

---

**ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

---

© Небылицин Ю.С., Сушков С.А., Козловский В.И., 2014  
УДК:616.1.001.73

**ВНУТРИСОСУДИСТЫЙ ГОМЕОСТАЗ  
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ВЕНОЗНОМ ТРОМБОЗЕ**

Ю.С. НЕБЫЛИЦИН, С.А. СУШКОВ, В.И. КОЗЛОВСКИЙ

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,  
г. Витебск, Республика Беларусь

---

**INTRAVASCULAR HOMEOSTASIS STATE IN CASE  
OF EXPERIMENTAL VENOUS THROMBOSIS**

YU.S. NEBYLITSIN, S.A. SUSHKOV, V.I. KOZLOVSKY

Vitebsk state medical university, Vitebsk

Установлено, что наиболее значительное снижение деформируемости эритроцитов (ДЭ) на 76,8% отмечалось в первые сутки после моделирования венозного тромбоза. На 5-е сутки ДЭ была ниже на 36,7%, чем в контроле, но выше, чем в первые сутки после введения тромбина на 29,3%. На 15-е сутки ДЭ оказалась снижена на 16,7% по сравнению со значениями в контрольной группе. В первые сутки экспериментального венозного тромбоза отмечалось увеличение числа циркулирующих эндотелиоцитов (ЦЭК) на 40,7%, по сравнению с контролем. На 5-е сутки выявлялось также возрастание числа ЦЭК на 18,4% по сравнению с контрольными значениями, но ниже, чем в первые сутки на 15,2%. На 15-е сутки количество ЦЭК возвращалось к значениям, обнаруженным в контрольной группе. Содержание нитратов/нитритов через сутки после введения тромбина снижалось на 8,9%, а на 5-е сутки статистически не отличалось от показателей в контрольной группе. На 15 сутки со-

держание нитратов/нитритов оказалось выше на 16,7%, чем в контроле. Концентрация диеновых конъюгатов (ДК) в первые и пятые сутки моделирования венозного тромбоза возросла в 2,4 и в 2,8 раза соответственно. На 15-е сутки после введения тромбина концентрация ДК оказалась выше на 77,5%, по сравнению со значениями, обнаруженными в контрольной группе.

Следовательно, острый венозный тромбоз сопровождается снижением ДЭ, содержания нитратов/нитритов в плазме, возрастанием числа ЦЭК и концентрации ДК.

Таким образом, обоснована рациональность применения деформируемости эритроцитов, циркулирующих эндотелиоцитов и диеновых конъюгатов в комплексном обследовании при остром тромбозе глубоких вен.

*Ключевые слова:* окислительный стресс, деформируемость эритроцитов, венозный тромбоз.

---

The most significant 76,8% decrease in the erythrocytes deformity was established to occur in the first day after venous thrombosis simulation. In the fifth day, the erythrocytes deformity was 36,7% lower than in the control group, but 29, 3% higher than in the first day after thrombin introduction. In the fifteenth day the erythrocytes deformity decreased by 16,7% in comparison with the indexes in the control group. In the first day of the experimental venous thrombosis, an increase by 40, 7% in the circulating endotheliocytes number was marked in comparison with the control. In the fifth day there was an increase of the circulating endotheliocytes number in comparison with the control indexes, but the number was 15,2% lower than in the first day. In the fifteenth day the circulating endotheliocytes number became the same as in the control group. The content of nitrates/nitrites after thrombin introduction decreased by 8,9%, and in the fifth day it wasn't statistically different from the indexes in the control group. In the fifteenth day the nitrates/nitrites content appeared to be 16,7% higher than in the control group. Dienal conjugates (DC) concentration in the first and fifth days of the venous thrombosis simulation has 2,4 and 2,8 times increased. In the fifteenth day after thrombin introduction DC was 77,5% higher in comparison with the indexes in the control group. Consequently, acute venous thrombosis is accompanied by the erythrocytes deformity decrease, nitrates/nitrites presence in the plasma and by an increase of the circulating endotheliocytes number and DC concentration.

