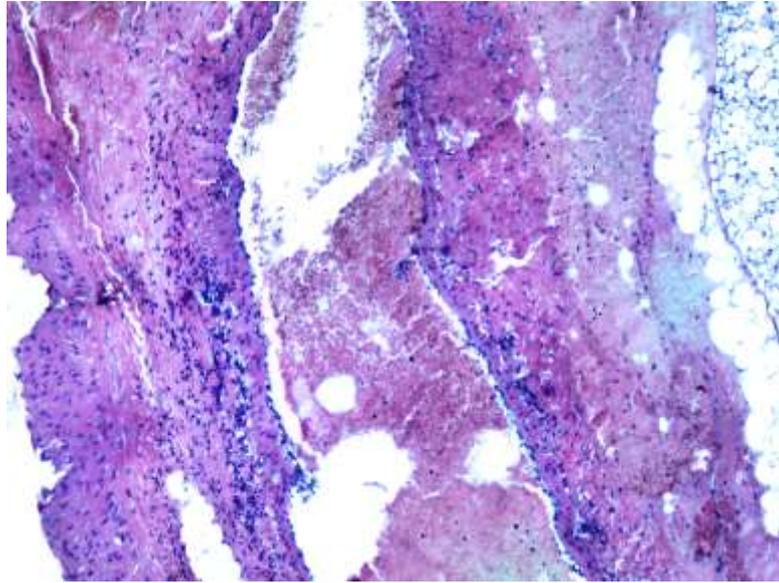


Рис. 34. Морфологическая картина венозной стенки в группе ТГВ на 6 месяц: в просвете вены остатки лизированных тромботических масс, пролиферация эндотелия на месте наложения фибриновых масс, развитая мышечная стенка. Окраска гематоксилином и эозином, x100.

В группе экспериментального ПТС начиная с 1 месяца от момента лигирования вены отмечалась следующая динамика морфологических изменений

Морфологическая картина на момент постановки модели до медикаментозной поддержки, представлена массивным периваскулярным интерстициальным отеком, с участками фибриноидного пропитывания вплоть до фибриноидного некроза. Очагово-диффузная воспалительная инфильтрация периваскулярно расположенная, с преобладанием мононуклеаров в экссудате. Стенка вены неравномерной толщины, с очаговой воспалительной инфильтрацией в адвентиции, в просвете гемолизированные и обесцвеченные эритроциты с фибриновой базофильной сетью, фибриноидные массы. По периферии сосуда, вокруг адвентиции поля зерен гемосидерина, как свободно лежащие, так и в единичных гемосидерофагах. В просвете вен организованные эритроцитарно-фибриновые тромбы преимущественно с частичной обтурацией просвета (рисунок 35).

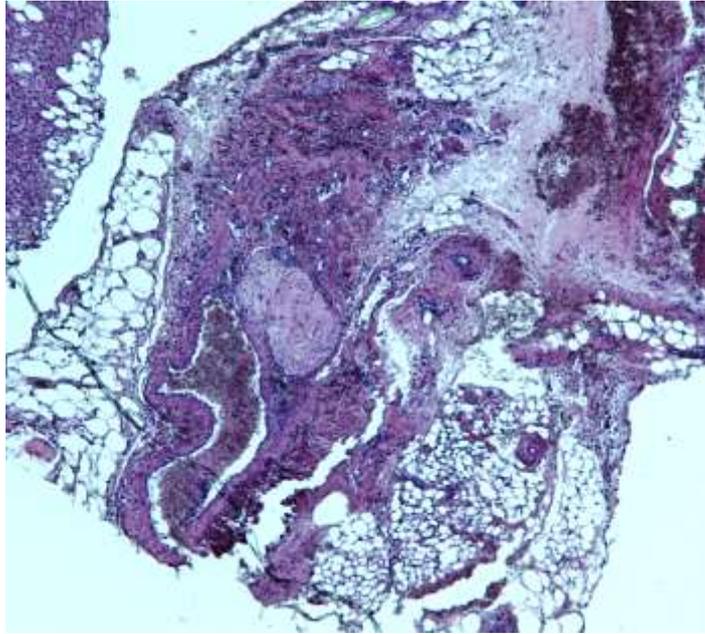


Рис. 35. Морфологическая картина венозной стенки в группе ПТС на момент постановки модели: поля дезорганизации соединительнотканного каркаса венозной стенки, очагово-диффузная воспалительная, преимущественно лимфоцитарно-макрофагальная инфильтрация с примесью мононуклеаров. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$.

К концу 1 месяца коррекции (рисунки 36-37), картина практически однотипна и представлена снижением интерстициального отека, хотя участки фибриноидных изменений в волокнистой строме адвентиции и средней оболочки имеют место. У животных данной группы отмечается уменьшение и формирование очаговой воспалительной инфильтрацией, преимущественно мононуклеарами.

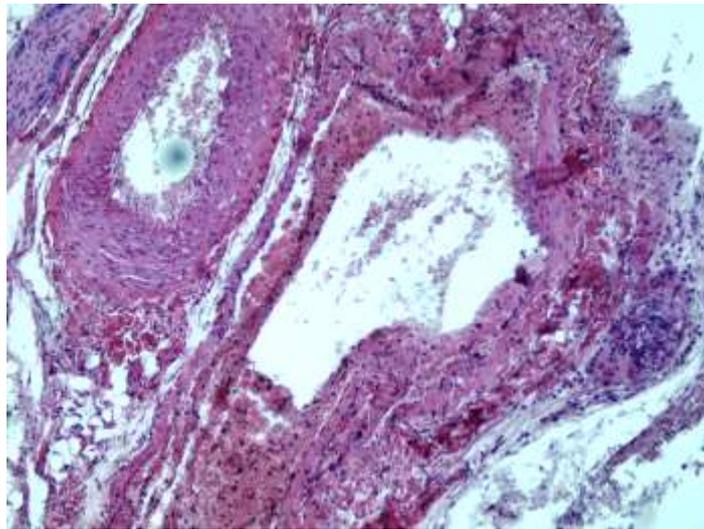


Рис. 36. Морфологическая картина венозной стенки в группе ПТС на 1 месяц от постановки модели: уменьшение воспалительной инфильтрации и отека венозной стенки, компактная адвентиция, адекватная васкуляризация стенки вены. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$.

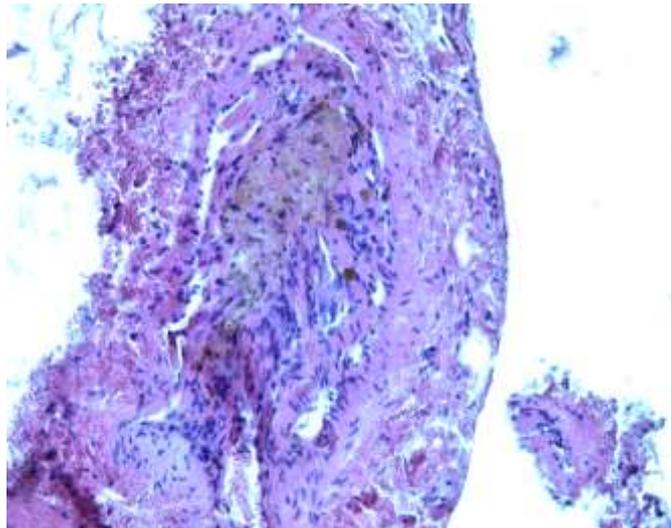


Рис. 37. Морфологическая картина венозной стенки в группе ПТС на 2 месяц от начала медикаментозной коррекции: резорбция зерен гемосидерина, активация макрофагов. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$.

Тромбы, имеющиеся в просвете сосудов с конденсацией эритроцитарно-фибринового каркаса, уплотнением его и наличием очагов рассасывания в краевых зонах. Имеются очаговые поля периваскулярного склероза, в местах наложения лигатуры эпителиоидно-клеточная реакция и активация клеток рассасывания, а также резорбция зерен гемосидерина, что является прогностически благоприятным явлением.

На 3 месяц от начала коррекции (рисунки 38-39) преобладают процессы восстановления эластомышечного каркаса вены, с активацией периваскулярного ангиогенеза, уменьшением воспалительной инфильтрации, в зоне наложения лигатуры по прежнему активация макрофагов и клеток рассасывания. Тромбы с участками реваскуляризации и резорбции гемосидерина.

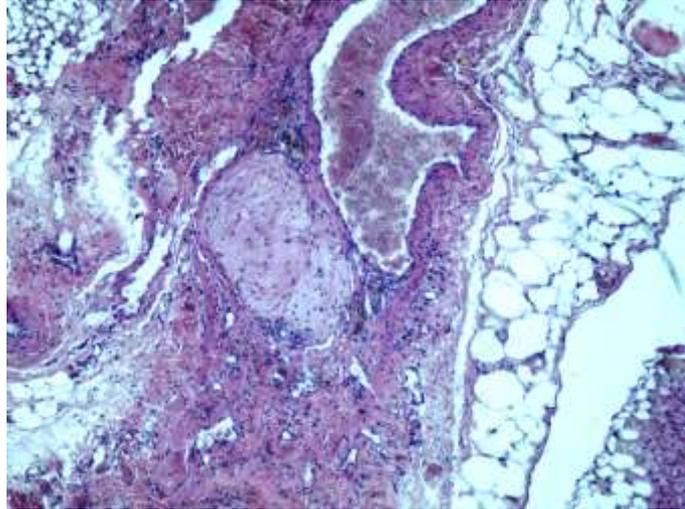


Рис. 38. Морфологическая картина венозной стенки в группе ПТС на 3 месяц: массивные поля ангиогенеза в адвентиции, компактизация мышечной оболочки. Окраска гематоксилином и эозином, x100.

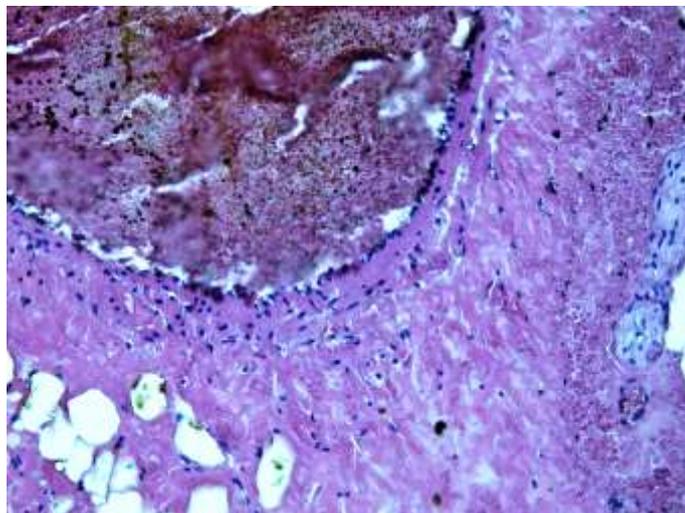


Рис. 39. Морфологическая картина венозной стенки в группе ПТС на 3 месяц: резорбция тромботических масс в просвете сосуда, очаги пролиферации эндотелия, очаговая пролиферация фибробластов венозной стенки. Окраска гематоксилином и эозином, x100.

К 6 месяцу коррекции ПТФС стенка вены с хорошо развитой мышечной стенкой, интима неравномерно утолщена, выстлана прерывистым эндотелием, нередко, его расположение частоклообразное (рисунок 40).

В просвете некоторых сосудов определяются остатки фибринозно-эритроцитарных тромбов, преимущественно с пристеночным расположением их, очагами реваскуляризации. Адвентиция и средняя оболочка с неравномерным утолщением и развитием ваза вазорум (рисунок 41).

В адвентиции рыхлая инфильтрация единичными макрофагами с признаками фагоцитарной активности, очаги резорбции гемосидерина. В зоне наложения лигатуры по прежнему сохраняется макрофагальная и эпителиоидно-клеточная активность, очаговые поля коллагена, ангиоматоз (рисунок 42).

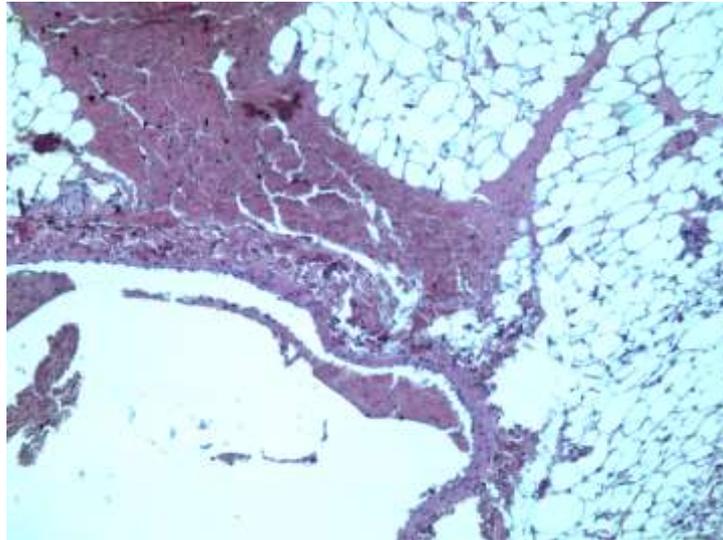


Рис. 40. Морфологическая картина венозной стенки в группе ПТС на 6 месяц: равномерный слой эндотелия, покрывающий просвет вены, компактная мышечная оболочка. Окраска гематоксилином и эозином, x100.

