



Ю.Л. Шевченко, Ю.М. Стойко, В.Г. Гудымович, А.М. Никитина

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

Национальный медико-хирургический Центр им. Н.И. Пирогова.

Россия, 105203, г. Москва, ул. Нижняя Первомайская, 70, e-mail: ystoyko@mail.ru

Цель: выявить причины патологических процессов венозной стенки, предшествующих появлению её необратимых изменений с целью профилактики заболеваний вен и повышению качества лечения больных с варикозной болезнью вен нижних конечностей.

Материалы и методы: исследование состояния эндотелия проведено у 92 больных с варикозной болезнью вен нижних конечностей путем определения уровня маркеров эндотелиальной дисфункции: Р-селектина, Е-селектина, тканевого активатора плазминогена, эндотелина-1, молекулы адгезии сосудистого эндотелия 1 типа (sVCAM-1), циркулирующих эндотелиальных клеток.

Результаты и заключение: по степени выраженности рассмотренных маркеров можно судить об активности процессов варикозной трансформации вен. У больных с варикозной болезнью вен нижних конечностей в послеоперационном и отдаленном периоде целесообразно проводить определение циркулирующих эндотелиальных клеток, VCAM-1, Р- и Е-селектинов, t-РА и эндотелина-1 с целью диагностики функционального состояния эндотелия, выраженности воспалительных процессов при варикозной болезни. Показатели эндотелиальной дисфункции перспективно также использовать для контроля эффективности консервативного лечения хронической венозной недостаточности.

Ключевые слова: варикозная болезнь вен нижних конечностей, комплексное лечение, эндотелиальная дисфункция.

Y. L. Shevchenko, Y. M. Stoyko, C. G. Gudymovich, A. M. Nikitina

ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN DEVELOPMENT OF VARICOSE VEINS OF LOWER EXTREMITIES AND POSSIBILITIES OF IT'S CORRECTION

National Medical Surgical Center n.a. N.I. Pirogov.

70 Nizhnyaya Pervomayskaya str., Moscow, 105203, Russia. E-mail: ystoyko@mail.ru

Purpose: To study pathologic processes of the venous wall, prior to the appearance of its irreversible changes for prevention of venous diseases and improve results of treatment of patients with varicose veins of lower extremities.

Materials and Methods: Conditions of endothelium was studied in 92 patients with varicose veins of lower extremities by determining the level of markers of endothelial dysfunction: P-selectin, E-selectin, tissue plasminogen activator, endothelin-1, adhesion molecules vascular endothelial type 1 (sVCAM-1), circulating endothelial cells.

Results and Summary: the severity of examined markers can be an indication of the activity of varicose processes of transformation veins. Patients with varicose veins of lower extremities in postoperative and long-term follow-up are advisable to determine commissions, VCAM-1, P - and E-selectins, t-PA and endothelin-1 in order to perform diagnostics of the functional state of the endothelium, inflammatory processes in varicose veins. Indicators of endothelial dysfunction prospectively also be used to monitor the effectiveness of conservative treatment of chronic venous insufficiency.

Keywords: varicose veins of lower extremities, a comprehensive treatment of endothelial dysfunction.



Введение

Хроническая венозная недостаточность (ХВН) нижних конечностей является одним из самых распространенных заболеваний современности. Варикозная болезнь в настоящее время занимает одно из ведущих мест среди сердечно-сосудистых заболеваний и диагностируется более чем у 20% мужчин и 40% женщин [1,2,3].

Хирургические технологии достигли практически вершин, объединяя в себе основную концепцию – нормализацию флебогемодинамики в том или ином сегменте в сочетании с высокой степенью косметичности любого оперативного вмешательства. Такой двунаправленный подход к хирургическому лечению патологии вен нижних конечностей привел к росту хирургической активности с одной стороны и дифференцированному подходу с другой. При этом частота рецидивов варикозной болезни не только не уменьшилась, а в большинстве случаев возросла.

Современное развитие направлений медицины, связанных с лечением заболеваний системы кровообращения, позволило пересмотреть ряд положений этиологии и патогенеза, которые напрямую могут оказать значимое влияние на диагностику и лечебную тактику и, в том числе, на концепцию эндотелиальной дисфункции (ЭД) [38].

