

## **Коррекция дисфункции эндотелия у пациентов острым тромбозом глубоких вен нижних конечностей**

*УО «Витебский государственный медицинский университет»*

Проведена оценка эффективности использования в комплексном лечении острого тромбоза глубоких вен нижних конечностей препаратов, восстанавливающих функциональное состояние эндотелия.

В зависимости от проводимого лечения больные были разделены на две группы. В первой группе применялась стандартная схема лечения: антикоагулянты прямого и непрямого действия; антиагреганты; препараты, улучшающие микроциркуляцию; ангиопротекторы. Во второй группе пациентам в комплексную схему лечения были включены препараты L-лизина эсцинат и антиоксидантный комплекс (кислота аскорбиновая - 0,5 г, альфа-токоферола ацетат - 0,2 г, ретинола ацетат - 33 000 МЕ).

Установлено, что применение в комплексном лечении L-лизина эсцината и антиоксидантного комплекса с целью коррекции функционального состояния эндотелия и процессов свободнорадикального окисления является патогенетически обоснованным. Отмечается снижение повышенных показателей перекисного окисления липидов (диеновых конъюгатов в 2,6 раза, малонового диальдегида на 33,7%); нормализация уровней маркеров эндотелиальной дисфункции (восстановление нитратов/нитритов, снижение количества циркулирующих эндотелиоцитов на 53,5%). Также отмечен регресс клинических проявлений заболевания (отек, боли, специфические клинические симптомы) и статистически достоверное снижение объема.

Следовательно, проведенное исследование подтвердило эффективность применения в комплексном лечении пациентов с острым тромбозом глубоких вен нижних конечностей препаратов, восстанавливающих функциональное состояние эндотелия.

Ключевые слова: окислительный стресс, нитрозилирующий стресс, дисфункция эндотелия, венозный тромбоз.

<!--[if Данный XML-элемент]>

<![endif]-->

Высокая частота тромбоза глубоких вен (ТГВ) системы нижней поллой вены, тенденция к росту тяжелых осложнений, нередко являющихся причиной смертности, свидетельствует о недостаточности эффективности существующих лечебных мероприятий, и побуждают к поиску новых патогенетически обоснованных методов лечения [9].

Одним из ключевых звеньев патогенеза острого венозного тромбоза является дисфункция эндотелия (ДЭ). Дисфункция эндотелия – это нарушение баланса между продукцией вазодилатирующих, антитромбогенных, антипролиферативных факторов, с одной стороны, и вазоконстрикторных, протромботических, пролиферативных продуцентов эндотелия – с другой, вызванное действием различных патогенных факторов [10].

В условиях венозного тромбоза при гипоксии может изменяться секреция монооксида азота (NO) и как следствие нарушение инициируемых им реакций со

стороны вен [12, 15]. Повышение уровня NO и свободных радикалов создает условия для гиперпродукции пероксинитрита (ONOO-) и развитию нитрозилирующего стресса, сопровождающегося образованием очень высоких концентраций нитрозотиолов и нитрозоаминов [11]. Показателями, отражающими нитрозилирующий стресс, являются нитрит (NO<sub>2</sub>) и нитрат (NO<sub>3</sub>), которые образуются в водном растворе при разложении NO [4, 13, 14]. В высоких концентрациях ONOO- индуцирует апоптоз, участвует в нитрозировании остатков тирозина в белках, повреждает ДНК, необратимо угнетает тканевое дыхание, инициирует перекисное окисление липидов. Избыточная активация реакций свободнорадикального окисления приводит к образованию свободнорадикальных форм кислорода, что является начальным этапом развития окислительного стресса. В результате накапливаются промежуточные свободнорадикальные формы кислорода и подавляются эндогенные антиоксидантные системы, нейтрализующие свободные радикалы. Образовавшиеся свободнорадикальные формы кислорода воздействуют на фосфолипиды и подвергают их перекисному окислению. В ходе этого окисления образуются свободнорадикальные формы ненасыщенных жирных кислот с повреждающими свойствами и токсичными продуктами окисления (липоперекиси, радикалы жирных кислот, кетоны, альдегиды, кетокислоты). В результате происходит изменение проницаемости мембран, окислительная модификация клеточных структур, что приводит к нарушению, как функции эндотелия, так и гладкомышечных клеток вен [1, 2, 5].