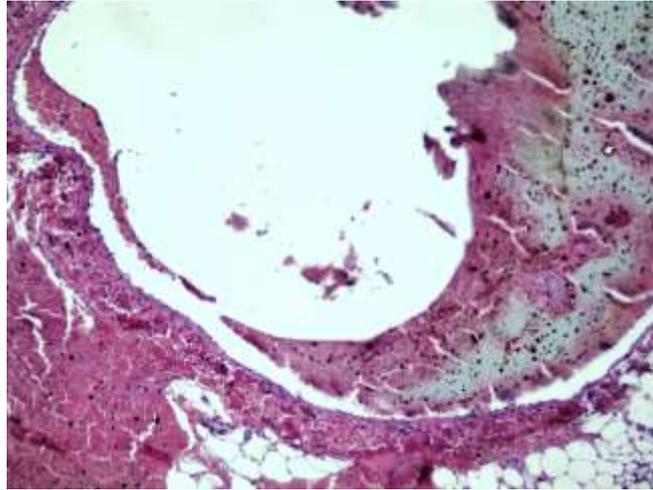


Рис. 41. Морфологическая картина венозной стенки в группе ПТС на 6 месяц медикаментозной коррекции: остатки компактных пристеночно расположенных тромботических масс в просвете вены, уплощение эндотелия, сохранность мышечной оболочки. Окраска гематоксилином и эозином, x100.

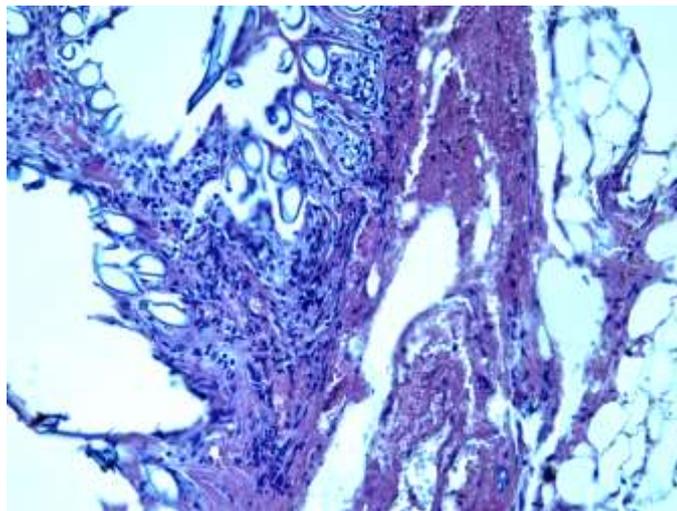


Рис. 42. Морфологическая картина венозной стенки в группе ПТС на 6 месяц от начала медикаментозной коррекции в зоне наложения лигатуры: классическая эпителиодно-клеточная реакция с активацией клеток рассасывания и армированием последними зоны наложения лигатуры. Окраска гематоксилином и эозином, x100.

Динамика морфологических изменений в группе L-NAME-индуцированной
эндотелиальной дисфункции

Морфологическая картина при световой микроскопии не отличается какими-либо патогномичными изменениями (рисунок 43), характерными для данной модели. Имеются поля массивного интерстициального отека, выраженные

поля дезорганизации эндотелия, заключающиеся в сдувании эндотелия, увеличение межэндотелиальных промежутков, и очаги фибриноидного надухания и некроза, утолщение стенки и коллагенолизис. Эксудативное воспаление в данной группе не преобладало и носило преимущественно серозный или интерстициальный характер с распределением экссудата очагово, преимущественно в адвентиции.

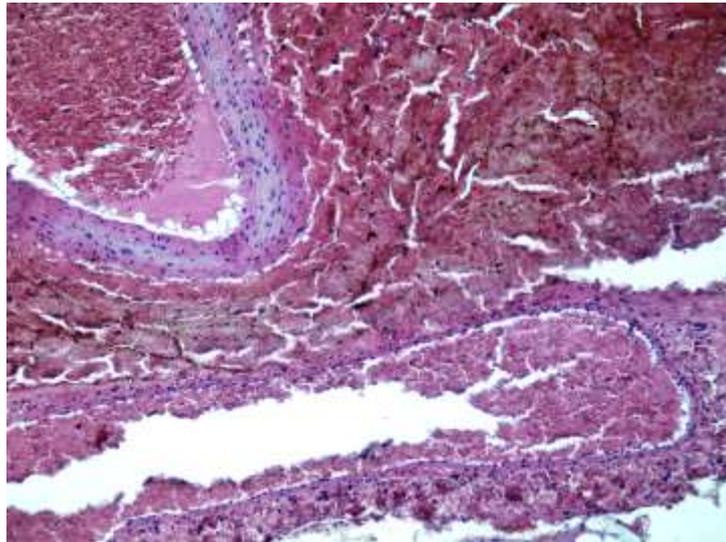


Рис. 43. Морфологическая картина венозной стенки на 8 сутки от начала эксперимента: очаги десквамации эндотелия, выраженный интерстициальный отек всех слоев стенки вены. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$.

В результате коррекции L-NAME индуцированной патологии МОФФ (рисунки 44-45) происходит восстановление целостности эндотелия, некоторые эндотелиоциты с картиной пролиферативной активности, периваскулярный отеки и изменения соединительнотканного и коллагенового каркаса претерпевают ряд изменений, направленных на восстановление поврежденного волокнистого каркаса, поля ангиогенеза, преимущественно в адвентиции, полнокровие сосудов окружающей клетчатки.

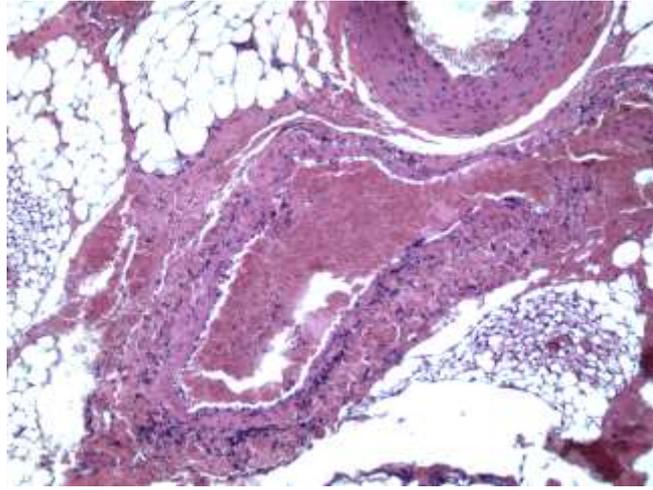


Рис. 44. Морфологическая картина венозной стенки на 3 месяц от начала эксперимента: восстановление непрерывности эндотелиального слоя, уменьшение межэндотелиальных промежутков. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$.

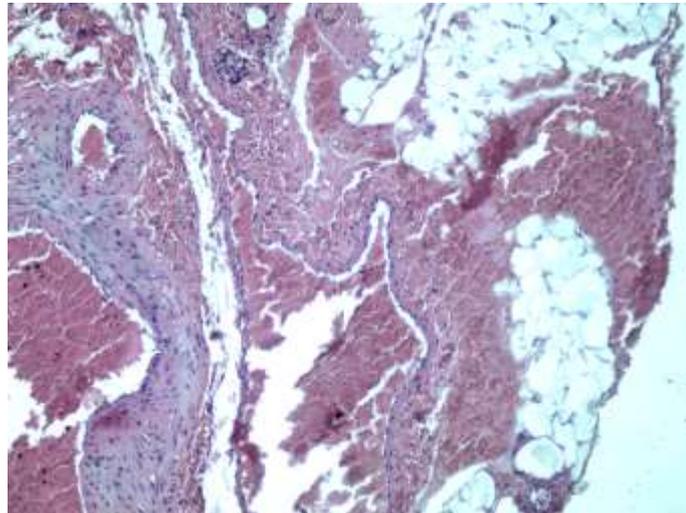


Рис. 45. Морфологическая картина венозной стенки на 3 месяц от начала эксперимента: поля ангиогенеза и извитость венозной стенки. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$.

В связи с малой специфичностью морфологических изменений в данной группе при стандартной световой микроскопии, была использована трансмиссионная электронная микроскопия с целью выявления тонких ультраструктурных изменений тканей венозной стенки и интимных механизмов восстановления составных частей венозного каркаса в различные сроки эксперимента.

На момент постановки модели наибольшие изменения претерпевают эндотелиоциты. В венозных сосудах, выстилающий их эндотелий уплощен, и поля мало заметными сосудистыми щелями, клетки здесь менее дифференцированные,

крупные, нередко выступают в виде сосочков в просвет сосуда и полностью закрывают его. Эндотелий содержит эухроматичное большое ядро, немногочисленные органеллы в цитоплазме, большая часть которой представлена полисомами, не связанными с цистернами ГЭР (рисунок 46). В ядре обилие эухроматина. Строма разряженная, представленная фибриллярными клетками с выраженным набуханием и отеком (рисунок 47), между коллагеновыми волокнами располагаются солидные тяжи из веретенообразных клеток, также определяется инфильтрация extravazатами из эритроцитов и лимфоцитами. Гладкие миоциты с активно функционирующими ядрами. Экстрацеллюлярный матрикс с конденсацией коллагеновых волокон и деструкций эластических. В паравазальной соединительной ткани очаги деструктивных изменений, интерстициальный отек и коллагенолизис.

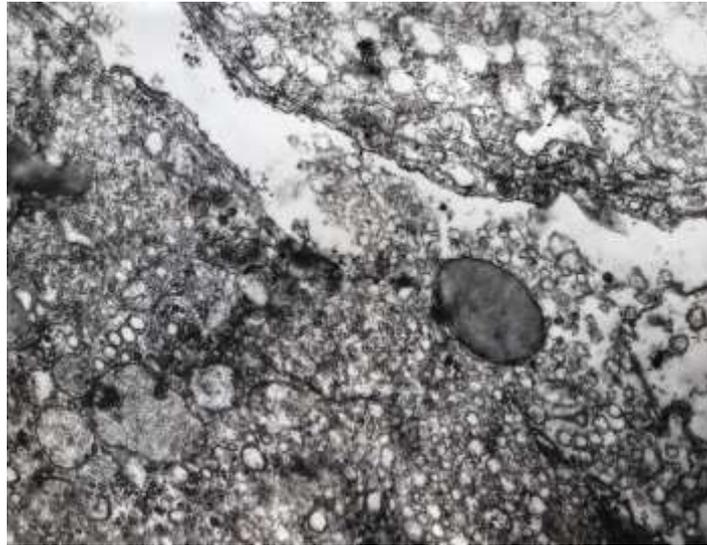


Рис. 46. Ультраструктура эндотелиоцита вены на момент постановки модели: расширение пространств гранулярной эндоплазматической сети, деструкция митохондрий, поля компактно расположенных полисом. Двойное контрастирование уранилацетатом и цитратом свинца, x12500.

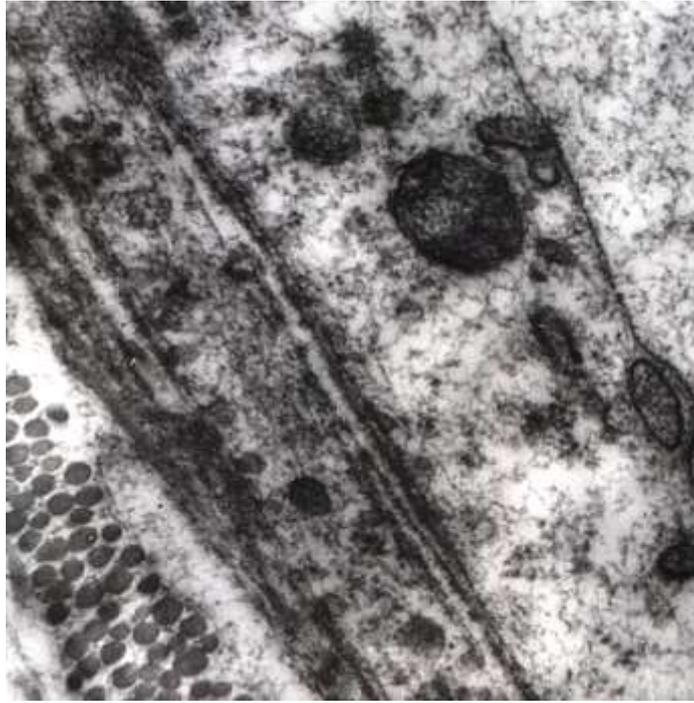


Рис. 47. Ультраструктура венозной стенки в субэндотелиальной области на момент постановки модели: конденсация коллагеновых волокон, деструкция эластических волокон. Двойное контрастирование уранилацетатом и цитратом свинца, $\times 12500$.

