

Р.Е. КАЛИНИН, И.А. СУЧКОВ, А.Н. НОВИКОВ, А.С. ПШЕННИКОВ

МОДЕЛИРОВАНИЕ И КОРРЕКЦИЯ ВЕНОЗНОЙ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова»,
Российская Федерация

Цель. Оценить различные способы моделирования венозной эндотелиальной дисфункции в эксперименте и изучить возможность ее коррекции путем применения микронизированной очищенной фракции флавоноидов (МОФФ).

Материал и методы. Эксперимент проводился на 105 крысах линии Wistar, которые были разделены на 3 группы: 1-я – модель тромбоза глубоких вен; 2-я – модель посттромботического синдрома; 3-я группа – модель L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции. Микронизированная очищенная фракция флавоноидов применялась в дозе 100 мг/кг/сутки в течение 6 месяцев. В установленные сроки в каждой группе производился забор крови у 7 животных с последующей их эвтаназией. Определялись следующие метаболиты: супероксиддисмутаза (СОД), малоновый диальдегид (МДА) и оксид азота (II) (NO).

Результаты. Во всех группах выявлены достоверное снижение метаболитов оксида азота (II), повышение уровня МДА и, как следствие, компенсаторная активация антиоксидантной системы, проявляющаяся в увеличении уровня СОД. Применение препарата МОФФ вызывало достоверное ($p < 0,05$) увеличение синтеза NO и снижение уровня МДА и СОД во всех группах на протяжении времени эксперимента. Причем изучаемые показатели достигли своих исходных значений к 1 месяцу наблюдения и оставались на этом же уровне на протяжении всего периода исследования. Активность СОД на фоне применения МОФФ снижалась, возможно, вследствие уменьшения содержания продуктов ПОЛ, что является предпосылкой для реализации положительных эффектов NO.

Заключение. Проведенное исследование подтвердило, что воспроизводимые модели позволяют создать в эксперименте необходимые условия для изучения различных заболеваний венозной системы. Применение МОФФ оказывает положительное влияние на функциональное состояние эндотелия, характеризующееся повышением уровня оксида азота (II) и снижением активности процессов свободно-радикального окисления.

Ключевые слова: эндотелиальная дисфункция, микронизированная очищенная фракция флавоноидов, тромбоз, посттромботический синдром

Objectives. To estimate the different ways of the venous endothelial dysfunction modeling in experiment and study its further correction using the micronized purified flavonoid fraction (MPFF).

Methods. The experiment was carried out on 105 Wistar rats divided into 3 groups: the 1st one – the model of deep venous thrombosis, the 2nd – the model of the postthrombotic syndrome and the 3rd group – the model of L-NAME-induced endothelial dysfunction. The micronized purified flavonoid fraction was administered within 6 months in the dosage 100 mg/kg/day. At the scheduled time the blood sampling was performed in 7 animals with their further euthanasia. The following metabolites have been determined: super oxide dismutase (SOD), malone dialdehyde (MDA) and nitric oxide (II) (NO).

Results. In all groups a reliable reduction of metabolites of nitric oxide (II), increasing of MDA level and, as a consequence, compensatory activation of antioxidant system, manifested in the increase of SOD level have been revealed. The authentic decreasing of NO and SOD levels, and increasing of MDA level and as the result a compensatory activity of antioxidant system, manifesting in the increase in the SOD level have been found out in all groups. The administration of the micronized purified fraction of flavonoids has led to the reliable ($p < 0,05$) increasing of NO synthesis and decreasing of MDA and SOD levels in all groups during the experiment. All studied readings had reached their initial levels by the 1st month of the research and remained on these levels within whole period of the experiment. It is likely, that SOD activity on the background of the micronized purified fraction of flavonoids administration decreased due to lipid peroxidation products reduction being a prerequisite for positive effects of NO realization.

Conclusions. The performed research has proved that the reproduced models allow making all requisite conditions for studying different diseases of the venous system in experiment. The administration of the micronized purified fraction of flavonoids makes a positive influence on the endothelium functional state characterizing by the increase of nitric oxide (II) level and reduction of free-radical oxidation.