Учитывая современные взгляды на патогенез ТГВ (снижение линейной и объемной скорости кровотока, гиперкоагуляция, дисфункция эндотелия), по-видимому, целесообразно необходимо в комплексное лечение заболевания включать антиоксидантные препараты, восстанавливающие функциональное состояние эндотелия. Исходя из того, что при венозном тромбозе клинические рекомендации по коррекции нитрозилирующего и окислительного стресса отсутствуют, целью настоящей работы являлось проведение оценки эффективности использования в комплексном лечении ТГВ препаратов, обладающих антиоксидантным действием.

#### Материал и методы исследования

В исследование включены 125 пациентов (мужчин-78, женщин-47) с ТГВ нижних конечностей, которые находились на лечении в УЗ «Вторая Витебская областная клиническая больница» в период 2005-2008 гг. Острый илиофemorальный тромбоз выявлен у 34 пациентов, бедренной вены-42, подколенной вены-30, икроножных вен-5, берцовых вен-10, мышечных синусов-4. Правосторонняя локализация выявлена у 70, левосторонняя у 55 пациентов. Средний возраст пациентов варьировал от 18 до 86 лет и составлял  $53,6 \pm 14,2$  года ( $M \pm \sigma$ ). В зависимости от проводимого лечения больные были разделены на две группы. Рандомизация проводилась методом «конвертов». Контрольную группу составили 95 пациентов, которым применялась стандартная схема лечения: антикоагулянты прямого и непрямого действия; антиагреганты; препараты, улучшающие микроциркуляцию (пентоксифиллин); ангиопротекторы. В основную группу вошли 30 пациентов, в комплексную схему лечения были включены препараты L-лизина эсцинат и антиоксидантный комплекс. Прием L-лизина эсцинат осуществлялся по следующей схеме: 0,1% - 5 мл препарата вводили внутривенно в разведении 50 мл 0,9% раствора хлорида натрия в течение 5-7 дней. Прием антиоксидантного комплекса (кислота

аскорбиновая – 0,5 г, альфа-токоферола ацетат – 0,2 г, ретинола ацетат – 33 000 МЕ) осуществлялся по следующей схеме: по 2 дозы в течение 5-7 дней внутрь.

В венозной крови определяли число ЦЭК. С этой целью использовали метод Hladovec J. et al. (1978) [16]. 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 помощи светового микроскопа ( $\times 200$ ) (рис. 1).

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 [6]. Диеновые конъюгаты в плазме крови определяли по методу Гаврилова В.Б. и соавт. [3] после экстракции гептаноизопропиловой смесью 1:3. Далее надосадочную жидкость измеряли спектрофотометрически при длине волны 232 нм дейтериевой лампой. Малоновый диальдегид определяли по методу Стального И.Д., Гаришвили Т.Г. [8] в модификации Андреевой Л.И. и соавт. [7] при помощи 0,6% тиобарбитуровой кислоты.

Оценка клинической эффективности лечения проводилась по выраженности субъективных ощущений: болевого синдрома, ощущение отечности, тяжести, дискомфорта, специфических симптомов (Хоманса, Мозеса). С этой целью использовали визуальную аналоговую шкалу (ВАШ) в баллах: 0 – отсутствие жалоб, 2 – умеренная степень выраженности симптома, 4 – значительная степень выраженности симптома (не влияющая на обычную активность и сон), 6 – выраженное проявление симптома (влияющее на активность и сон). Эффективность лечения оценивалась врачом и пациентом. С этой целью больной заполнял анкету перед включением в исследование и по его окончании.

Динамику отечного синдрома оценивали путем измерения окружности нижней конечности с помощью градуированной ленты на различных уровнях голени и бедра. Вычисление объема конечности проводили по формуле Kalas (объем конечности равен сумме квадратов длин окружностей, измеренных на разных уровнях нижней конечности). Также с целью измерения объема конечности применяли иммерсионную волюметрию. Для этого использовали прибор для измерения уровня подъема подкрашенной воды в специальном контейнере, куда помещалась конечность (до нижней трети бедра) пациента [5]. Измерения проводили утром в одно и то же время. Для оценки степени эффективности проводимого лечения определяли разность объема вытесненной жидкости перед проведением лечения и по его окончании.

Диагноз тромбоза глубоких вен у пациентов подтверждался при проведении дуплексного ультразвукового ангиосканирования, которое осуществлялось с помощью ультразвукового сканера “Logiq-500 Pro” (General Electric, США) с конвексным датчиком 5 МГц и линейным датчиком 11 МГц.