Картина на сроках 1 и 2 месяца идентична, отличается от предыдущей наличием миоэпителиальных соединений между эндотелиоцитами и гладкомышечными клетками (рисунок 48). Эти соединения допускают транспорт сигнальных молекул, эндотелина. В цитоплазме эндотелиоцитов практически постоянно и отчетливо выявляются элементы цитоскелета, представленные тонкими пучками актиновых филаментов, промежуточными филаментами. Клетки связаны между собой плотными контактами. В цитоплазме содержится небольшое количество фрагментов ГЭР, округлые митохондрии с редкими криптами и разнообразные гранулы (рисунок 49). В эндотелиоцитах встречаются единичные тельца (гранулы) Вебера-Паллада, что говорит о «молодости» и синтетической активности эндотелиальной клетки (рисунок 50). В ядре эндотелиоцитов диспергированный хроматин, активное ядрышко. Определяется выраженная базальная пластинка. В перивазальной строме встречаются макрофаги с признаками синтетической и макрофагальной активности и тучные

клетки. Единичные эндотелиоциты с фенестрированной цитоплазмой и наличием микровезикул в апикальных слоях клетки.



Рис. 48. Ультраструктура венозной стенки на 1 месяц от начала эксперимента: миоэпителиальные соединения между эндотелиоцитами и гладкомышечными клетками, тонкие пучки актиновых филаментов. Двойное контрастирование уранилацетатом и цитратом свинца, x24500.

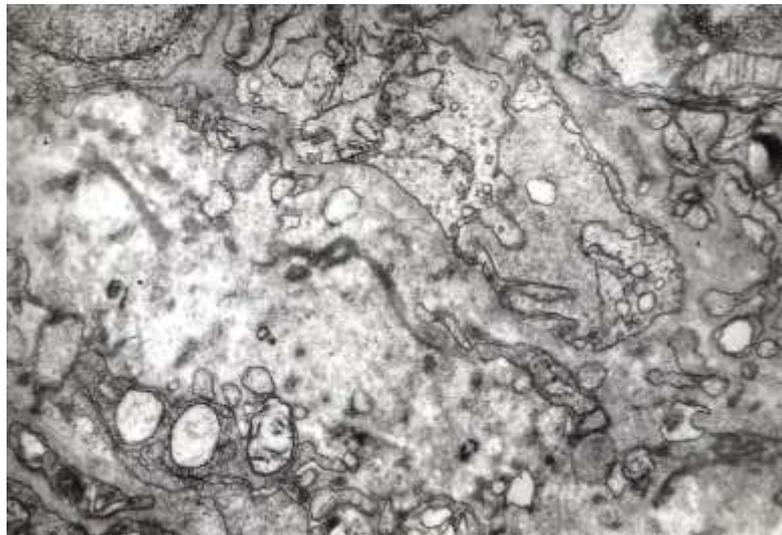


Рис. 49. Ультраструктурные изменения венозной стенки на 1 месяц от начала эксперимента: в цитоплазме развитые фрагменты гранулярной эндоплазматической сети, округлые митохондрии с редкими криптами и разнообразные гранулы различной электронной плотности. Двойное контрастирование уранилацетатом и цитратом свинца, x12500.



Рис. 50. Ультраструктурные изменения венозной стенки на 2 месяц от начала эксперимента: выраженная синтетическая активность эндотелиоцита: концентрические митохондрии с выраженными криптами, осмифильные тельца, ядро с плотной нуклеолеммой. Двойное контрастирование уранилацетатом и цитратом свинца, x20500.

В временных промежутках 3 и 6 месяцев ультраструктура венозной стенки представлена активными эндотелиальными клетками с признаками синтетической активности, определяются явления клазматоза, клеточная поверхность содержит многочисленные мембранные везикулярные структуры (рисунок 51). Подобные морфологические изменения рассматриваются как положительная тенденция на пути восстановления структурно-функционального баланса эндотелиального монослоя.

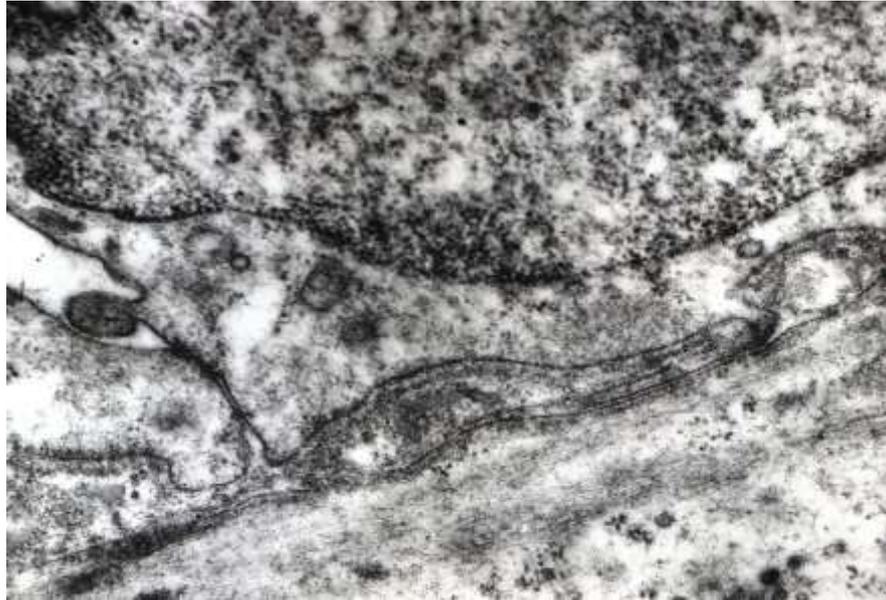


Рис. 51. Ультраструктура венозной стенки в области субэндотелиального пространства на 3 месяц от начала эксперимента: в ядре эндотелиоцита диспергированный хроматин, активное ядрышко, плотная и компактная нуклеолема, цитоплазма с везикулярными выростами. Двойное контрастирование уранилацетатом и цитратом свинца, $\times 20500$.

Базальная пластинка отчетливо выявляется на базальной поверхности эндотелия, отделена от подлежащей соединительной ткани более светлой зоной с разряженным экстрацеллюлярным матриксом. Сохранение целостности базальной мембраны, а также признаки синтетической активности в ее области, являются благоприятными предпосылками для восстановления эндотелиального монослоя. В данной группе отчетливо виден синтез экстрацеллюлярного матрикса с секрецией из зоны Гольджи в экстрацеллюлярное пространство фибриллярного материала, что свидетельствует об интенсификации репаративных процессов венозной стенки (рисунок 52).

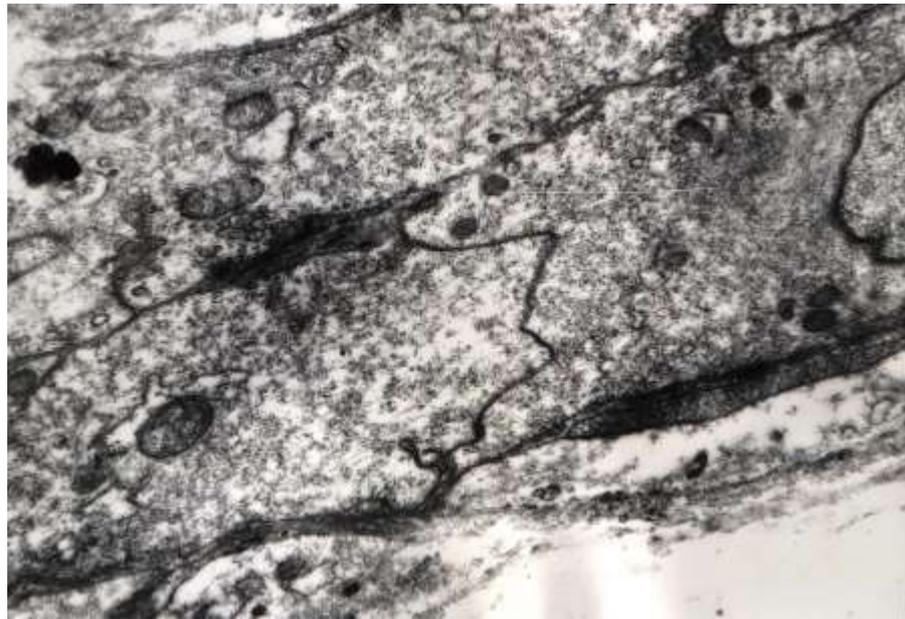


Рис. 52. Ультраструктура венозной стенки на 6 месяц от начала эксперимента: экскреция фибриллярного материала из периферийных зон цитолеммы и зон Гольджи с выходом в перичеллюлярное пространство. Двойное контрастирование уранилацетатом и цитратом свинца, $\times 20500$.

Таким образом, в группах ТГВ, ПТС и контроля отмечены выраженные структурные нарушения венозной стенки, затрагивающие в основном эндотелиальный слой и адвентицию, мышечную пластинку в меньшей степени и, в контексте работы, являясь морфологическими проявлениями ЭД. Морфологически нами установлен характер данных изменений: структурная реорганизация в данных группах проявляется за счет дегенеративных и дистрофических изменений, вызванных в первую очередь острым и хроническим воспалением и активностью клеток воспалительного ряда. В группе L-NAME подобные изменения отсутствовали или были минимально выраженными, при морфологическом и ультраструктурном исследовании были показаны в основном изменения дистрофического характера разной степени выраженности и глубины поражения, при этом наблюдались биохимические сдвиги, что говорит об обратимости последствий данной экспериментальной модели.

Воздействие МОФФ оказывает положительные эффекты на морфоструктуру всех компонентов венозной стенки во всех без исключения экспериментальных группах, но большей выраженностью демонстрирует

эндотелий с субэндотелиальными зонами, адвентиция. Эти эффекты демонстрировались в снижении интерстициального отека, уменьшении мононуклеарной и лимфоидно-макрофагальной инфильтрации, частичном регрессе склеротического процесса и восстановлении гладкомышечного и эластомышечного каркаса. Однако, степень выраженности подобного рода структурных изменений в виде регресса воспалительных и дегенеративно-дистрофических процессов варьирует среди всех групп животных. Так, в наименьшей степени, вернее полным отсутствием подобного регресса характеризуется группа контроля, где препарат МОФФ не применялся. В наименьшей степени структурные изменения затронули венозную стенку животных группы L-NAME-индуцированной ЭД, однако даже при подобных незначительных нарушениях, отмеченных на ультраструктурном уровне в венозной стенке, отмечалось положительное действие МОФФ направленное на восстановление целостности эндотелиальной выстилки, компатизации ее. Выраженный регресс структурных нарушений, направленных на восстановление структурных компонентов венозной стенки и регресса процесса тромбообразования с тромболизисом, отмечен в группе ТГВ, где препарат применялся с 10 суток от момента начала эксперимента. В группе ПТС подобный регресс был менее выражен, что по-видимому связано с более длительным периодом от момента тромбоза до начала применения МОФФ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема профилактики и лечения острой и хронической венозной патологии является одной из наиболее животрепещущих междисциплинарных проблем современной медицины. Несмотря на подробные и доступные рекомендации по лечению и профилактике ВТЭО, динамичность развития ангиологии и сосудистой хирургии, заболеваемость данной нозологией и ее осложнениями остаются на стабильно высоком уровне, в связи с чем в последние годы среди многих авторов наметилась тенденция к пересмотру или иной трактовке фундаментальных постулатов патофизиологии венозной системы. Одной из ведущих причин к подобного рода умозаключениям послужила невозможность объяснения высокой степени положительной корреляционной связи между риском развития ВТЭО и атеросклеротическим поражением артериального русла, исходя из «классических» теорий развития этих групп заболеваний. С другой стороны набирающая в последнее время все большую популярность теория ЭД позволяет дать объяснение данному явлению. При этом, исходя из результатов многих исследований, роль ЭД в развитии атеросклероза укоренилась на ведущих позициях, однако публикации о венозной эндотелиальной дисфункции до настоящего момента имели несистемный малочисленный характер, хотя ее наличие и роль в развитии ВТЭО кажутся вполне логичными.

С учетом вышеизложенного были сформулированы задачи, цели и дизайн настоящего исследования. Работа выполнена в рамках научного плана ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России.

Нарушение ФСЭ, характеризующаяся исключительно биохимическими сдвигами, является начальной стадией каскада патофизиологических процессов при ЭД. Дисбаланс между процессами ПОЛ и активностью АОС является одним из базовых элементов в повреждении эндотелия и развитии относительного дефицита NO со всеми вытекающими отсюда последствиями. Изолированная стимуляция синтеза оксида азота путем применения его предшественников либо эндотелиотропных препаратов в условиях оксидативного стресса приводит лишь

к усугублению ЭД. Оптимальным решением при коррекции ЭД является первостепенная нормализация процессов ПОЛ и активация АОС с последующей стимуляцией выработки NO. Указанным условиям в полной мере соответствует МОФФ – флеботропный препарат выбора при лечении венозной патологии с выраженными антиоксидантными свойствами.

