

Ю.С. НЕБЫЛИЦИН, С.А. СУШКОВ, А.П. СОЛОДКОВ

**ПОКАЗАТЕЛИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ЦИРКУЛИРУЮЩИХ
ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ В РАЗНЫЕ СТАДИИ ТРОМБОЗА ГЛУБОКИХ ВЕН НИЖНИХ
КОНЕЧНОСТЕЙ**

УО «Витебский государственный медицинский университет»,
Республика Беларусь

Изучено изменение количества циркулирующих эндотелиоцитов (ЦЭК), а также содержания продуктов деградации монооксида азота, малонового диальдегида (МДА) и диеновых конъюгатов (ДК) в венозной крови у 99 пациентов в активную и неактивную стадии острого тромбоза глубоких вен нижних конечностей.

Установлено, что при остром венозном тромбозе в активную стадию отмечалось увеличение числа ЦЭК на 167,7% по сравнению с контролем. В неактивную стадию процесса выявлялось снижение количества ЦЭК на 14,39% в сопоставлении с показателями в активную стадию. Содержание NO_2/NO_3 в плазме крови оказалась выше на 82,7%, по сравнению с показателями в контрольной группе, а на 12-е сутки снизилось на 30,1% при сопоставлении со значениями в активную стадию. МДА было увеличено на 20,2% ($p < 0,05$), ДК на 47,8% по сравнению с контрольными значениями. В неактивную стадию содержание МДА и ДК статистически не отличалось от показателей в активную стадию. Следовательно, острый венозный тромбоз в активную стадию сопровождается возрастанием числа ЦЭК, содержания NO_2/NO_3 в плазме, МДА и ДК и снижением указанных показателей в неактивную стадию.

Таким образом, определение в крови ЦЭК, МДА, ДК и концентрации NO_2/NO_3 в плазме может быть использовано как маркер, характеризующий тяжесть острого венозного тромбоза.

Ключевые слова: дисфункция эндотелия, острый венозный тромбоз.

Changes in number of circulating endotheliocytes (CE) were studied as well as products content of nitrogen monoxide degradation, of malonate dialdehyde (MDA) and dienic conjugates (DC) in the venous blood of 99 patients at the active and non-active stages of acute lower limbs deep veins thrombosis. It was established that in case of acute venous thrombosis at the active stage, increase of CE by 167,7% was observed in comparison with control. At the non-active stage of the process, decrease of CE by 14,39% in comparison with the active stage indexes was marked. NO_2/NO_3 content in blood plasma was 82,7% higher in comparison with indexes in the control group, on the 12th day it reduced by 30, 1% in comparison with indexes of the active stage. MDA was 20,2% increased, DC – 47,8% increased in comparison with the control indexes. During non-active stage MDA and DC content didn't differ statistically from the active stage indexes Therefore acute venous thrombosis in the active stage is accompanied by increase in circulating endotheliocytes number, by increase of NO_2/NO_3 content in plasma and by decrease of the given indexes at the non-active stage.

So, determination of CE, MDA and DC in the blood and NO_2/NO_3 concentration in the plasma can be used as markers, characterizing severity of acute venous thrombosis.

Key-words: endothelial dysfunction, acute venous thrombosis.

Тромбоз глубоких вен (ТГВ) нижних конечностей и его последствие – тромбоэмболия легочной артерии (ТЭЛА) – занимают ведущее место среди послеоперационных осложнений и причин летальности. В Европе острый венозный тромбоз и ТЭЛА являются более частой причиной смерти, чем рак молочной железы, рак предстательной железы, ВИЧ-инфекция/СПИД и дорожно-транспортный травматизм вместе взятые.

Провоцирующими факторами являются оперативные вмешательства и инвазивные вмешательства в области крупных венозных магистралей, заболевания, предрасполагающие к ТГВ (злокачественные новообразования, ожирение, сахарный диабет, сердечная недостаточность и др.). ТГВ развивается у 30% больных после общехирургических вмешательств, у 70-80% после травматологических и ортопедических, более чем у 50% больных с висцеральными формами рака (синдром Труссо), у 43% пациентов после нейрохирургических операций [1, 2, 3, 4]. Данное заболевание возникает и у больных терапевтического профиля, находящихся на длительном постельном режиме. У пациентов с крупноочаговым инфарктом миокарда ТГВ встречается в 38-40% случаев, нестабильной стенокардии – 24%, пороках сердца и нарушениях ритма, осложненных недостаточностью кровообращения – 30%, острым нарушении мозгового кровообращения – 42-63% [2, 3, 4].