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

## Результаты

В группе пациентов с ТГВ, которым в комплексном лечении использовались препараты L-лизина эсцинат и антиоксидантный комплекс, отмечалось снижение ЦЭК ( $p < 0,05$ ) (табл. 1).

Таблица-1. Сравнительная характеристика количества циркулирующих эндотелиоцитов при проведении стандартного лечения и с применением препаратов L-лизина эсцинат и антиоксидантного комплекса.

Показатели	1. Группа пациентов до лечения (n=125) $M \pm \sigma$	2. Опытная группа №1 с проведением стандартного лечения (n=95) $M \pm \sigma$	3. Опытная группа №2 с применением препаратов L-лизина эсцинат и антиоксидантного комплекса (n=30) $M \pm \sigma$
ЦЭК, кл/100мкл $M \pm \sigma$	39,8±10,3	32±8,7	23,6±4,31

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

У пациентов опытной группы №1 получавших стандартное лечение содержание NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>, концентрация МДА не отличались от показателей в группе пациентов до лечения. Содержание ДК снизилось на 46,6% и составило 109,2±12,6 нМ/г липидов, что статистически отличалось от показателей в группе пациентов до лечения (табл. 2).

Следовательно, применение стандартного лечения не оказывало воздействия на показатели нитрозирующего стресса и мало влияло на выраженность окислительного стресса и состояние эндотелия.

Таблица-2. Сравнительная характеристика показателей окислительного и нитрозирующего стресса при проведении стандартного лечения и с применением препаратов L-лизина эсцинат и антиоксидантного комплекса.

Показатели	1. Группа пациентов до лечения (n=125) $M \pm \sigma$	2. Опытная группа №1 с проведением стандартного лечения (n=95) $M \pm \sigma$	3. Опытная группа №2 с применением препаратов L-лизина эсцинат и антиоксидантного комплекса (n=30) $M \pm \sigma$
Нитраты/ нитриты мкМ/л $M \pm \sigma$	48,1±9,1	39,6±5,9	32,4±4,41

МДА нМ/г белка плазмы M±σ	102,4±19,6	86,4±16,2	67,9±12,11
ДК нМ/г липидов M±σ	200,6±43,1	109,2±12,61,3	77,1±10,2

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

После применения препаратов L-лизина эсцинат и антиоксидантного комплекса у пациентов второй группы наблюдались статистически значимые позитивные изменения показателей окислительного и нитрозилирующего стресса. Отмечалось снижение содержания продуктов деградации монооксида азота - NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> на 32,7%, уменьшение концентрации МДА и ДК на 33,7% и в 2,6 раза соответственно. Об улучшении состояния эндотелия при применении данной схемы лечения свидетельствовало снижение количества ЦЭК на 40,7%.

Следовательно, применение препаратов L-лизина эсцинат и антиоксидантного комплекса приводило к снижению количества ЦЭК, NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub>, уменьшению концентрации МДА и ДК.

Таким образом, включение в схему лечения пациентов с острым тромбозом глубоких вен нижних конечностей препаратов L-лизина эсцинат и антиоксидантного комплекса может быть значимым в отношении нормализации функционального состояния венозного эндотелия.

При оценке клинической эффективности с применением препаратов L-лизина эсцинат и антиоксидантного комплекса путем бальной оценки симптомов наблюдалось достоверное снижение интенсивности проявлений ТГВ. Динамика изменений выраженности болевого синдрома, ощущение отечности, тяжести, дискомфорта и специфических симптомов (Хоманса, Мозеса, Ловенберга) после применения в комплексном лечении препаратов L-лизина эсцинат и антиоксидантного комплекса отличались в оцениваемых группах наблюдения ( $p < 0,05$ ) (табл. 3).

Преобладающими субъективными симптомами по частоте встречаемости были ощущение отечности (5,3±1,2 балла), боли (4,8±1,2 балла). Данные жалобы выявлялись практически у всех пациентов. После проведения курса консервативного лечения у большинства больных отмечалась положительная динамика. При сравнении средних показателей в исследуемых группах по шкале ВАШ в группе №2 отмечалось снижение ощущение отечности на 60,4%, а в группе №1 на 41,5% ( $p < 0,05$ ). Также отмечалось снижение интенсивности болевого синдрома в группе №2 на 62,5%, а в группе №1 на 37,5% ( $p < 0,05$ ).

При сравнении показателей в исследуемых группах интенсивности ощущения тяжести и дискомфорта отмечалось более выраженное снижение во второй группе на 58,5% и 47,1% ( $p < 0,05$ ).