Эксперимент выполнен на 147 лабораторных крысах линии Wistar массой 250-350 г. Животные разделены на четыре группы: контрольная, ПТС, ТГВ и L-NAME-индуцированной ЭД. На протяжении 6 месяцев животным опытных групп энтеральным путем вводилась водная суспензия микронизированной очищенной фракции флавоноидов в дозе 100 мг/кг/сутки. Выполнялась оценка уровней метаболитов NO, СОД, МДА, ГП и iNOS на протяжении всего периода исследования. Проводилось морфологическое исследование венозной стенки на протяжении периода исследования. В группе L-NAME-индуцированной ЭД дополнительно проводилась трансмиссионная электронная микроскопия с целью выявления ультраструктурных изменений тканей венозной стенки в различные сроки эксперимента.

В качестве исходных биохимических показателей были взяты образцы крови у интактных животных. Были получены следующие результаты: метаболиты NO $29,314 \pm 3,124$ мкмоль/мл; МДА $5,398 \pm 0,962$ нмоль/г Hb; СОД $0,287 \pm 0,092$ у.е./мг Hb; ГП 13 НАДФН₂/мин х мг белка; iNOS 26,45 пг/мл.

В контрольной группе животных на 8-10 сутки от момента лигирования магистральной вены отмечалось достоверное снижение содержания метаболитов оксида азота ($11,508 \pm 3,162$ мкмоль/мл) ($p < 0,05$) при одновременном повышении уровней ГП ($18,85$ НАДФН₂/мин х мг белка) ($p > 0,05$), СОД ($0,847 \pm 0,523$ у.е./мг Hb) ($p > 0,05$), МДА ($17,395 \pm 3,541$ нмоль/г Hb) ($p < 0,05$) и iNOS (61,1 пг/мл) ($p < 0,05$). Содержание МДА – интегрального показателя процессов ПОЛ – увеличивается, по-видимому в результате развития оксидативного стресса на фоне острой ишемии венозной стенки. Одновременно отмечается рост основных ферментов АОС – ГП и СОД – который, вероятно обусловлен компенсаторной активацией АОС на фоне увеличения активности процессов ПОЛ. Повышение

уровня iNOS обусловлено воспалительной реакцией венозной стенки и окружающих тканей на внешнее воздействие и развитие тромбоза. Парадоксально выглядит тот факт, что на фоне роста содержания iNOS – самого активного представителя NO-синтаз, происходит довольно выраженное снижение содержания метаболитов оксида азота (II). Этот факт возможно объяснить тем, что в условиях оксидативного стресса происходит взаимодействие NO с активными формами кислорода с образованием пероксинитрита (ONOO^-), вещества с высокой нитрозилирующей активностью в отношении липопротеидов клеточных мембран. В условиях повышения активности процессов ПОЛ происходит вовлечение NO в каскад патофизиологических реакций, приводящих к нарушению целостности клеточных структур, а также формированию абсолютного дефицита физиологических эффектов NO вследствие его взаимодействия с избытком супероксидных радикалов и образованию ONOO^- . Пероксинитрит, в свою очередь, обладает высокой реакционной активностью в отношении липопротеидов клеточных мембран, приводя к их нитрозированию и, тем самым, создавая дефицит азотсодержащих метаболитов NO в сыворотке крови.

Таким образом, именно динамическое равновесие между процессами ПОЛ и АОС имеет решающее значение в реализации физиологических эффектов NO, либо его вовлечении в каскад патобиохимических реакций с образованием ONOO^- .

В контрольной группе животных на протяжении последующего периода наблюдения сохранялся аналогичный биохимический статус без статистически значимых изменений, что и на момент постановки модели, что говорит о стойком нарушении ФСЭ при воспроизведении венозного тромбоза.

Использованные экспериментальные модели создают *in vivo* условия для воспроизведения ЭД. В каждой из опытных групп в той или иной степени отмечено положительное влияние МОФФ на ФСЭ и структурные изменения венозной стенки, что говорит о наличии у данного препарата эндотелиотропных свойств.

В группе ПТС на момент постановки модели отмечено достоверное ($p < 0,05$) снижение уровня метаболитов NO ($12,47 \pm 2,83$ мкмоль/мл) (табл. 10, рис. 18) при одновременном повышении уровней МДА ($16,52 \pm 4,28$ нмоль/г Hb) ($p < 0,05$), iNOS ($66,2$ пг/мл) ($p < 0,05$), СОД ($0,423 \pm 0,168$ у.е./мг Hb) ($p > 0,05$) и ГП ($21,25$ НАДФН₂/мин х мг белка) ($p > 0,05$). При последующем применении МОФФ, отмечается достоверное повышение содержания метаболитов NO в сыворотке крови ($44,31 \pm 15,11$ мкмоль/мл), при одновременной нормализации маркеров оксидативного стресса: МДА ($4,98 \pm 0,64$ нмоль/г Hb) ($p < 0,05$), СОД ($0,1 \pm 0,044$ у.е./мг Hb) ($p < 0,05$), ГП ($13,35$ НАДФН₂/мин х мг белка) ($p > 0,05$). Уровень iNOS на фоне коррекции МОФФ достоверно снижается iNOS ($50,85$ пг/мл) ($p > 0,05$), что говорит о влиянии препарата на процессы хронического интерстициального воспаления венозной стенки на фоне ПТС. Повышение уровня метаболитов NO также объясняется нормализацией процессов ПОЛ под действием флавоноидов. Снижение активности основных ферментов АОС, по-видимому, также вызвано снижением оксидативного стресса на фоне фармакологической коррекции.

При группе L-NAME-индуцированной ЭД на момент постановки модели отмечено достоверное снижение уровня метаболитов NO ($12,022$ мкмоль/мл) ($p < 0,05$), вызванное ингибированием eNOS, при этом уровень iNOS ($27,85$ пг/мл) ($p > 0,05$) не подвергся достоверным изменениям, что говорит о специфичности действия препарата L-NAME. В то же время у животных данной группы выявлено достоверное повышение маркеров оксидативного стресса – МДА ($13,108 \pm 1,371$ нмоль/г Hb) ($p < 0,05$) и увеличения активности СОД ($0,798 \pm 0,276$ у.е./мг Hb) ($p < 0,05$) и ГП ($26,15$ НАДФН₂/мин х мг белка) ($p > 0,05$). Подобный эффект объясняется тем, что L-NAME является синтетическим аналогом эндогенных ингибиторов eNOS, которые в физиологических условиях приводят к возникновению оксидативного стресса в ЭК. На фоне применения МОФФ у животных данной группы отмечалось достоверное повышение уровня метаболитов NO, понижение уровня МДА, а также понижение активности СОД на протяжении всего периода наблюдения. При этом не выявлено какого-либо

значимого влияния препарата МОФФ на уровень iNOS на протяжении эксперимента.

Таким образом, в данной группе отмечалось снижение уровня метаболитов NO при стабильных показателях iNOS, а также повышение уровня ПОЛ и активация АОС. Применение препарата МОФФ в данной группе привело к повышению уровня метаболитов NO и снижению уровней ГП, СОД и МДА, без достоверного влияния на содержание iNOS в плазме крови.

Воспроизведение указанных экспериментальных моделей сопровождалось структурными изменениями венозной стенки, выраженными в каждой из экспериментальных групп в различной степени. В контрольной группе, развитие морфологических изменений проходило по «классическим» принципам венозного тромбоза с последующим его регрессом. Это сопровождалось развитием массивной лейкоцитарной инфильтрацией венозной стенки и окружающих тканей, нарушением целостности эндотелия и/или его полной десквамацией, формированием красного тромба в просвете вены. Регресс данных изменений не подвергался какому-либо воздействию извне в виде медикаментозной поддержки, в результате чего произошло развитие грубых фиброзно-склеротических изменений венозной стенки с замедленной резорбцией тромботических масс и их реканализации. Не наблюдалось каких-либо признаков восстановления эндотелиального монослоя, по чему можно судить о низкой способности к регенераторным процессам у животных данной группы.

В группе ТГВ в момент постановки модели отмечались сопоставимые морфологические изменения с животными группы контроля на этом сроке. В процессе применения МОФФ отмечено частичное восстановление эндотелиального монослоя и эласто-мышечного каркаса венозной стенки. При этом уже к первому месяцу применения МОФФ выявлено заметное снижение лейкоцитарной инфильтрации в зоне наложения лигатуры, что позволяет говорить о снижении агрессивного воздействия со стороны воспалительных клеточных структур на фоне применения препарата.

В группе ПТС на момент постановки модели отмечены более выраженные

структурные изменения венозной стенки. Это связано, по-видимому, с более поздним началом применением МОФФ по сравнению с группой ТГВ (с 31 суток в отличие от группы ТГВ, где начало медикаментозной коррекции стартовало с 11 суток от момента лигирования вены). Отмечен более низкий регресс структурных изменений на фоне применения МОФФ, что проявлялось в слабом восстановлении эндотелиального слоя, а так же сохранением довольно грубых нарушений эласта мышечного каркаса и широкими участками коллагеновых волокон.

В группе L-NAME-индуцированной ЭД при световой микроскопии не выявлено значимых структурных изменений сосудистой стенки. При трансмиссионной электронной микроскопии на момент постановки модели в паравазальной соединительной ткани выявлены колагенолизис и интерстициальный отек. В эндотелиоцитах отмечено разряжение стромы и пониженная синтетическая активность. На фоне применения МОФФ отмечалась активация синтетических процессов в эндотелиоцитах с синтезом экстрацеллюлярного матрикса с последующим его транспортом посредством большого количества везикул в экстрацеллюлярное пространство. Также отмечалось наличие в исследуемых срезах вен молодых эндотелиальных клеток, что говорит о создании благоприятных условий препарата МОФФ для эндотелизации венозной стенки.

В ходе проведенного исследования отмечено заметное влияние тромботического процесса на ФСЭ и морфологическую структуру венозной стенки. Выявлены положительные свойства препарата МОФФ по влиянию на процессы ПОЛ, функционирование АОС и явления воспаления при экспериментальном венозном тромбозе. При L-NAME-индуцированной ЭД исследуемый препарат способствовал регрессу ультраструктурных изменений венозной стенки, что является своего рода превентивной мерой в процессе формирования патологических состояний венозной системы, в том числе тромбоза.

ВЫВОДЫ

1. Используемые в работе экспериментальные модели характеризуются функциональными сдвигами в эндотелии, увеличением интенсивности процессов ПОЛ, органическими нарушениями сосудистой стенки, что позволяет говорить об их применимости для воспроизведения венозной эндотелиальной дисфункции *in vivo*.
2. Во всех экспериментальных группах выявлена интенсификация ПОЛ и компенсаторная активация ферментов АОС, что говорит о нарушении физиологического равновесия между данными процессами и формировании благоприятных условий для повреждения эндотелия и нарушения его функционального состояния, что проявляется дефицитом метаболитов оксида азота (II).
3. Во всех экспериментальных группах животных выявлены структурные изменения венозной стенки различной степени, что позволяет говорить о стойкости воспроизводимых нарушений функционального состояния эндотелия.
4. Микронизированная очищенная флавоноидная фракция диосмина обладает выраженным влиянием на эндотелий, проявляющемся в усилении секреции оксида азота (II), снижении образования продуктов перекисного окисления липидов и уменьшении дегенеративно-дисстрофических изменений венозной стенки, что открывает новые перспективы его применения.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антитромбогенная активность липовертина на модели венозного тромбоза у крыс [Текст] / И.С. Иванов [и др.] // Фармакология. – 2010. – Т.11, № 2. – С. 590-595.
2. Белоусов, Ю.В. Эндотелиальная дисфункция как причина атеросклеротического поражения артерий при артериальной гипертензии: методы коррекции [Текст] / Ю.В. Белоусов, Ж.Н. Намсараев // Фарматека. – 2006. – №6. – С.12–15.
3. Биофлавоноиды и их значение в ангиологии. Фокус на диосмин [Текст] / В.Ю. Богачев [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2013. – Т. 19, № 1. – С. 73-80.
4. Богачев, В.Ю. Новые данные о хронической венозной недостаточности [Текст] / В.Ю. Богачев // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2000. – Т. 8, № 2. – С. 119-122.
5. Веденский, А.Н. Посттромботическая болезнь [Текст] / А.Н. Веденский. – Л.: Медицина, 1986. – 240 с. : ил.
6. Гланц, С. Медико-биологическая статистика: пер. с англ. [Текст] / С. Гланц; под ред. Н.Е. Бузикашвили, Д.В. Самойлова. – М.: Практика, 1999. – 459 с.: ил.
7. Граник, В.Г. Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств [Текст] / В.Г. Граник, Н.Б. Григорьев. – М.: Вузовская книга, 2004. – 360 с.: ил.
8. Диагностическая ценность определения десквамированных клеток крови [Текст] / Н.Н. Петрищев [и др.] / Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – № 1. – С. 50-52.
9. Дисфункция эндотелия как одна из возможных причин возникновения и прогрессирования хронической венозной недостаточности нижних конечностей [Текст] / Ю.М. Стойко [и др.] // Вестн. хирургии им. Грекова. – 2004. – Т. 163, № 2. – С. 122-127.
10. Дисфункция эндотелия при острой и хронической венозной недостаточности [Текст] / Ю.С. Небылицин [и др.] // Новости хирургии. –

2008. – Т. 16, № 4. – С. 141-153.