Цель работы – выявление причин патологических процессов венозной стенки, предшествующих появлению её необратимых изменений с целью профилактики заболеваний вен и повышению качества лечения больных с варикозной болезнью вен нижних конечностей (ВБВНК).

Материалы и методы

Исследование эффективности влияния комплексного лечения на функциональное состояние эндотелия проведено у 92 больных с ВБВНК, находившихся в хирургической клинике ФГБУ «Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения России с 2009 по июнь 2013 года. В зависимости от вида оперативного вмешательства больные были разделены на две подгруппы. В 1 подгруппу (n=50) включили пациентов, перенесших комбинированную флебэктомию (ФЭ), во 2 подгруппу (n=42) – пациентов, перенесших эндовенозную лазерную облитерацию (ЭВЛО) поверхностных вен нижних конечностей. В до- и послеоперационных периодах все пациенты получали медикаментозную терапию препаратом Антистакс®, основными составляющими компонентами которого являются кверцетин-глюкуронид и изо-кверцетин.

В контрольной группе из 36 пациентов с сегментарным варикозом проводилось только консервативное лечение с использованием препарата Антистакс®. Количество здоровых добровольцев составило 30 человек.

Всем больным, помимо общеклинического обследования, исследовали гемореологические свойства крови. Эндотелиальную дисфункцию оценивали путем определения уровня маркеров эндотелиальной дисфунк-

ции: Р-селектина, Е-селектина, тканевого активатора плазминогена, эндотелина-1, молекулы адгезии сосудистого эндотелия 1 типа (sVCAM-1), циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК). При определении ЦЭК пользовались методикой J. Hladovcs в интерпретации Н.Н. Петрищева и соавт., 2001.

Концентрации Р-селектина, Е-селектина, тканевого активатора плазминогена, молекулы адгезии сосудистого эндотелия 1 типа (sVCAM-1) определяли с использованием наборов фирмы «BenderMedSystems» (Австрия) для иммуноферментного анализа (ИФА) согласно инструкции производителя. Концентрацию эндотелина-1 устанавливали с использованием наборов фирмы «Biomedica» (Канада) для ИФА согласно инструкции производителя.

Оценку локализации и степени экспрессии белковых антигенов на поверхности и внутри клеток проводили методом проточной иммуноцитометрии на проточном цитометре FACS Calibur с программным обеспечением CellQuest (BectonDickinson).

Материалом для морфологического исследования служили интактные и варикозно-расширенные вены 15 пациентов. Забор производили *in vivo* в стерильных условиях во время аортокоронарного шунтирования (АКШ) (в качестве контроля – 5 образцов) и при комбинированной флебэктомии нижней конечности – 10 образцов. Импрегнация межклеточных контактов: после забора вен с помощью 0.1% водного раствора нитрата серебра.

Результаты

В морфометрическом отношении в неизменной вене эндотелий вен был представлен пластом, состоящим из отдельных клеток, границы которых импрегнируются нитратом серебра и напоминает однослойный плоский эпителий (рис. 1). ЭК имели полигональную форму с сохраняющимися клеточными мембранами в виде септ. Наряду с клетками вытянутыми, веретенообразными с заостренными краями, имелись клетки с закругленными концами. Выявлены также клетки, в которых оказалась окрашена не только цитоплазма, но и ядра в виде шаровидного утолщения контура цитоплазмы.

В дальнейшем было установлено, что на фоне выраженных склеротических изменений венозной стенки эндотелиальный слой претерпевает ряд морфологических изменений. В первую очередь, речь идет о наличии гигантских клеток, специфической реорганизации эндотелиального пласта, его гетерогенности (рис. 2).

Процентное соотношение гигантских клеток в каждом образце из рассмотренных 30 полей зрения на 220 ± 25 нормальной формы клеток составил 14 ± 5 %. В ряде полей зрения выявлены клетки средней величины, контуры которых напоминали «бусины, нанизанные на нить» (межклеточные контакты).

Наблюдалась отчетливая картина выпадения ЭК из монослоя, локальная десквамация эндотелиального слоя (рис. 3). Количество отсутствующих эндотелиальных клеток составило 15 ± 2 % на 210 ± 23 клеток эндотелия.