Клинически острый венозный тромбоз протекает, как правило, скрытно и проявляется лишь в одном случае из восьми и таит в себе опасность развития ТЭЛА. Диагностировать ТГВ часто невозможно из-за отсутствия специфических симптомов заболевания [1, 3]. Бессимптомное течение тромбоза связано с сохранением адекватного кровотока. В 70% случаев тромбы приобретают эмбологенный характер, и первым признаком ТГВ является ТЭЛА [1]. Ранняя диагностика острого тромбоза до настоящего времени вызывает определенные затруднения.

Встречаемость ТГВ, проявляющегося клинически, в общей популяции составляет 50 случаев на 100 000 населения в год. В странах Европейского Союза частота документально подтвержденного венозного тромбоза ежегодно составляет 684 000, фатальной ТЭЛА – 543 000, нефатальной ТЭЛА – 435 000 [1].

Причиной острого венозного тромбоза являются замедление объемной и линейной скорости кровотока в глубоких венах нижних конечностей, наличие тромбофилии, угнетение фибринолитической способности крови, дисфункция эндотелия [5, 6, 7, 8].

Оксид азота (NO) эндотелиального происхождения является мощным вазодилататором, ингибитором адгезии и агрегации тромбоцитов к эндотелию. Он также способен связывать свободные радикалы кислорода. В высоких концентрациях NO токсичен. Избыточная продукция NO вступает в реакцию с кислородом и супероксиданионом и образует пероксинитрит, который является более токсичным, чем сам NO [9].

При агрегации тромбоцитов NO высвобождается из самих агрегирующих тромбоцитов. Также они высвобождают АДФ, который активирует eNOS в эндотелии. NO предупреждает агрегацию тромбоцитов и противодействует вазоконстрикторному эффекту тромбоксана A₂ и серотонина, которые продуцируются тромбоцитами. В условиях дефицита эндотелиального NO этот защитный механизм не работает, и, соответственно, создаются условия, способствующие вазоконстрикции и тромбозам. При повреждении кровеносных сосудов, в частности при венозном застое, может изменяться количество циркулирующих в крови эндотелиальных клеток и содержание продуктов деградации NO [10, 11]. Функционирование эндотелиальной системы при остром венозном тромбозе исследовано недостаточно. В связи с этим представляется актуальным изучить количество циркулирующих эндотелиоцитов (ЦЭК), продуктов деградации монооксида азота, малонового диальдегида (МДА) и диеновых конъюгатов (ДК) при остром венозном тромбозе.

Цель работы: оценка содержания циркулирующих эндотелиальных клеток, продуктов деградации монооксида азота, малонового диальдегида и диеновых конъюгатов как маркера дисфункции эндотелия при остром тромбозе глубоких вен нижних конечностей.

Материалы и методы

Обследовали 99 пациентов ТГВ, которые находились на лечении в хирургическом отделении ЛПУ «Отделенческая клиническая больница на станции Витебск» в период 2002-2007г. Среди них мужчин было 63, женщин 36. Острый илюофеморальный тромбоз выявлен у 16 пациентов, бедренной вены – 21, подколенной вены – 28, икроножных вен – 4, берцовых вен – 10, мышечных синусов – 20. Правосторонняя локализация выявлена у 41, левосторонняя у 58 пациентов. Средний возраст пациентов составил $52,07 \pm 11,67$ года ($M \pm \sigma$).

При проведении триплексного ультразвукового ангиосканирования диагноз тромбоза глубоких вен нижних конечностей подтвержден у всех пациентов. Оно осуществлялось ультразвуковым сканером “Logiq-500 Pro” (General Electric, США) с конвексным датчиком 5 МГц и линейным датчиком 11 МГц. В В-режиме оценивалось состояние сосудистой стенки, диаметр сосудов и состояние клапанного аппарата. Далее выполнялись пробы с дистальной и проксимальной компрессией, тест Вальсальвы продолжительностью напряжения не менее 10 с. Анализировались данные цветового и энергетического кодирования венозного кровотока и его спектральные характеристики [12].