Таблица-3. Сравнительная характеристика динамики клинических проявлений до и после лечения в исследуемых группах.

Клинические симптомы	1. Группа пациентов до лечения (n=125) по шкале ВАШ (в баллах) M±σ	2. Опытная группа №1 с проведением стандартного лечения (n=95) по шкале ВАШ (в баллах) M±σ	3. Опытная группа №2 с применением препаратов L-лизина эсцинат и антиоксидантного комплекса (n=30) по шкале ВАШ (в баллах) M±σ
Боль	4,8±1,4	3,0±1,3	1,8±0,71,2
Ощущение отечности	5,3±1,4	3,1±1,1	2,1±0,81,2
Тяжесть	4,1±1,2	2,6±0,9	1,7±0,61
Дискомфорт	3,4±1,2	3,1±0,9	1,8±0,41,2

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

Объективным показателем эффективности лечения служил объем нижней конечности, который достоверно ( $p < 0,01$ ) был ниже в группе пациентов, которым в комплексное лечение были включены препараты L-лизина эсцинат и антиоксидантный комплекс. Отмечалась достоверная разница в уменьшении окружности нижней конечности в двух группах наблюдения к 7-м суткам после начала лечения и уменьшение объема вытесненной жидкости. Во второй группе отмечалось снижение объема нижней конечности на 7,3%, а в первой на 3,1% ( $p < 0,01$ ).

Следовательно, применение препаратов L-лизина эсцинат и антиоксидантного комплекса в схеме лечения пациентов с острым тромбозом глубоких вен нижних конечностей позволяет уменьшить выраженность клинических симптомов заболевания.

#### Обсуждение

При ТГВ развивается дисфункция эндотелия, которая характеризуется увеличением количества ЦЭК в периферической крови, развитием окислительного и нитрозилирующего стресса, характеризующихся увеличением образования продуктов деградации монооксида азота, концентрации МДА и ДК [4]. Повышение секреции монооксида азота (NO) в условиях острой гипоксии характерной для ТГВ приводит к нарушению поддержания прооксидантно-антиоксидантного равновесия в крови. Дисфункция эндотелия развивается под влиянием активации свободнорадикальных процессов, в частности перекисного окисления липидов.

Следовательно, при ТГВ патогенетически обоснованным является применение в комплексном лечении препаратов, оказывающих влияние на состояние венозного эндотелия, окислительный и нитрозилирующий стресс.

Использование традиционного комплекса препаратов в лечении больных с ТГВ не вызывало нормализации состояния эндотелия, не оказывало воздействия на показатели нитрозилирующего стресса и мало влияло на показатели окислительного стресса. Сочетанное использование препаратов L-лизина эсцинат и антиоксидантного комплекса позволяют улучшить состояние эндотелия, что подтверждалось в

исследовании значительным снижением количества ЦЭК ( $p < 0,05$ ), содержания  $NO_2/NO_3$  и концентрации МДА и ДК.

Указанное сочетание препаратов обладает антиоксидантным (повышение уровня каталазы, снижение уровня малонового диальдегида и диеновых конъюгатов, снижение количества свободных радикалов), мембраностабилизирующим действием (сохранение текучести мембран, протекция фосфолипидов от окисления), а также оказывает ингибирующее влияние на выраженность нитрозилирующего стресса (снижение синтеза молекул  $NO$ ), что, по-видимому, приводит к восстановлению функционального состояния эндотелия.

Оценка клинической эффективности действия препаратов L-лизина эсцинат и антиоксидантного комплекса показала более выраженное снижение субъективных симптомов (боль, ощущение отечности, тяжести, дискомфорта и специфических симптомов) в группе больных получавших данное лечение. Изучение объективного показателя клинической эффективности лечения – объема нижней конечности позволило выявить достоверную разницу уменьшения окружности и снижение её объема в группе пациентов, которым в комплексное лечение были включены препараты L-лизина эсцинат и антиоксидантный комплекс. Клиническая эффективность может быть связана с тем, что препараты обладают многокомпонентным действием, объединяющих в себе эндотелиопротективный, антиоксидантный, противовоспалительный и противиотечный эффекты. Это приводит к угнетению экссудативной стадии воспаления, повышению резистентности сосудов и создает вено-tonизирующий эффект. Восстановление венозного тонуса вызывает ускорение линейной и объемной скорости кровотока и как следствие приводит к улучшению дренажной функции и к снижению отека. Это позволяет рано активизировать пациентов, что способствует более быстрому восстановлению больных с венозным тромбозом.