Keywords: endothelial dysfunction, micronized purified fraction of flavonoids, thrombosis, postthrombotic syndrome

Novosti Khirurgii. 2014 Mar-Apr; Vol 22 (2): 150-154

Modeling and correction of experimental venous endothelial dysfunction

R.E. Kalinin, I.A. Suchkov, A.N. Novikov, A.S. Pshennikov

Введение

Венозные тромбозы являются ведущей причиной смертности и инвалидизации населения в России, Европе и США. В США ежегодно регистрируется примерно 1 млн. случаев тромбоза глубоких вен (ТГВ), 300 тыс. из которых с подтвержденной тромбозом легочной артерии (ТЭЛА) с летальностью до 30% [1]. Посттромботический синдром (ПТС) регистрируется с частотой до 40% [2]. В России ежегодно более 35 млн. человек с хроническими заболеваниями венозной системы нижних конечностей нуждается в специализированной помощи, 1,5 млн. из которых имеют инвалидность, страдая тяжелыми трофическими расстройствами [3].

В настоящее время происходит переосмысление взглядов на механизмы развития патологических состояний венозной системы. В частности, в последние годы, все большее количество сторонников получает теория дисфункции эндотелия в развитии различных заболеваний сосудов [4, 5]. Теория дисфункции эндотелия — многогранна, с множеством вероятных механизмов повреждения эндотелиоцитов, таких как активированные лейкоциты, свободные радикалы и продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ), пероксинитрит (ONOO⁻), гипопродукция оксида азота (II) (NO) вследствие воздействия различных факторов [4, 5]. В связи с накоплением клинического и лабораторного материала по данной проблеме, возросла потребность к экспериментальному воспроизведению дисфункции эндотелия венозной стенки. В литературе представлено большое количество работ, посвященных экспериментальному моделированию венозного тромбоза и, соответственно, ПТС, однако малое количество работ рассматривает данные модели с позиции функционального состояния эндотелия (ФСЭ) венозной стенки, факторов влияющих на него и возможные пути коррекции.

Исходя из данных литературы, нами были выбраны и использованы следующие экспериментальные модели венозной эндотелиальной дисфункции: L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции [6], модели острого ТГВ и ПТС [7].

Самой широкой группой препаратов, применяемой при различных заболеваниях вен, на сегодняшний день остаются флебопротекторы. Микронизированная очищенная фракция флавоноидов (МОФФ) является представителем препаратов группы выбора с доказанными

эффектами на проницаемость капилляров, активацию лейкоцитов и свободнорадикальное окисление [8, 9]. Учитывая влияние данного препарата на процессы, участвующие в развитии эндотелиальной дисфункции, изучение его эффектов на биохимические маркеры функционального состояния эндотелия представляется весьма перспективным.

Цель исследования: оценить различные способы моделирования венозной эндотелиальной дисфункции в эксперименте и изучить возможность ее коррекции путем применения микронизированной очищенной фракции флавоноидов.

Материал и методы

Исследуемую группу составили 105 самок крыс линии Wistar массой 250 — 350 г. 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 13.11.1984 г.

Животные были разделены на 3 группы.

В группе 1 (экспериментальный ТГВ) животным (n=35) под наркозом после срединной лапаротомии выполнялась перевязка правой общей подвздошной вены и введение дистальнее лигатуры 0,3 мл подогретого до 37-37,5°C раствора тромбина (40 ЕД/кг). С 11 суток от момента оперативного вмешательства и на протяжении 6 месяцев животным энтеральным путем вводилась водная суспензия микронизированной очищенной фракции флавоноидов в дозе 100 мг/кг/сутки. Определение биохимических показателей ФСЭ и антиоксидантного статуса осуществлялось на 10-е сутки после оперативного вмешательства и на 1, 2, 3 и 6 месяцы с момента постановки модели ТГВ.

В группе 2 (экспериментальный ПТС) животным (n=35) под наркозом после срединной лапаротомии выполнялась перевязка правой общей подвздошной вены и введение дистальнее лигатуры 0,3 мл подогретого до 37-37,5°C раствора тромбина (40 ЕД/кг). С 31 суток от момента оперативного вмешательства и на протяжении 6 месяцев животным энтеральным путем вводилась водная суспензия микронизированной очищенной фракции флавоноидов в дозе 100 мг/кг/сутки. Определение биохимических показателей ФСЭ и антиоксидантного статуса осуществлялось на 30-е сутки после оперативного вмешательства и на 1, 2, 3 и 6 месяцы с момента постановки

модели ПТС с последующим определением биохимических показателей ФСЭ и антиоксидантного статуса.