В основной группе производили забор венозной крови из подкожной локтевой вены. В качестве контроля исследовалась кровь 30 доноров.

В венозной крови определяли содержание стабильных продуктов деградации монооксида азота в плазме крови по методу Грисса. Конверсию нитратов в нитриты осуществляли цинковой пылью, обработанной аммиачным комплексом сульфата меди, которую добавляли в пробирку с исследуемой плазмой [13]. Содержание МДА определяли по методу В.Б. Гаврилова спектрофотометрически при длине волны 535 нм в бутаноловой фазе [14]. ДК экстрагировали гептанизопропиловой смесью 1:3 и надосадочную жидкость измеряли спектрофотометрически при длине волны 232 нм дейтериевой лампой. Также в венозной крови определяли число ЦЭК. С этой целью использовали метод Hladovec J. et al. (1978) [15]. Он основан на изоляции клеток эндотелия из крови вместе с тромбоцитами, с последующим осаждением тромбоцитов с помощью аденозиндифосфата. Количество клеток подсчитывали в 100 мкл бедной тромбоцитами плазме в камере Горяева при световой микроскопии (x200).

Цифровой материал обрабатывали статистически с использованием стандартных пакетов прикладных программ («Statistica for Windows – 6»). В случае нормального распределения использовали непарный t-критерий Стьюдента, при ненормальном распределении значений - непараметрический критерий Mann–Whitney–Wilcoxon.

Результаты и обсуждение

Детальное изучение клинических проявлений позволило выявить, что отек пораженной конечности, имелся у 79 пациентов. При осмотре кожных покровов гиперемия наблюдалась у 4, цианоз – у 2 пациентов. На боли жаловались 75 пациентов. Из клинических симптомов наиболее информативными оказались пробы Хоманса и Мозеса, которые выявлялись в 49 и 28 случаях соответственно. Симптом Ловенберга определялся у 19 пациентов, Пратта – у 13, Пайра – у 11, Лискера – у 8. У остальных пациентов клиническая симптоматика была стертой, имелась умеренная пастозность дистальных отделов и неясные болевые ощущения.

В венозной крови контрольной группы количество ЦЭК оказалось равным $21,45 \pm 0,51$ клеток/100 мкл (таблица 1), содержание NO_2/NO_3 было $37,21 \pm 1,66$ мкМ/л, концентрация МДА равнялась $79,67 \pm 4,49$ нМ/г белка плазмы, концентрация ДК составляла $75,9 \pm 7,03$ нМ/г липидов (таблица 2).

Таблица 1

**Содержание циркулирующих эндотелиоцитов в венозной крови
в активную стадию у пациентов с острым тромбозом
глубоких вен нижних конечностей**

Показатели	1. Контрольная группа (n=20)	2. Опытная группа (n=99)
ЦЭК, кл/100мкл $M \pm m$	$21,45 \pm 0,51^2$	$57,42 \pm 2,24^1$

Примечание: надстрочными индексами отмечены достоверные ($p < 0,05$) различия между соответствующими группами.

Таблица 2

**Содержание малонового диальдегида, диеновых конъюгатов
и продуктов деградации монооксида азота в венозной крови в активную ста-
дию у пациентов с острым тромбозом глубоких вен нижних конечностей**

Показатели	1. Контрольная группа (n=30)	2. Опытная группа (n=42)
Нитраты/нитриты мкМ/л $M \pm m$	$37,21 \pm 1,66^2$	$67,99 \pm 1,2^1$
МДА нМ/г белка плазмы $M \pm m$	$79,67 \pm 4,49^2$	$95,79 \pm 7,61^1$
ДК нМ/г липидов $M \pm m$	$75,9 \pm 7,03^2$	$112,21 \pm 9,98^1$

Примечание: надстрочными индексами отмечены достоверные ($p < 0,05$) различия между соответствующими группами.