11. Дисфункция эндотелия у больных хронической венозной недостаточностью нижних конечностей и возможности её коррекции [Текст] / Ю.М. Стойко [и др.] // Новости хирургии. – 2010. – Т. 18, № 4. – С. 57-64.
12. Затейщикова, А.А. Эндотелиальная регуляция сосудистого тонуса: методы исследования и клиническое значение [Текст] / А.А. Затейщикова, Д.А. Затейщиков // Кардиология . – 1998. – № 9. – С. 68-80.
13. Киричук, В.Ф. Дисфункция эндотелия [Текст] / В.Ф. Киричук, А.И. Глыбочко. – Саратов: Изд-во СГМУ, 2008. – 110 с.
14. Колобова, О.И. Биохимические основы дисфункции эндотелия при варикозной болезни [Текст] / О.И. Колобова, С.А. Трянкина, И.В. Минаков // Третий Междунар. хирургич. конгресс. – М., 2008. – С. 205.
15. Концентрация стабильных продуктов деградации NO и число циркулирующих эндотелиоцитов как дополнительный диагностический критерий для оценки тяжести венозной патологии [Текст] / С.А. Сушков [и др.] // Материалы III Междунар. науч. – практ. конф. «Дисфункция эндотелия».– Витебск. – 2004. – С. 247-251.
16. Коробейникова, Э.Н. Модификация определения продуктов перекисного окисления липидов в реакции с тиобарбитуровой кислотой [Текст] / Э.Н. Коробейникова // Лабораторное дело. – 1989. – № 2. – С. 8-9.
17. Костюк, В.А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина [Текст] / В.А. Костюк, А.И. Потапович, Ж.В. Ковалёва // Вопросы медицинской химии. – 1990. – Т. 36, № 2. – С. 88-91.
18. Кузин, М.И. Раны и раневая инфекция [Текст] / М.И. Кузин, Б.М. Костюченко. – М.: Медицина, 1990. – 591 с.: ил.
19. Ланкин, В.З. Ингибирование перекисления липидов и детоксикация липоперекисей защитными ферментативными системами (супероксиддисмутаза, глутатион-пероксидаза, глутатион-редуктаза) при

- экспериментальном злокачественном росте [Текст] / В.З. Ланкин, С.М. Гуревич // ДАН СССР. – 1976. – Т.226, №3. – С. 705-708.
20. Ланкин, В.З. Свободнорадикальные процессы в норме и при патологических состояниях: пособие для врачей / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, Ю.Н. Беленков; НИИ кардиологии им. А.Л. Мясникова РКНПК МЗ РФ. – 2-е изд., испр. и доп. – М., 2001. – 78 с.
 21. Лечение острого варикотромбофлебита нижних конечностей ударными дозами микронизированного диосмина [Текст] / А. Ю. Крылов [и др.] // Флебология. – 2010. – Т. 4, № 2. – С. 141-142. – (Прил. к журн.: Материалы VIII науч. – практ. конф. Ассоциации флебологов России с Междунар. участием).
 22. Малкоч, А.В. Физиологическая роль оксида азота (Часть I) [Текст] / А.В. Малкоч, В.Г. Майданник, Э.Г. Курбатова // Нефрология и гемодиализ. – 2000. – Т. 2, №1-2. – С. 27-30.
 23. Малышев, И.Ю. Стресс, адаптация и оксид азота [Текст] / И.Ю. Малышев, Е.Б. Манухина // Биохимия. – 1998. – Т. 63, №7. – С. 992-1006.
 24. Маркауцан, П.В. Изменение интимы вены при замедлении кровотока в эксперименте [Текст] / П.В. Маркауцан, А.А. Баешко, Л.И. Арчакова // Новости хирургии. – 2007. – Т. 15, №4. – С. 42-47.
 25. Марков, Х.М. Молекулярные механизмы дисфункции сосудистого эндотелия [Текст] / Х.М. Марков // Кардиология. – 2005. – №12. – С. 62-72.
 26. Марков, Х.М. О биорегуляторной системе L-аргинин – оксид азота [Текст] / Х.М. Марков // Патологическая физиология. – 1996. – №1. – С. 34-39.
 27. Медикаментозная коррекция негативных флеботропных эффектов гормонозаместительной терапии у женщин [Текст] / Ю.Т. Цуканов [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2009. – Т.15, № 3. – С. 87-91.
 28. Метельская, В.А. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке [Текст] / В.А. Метельская, Н.Г. Гуманова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. – № 6. – С. 15-18.
 29. Моделирование заболеваний [Текст] / под ред. С.В. Андреева. – М. :

Медицина, 1973. – 336 с.: ил.

30. Молекулярные механизмы эндотелиальной дисфункции при венозном тромбозе: современные представления и перспективы дальнейшего изучения (обзор литературы) [Текст] / А.П. Полякова [и др.] // Трансфузиология. – 2011. – Т.12. – С. 1248-1265.
31. Небылицин, Ю.С. Дисфункция эндотелия и её коррекция у пациентов с острым тромбозом глубоких вен нижних конечностей / Ю.С. Небылицин, С.А. Сушков // Флебология. – 2010. – Т. 4, № 2. – С. 135-136. – (Прил. к журн.: Материалы VIII науч. – практ. конф. Ассоциации флебологов России с Междунар. участием).
32. Небылицин, Ю.С. Дисфункция эндотелия при экспериментальном моделировании острой венозной недостаточности [Текст] / Ю.С. Небылицин, С.А. Сушков, А.П. Солодков // Вестник ВГМУ. – 2007. – Т. 6, №2. – С. 1-15.
33. Небылицин, Ю.С. Коррекция окислительного и нитрозилирующего стресса у пациентов с тромбозом глубоких вен нижних конечностей [Текст] / Ю.С. Небылицин, С.А. Сушков, А.П. Солодков // Новости хирургии. – 2010. – Т.18, №1. – С. 52-60.
34. Небылицин, Ю.С. Показатели окислительного стресса и циркулирующих эндотелиоцитов в разные стадии тромбоза глубоких вен нижних конечностей [Текст] / Ю.С. Небылицин, С.А. Сушков, А.П. Солодков // Новости хирургии. – 2007. – №2. – С. 24-31.
35. Недоспаев, А.А. Биогенный NO в конкурентных отношениях [Текст] / А.А. Недоспаев // Биохимия. – 1998. – Т.63, №7. – С. 881-904.
36. Ноздрачёв, А. Д. Анатомия крысы (лабораторные животные) : учеб. пособие [Текст] / А. Д. Ноздрачёв, Е. Л. Поляков; под общ. ред. А.Д. Ноздрачёва. – СПб.: Лань, 2001. – 464 с.: ил.
37. Петрищев, Н.Н. Дисфункция эндотелия. Патогенетическое значение и методы коррекции [Текст] / Н.Н. Петрищев; под ред. Н.Н. Петрищева. – СПб.: ИИЦ ВМА, 2007. – 296 с.: ил.

38. Покровский, А.В. Хроническая венозная недостаточность нижних конечностей, современные проблемы диагностики, классификации, лечения [Текст] / А.В. Покровский, С.В. Сапелкин // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2003. – Т.9, №1. – С. 53-58.
39. Реутов, В.П. NO-синтазная и нитритредуктазная компоненты цикла оксида азота [Текст] / В.П. Реутов, Е.Г. Сорокина // Биохимия. – 1998. – Т.63, №7. – С. 1029-1040.
40. Российские клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике венозных тромбозмболических осложнений // Флебология. – 2010. – Т.4, №2 (Прил. 1). – с. 2-37.
41. Смертность от болезней системы кровообращения в России и в экономически развитых странах. Необходимость усиления кардиологической службы и модернизации медицинской статистики в Российской Федерации [Текст] / В.И. Харченко [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2005. – №2. – С. 5-18.
42. Современный взгляд на патогенез хронических заболеваний вен нижних конечностей с позиции эндотелиальной дисфункции / Ю.Л. Шевченко [и др.] // Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова. – 2011. – Т.6, № 1. – С. 24-27.
43. Стойко, Ю.М. Клиническая значимость факторов риска хронической венозной недостаточности нижних конечностей и возможности консервативной терапии [Текст] / Ю.М. Стойко // Болезни сердца и сосудов. – 2006. – №4. – С. 64-68.
44. Структурные изменения сосудистой стенки при экспериментальном моделировании венозного тромбоза [Текст] / Ю.С. Небылицин [и др.] // Медицинский журнал. – 2007. – №4. – С. 82–86.
45. Ультраструктура клеток венозной стенки больных острым тромбозом [Текст] / В.А. Прасол [и др.] // Международный медицинский журнал. – 2011. – №1. – С. 90-94.
46. Флебология: руководство для врачей [Текст] / В.С. Савельев [и др.]; под

ред. В.С. Савельева. – М.: Медицина, 2001. – 664 с.: ил.

47. Фотоколориметрический метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови [Текст] / Р.Е. Калинин [и др.] // Астраханский мед. журн. – 2010. – Т.5, №1 (Прил.) – С. 188-189. – (Прил. к журн.: Материалы 7-й Междунар. науч. - практ. конф. «Достижения фундаментальных наук в решении актуальных проблем медицины» (Астрахань, 2010)).
48. Шалимов, С.А. Руководство по экспериментальной хирургии [Текст] / С.А. Шалимов, А.П. Радзиховский, Л.В. Кейсевич. – М.: Медицина, 1989. – 272 с.: ил.
49. Шляхто, Е.В. Клеточные и молекулярно-генетические аспекты эндотелиальной дисфункции [Текст] / Е.В. Шляхто, О.А. Беркович, О.М. Моисеева // Вестник РАМН. – 2010. – №10. – С. 50-52.
50. Экспериментальные модели венозного тромбоза и возможность применения клеточных технологий для коррекции тромботических состояний [Текст] / И.В. Кузнецова [и др.] // Флебология. – 2012. – №1. – С. 43-47.
51. Эндотелиальная дисфункция в патогенезе венозной трансформации [Текст] / Ю.Л. Шевченко [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2008. – Т.14, №1. – С. 15-20.
52. Эндотелий: функция и дисфункция [Текст] / З.А. Лупинская [и др.]. – Б.: Изд-во КРСУ, 2008. – 373 с.: ил.
53. Эффективность микронизированной флавоноидной фракции диосмина с геспередином у больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей [Текст] / О.Д. Наставшева [и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2013. – Т.19, №2 – С. 274-276. – (Прил. к журн.: Материалы XXVIII Междунар. конф. «Новые направления и отдаленные результаты открытых и эндоваскулярных вмешательств в лечении сосудистых больных» (Новосибирск, 2013)).
54. (–) – epicatechin activation of endothelial cell endothelial nitric oxide synthase, nitric oxide, and related signalling pathways [Text] / I. Ramirez-Sanchez [et al.]

// Hypertension. – 2010. – Vol. 55, issue 6. – P. 1398-1405.