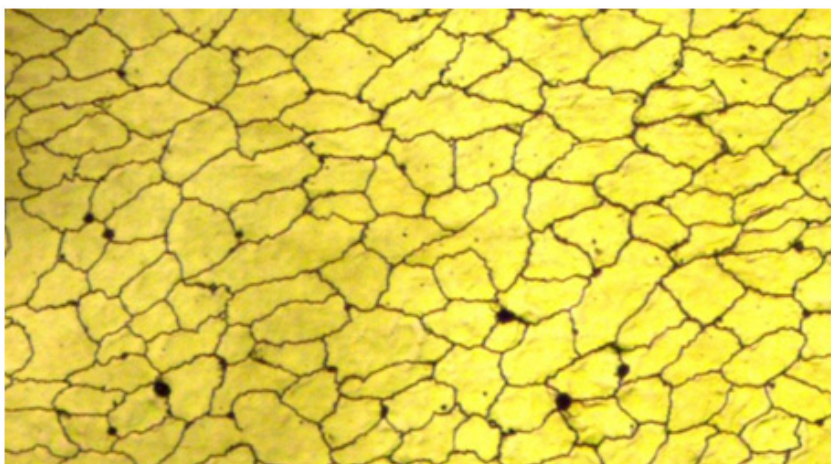
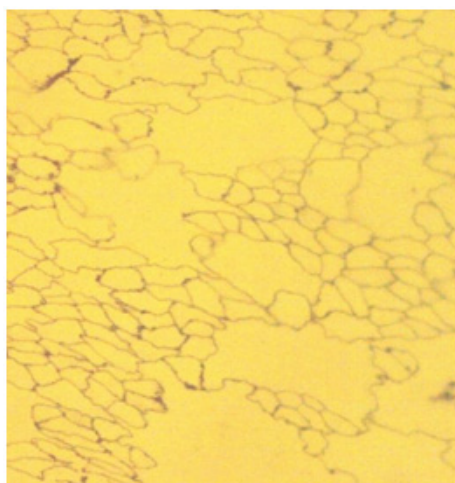
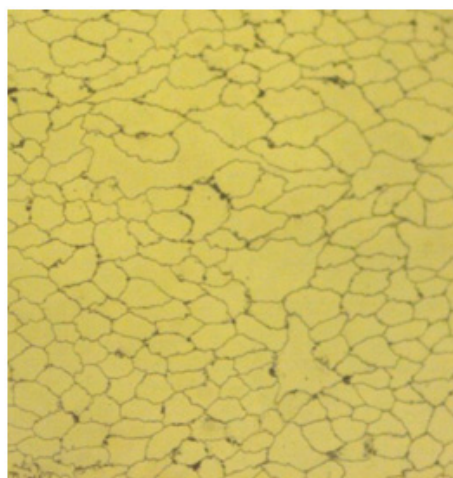


Рис.1. Гистологическая картина венозного эндотелия в норме (ствол БПВ) (окраска нитратом серебра, ув.х100).



А



Б

Рис.2. Гигантские активированные эндотелиальные клетки варикозной вены (окраска нитратом серебра, ув.х100). А – в вариксе; Б –стенка вены.