При ТГВ в активную стадию процесса количество ЦЭК статистически достоверно увеличивалось и составляло $57,42 \pm 2,24$ клеток/100 мкл (рис. 1).

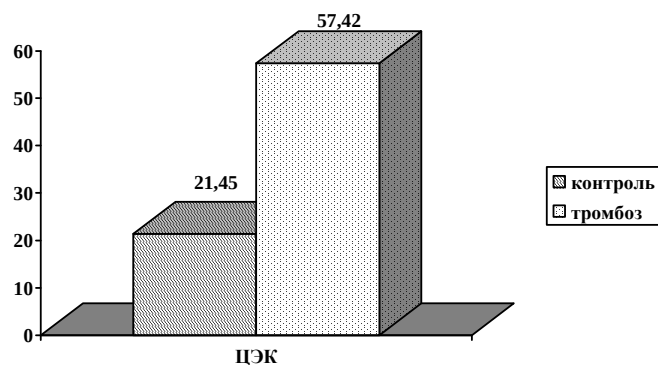


Рис. 1. Содержание циркулирующих эндотелиоцитов в крови больных с острым тромбозом и в контрольной группе.

Содержание NO_2/NO_3 в активную стадию венозного тромбоза увеличивалось на 82,7%, и составляло $67,99 \pm 1,2$ мкМ/л (рис. 2). Содержание МДА и ДК возрастало на 20,2% и 47,8% соответственно и равнялось $95,79 \pm 7,61$ нМ/г и $112,21 \pm 9,98$ нМ/г (рис. 3, 4).

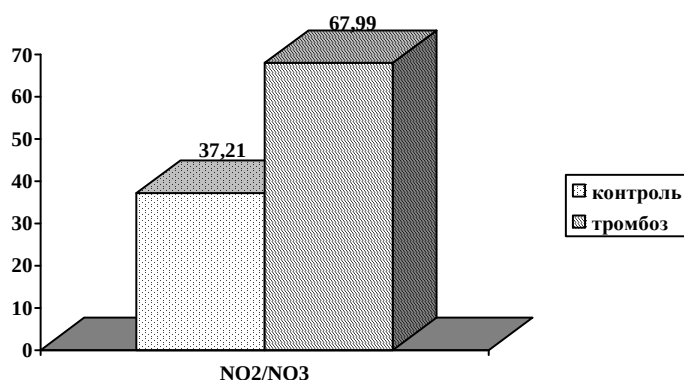


Рис.2. Содержание продуктов деградации монооксида азота в венозной крови у пациентов с острым тромбозом глубоких вен нижних конечностей и в контрольной группе.

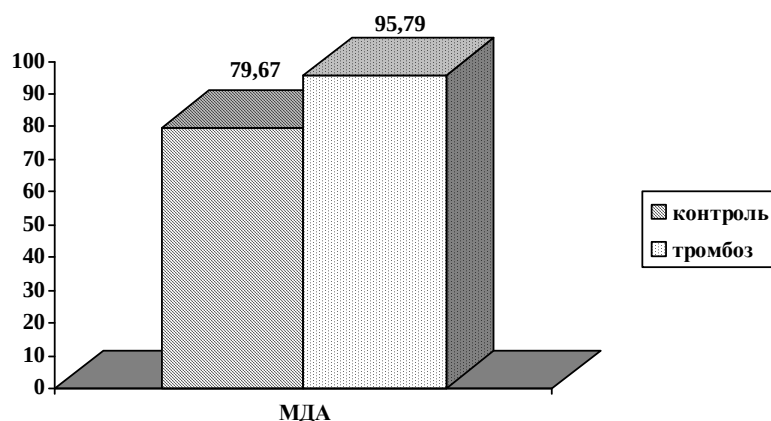


Рис. 3. Содержание малонового диальдегида в венозной крови у пациентов с острым тромбозом глубоких вен нижних конечностей и в контрольной группе