Следовательно, результаты исследования показали, что включение в схему лечения пациентов с ТГВ препаратов L-лизина эсцинат и антиоксидантного комплекса является патогенетически обоснованным. Это позволяет оказывать корригирующее действие на одно из важных звеньев патогенеза заболевания – функциональное состояние венозного эндотелия, окислительный и нитрозилирующий стресс, поскольку позволяет повысить эффективность лечения.

Таким образом, проведенная оценка результатов лечения пациентов с ТГВ показала, что использование препаратов L-лизина эсцинат и антиоксидантного комплекса способствует улучшению результатов лечения. Хорошая переносимость препаратов L-лизина эсцината и антиоксидантного комплекса позволяют рекомендовать данные препараты для более широкого применения во флебологии и включения в комплексную схему консервативного лечения ТГВ.

#### Выводы

1. Назначение пациентам с острым тромбозом глубоких вен нижних конечностей препаратов L-лизина эсцинат и антиоксидантного комплекса является патогенетически обоснованным, так как способствует снижению в периферической крови количества циркулирующих эндотелиоцитов, показателей окислительного стресса – малонового диальдегида и диеновых конъюгатов, показателей нитрозилирующего стресса – нитратов/нитритов.

2. Применение в комплексной схеме лечения препаратов, восстанавливающих функциональное состояние эндотелия, приводит к достоверно большему регрессу

субъективных клинических симптомов у пациентов с острым тромбозом глубоких вен нижних конечностей.

#### Литература

1. Арутюнян, А. В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма / А. В. Арутюнян, Е. Е. Дубинина, Н. А. Зыбина. СПб.: ИКФ «Фолиант», 2000. 140 с.
2. Владимиров, Ю. А. Свободные радикалы в биологических системах / Соросовский обзорный журнал. 2000. Т. 6. № 12. С. 13–19.
3. 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. 1988. № 2. С. 60–64.
4. Дисфункция эндотелия при острой и хронической венозной недостаточности Ю. С. Небылицин [и др.] // Новости хирургии. 2008. № 4. С. 141–153.
5. Дубинина, Е. Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состоянии окислительного стресса / Е. Е. Дубинина // Вопросы медицинской химии. 2001. Т. 47. № 6. С. 561–581.
6. Модифицированный метод определения NO<sub>3</sub> и NO<sub>2</sub> с помощью цинковой пыли в присутствии аммиачного комплекса сульфата меди / И. С. Веремей [и др.] // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования: сб. тр. республиканской научно-практической конференции / Витебск. гос. мед. ун-т. Витебск, 2000. С. 112–115.
7. Модификация метода определения перекисей липидов с тиобарбитуровой кислотой / Л. И. Андреева [и др.] // Лабораторное дело. 1988. № 11. С. 41–43.
8. Стальной, Д. М. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / Д. М. Стальной, Т. Г. Гаришвили // Современные методы биохимии / В. Н. Орехович; под ред. В. Н. Ореховича. М.: Медицина, 1977. С. 66–68.
9. Флебология: руководство для врачей / В. С. Савельев [и др.]; под ред. В. С. Савельева. М.: Медицина, 2001. 664 с.
10. Шебеко, В. И. Эндотелий и система комплемента. Витебск: ВГМУ, 1999. 149 с.
11. Эндотелий, ауторегуляция коронарных сосудов и стресс / А. П. Солодков [и др.] // Вестник ФФИ. 2005. № 1. С. 79–95.
12. Beckman, J.S. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly / J.S. Beckman, W.H. Koppenol // Am.J.Physiol. 1996. Vol. 40. P. 1424–1437.
13. Brown, G.C. Nitric oxide and mitochondrial respiration / G.C. Brown // Biochim.Biophys.Acta. 1999. Vol. 1411. P. 351–369.
14. Cassina, A. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport / A. Cassina, R. Radi // Arch. Biochem. Biophys. 1996. Vol. 328. P. 309–316.
15. Crow, J.P. The importance of superoxide in nitric oxide-dependent toxicity / J.P. Crow, J.S. Beckman // Adv.Exp.Med.Biol. 1996. Vol. 387. P. 147–161.
16. Hladovec, J. Circulating endothelial cells as a sign of vessels wall lesions / J. Hladovec // Physiologia bohemoslovaca. 1978. Vol. 27. P. 400.