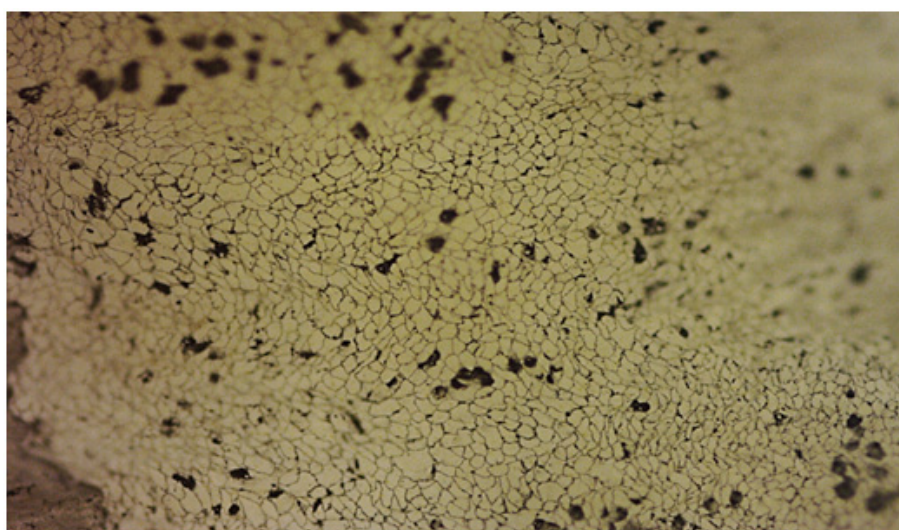
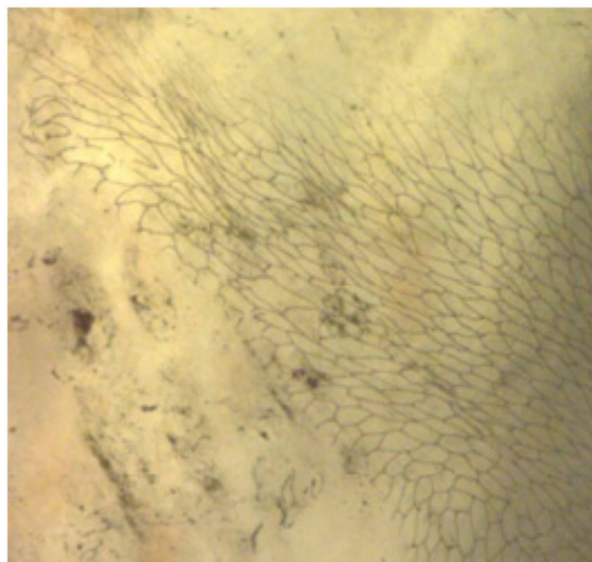


Рис.3. Десквамация эндовенозного эндотелия (окраска нитратом серебра, ув.х100).

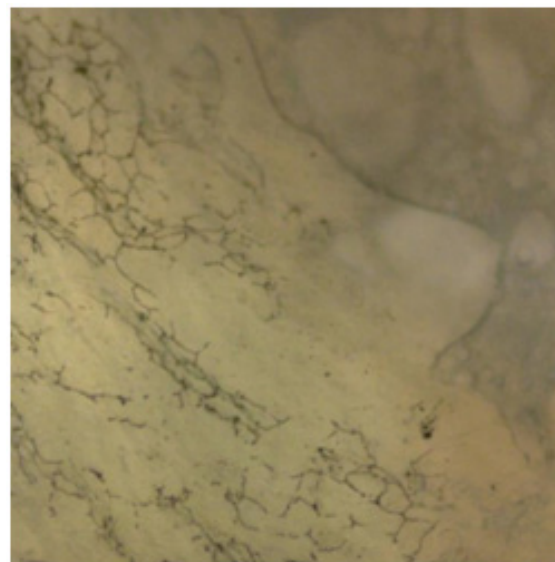


В участках клапана наблюдалась полная десквамация эндотелиального пласта (рис. 4). ЭК, располагающиеся на стенке вен, тот час же за клапанным синусом, имели вете-

ренообразную вытянутую форму, среди них также встречались гигантские клетки (рис. 5).



А



Б

Рис. 4 (А,Б). Эндотелий клапана варикозно расширенной вены (окраска нитратом серебра, ув.х100): А-в венозномклапане, Б-при переходе клапанного синуса на стенку вены.

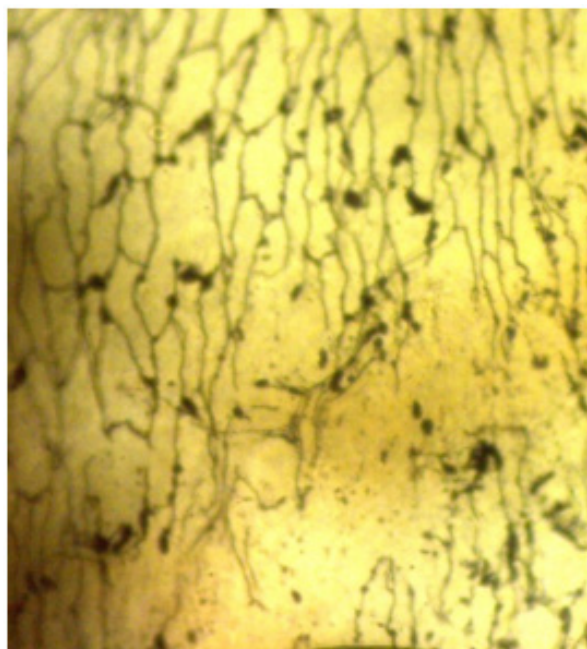


Рис. 5. Веретенообразные ЭК венозной стенки, располагающиеся под клапанным синусом (окраска нитратом серебра, ув.х100).