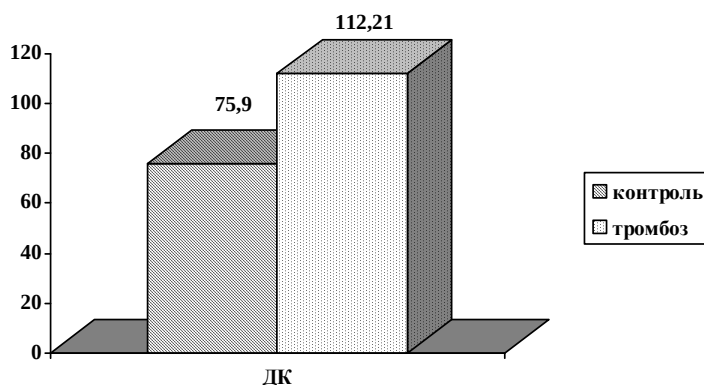


Рис. 4. Содержание диеновых конъюгатов в венозной крови у пациентов с острым тромбозом глубоких вен нижних конечностей и в контрольной группе

В неактивную стадию данного заболевания на 12-е сутки количество ЦЭК уменьшилось на 14,39% по сравнению с показателями в активную стадию и оказалось равным $49,16 \pm 1,75$ клеток/100 мкл. (табл. 3).

Таблица 3

Содержание циркулирующих эндотелиоцитов в венозной крови в неактивную стадию у пациентов с острым тромбозом глубоких вен нижних конечностей

Показатели	1. Опытная группа активная стадия (n=99)	2. Опытная группа неактивная стадия (n=12)
ЦЭК, кл/100мкл $M \pm m$	$57,42 \pm 2,24^2$	$49,16 \pm 1,75^1$

Примечание: надстрочными индексами отмечены достоверные ($p < 0,05$) различия между соответствующими группами.

При остром тромбозе глубоких вен содержание NO_2/NO_3 в неактивную стадию процесса снизилось на 30,1% по сравнению с показателями в активную стадию и составило $47,54 \pm 3,04$ мкМ/л. Содержание МДА и ДК уменьшалось статистически недостоверно и равнялось $83,81 \pm 9,72$ нМ/г и $102,27 \pm 18,3$ соответственно (табл. 4).

Таблица 4

Содержание малонового диальдегида, диеновых конъюгатов и продуктов деградации монооксида азота в венозной крови в неактивную стадию у пациентов с острым тромбозом глубоких вен нижних конечностей

Показатели	1. Опытная группа активная стадия (n=42)	2. Опытная группа неактивная стадия (n=10)
Нитраты/нитриты мкМ/л $M \pm m$	$67,99 \pm 1,2^2$	$47,54 \pm 3,04^1$
МДА нМ/г белка плазмы $M \pm m$	$95,79 \pm 7,61$	$83,81 \pm 9,72$
ДК нМ/г липидов $M \pm m$	$112,21 \pm 9,98^2$	$102,27 \pm 18,3$

Примечание: надстрочными индексами отмечены достоверные ($p < 0,05$) различия между соответствующими группами.

Следовательно, при остром венозном тромбозе в активную стадию наблюдается повышение количества циркулирующих в крови эндотелиоцитов, увеличивается образование монооксида азота, малонового диальдегида и диеновых конъюгатов. В неактивную стадию данного заболевания выраженность указанных изменений уменьшается.

Таким образом, при ТГВ, по-видимому, имеет место повреждение эндотелиального слоя венозной стенки, происходит отслоение и отрыв клеток эндотелия от базальной мембраны, а также увеличивается синтез продуктов деградации монооксида азота, малонового диальдегида и диеновых конъюгатов. Указанные изменения служат показателем нарушения целостности эндотелиального слоя венозной стенки при данном заболевании. Возможно, выявленные изменения состояния сосудистого эндотелия позволят разработать новые методы диагностики, осуществить поиск новых маркеров тромботических состояний, а также использование этих показателей для оценки тяжести и дальнейшего течения заболевания. Кроме того, полученные результаты показывают целесообразность поиска препаратов, восстанавливающих функцию эндотелия в комплексном лечении пациентов ТГВ нижних конечностей.

В результате проведенного исследования сделаны следующие выводы.

Выводы

1. У больных с острым тромбозом глубоких вен нижних конечностей в активную стадию повышен в крови уровень циркулирующих эндотелиальных клеток и продуктов деградации монооксида азота с последующим снижением в неактивную стадию.