В группе 3 (L-NAME-индуцированная эндотелиальная дисфункция) (n=35) выполнялось внутрибрюшинное введение N-нитро-L-аргинин метилового эфира (L-NAME) 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 микронизированной очищенной фракции флавоноидов в дозе 100 мг/кг/сутки. Определение биохимических показателей ФСЭ и антиоксидантного статуса осуществлялось на 8-е сутки от начала эксперимента и на 1, 2, 3 и 6 месяцы с момента постановки модели L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции с последующим определением биохимических показателей ФСЭ и антиоксидантного статуса.

Забор крови у животных осуществлялся из нижней полой вены после ре- и лапаротомии под наркозом. Выведение животных из эксперимента в количестве 7 особей производилось в конкретные для каждой группы сроки, путем внутривенной передозировки раствором сернокислой магнезии. Эвтаназия животных на протяжении периода исследования осуществлялась ввиду необходимости для определения исследуемых показателей около 5 мл крови от особи, что само по себе является фатальной кровопотерей для животного.

Цельная кровь центрифугировалась при 3000 об./мин. в течение 15 минут. Эритроциты гемолизировали разбавлением дистиллированной водой в соотношении 1:10. Активность супероксиддисмутазы (СОД) определялась в гемолизате по методу, основанному на реакции окисления кверцетина [10]. Содержание малонового диальдегида (МДА) в гемолизате определяли по методу, основанному на реакции с тиобарбитуровой кислотой [11]. Определение СОД и МДА выполнено на фотометре КФК-3-01-«ЗОМЗ». Содержание метаболитов NO определяли в сыворотке крови на ИФА-

анализаторе “Stat Fax 2100” по методике В.П. Метельской [12].

Значения определяемых показателей представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, а m – стандартная ошибка среднего. При проверке совпадения законов распределения исследуемых количественных показателей с нормальным в группах пользовались критерием согласия Колмогорова-Смирнова. В случае нормального закона распределения достоверность различий показателей определяли при помощи t-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Исследуемые показатели в различные сроки после постановки моделей представлены в таблицах 1-3.

Как видно из таблиц, колебания основных биохимических показателей ФСЭ, которые были определены в исследовании, позволяют с уверенностью говорить, что оперативное вмешательство и введение L-NAME влияют на ФСЭ, с заметными изменениями биохимического профиля после их воздействия. Как следует из результатов, во всех моделях после их постановки отмечаются сопоставимые в количественном отношении результаты. Наблюдается достоверное снижение метаболитов оксида азота (NO), повышение уровня МДА и, как следствие, компенсаторная активация антиоксидантной системы, проявляющейся в увеличении уровня СОД. Применение препарата МОФФ вызывает достоверное ($p < 0,05$) увеличение синтеза NO и снижение уровня МДА и СОД во всех группах на протяжении времени эксперимента. Причем изучаемые показатели достигли своих исходных значений к 1 месяцу наблюдения и оставались на этом же уровне на протяжении всего периода исследования. Активность СОД на фоне применения МОФФ снижается, возможно, вследствие уменьшения содержания продуктов ПОЛ, что является предпосылкой для реализации положительных

Таблица 1

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

	NO, мкмоль/мл	СОД, у.е./мг Hb	МДА, нмоль/г Hb
Исходные показатели	29,314±3,124*	0,287±0,092*	5,398±0,962*
На момент постановки модели	12,342±2,06	0,768±0,144	12,09±4,31
1 месяц	66,58±7,58*	0,157±0,084*	5,928±0,661*
2 месяца	55,67±12,05*	0,234±0,074*	6±1,152*
3 месяца	54,36±12,49*	0,148±0,077*	5,74±1,47*
6 месяцев	50,6±19,08*	0,138±0,098*	5,02±1,75*

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

Таблица 2

**Значение исследуемых показателей в различные сроки после операции
в группе экспериментального посттромботического синдрома (M±m)**