При исследовании экспрессии молекулы клеточной адгезии VCAM-1 с помощью проточной цитометрии установлено, что контрольные образцы не содержали клеток, экспрессирующих на своей поверхности VCAM-1. При иммуногистохимическом анализе исследуемых

вен, пораженных варикозной болезнью, отмечено появление клеток, экспрессирующих на поверхности VCAM-1. Результаты гистохимического окрашивания были подтверждены методом проточной цитометрии (рис. 6).

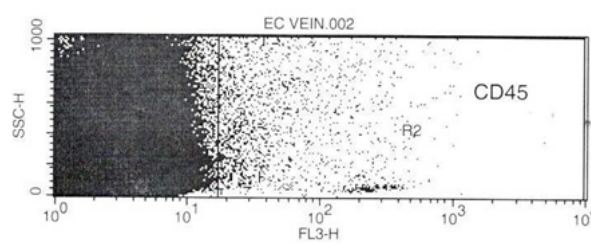
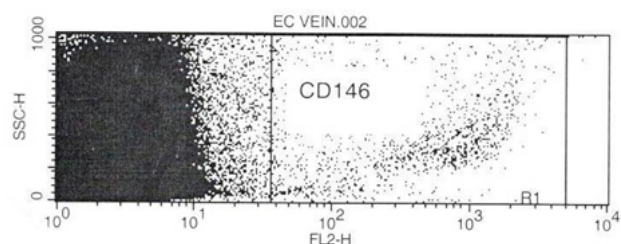


Рис. 6 (А,Б). Результаты проточной цитометрии в варикозной вене.
А- распределение эндотелиоцитов (маркер CD146); Б- распределение лейкоцитов (маркер CD 45).

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

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

Таблица 1

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

Сроки определения маркеров	Группа после хирургического лечения		Контрольная группа
	I подгруппа (ФЭ)	II подгруппа (ЭВЛО)	
ЦЭК, клеток x104/л			
Первичное определение	7.89±2.7**	7,2±2,1**	4,6±1,1*
8-9 сут. после операции	10,8±4,3**	9,6±3,2**	
2 мес. после операции	5,02±1,8**	4,3±0,5**	
VCAM-1, нг/мл			
Первичное определение	367,2±76,2**	357,6±66,3**	249,2±64,8*
8-9 сут. после операции	460,9±74*,**	477,7±77,4*,**	
2 мес. после операции	299,6±83,8*,**	251,8±86,9*,**	
Р-селектин, нг/мл			
Первичное определение	191,9±35,7**	187.7±31.7**	159,9±23,3*
8-9 сут. после операции	179,6±19,9**	179,6±19,9**	
2 мес. после операции	158,9±32,3**	155,3±17,4**	
Е-селектин, нг/мл			
Первичное определение	48,5±10,8**	46,5±9,8**	40,5±10,9*
8-9 сут. после операции	37,8±3,6**	32,1±2,9**	
2 мес. после операции	27,5±4,2**	25,2±3,8**	
t-РА, нг/мл			
Первичное определение	2,9±0,9	2,4±0,8	3,2±1,04*
8-9 сут. после операции	3,3±1,04	2,6±0,3	
2 мес. после операции	4±1,7	4,2±1,1	
Эндотелин-1, fmol/ml			
Первичное определение	1,9±1,24	1,7±1,3	2.27±0.6
8-9 сут. после операции	2,9±0,9	2,8±0,3	
2 мес. после операции	2,53±1,1	2,4±0,7	

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



В послеоперационном периоде (спустя 2 месяца) на фоне консервативной терапии Антистаксом® отмечалось снижение показателя ЦЭК до $5,02 \pm 1,8$ клеток $\times 10^4/\text{л}$ в 1 группе и $4,3 \pm 0,5$ клеток $\times 10^4/\text{л}$ ($M \pm m$) ($p < 0,05$) во II

группе (рис.7). Уровень эндотелинии оказался выше после ФЭ ($p > 0,05$), что можно объяснить несколько большей травматичностью данного оперативного вмешательства