55. A color Doppler ultrasound study of venous reflux in patients with chronic leg ulcer [Text] / M.B. Magnusson [et al.] // Eur. J. Endovasc. Surg. – 2001. – Vol.21, №4. – P. 353-360.
56. A prospective study of the incidence of deep-vein thrombosis within a defined urban population [Text] / M. Nordstrom [et al.] // J. Int. Med. – 1992. – Vol.232, №2. – P. 155-160.
57. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension [Text] / J.A. Panza [et al.] // N. Engl. J. Med. – 1990. – Vol.323, №1. – P. 22-27.
58. ACE-inhibition with quinapril modulates the nitric oxide pathway in normotensive rats [Text] / T. Bachetti [et al.] // J. Mol. Cell Cardiol. – 2001. – Vol.33, issue 3. – P. 395-403.
59. Acute administration of nicotine impairs the hypotensive responses to bradykinin in rats [Text] / M.O. Paganelli [et al.] // Eur. J. Pharmacol. – 2001. – Vol.413, №2-3. – P. 241-246.
60. Acute consumption of flavanol-rich cocoa and the reversal of endothelial dysfunction in smokers [Text] / C. Heiss [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. – 2005. – Vol.46, №7. – P. 1276-1283.
61. Ageno, W. Venous thromboembolism and arterial thromboembolism. Many similarities, far beyond per se [Text] / W. Ageno, F. Dentali // Thromb. Haemost. – 2008. – Vol.100 (Suppl. 2). – P. 181-183.
62. An association between atherosclerosis and venous thrombosis [Text] / P. Prandoni [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2003. – Vol.348, №15. – P. 1435-1441.
63. Andrew, P.J. Enzymatic function of nitric oxide synthases [Text] / P.J. Andrew, B. Mayer // Cardiovascular research. – 1999. – Vol. 43, №3. – P. 521-531.
64. Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke prone SHR [Text] / X. Chen [et al.] // Hypertension. – 2001. – Vol.38, №1. – P.606-611.
65. Antioxidant gene therapy for cardiovascular disease: current status and future

- perspectives [Text] / A. Levonen [et al.] // *Circulation*. – 2008. – Vol.117, №16. – P. 2142-2150.
66. Association of peripheral venous disease with arterial endothelial dysfunction: a proof-of-concept study [Text] / L. Moro [et al.] // *Phlebology*. – 2013. – Vol.28, № 7. – P. 366-368.
67. Atherogenic lipids and endothelial dysfunction: mechanisms in the genesis of ischemic syndromes [Text] / M.A. Adams [et al.] // *Ann. Rev. Med.* – 2000. – Vol.51. – P. 149-167.
68. Bergan, J.J. Chronic venous insufficiency and the therapeutic effects of Daflon 500 mg [Text] / J.J. Bergan // *Angiology*. – 2005. – Vol.56 (Suppl. 1). – P. 21-24.
69. Bergan, J.J. Therapeutic approach to chronic venous insufficiency and its complications: place of Daflon 500 mg [Text] / J.J. Bergan, Geert W. Schmid-Schönbein, S. Takase // *Angiology*. – 2001. – Vol.52 (Suppl. 1). – P. 43-47.
70. Boger, R.H. Is asymmetric dimethylarginine a novel marker of atherosclerosis? [Text] / R.H. Boger, S. M. Bode-Boger // *Circulation*. – 2000. – Vol.101, issue 14. – P. 160-161.
71. Boulanger, C.M. Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure [Text] / C.M. Boulanger // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 1999. – Vol.31, issue 1. – P. 39-49.
72. Bouskela, E. Effects of oral administration of purified micronized flavonoid fraction on increased microvascular permeability induced by various agents and on ischemia/reperfusion in the hamster cheek pouch [Text] / E. Bouskela, K.A. Donyo // *Angiology*. – 1997. – Vol.48, №5. – P.391-399.
73. Capillary filtration and ankle edema in patients with venous hypertension: effects of Daflon [Text] / M.R. Cesarone [et al.] // *Angiology*. – 1993. – Vol.44, №1. – P. 57-61.
74. Carpentier, P.H. Role of leukocytes in the pathogenesis of trophic venous disorders [Text] / P.H. Carpentier // *J. Mal. Vasc.* – 1998. – Vol.23, №4. – P. 274-276.

75. Cellular glutathione peroxidase deficiency and endothelial dysfunction [Text] / M.A. Forgione [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2002. – Vol.282, issue 4. – P. H1255-H1261.
76. Chen, G.L. Effect and mechanism of total saponin of dioscorea on animal experimental hyperuricemia [Text] / G.L. Chen, W. Wei and S.Y. Xu // *Am. J. Chin. Med.* – 2006. – Vol.34, №1. – P. 77-85.
77. Choosing the appropriate antithrombotic agent for the prevention and treatment of VTE: a case-based approach [Text] / E. A. Nutescu [et al.] // *Ann. Pharmacother.* – 2006. – Vol.40, issue 9. – P. 1558-1571.
78. Chronic venous disease [Text] / J.J. Bergan [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2006. – Vol.355, №5. – P.488-498.
79. Clinical haemorheology and microcirculation [Text] / L. Mannini [et al.] // *Ann. Ist. Super Sanita.* – 2007. – Vol.43, №2. – P. 144-155.
80. Clinical and hemodynamic outcomes in patients with chronic venous insufficiency after oral micronized flavonoid therapy [Text] / A.C.W. Ting [et al.] // *Vascular surgery.* – 2001. – Vol.35, №6. – P.443-447.
81. Cocoa and cardiovascular health [Text] / R. Corti [et al.] // *Circulation.* – 2009. – Vol.119, issue 10. – P. 1433-1441.
82. Comparison of antioxidant enzyme activity in the internal spermatic vein and brachial veins of patients with infertile varicocele [Text] / E. Ozbek [et al.] // *International Urology and Nephrology.* – 2008. – Vol.40, issue 3. – P. 679-683.
83. Comparison of the antioxidant effects of Concord grape juice flavonoids and α -tocopherol on markers of oxidative stress in healthy adults [Text] / D.J. O'Byrne [et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2002. – Vol.76, №6. – P. 1367-1374.
84. Coleridge-Smith, P.D. From skin disorders to venous leg ulcers: pathophysiology and efficacy of Daflon 500 mg in ulcer healing [Text] / P.D. Coleridge Smith // *Angiology.* – 2003. – Vol.54 (Suppl. 1). – P.45-50.
85. Coleridge-Smith, P.D. Venous ulcer: a meta-analysis of adjunctive therapy with micronized purified flavonoids fraction [Text] / P. Coleridge-Smith, C. Lok, A.A. Ramelet // *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* – 2005. – Vol.30, №2. – P.198-208.

86. Coombes, R. Venous thromboembolism caused 25000 deaths a year, say MPs [Text] / R. Coombes // *BMJ*. – 2005. – Vol. 330, №7491. – P. 559.
87. Correlations between endothelial dysfunction and glycaemia in venous thrombosis pathogenesis [Text] / C. Bădescu [et al.] // *Ann. of RSCB*. – 2012. – Vol.17, issue 1. – P. 143-148.
88. Development of an experimental model of prethrombosis in rats based on Wessler's principle using a calibrated venous stasis [Text] / P. Pottier [et al.] // *Blood Coagul. Fibrinolysis*. – 2003. – Vol.14, №1. – P. 3-9.
89. Diosmin protects against ethanol-induced hepatic injury via alleviation of inflammation and regulation of TNF- α and NF-kB activation [Text] / M. Tahir [et al.] // *Alcohol*. – 2013. – Vol.47, №2. – P. 131-139.
90. Diosmin protects rat retina from ischemia/reperfusion injury [Text] / N. Tong [et al.] // *Journal of ocular pharmacology and therapeutics*. – 2012. – Vol. 28, №5. – P. 459-466.
91. Drexler, H. Nitric oxide and coronary endothelial dysfunction in humans [Text] / H. Drexler // *Cardiovasc. Res*. – 1999. – Vol. 43, issue 3. – P. 572-579.
92. Effects of Bulgaria red and white wines on primary hemostasis and experimental thrombosis in rats [Text] / T. Wollny [et al.] // *Pol. J. Pharmacol*. – 2003. – Vol.55, №6. – P. 1089-1096.
93. Effect of long-term treatment with purified micronized flavonoid fraction on pancreatic mononuclear cell infiltration in diabetic BB rats [Text] / R. Guillot [et al.] // *Pancreas*. – 1998. – Vol.17, №3. – P. 301-308.
94. Effect of oral micronized purified flavonoid fraction treatment on leukocyte adhesion molecule expression in patients with chronic venous insufficiency: a pilot study [Text] / S.S. Shoab [et al.] // *J. Vasc. Surg*. – 2000. – Vol.31, №3. – P. 456-461.
95. Effects of purified micronized flavonoid fraction (Detralex[®]) on prophylactic treatment of adjuvant arthritis with methotrexate in rats [Text] / J. Rovenský [et al.] // *Issues in rheumatology and autoimmunity*. – 2008. – Vol.10, №5. – P. 377-380.

96. Effects of selenium on the vessel walls and anti-elastin antibodies in spontaneously hypertensive rats [Text] / B. Ruseva [et al.] // *Experimental Biology and Medicine*. – 2012. – Vol.237, №2. – P. 160-166.
97. Effects of topical nitroglycerin and flurbiprofen in the rat comb burn model [Text] / P.J. Gorman [et al.] // *Ann. Plast. Surg.* – 1999. – Vol.42, №5. – P. 529-532.
98. Endermann, H.D. Endothelial dysfunction [Text] / H.D. Endermann, E.L. Schiffrin // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2004. – Vol.15, №8. – P. 1983-1992.
99. Endothelial dysfunction, atherosclerosis and thrombosis in uremia – possibilities of intervention [Text] / M. Myśliviec [et al.] // *Ann. Acad. Medicae Bialostocensis*. – 2004. – Vol.49. – P. 151-156.
100. Endothelial dysfunction, oxidative stress and risk of cardiovascular events in patients with coronary disease [Text] / T. Heitzer [et al.] // *Circulation*. – 2001. – Vol.104, issue 22. – P. 2673–2678.
101. Endothelial dysfunction and hypertension in 5/6 nephrectomized rats are mediated by vascular superoxide [Text] / G. Hasdan [et al.] // *Kidney Int.* – 2002. – Vol.61, №2. – P. 586-590.
102. Endothelial dysfunction and reduced antioxidant protection in an animal model of the developmental origins of cardiovascular disease [Text] / J.L. Rodford [et al.] // *J. Physiol.* – 2008. – Vol.586, №19. – P. 4709-4720.
103. Endothelial dysfunction in patients with spontaneous venous thromboembolism [Text] / R. Migliacci [et al.] // *Haematologica*. – 2007. – Vol.92, №6. – P. 812-818.
104. Endothelial dysfunction in venous pulmonary hypertension in the neonatal piglet [Text] / A. Serraf [et al.] // *Ann. Thoracic Surg.* – 1995. – Vol.59, issue 5. – P.1155-1161.
105. Endothelial function and hemostasis [Text] / B.F. Becker [et al.] // *Z. Kardiol.* – 2000. – Vol.89, №3. – P.160-167.
106. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension [Text] / Y. Higashi [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2002. – Vol.346, №25. – P. 1954-1962.

107. Endothelial function impairment in chronic venous insufficiency: effect of some cardiovascular protectant agents [Text] / F.O. Carrasco [et al.] // *Angiology*. – 2009. – Vol.60, №6. – P. 763-771.
108. Endothelial function in coronary arterioles from pigs with early-stage coronary disease induced by high fat, high-cholesterol-diet: effect of exercise [Text] / K.K. Henderson [et al.] // *J. Applied Physiol.* – 2004. – Vol.97, issue 3. – P. 1159-1168.
109. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of wine and other grape products [Text] / D.F. Fitzpatrick [et al.] // *Am. J. Physiol.* – 1993. – Vol.265, №2. – P. H774-H778.
110. Enhanced nitric oxide inactivation and protein nitration by reactive oxygen species in renal insufficiency [Text] / N.D. Vaziri [et al.] // *Hypertension*. – 2002. – Vol.39, №1. – P. 135-141.
111. Epidemiology of chronic venous disorders in geographically diverse populations: results from the Vein Consult Program [Text] / E. Rabe [et al.] // *International Angiology*. – 2012. – Vol.31, №2. – P. 105-115.
112. Experimental models for vascular endothelial dysfunction [Text] / B. Pitchai [et al.] // *Trends in Medical Research*. – 2007. – Vol.2, issue 1. – P. 12-20.
113. Experimental preretinal neovascularization by laser-induced venous thrombosis in rats [Text] / Y. Saito [et al.] // *Curr. Eye Res.* – 1997. – Vol.16, №1. – P. 26-33.
114. 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 [Text] / M. Perchen [et al.] // *Acta Dermato-Venerologica*. – 1999. – Vol.79, №1. – P. 27-32.
115. Ferri, C. Antioxidants and beneficial microvascular effects: is this the remedy? [Text] / C. Ferri, D. Grassi // *Hypertension*. – 2010. – Vol.55, issue 6. – P. 1310-1311.
116. Fibrinogen as a factor of thrombosis: experimental study [Text] / F. Doutremepuich [et al.] // *Am. J. Chin. Med.* – 1998. – Vol.90, №2. – P. 57-64.

117. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants [Text] / C. Yuting [et al.] // *Free Radical Biol. & Med.* – 1990. – Vol.9, №1. – P. 19-21.
118. Genetic polymorphisms in folate and homocysteine metabolism as risk factors for DNA damage [Text] / N. Botto [et al.] // *Eur. J. Hum. Genet.* – 2003. – Vol.11, №9. – P. 671-678.
119. Glutathione peroxidase-1 deficiency potentiates dysregulatory modifications of endothelial nitric oxide synthase and vascular dysfunction [Text] / M. Oelze [et al.] // *Hypertension.* – 2014. – Vol.63, issue 2. – P. 390-396.
120. Grape juice causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of eNOS [Text] / E. Anselm [et al.] // *Cardiovascular Research.* – 2007. – Vol.73, №2. – P. 404-413.
121. Gresele, P. Endothelium, venous thromboembolism and ischaemic cardiovascular events [Text] / P. Gresele, S. Momi, R. Migliacci // *Thromb. Haemost.* – 2010. – Vol.103, №1. – P. 56-61.
122. Griffith, O.M. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanisms [Text] / O.M. Griffith, D.J. Stuehr // *Ann. Rev. Physiol.* – 1995. – Vol.57. – P.707-736.
123. Heiss, C. Flavanols and cardiovascular disease prevention [Text] / C. Heiss, C.L. Keen, M. Kelm // *Eur. Heart J.* – 2010. – Vol.31, №21. – P. 2583-2592.
124. Heit, J.A. Venous thromboembolism: disease burden, outcomes and risk factors [Text] / J.A. Heit // *J. Thromb. Haemost.* – 2005. – Vol.3, №8. – P. 1611-1617.
125. Herbert J.M. Importance of platelets in experimental venous thrombosis in the rat [Text] / J.M. Herbert, A. Bernat, J.P. Maffron // *Blood.* – 1992. – Vol.80, №9. – P. 2281-2286.
126. High methionine and cholesterol diet abolishes endothelial relaxation [Text] / A. Zulli [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2003. – Vol.23, issue 8. – P. 1358-1363.
127. Hladovec, J. Circulating endothelial cells as a sign of vessels wall lesions [Text] / J. Hladovec // *Physiologia bohemoslovaca.* – 1978. – Vol.27, №2. – P.140-144.
128. Holst, A.G. Risk factors for venous thromboembolism: results from the

- Copenhagen city heart study [Text] / A.G. Holst, G. Jensen, E. Prescott // *Circulation*. – 2010. – Vol.121, issue 17. – P.1896-1903.
129. HR, 0-(beta-hydroxyethyl)-rutosides, in comparison with diosmin+hesperidin in chronic venous insufficiency and venous microangiopathy: an independent, prospective, comparative registry study [Text] / M.R. Cesarone [et al.] // *Angiology*. – 2005. – Vol.56, №1. – P. 1-8.
130. Idiopathic deep venous thrombosis and arterial endothelial dysfunction in the elderly [Text] / G. Mazzocchi [et al.] // *AGE*. – 2012. – Vol.34, issue 3. – P. 751-760.
131. Impaired endothelium-dependent relaxation by adrenomedullin in monocrotaline-treated rat arteries [Text] / B. Gout [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 1999. – Vol.380, issue 1. – P. 23- 30.
132. Improvement of cutaneous microcirculation and oxygen supply in patients with chronic venous insufficiency by orally administered extract of red wine leaves AS 195: a randomised, double-blind, placebo-controlled, crossover study [Text] / U. Kalus [et al.] // *Drugs R&D*. – 2004. – Vol.5, №2. – P.63-71.
133. Improvement of endothelial function with dietary flavanols is associated with mobilization of circulating angiogenic cells in patients with coronary artery disease [Text] / C. Heiss [et al.] // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2010. – Vol.56, №3. – P. 218-224.
134. Incidence of venous thromboembolism in hospitalized patients vs community residents [Text] / J.A. Heit [et al.] // *Mayo Clinic Proceedings*. – 2001. – Vol.76, №11. – P. 1102-1110.
135. Inferior vena cava ligation rapidly induces tissue factor expression and venous thrombosis in rats [Text] / J. Zhou [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2009. – Vol.29, №6. – P. 863-869.
136. Intake of red wine increases the number and functional capacity of circulating endothelial progenitor cells by enhancing nitric oxide bioavailability [Text] / P.H. Huang [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2010. – Vol.30, №4. – P. 869-877.

137. Isoforms of nitric oxide synthase: characterization and purification from different cell types [Text] / U. Forstermann [et al.] // *Biochem. Pharmacol.* – 1991. – Vol.42, issue 10. – P. 1849-1857.
138. Jerjes-Sanchez, C. Venous and arterial thrombosis: a continuous spectrum of the same disease? [Text] / C. Jerjes-Sanchez // *Eur. Heart J.* – 2005. – Vol.26, №1. – P. 3-4.
139. Kahn, S.R. Relationship between deep venous thrombosis and the postthrombotic syndrome [Text] / S.R. Kahl, J. S. Grinsberg // *Arch. Int. Med.* – 2004. – Vol.164, №1. – P. 17-26.
140. Kumagi, Y. Molecular basis for arsenic induced alteration in nitric oxide production and oxidative stress. Implication of endothelial dysfunction [Text] / Y. Kumagi, J. Pi // *Toxicol. Applied Pharmacol.* – 2004. – Vol.198, issue 3. – P. 450-457.
141. L-NAME hypertension alters endothelial and smooth muscle function in rat aorta [Text] / C.F. Kung [et al.] // *Hypertension.* – 1995. – Vol.26, issue 5. – P. 744-751.
142. Labrid, M. Pharmacologic properties of Daflon 500 mg [Text] / M.Labrid // *Angiology.* – 1994. – Vol.45, №6. – P. 524-530.
143. Lavi, S. The interaction between coronary endothelial dysfunction, local oxidative stress, and endogenous nitric oxide in humans [Text] / S. Lavi // *Hypertension.* – 2008. – Vol.51, issue 1. – P. 127-133.
144. Lilienfeld, D. E. Decreasing mortality from pulmonary embolism in the united, 1979-1996 [Text] / D. E. Lilienfeld // *Int. J. Epidemiol.* – 2000. – №29. – P. 465-469.
145. Lindblad, B. Incidence of venous thromboembolism verified by necropsy over 30 years [Text] / B. Lindblad, N.H. Strnby, D. Berqvist // *BMJ.* – 1991. – Vol.302, issue 6778. – P. 709-711.
146. Lip, G.Y. Does hypertension confer a prothrombotic state? : Virchow's triad revisited [Text] / G.Y. Lip, A.D. Blann // *Circulation.* – 2000. – Vol.101, №3. – P. 218-220.

147. Lucher, T.F. Biology of the endothelium [Text] / T.F. Lucher, M. Barton // Clin. Cardiol. – 1997. – Vol.10 (Suppl. 1). –P. 3-10.
148. Lyseng-Williamson, K.A. Micronised purified flavonoid fraction [Text] / K.A.Lyseng-Williamson, C.M. Perry // Drugs. – 2003. – Vol.63, issue 1. – P. 71-100.
149. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate [Text] / M.A. Marletta [et al.] // Biochemistry. – 1988. – Vol.27, issue 24. – P. 8706-8711.
150. Manuel y Keenoy, B. The effect of flavonoid treatment on the glycation and antioxidant status in Type 1 diabetic patients[Text] / B. Manuely Keenoy,J. Vertommen, I. DeLeeuw// Diabetes, nutrition and metabolism. – 1999. – Vol.12, №4. – P. 256-263.
151. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction induced by fasting hyperhomocystinemia in normotensive subjects and patients with essential hypertension [Text] / A. Viridis [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. – 2001. – Vol.38, №4. – P. 1106-1115.
152. Methods in enzymology. Volume 301: Nitric oxide. Part C: Biological and antioxidant activities [Text] / ed.: L. Packer. – San Diego (USA): Academic Press, 1999. – 591 p.
153. Michel, T. Nitric oxide synthases: which, where, how and why [Text] / T. Michel, O. Feron // J. Clin. Invest. – 1997. – Vol.100, №9. – P. 2146-2152.
154. Michiels, C. Endothelial cell responses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions [Text] / C. Michiels, T. Arnould, J. Remacle // Biochimica et Biophysica Acta. – 2000. – Vol.1497, №1. – P. 1-10.
155. Modulation of haemostatic function and prevention of experimental thrombosis by red wine in rats: a role for increased nitric oxide production [Text] / T. Wollny [et al.] // Br. J. Pharmacol. – 1999. – Vol.127, issue 3. – P. 747-755.
156. Mortality from pulmonary embolism in the United States: 1962 to 1984 [Text] / D. E. Lilienfeld [et al.] // Chest. – 1990. – №98. – P. 1067-1072.
157. Millet J. A new experimental model of venous thrombosis in rats involving

- partial stasis and slight endothelium alterations [Text] / J. Millet, J. Theveniaux, M. Pascala // *Thrombosis Res.* – 1987. – Vol.45, issue 2. – P. 123-133.
158. Modulation by flavonoids of PAF and related phospholipids in endothelial cells during oxidative stress [Text] / M.L. Balestrieri [et al.] // *Journal of lipid research.* – 2003. – Vol.44, №2. – P. 380-387.
159. Momboli, J.-V. Endothelial Dysfunction: From Physiology to Therapy [Text] / J.-V. Momboli, P.M. Vanhoutte // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 1999. – Vol.31, №1. – P. 61-74.
160. Moncada, S. XIV International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide [Text] / S. Moncada, A. Higgs, R. Furchgott // *Research Pharmacol. Reviews.* – 1997. – Vol.49, №2. – P. 137-142.
161. Moncada, S. Nitric oxide: physiology, pharmacology pthophysiology [Text] / S. Moncada, R. J. M. Palmer, E. A. Higgs // *Pharmacol. Rev.* – 1991. – Vol.43, №3.– P. 109-142.
162. Moncada, S. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂ and prostacyclin [Text] / S. Moncada, J. P. Vane // *Pharmacol. Rev.* – 1978. – Vol.30, №3. – P. 293-331.
163. Monocytes and tissue factor promote thrombosis in a murine model of oxygen deprivation [Text] / C. A. Lawson [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 1997. – Vol.99, №7. – P. 1729-1738.
164. Mostafa, T. Reactive oxygen species and antioxidants relationship in the internal spermatic vein blood of infertile men with varicocele [Text] / T. Mostafa // *Asian J. Androl.* – 2006. – Vol.8, №4. – P. 451-454.
165. Murad, F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling [Text] / F. Murad // *Biosci. Rep.* – 1999. – Vol.78, issue 3. – P. 133-154.
166. Myocardium calcium-independent nitric oxide synthase activity is present in dilated cardiomyopathy, myocarditis, and postpartum cardiomyopathy, but not in ischaemic or vulvular heart disease [Text] / A.J. De Belder [et al.] // *Br. Heart J.* – 1995. – Vol.74, issue 4. – P. 426-430.

167. Neuroprotective and hepatoprotective effects of micronized purified flavonoid fraction (Daflon®) in lypopolysaccharide-treated rats [Text] / O.M.E. Abdel-Salam [etal.] // Drug discoveries and therapeutics. – 2012. – Vol.6, №6.– P. 306-314.
168. Nicolaides, A.N. Chronic venous disease and the leukocyte-endothelium interaction: from symptoms to ulceration [Text] / A.N. Nicolaides // Angiology. – 2005. – Vol.56 (Suppl. 1). – P. 11-19.
169. Nicolaides, A.N. From symptoms to leg edema: efficacy of Daflon 500 mg [Text] / A.N. Nicolaides // Angiology. – 2003. – Vol.54 (Suppl. 1). – P. 33-44.
170. Nitric oxide [Text] // Methods in enzymology. Part D / eds.: E. Cadenas, L. Packer. – San Diego (USA): Academic Press, 2002. – Vol. 359.- 514 p.
171. Nitric oxide and endothelin in pathophysiological settings [Text] / T.E. Hanley [et al.] // Pediatr. Nephrol. – 1995. – Vol.9, №2. – P. 235-244.
172. Nitric oxide in skeletal muscle / L. Kobzik [et al.] // Nature. – 1994. – Vol.372, №6506. – P. 546 – 548.
173. Nitric oxide synthase enzymes in the airways of mice exposed to ovalbumin: NOS2 expression is NOS3 dependent [Text] / M.J. Bratt [et al.] // Mediators of inflammation. – 2010. – Vol. 56 (Suppl. 1). – P. 21-24.
174. Novel effects of nitric oxide [Text] / K.L. Davis [et al.] // Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2001. – Vol.41. – P. 203-236.
175. Ody, C. Effect of variable glutathione peroxidase activity on H₂O₂-related cytotoxicity in cultured aortic endothelial cells [Text] / C. Ody, F. Junod // Experimental biology and medicine. – 1985. – Vol.180, №1. – P. 103-111.
176. Olszewski, W. Clinical efficacy of micronized purified flavonoid fraction (MPFF) in edema [Text] / W. Olszewski // Angiology. – 2000. – Vol.51, №1. – P. 25-29.
177. One clip, one-kidney hypertension in rats with hereditary hypothalamic diabetes incipidus [Text] / L. Share [et al.] // Clin. Exp. Hypertens. – 1982. – Vol. a4, №8. – P. 1261-1270.