2. В активную стадию при остром венозном тромбозе отмечается повышение содержания малонового диальдегида и диеновых конъюгатов.

3. Определение концентрации продуктов деградации монооксида азота, малонового диальдегида, числа циркулирующих эндотелиоцитов может служить дополнительным диагностическим критерием для оценки тяжести патологического процесса при остром тромбозе глубоких вен.

ЛИТЕРАТУРА

1. Профилактика и лечение тромбоза глубоких вен: учеб.- метод. пособие / авт. - сост. М. Т. Воевода, А. А. Баешко. – Минск : Белпринт, 2006. – 48 с.

2. Флебология: руководство для врачей / В. С. Савельев [и др.]; под ред. В. С. Савельева. – М.: Медицина, 2001. – 664 с.

3. Суджаева, С. Г. Тромбоэмболия легочной артерии / С. Г. Суджаева. – Минск: Белпринт, 2004. – 128 с.

4. Stein, P. D. Acute pulmonary embolism / P. D. Stein // Dis. Mon. – 1994. – Vol. 40. – P. 467-523.

5. Zanetti, M. Expression and function of recombinant endothelial nitric oxide synthase in human endothelial cells / M. Zanetti, Z. S. Katusic, T. O'Brien // J. Vasc. Res. – 2000. – Vol. 37, N 6. – P. 449-456.

6. Michiels, C. Interactions between endothelial cells and smooth muscle cells after their activation by hypoxia. A possible etiology for venous disease / C. Michiels, T. Arnould, D. Janssens // Int. Angiol. – 1996. – Vol. 15, N 2. – P. 124-130.

7. Michiels, C. Endothelial cell reponses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions / C. Michiels, T. Arnould, J. Remabe // J. Biophim. Biophys. Acta. – 2000. – Vol. 1497, N 1. – P. 1-10.
8. Баркаган, З. С. Основы диагностики нарушений гемостаза / З. С. Баркаган, А. П. Момот. – Москва, 1999. – 246 с.
9. Манухин, Е. Б. роль оксида азота в развитии и предупреждении дисфункции эндотелия / Е. Б. Манухин, И. Ю. Малышев // Вестник ВГМУ. – 2003. – № 2. – С.5-17.
10. Количество циркулирующих эндотелиоцитов и базальный уровень NO кровеносных сосудов у пациентов с хронической венозной недостаточностью / А. Н. Косинец [и др.] // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования: сб. тр. II Междунар. науч.-практич. конф. / Витебск. гос. мед. ун-т. – Витебск, 2002. – С. 175-179.
11. Концентрация стабильных продуктов деградации NO и число циркулирующих эндотелиоцитов как дополнительный диагностический критерий для оценки тяжести венозной патологии. / С. А. Сушков [и др.] // Дисфункция эндотелия: сб. тр. 3 Междунар. науч.-практич. конф. / Витебск. гос. мед. ун-т. – Витебск, 2004. – С. 247-251.
12. Зубарев, А. Р. Ультразвуковая диагностика заболеваний вен нижних конечностей / А. Р. Зубарев, В. Ю. Богачев, В. В. Митьков. – Москва: Видар, 1999. – 104 с.
13. Модифицированный метод определения NO₃ и NO₂ с помощью цинковой пыли в присутствии аммиачного комплекса сульфата меди / И. С. Веремей [и др.] // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования: сб. тр. респуб. науч.-практич. конф. / Витебск. гос. мед. ун-т. – Витебск, 2000.-С.112-115.
14. Гаврилов, В. Б. Измерение диеновых конъюгатов в плазме по ультрафиолетовому поглощению гептановых и изопропиловых экстрактов / В. Б. Гаврилов, А. Р. Гаврилова, Н. Ф. Хмара // Лабораторное дело. – 1998. – №2. – С. 60-64.
15. Hladovec, J. Circulating endothelial cells as a sign of vessels wall lesions / J. Hladovec // Physiologia bohemoslovaca. – 1978. – Vol. 27. – P. 400.

Поступила 28.05.2007г.