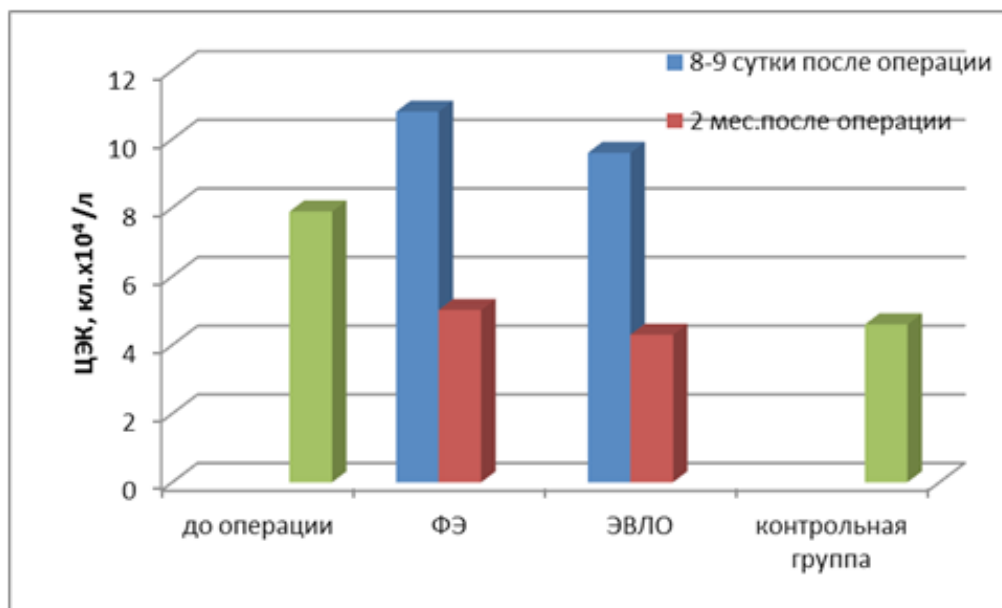


Рис. 7. Динамика ЦЭК у пациентов ($n=92$) ВБВНК в до- и послеоперационном периодах ($p < 0,05$).

Аналогичная картина наблюдалась в обеих группах с концентрацией VCAM-1. При изначально повышенном уровне $367,2 \pm 76,2$ нг/мл ($M \pm m$) в 1 подгруппе и $357,6 \pm 66,3$ нг/мл ($M \pm m$) во 2 подгруппе, после оперативного вмешательства обнаружен выраженный всплеск концентрации VCAM-1. После ФЭ до $460,9 \pm 74$ нг/мл ($M \pm m$) и после ЭВЛО – до $477,7 \pm 77,4$ нг/мл ($M \pm m$). Однако воспалительная реакция оказалась менее выражена после эндоваскулярного вмешательства, о чем

говорят статистически достоверные более низкие показатели VCAM-1.

Спустя 2 месяца после проведенного комплексного лечения, включающего прием флеботропных препаратов (Антистакс®), показатели VCAM-1 в 2-х подгруппах снизились и приблизились к значениям контрольной группы ($p < 0,05$). Следует отметить, что концентрация VCAM-1 у пациентов после ЭВЛО (2 подгруппа) были достоверно ниже ($251,8 \pm 86,9$ нг/мл ($M \pm m$)) (рис. 8).