178. Oral administration of purified micronized flavonoid fraction suppresses leukocyte adhesion in ischemia-reperfusion injury: in vivo observations in the hamster skin-fold [Text] / B. Friesenecker [et al.] // *Int. J. Microcirc.* – 1994. – Vol.14, №1-2. – P. 50-55.
179. Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure [Text] / M. Annuk [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2001. – Vol.12, №12. – P.2747-2752.
180. Oxygen-derived free radicals as mediators of varicose vein damage [Text] / R. Farbiszewski [et al.]// *Vasc. Endovascular Surg.* – 1996. – Vol.30, №1. – P. 47-52.
181. Pacher, P. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease [Text] / P. Pacher, J.S. Beckman, L. Liaudet // *Physiol. Rev.* – 2007. – Vol.87, №1. – P. 315-424.
182. Paglia, D.E. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathionperoxidase [Text] / D.E. Paglia, W.N. Valentine // *J. Lab. Clin. Med.* – 1967. – Vol.70, issue 1. – P. 158-169.
183. Palmer, R.M. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor [Text] / R.M. Palmer, A.G. Ferrige, S. Moncada// *Nature.* – 1987. – Vol.327, №6122. – P. 524-526.
184. Perfused human saphenous veins for the study of the origin of varicose veins: role of endothelium and hypoxia [Text] / C. Michiels [et al.] // *Int. Angiol.* – 1997. – Vol.16, №2. – P. 134-141.
185. Preservation of venous endothelial function in the forearm venous capacitance bed of patients with chronic heart failure despite arterial endothelial dysfunction [Text] / A.K. Nightingale [et al.] // *JACC.* – 2001. – Vol.37, №4. – P. 1062-1068.
186. Probucol protects against hypochlorite induced endothelial dysfunction: identification of a novel pathway of probucol oxidation to a biologically active intermediate [Text] / P.K. Witting [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol.280, issue16. – P. 15612-15618.
187. Procoagulant activity in hemostasis and thrombosis: Virchow's triad revisited / A.S. Wolberg [et al.] // *Anesth. Analg.* – 2012. – Vol.114, issue 2. – P. 275-285.

188. Production and storage of nitric oxide in adaptation to hypoxia [Text] / E.B. Manukhina [et al.] // Nitric Oxide: Biol. & Chem. – 1999. – Vol.3, issue 5. – P. 393-401.
189. Protective effect of diosmin against diabetic neuropathy in experimental rats [Text] / D. Jain [et al.] // Journal of integrative medicine. – 2014. – Vol.12, №1. – P.35-41.
190. Protective effects of flavonoids contained in the red vine leaf on venular endothelium against the attack of activated blood components in vivo [Text] / S. Nees [et al.] // Arzneimittel Forschung. – 2003. – Vol.53, №5. – P. 330-341.
191. Ramelet, A.A. Clinical benefits of Daflon 500 mg in the most severe stages of chronic venous insufficiency [Text] / A.A. Ramelet // Angiology. – 2001. – Vol.52 (Suppl. 1). – P. 49-56.
192. Ramelet, A.A. Daflon 500 mg: symptoms and edema: clinical update [Text] / A.A. Ramelet // Angiology. – 2005. – Vol.56 (Suppl. 1). – P. 25-31.
193. Ramelet, A.A. Pharmacologic aspects of a phlebotropic drug in CVI-associated edema [Text] / A.A. Ramelet // Angiology. – 2000. – Vol.51, №1. – P. 19-23.
194. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells [Text] / J.F. Leikert [etal.] // Circulation. – 2002. – Vol.106, issue 13. – P. 1614-1617.
195. Relationship between venous and arterial thrombosis: a review of the literature from a causal perspective [Text] / W.M. Lijfering [et al.] // Seminars in thrombosis and hemostasis. – 2011. – Vol.37, №8. – P. 885-896.
196. Release of EDRF and NO in ex vivo perfused aorta: inhibition by in vivo E. coli endotoxemia [Text] / P.R. Myers [et al.] // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 1995. – Vol.268, issue 2. – P. H955-H961.
197. Regulation of nitric oxide production in limb and ventilator muscles during chronic exercise training [Text] / T. Vassilakopoulos [et al.] // Am. J. Physiol. – 2003. – Vol.284, issue 3. – P. L452-L457.
198. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitricoxide synthase [Text] / T. Wallerath [et al.] // Circulation. – 2002. – Vol.106, issue 13. – P. 1652-1658.
199. Reyers, I. Venostatis-induced thrombosis in rats is not influenced by circulating

- platelet or leukocyte number [Text] / I. Reyers, G. de Gaetono, M.B. Donati // Agents Actions. – 1989. – Vol.28, №1-2. – P. 137-141.
200. Role of coagulation factors in cerebral venous sinus and cerebral microvascular thrombosis [Text] / M. Nagai [et al.] // Neurosurgery. – 2010. – Vol.66, №3. – P. 560-565.
201. Role of promoter polymorphisms in the plasma glutathione peroxidase (GPx-3) gene as a risk factor for cerebral venous thrombosis [Text] / B. Voetsch [et al.] // Stroke. – 2008. – Vol.39, №2. – P. 303-307.
202. Ross, R. Atherosclerosis – an inflammatory disease [Text] / R. Ross // N. Engl. J. Med. – 1999. – Vol.340, №2. – P. 115-126.
203. Ross, R. Cellular and molecular studies of atherogenesis [Text] / R. Ross // Atherosclerosis. – 1997. – Vol.131 (Suppl. 1). – P.3-4.
204. Schiffrin, E.L. A critical review of the role of endothelial factors in the pathogenesis of hypertension [Text] / E.L. Schiffrin // J. Cardiovasc. Pharmacol. – 2001. – Vol.38 (Suppl. 2). – P.3-6.
205. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release [Text] / J.E. Freedman [et al.] // Circulation. – 2001. – Vol.103, №23. – P. 2792-2798.
206. Shah, D.I. Effect of bis-maltolato-oxovanadium on experimental vascular endothelial dysfunction [Text] / D.I. Shah, M. Singh // Naun. Schmied. Arch. Pharmacol. – 2006. – Vol.373, issue 3. – P. 221-229.
207. Shah, D.I. Possible role of Akt to improve vascular endothelial dysfunction in diabetic and hyperhomocysteinemic rats [Text] / D.I. Shah, M. Singh // Mol. Cell. Biochem. – 2007. – Vol.295, №1-2. – P. 65-74.
208. Shaharay, M. Leukocyte activity in the microcirculation of the leg in patients with chronic venous disease [Text] / M. Shaharay // J. Vasc. Surg. – 1997. – Vol.26, №2. – P.265-273.
209. Shimokawa, H. Primary Endothelial Dysfunction: Atherosclerosis [Text] / H. Shimokawa // J. Mol. Cell. Cardiol. – 1999. – Vol.31, №1. – P. 23-37.
210. Silambarasan, T. Diosmin, a bioflavonoid reverses alterations in blood pressure,

- nitric oxide, lipid peroxides and antioxidant status in DOCA-salt induced hypertensive rats [Text] / T. Silambarasan, B. Raja // *Eur. J. Pharmacol.* – 2012. – Vol.679, №1-3. – P. 81-89.
211. Smith, P.C. Daflon 500 mg and venous leg ulcer: new results from a meta-analysis [Text] / P.C. Smith // *Angiology.* – 2005. – Vol.56 (Suppl. 1). – P. 33-39.
212. Socioeconomic impact of chronic venous insufficiency: an underestimated public health problem [Text] / R. van den Oever [et al.] // *Int. Angiol.* – 1998. – Vol.17, №3. – P. 161-167.
213. Standing at work and varicose veins [Text] / F. Tuchsén [et al.] // *Scand. J. Work Environ. Health.* – 2000. – Vol.26, №5. – P. 414-420.
214. Struckmann, J.R. Flavonoids: A review of the pharmacology and therapeutic efficacy of Daflon 500 mg in patients with chronic venous insufficiency and related disorders [Text] / J.R. Struckmann, A.N. Nicolaides // *Angiology.* – 1994. – Vol.45, №6. – P. 419-428.
215. Subramani, S. Ameliorative effect of diosmin, a citrus flavonoid against streptozotocin-nicotinamide generated oxidative stress induced diabetic rats [Text] / S. Subramani, L. Pari // *Chemico-Biological Interactions.* – 2012. – Vol.195, №1. – P. 43-51.
216. Superoxide anions and endothelial cell proliferation in normoglycemia and hyperglycemia [Text] / M. Zanetti [et al.] // *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology.* – 2001. – Vol.21, №2. – P.195-200.
217. Systemic hypoxia promotes leukocyte-endothelial adherence via reactive oxidant generation [Text] / J.G. Wood [et al.] // *J. Appl. Physiol.* – 1999. – Vol.87, №5. – P. 1734-1740.
218. Takase, S. Leukocyte activation in patients with venous insufficiency [Text] / S. Takase, Geert W. Schmid-Schönbein, J.J. Bergan // *J. Vasc. Surg.* – 1999. – Vol.30, №1. – P. 148-156.
219. The antiphospholipid syndrome-association with venous thrombosis and endothelial dysfunction [Text] / A.L. Dumitrascu [et al.] // *Ultraschall in Med.* –

2006. – Vol.27 (Suppl. 1). – P.5-6.
220. The effect of a flavonoid fractions diosmin + hesperidin on radiation-induced acute proctitis in a rat model [Text] / A. Sezer [et al.] // *J. Cancer Res. Ther.* – 2011. – Vol.7, №2. – P. 152-156.
221. The effect of diosmin-hesperidin combination treatment on the lipid profile and oxidative-antioxidative system in high-cholesterol diet-fed rats [Text] / Y. Alptekin [et al.] // *Turkish Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery.* – 2011. – Vol.19, №1. – P. 55-61.
222. The effect of taurolidine on experimental thrombus formation [Text] / L. Kaptanoglu [etal.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 578, №2-3. – P. 238-241.
223. The flavonoids effect against vinblastine, cyclophosphamide and paracetamol toxicity by inhibition of lipid-peroxydation and increasing liver glutathione concentration [Text] / M. Lahouel [et al.] // *Pathologie biologique.* – 2004. – Vol.52, №6. – P. 314-322.
224. The protective effect of diosmin on hepatic ischemia reperfusion injury: an experimental study [Text] / Y. Tanrikulu [et al.] // *Bosn. J. Basic Med. Sci.* – 2013. – Vol.13, №4. – P. 218-224.
225. The phytoestrogen genistein produces acute nitric oxide dependent dilatation of human forearm vasculature with similar potency to 17- β -estradiol [Text] / H.A. Walker [et al.] // *Circulation.* – 2001. – Vol.103, issue 3. – P. 258-262.
226. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL [Text] / H. Esterbauer [et al.] // *Free Radic. Biol. Med.* – 1992. – Vol.13, issue 4. – P. 341-390.
227. The utility of endothelial function as assessed by reactive hyperemia-peripheral arterial tonometry in predicting deep venous thrombosis after orthopedic surgery [Text] / H. Suzuki [et al.] // *JACC.* – 2013. – Vol.61, issue 10. – P. e2092.
228. Umans, J.G. Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure [Text] / J.G. Umans, R. Levi // *Ann. Rev. Physiol.* – 1995. – Vol.57. – P. 771-790.
229. Ungersböck, K. Cerebral blood flow alterations in a rat model of cerebral sinus thrombosis [Text] / K. Ungersböck, A. Heimonn, O. Kempfski // *Stroke.* – 1993.

- Vol.24, №4. – P. 563-569.
230. Veno-active drugs in the management of chronic venous disease. An international consensus statement: current medical position, prospective views and final resolution [Text] / A.A. Ramelet [et al.] // Clin. Hemorheol. Microcirc. – 2005. – Vol.33, №4. – P.309-319.
231. Venous elasticity after treatment with Daflon 500 mg [Text] / V. Ibegbuna [et al.] // Angiology. – 1997. – Vol.48, №1. – P.45-49.
232. Venous endothelial dysfunction potentiates deep venous thrombosis in a mouse model of pneumonia [Text] / A.T. Obi [et al.] // Journal of Surgical Research. – 2014. – Vol.186, issue 2. – P. 513.
233. Violi, F. Synergism among flavonoids in inhibiting platelet aggregation and H₂O₂ production [Text] / F. Violi, P. Pignatelli, F.M. Pulcinelli // Circulation. – 2002. – Vol.105, №8. – P. e53.
234. Vita, J.A. Endothelial function [Text] / J.A. Vita // Circulation. – 2011. – Vol.124, №25. – P. 906-912.
235. Wessler, S. Biological assay of a thrombosis inducing activity in human serum [Text] / S. Wessler, S.M. Reimer, M.C. Sheps // J. Appl. Physiol. – 1959. – Vol.14, №6. – P. 943-946.
236. White, R.H. The epidemiology of venous thromboembolism [Text] / R.H. White // Circulation. – 2003. – Vol.107, issue 23 (Suppl. 1). – P. 4-8.
237. Wolf, G. Nitric oxide and nitric oxide synthase: biology, pathology, localization [Text] / G. Wolf // Histology and Histopathology. – 1997. – №12. – P. 251-261.
238. Wu, J. Inhibition of inducible nitric oxide synthase promotes vein graft neoadventitial inflammation and remodeling [Text] / J. Wu, R.M. Wadsworth, S. Kennedy // J. Vasc. Res. – 2011. – Vol.48, №2. – P. 141-149.
239. Young, J.S. Endothelial dependent and independent responses in the thoracic aorta during endotoxic shock [Text] / J.S. Young, J.P. Headrick, R.M. Berne // Circ. Shock. – 1991. – Vol.35, №1. – P. 25-30.