	NO, мкмоль/мл	СОД, у.е./мг Hb	МДА, нмоль/г Hb
Исходные показатели	29,314±3,124*	0,287±0,092**	5,398±0,962
На момент постановки модели	12,47±2,83	0,423±0,168	16,52±4,28
1 месяц	44,31±15,11*	0,1±0,044*	4,98±0,64*
2 месяца	45,92±12,07*	0,07±0,03*	5,162±0,92*
3 месяца	48,32±13,17*	0,1±0,057*	4,69±0,75*
6 месяцев	32,076±9,73*	0,184±0,1**	5,74±1,86*

Примечание: * – значимое отличие от уровня на момент постановки модели (p<0,05); ** – различия недостоверны в сравнении с уровнем на момент постановки модели (p>0,05).

Таблица 3

**Значение исследуемых показателей в различные сроки
в группе L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции (M±m)**

	NO, мкмоль/мл	СОД, у.е./мг Hb	МДА, нмоль/г Hb
Исходные показатели	29,314±3,124*	0,287±0,092*	5,398±0,962*
На момент постановки модели	12,022±2,952	0,798±0,276	13,108±1,371
1 месяц	46,428±5,4*	0,175±0,073*	4,475±2,539*
2 месяца	36,93±8,47*	0,0983±0,036*	4,835±1,987*
3 месяца	38,32±5,31*	0,17±0,098*	5,595±0,86*
6 месяцев	35,542±4,826*	0,18±0,091*	4,485±0,91*

Примечание: * – значимое отличие от уровня на момент постановки модели (p<0,05).

эффектов NO, однако данный показатель достоверен не во всех группах.

Супероксиддисмутаза (СОД) является важным компонентом антиоксидантной системы, катализирует реакцию превращения супероксида в пероксид водорода (H₂O₂). Оксид азота (II) и СОД конкурируют за супероксид-анион, однако эта конкуренция разнонаправлена по конечным эффектам: при взаимодействии NO с супероксидом образуется ONOO⁻ – клеточный яд, а под действием СОД – пероксид водорода (H₂O₂). Высокая концентрация СОД в сыворотке крови животных говорит об активности антиоксидантной системы. Малоновый диальдегид (МДА) является конечным продуктом ПОЛ. Повышение уровня МДА, является маркером активности процессов перекисного окисления липидов, которые могут усугубить повреждение эндотелия и привести к прогрессирующей эндотелиальной дисфункции.

Положительное влияние препарата с выраженным флеботропным эффектом (МОФФ) на показатели ФСЭ при моделировании L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции, исходя из результатов исследования, говорит о развитии дисфункции венозного эндотелия, что говорит о системности угнетения синтеза оксида азота (II) препаратом L-NAME. Данный факт говорит о системности действия последнего (развитие дефицита NO как в артериальном, так и в венозном русле) и характеризует данную модель с точки зре-

ния универсальности ее применения. Однако модели венозного тромбоза и ПТС в большей степени приемлемы для изучения данных заболеваний как таковых и, соответственно, изменений ФСЭ возникающих при этом.

Прямая корреляционная связь между развитием атеросклероза – патологического процесса, роль эндотелиальной дисфункции в развитии которого на сегодняшний день трудно переоценить и частотой возникновения венозных тромбозов [13, 14] говорит о системных молекулярных сдвигах в организме, которые воспроизводятся во всех использованных экспериментальных моделях, однако их системность – в большей степени – в модели L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции.

Выводы

1. Использованные в работе модели позволяют создать в эксперименте *in vivo* необходимые условия для разностороннего изучения различных процессов, которые происходят в эндотелии вен при различных патологических состояниях.

2. Применение указанных моделей открывает возможности для поиска способов коррекции эндотелиальной дисфункции при острой и хронической венозной патологии.

3. Применение МОФФ оказывает положительное влияние на функциональное состояние эндотелия, характеризующееся повы-

шением уровня оксида азота (II) и снижением активности процессов свободно-радикального окисления.