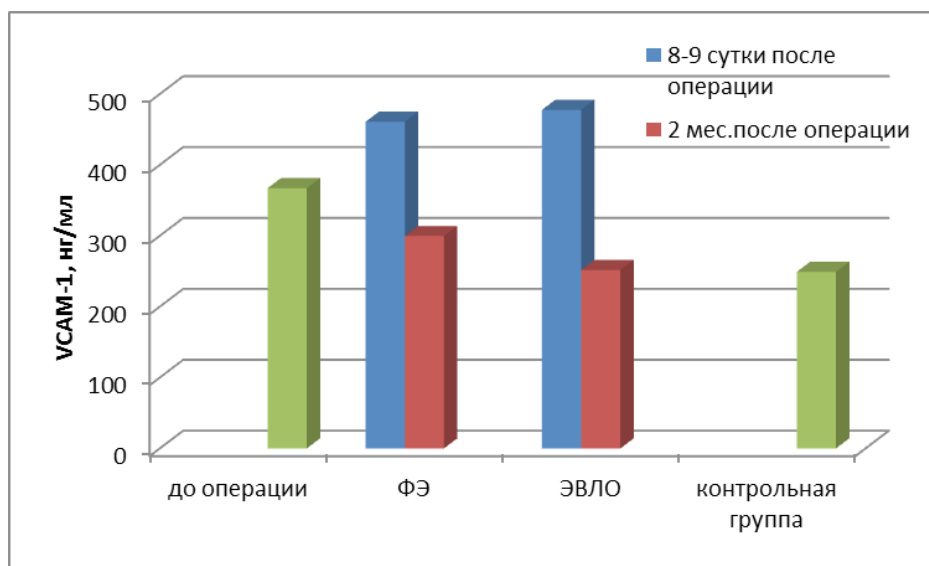


Рис. 8. Динамика концентрации VCAM-1 у пациентов ВБВНК ($n=92$) в до- и послеоперационном периодах ($p < 0,05$).



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

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

У 36 пациентов контрольной группы с сегментарным варикозом без оперативного вмешательства проведено исследование влияния консервативной терапии (Антистакс®) на динамику ЭД, оцениваемую по количеству ЦЭК в периферической крови. Исходно в контрольной группе пациентов этот показатель составил $5,8 \pm 0,71 \times 10^4$ клеток/мл. На фоне приема Антистакса® в течение 3 месяцев в дозировке 360 мг/сутки достоверно ($p < 0,05$) уменьшалось количество ЦЭК. После окончания курса приема этого препарата этот показатель составил $3,4 \pm 0,82 \times 10^4$ клеток/мл, фактически приближаясь к норме. Нормализация показателя ЦЭК сопровождалась выраженным улучшением субъективных ощущений (уменьшение боли, частоты возникновения судорог, тяжести в ногах).

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

Заключение

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

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

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

Флеботропная терапия с использованием Антистакса® снижает проявления ЭД, сопровождается уменьшением количества ЦЭК и уровня биохимических маркеров (VCAM-1, Р- и Е-селектинов) ($p < 0,05$), что является отражением эффективности кверцетина и изокверцетина глюкуронида в лечении ХВН.

Безусловно, многие аспекты патогенеза варикозной трансформации вен остаются до конца невыясненными. Ответы на многие вопросы, а также последующие исследования, посвященные выявлению наиболее веских причин патологических процессов венозной стенки, предшествующих появлению её необратимых изменений, без сомнения, будут способствовать совершенствованию системы профилактики заболеваний вен и повышению качества лечения больных ХВН.

ЛИТЕРАТУРА

1. Покровский А.В., Сапелкин С.В. Хроническая венозная недостаточность нижних конечностей — современные проблемы диагностики, классификации, лечения // *Ангиология и сосудистая хирургия*. - 2003. - Т.9, №1. - С. 53-60.
2. Основы клинической флебологии / Под ред. Ю.Л. Шевченко, Ю.М. Стойко. 2-е изд., испр. и доп. - М.: ЗАО «Шико», 2013. - 336 с.
3. Bergan J.J. The vein book. London, 2007. - 617 p.
4. Шевченко Ю.Л., Стойко Ю.М., Гудымович В.Г. и др. Дисфункция эндотелия у больных варикозной болезнью нижних конечностей и возможности ее коррекции // *Ангиология и сосудистая хирургия*. - 2010. - Т.16, №4. - С. 99-104.
5. Швальб П.Г., Ухов Ю.И. Патология венозного возврата из нижних конечностей. - Рязань, 2009. - 152с.
6. Петрищев Н.Н. Дисфункция эндотелия. Причины, механизмы, фармакологическая коррекция / Н.Н. Петрищев. - СПб.: СПбГМУ, 2003. - 184с.
7. Ciuffetti G., Lombardini R., Pasqualini L., et al. Circulating leucocyte adhesion molecules in chronic venous insufficiency // *Vasa*. - 1999. - Vol. 28, № 3. - P. 156-159.
8. Michiels C., Bouaziz N., Remacle J. Role of the endothelium and blood stasis in the appearance of varicose veins // *Int. Angiol.* - 2002. - Vol.21, №1. - P. 1-8.