Конфликт интересов отсутствует

Работа выполнялась в соответствии с планом научных исследований ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова». Финансовой поддержки со стороны компаний-производителей лекарственных препаратов авторы не получили.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lilienfeld D. E. Decreasing mortality from pulmonary embolism in the united, 1979-1996 / D. E. Lilienfeld // *Int J Epidemiol.* – 2000 Jun. – Vol. 29, N 3. – P. 465–69.
2. Heit J. A. Venous thromboembolism: disease burden, outcomes and risk factors / J. A. Heit // *J Thromb Haemost.* – 2005 Aug. – Vol. 3, N 8. – P. 1611–17.
3. Покровский А. В. Хроническая венозная недостаточность нижних конечностей, современные проблемы диагностики, классификации, лечения / А. В. Покровский, С. В. Сапелкин // *Ангиология и сосуд. хирургия.* – 2003. – Т. 9, № 1. – С. 53–60.
4. Калинин Р. Е. Проблема перекисного окисления липидов в сосудистой хирургии : обзор литературы / Р. Е. Калинин // *Рос. мед.-биол. вестн. им. акад. И. П. Павлова.* – 2006. – № 3. – С. 84–89.
5. Киричук В.Ф. Дисфункция эндотелия / В. Ф. Киричук, В. Ф. Глыбочко. – Саратов : Изд-во СГМУ, 2008. – 110 с.
6. Граник В. Г. Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств / В. Г. Граник, Н. Б. Григорьев. – М. : Вуз. кн., 2004. – 360 с.
7. Экспериментальные модели венозного тромбоза и возможность применения клеточных технологий для коррекции тромботических состояний / И. В. Кузнецова [и др.] // *Флебология.* – 2012.

- Т. 6, № 1. – С. 43–47.
8. Биофлавоноиды и их значение в ангиологии. Фокус на диосмин / В. Ю. Богачев [и др.] // *Ангиология и сосуд. хирургия.* – 2013. – Т. 19, № 1. – С. 73–81.
9. Silambarasan T. Diosmin, a bioflavonoid reverses alterations in blood pressure, nitric oxide, lipid peroxides and antioxidant status in DOCA-salt induced hypertensive rats / T. Silambarasan, B. Raja // *Eur J Pharmacol.* – 2012 Mar 15. – Vol. 679, N 1-3. – P. 81–89.
10. Костюк В. А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции кверцетина / В. А. Костюк, А. И. Потапович, Ж. В. Ковалва // *Вопр. мед. химии.* – 1990. – Т. 36, № 2. – С. 88–91.
11. Коробейникова Э.Н. Модификация определения продуктов перекисного окисления липидов в реакции с тиобарбитуровой кислотой / Э. Н. Коробейникова // *Лаб. дело.* – 1989. – № 7. – С. 8–10.
12. Метельская В. П. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови / В. П. Метельская, Н. Г. Чуманова // *Клин. лаб. диагностика.* – 2005. – № 6. – С. 15–18.
13. Jerjes-Sanchez C. Venous and arterial thrombosis: a continuous spectrum of the same disease? / C. Jerjes-Sanchez // *Eur Heart J.* – 2005 Jan. – Vol. 26, N 1. – P. 3–4.
14. Prandoni P. An association between atherosclerosis and venous thrombosis / P. Prandoni [et al.] // *N Engl J Med.* – 2003. – Vol. 348, N 15. – P. 1435–41.

Адрес для корреспонденции

390026, Российская Федерация,
г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9,
кафедра ангиологии, сосудистой,
оперативной хирургии и топографической анатомии
ГБОУ ВПО «Рязанский государственный
медицинский университет им. акад. И.П. Павлова»,
тел. раб.: +7(4912) 46-08-01,
e-mail: anovikovn@rambler.ru,
Новиков Алексей Николаевич

Сведения об авторах

Калинин Р.Е., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой ангиологии, сосудистой, оперативной хирургии и топографической анатомии ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова».

Сучков И.А., к.м.н., доцент кафедры ангиологии, сосудистой, оперативной хирургии и топографической анатомии ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова».

Новиков А.Н., очный аспирант кафедры ангиологии, сосудистой, оперативной хирургии и топографической анатомии ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова».

Пшенников А.С., к.м.н., ассистент кафедры ангиологии, сосудистой, оперативной хирургии и топографической анатомии ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова».

Поступила 13.12.2013 г.