**Thus, rationality of the erythrocytes deformity, circulating endotheliocytes and dienal conjugates application is grounded in the complex examination in case of acute deep veins thrombosis.**

*Keywords: oxidation stress, erythrocytes deformity, venous thrombosis.*

### **Введение**

Тромбоз глубоких вен (ТГВ) нижних конечностей и связанная с ним тромбоэмболия легочной артерии представляют серьезную проблему современного здравоохранения, являясь одной из основных причин летальности в большинстве развитых стран, а также нередко тяжелой инвалидизации пациентов [8, 9, 10]. Поэтому все исследования направленные на изучение вопросов этиологии, патогенеза и лечения данной патологии представляются актуальными.

В основе развития ТГВ лежит «тромботическая триада», сформулированная в 1856 году немецким патологом Рудольфом Вирховым: замедление кровотока, нарушение целостности сосудистой стенки, повышение способности крови к свертыванию. В настоящее время представления о механизмах тромбообразования расширились, но по своей сути они остались прежними, лишь приобретя современные названия: снижение объемной и линейной скорости кровотока, гиперкоагуляция, повреждение эндотелия.

При ТГВ в условиях гипоксии венозной стенки изменяются показатели кислородтранспортной функции крови

[13, 14], процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) [7, 8], антиоксидантной системы, реологические свойства крови [1], в частности деформируемость и агрегация эритроцитов [13, 14]. Важная роль в поддержании внутрисосудистого гомеостаза принадлежит эндотелию, чья функциональная активность изменяется в условиях кислородной недостаточности при венозном тромбозе [6, 7]. От деформируемости зависит способность эритроцитов поддерживать кровоток в микроциркуляторном русле и обеспечивать доставку тканям кислорода [11, 15]. Повышение вязкости может наблюдаться при изменении метаболических процессов в эритроцитах и в целом всего организма [3]. В возникновении нарушения кислородного обеспечения при ТГВ важная роль принадлежит не только кислородсвязующим свойствам крови, но также и активации свободнорадикальных реакций. Следовательно, все рассмотренные показатели в условиях развития гипоксии при венозном тромбозе могут тесно взаимодействовать на этапе нарушения его стабильности и требуют изучения. Поэтому исследование деформируемости эритроцитов (ДЭ), циркулирующих эндотелиальных кле-

ток (ЦЭК), продуктов деградации монооксида азота ( $\text{NO}_2/\text{NO}_3$ ) и диеновых конъюгатов (ДК) при остром тромбозе глубоких вен нижних конечностей является актуальным.

#### **Цель исследования**

Изучение изменений деформируемости эритроцитов, активности окислительного стресса и их взаимосвязи с выраженностью дисфункции эндотелия в условиях экспериментального моделирования венозного тромбоза.

#### **Материалы и методы**

Эксперимент выполнен на 125 беспородных крысах самцах массой 300-350 г (контрольная группа 63 здоровые крысы). После определения пульсации подвздошной артерии в месте её проекции производили разрез кожи и подкожной клетчатки длиной 4-5 см. Путём тупого разъединения мышц находили сосудисто-нервный пучок, выделяли в нём подвздошную вену и перевязывали её. Тромбоз в эксперименте воспроизводили путем введения 0,3 мл подогретого до 37-37,5°C раствора тромбина (40 ЕД/кг). Рану послойно ушивали. После выведения из наркоза экспериментальное животное помещалось в виварий, где проводилось наблюдение.

Кровь для исследования у экспериментальных животных получали из орбитальной вены на 1, 5 и 15 сутки после операции. В качестве кон-

троля исследовалась кровь 63 здоровых беспородных крыс.

В венозной крови определяли деформируемость эритроцитов. Метод определения деформируемости эритроцитов основан на регистрации скорости прохождения суспензии эритроцитов через сетчатые фильтры. Использовался сетчатый бумажный фильтр ТУ 6-09-1706-82. Выделение эритроцитов производили путем центрифугирования при 2000 об/мин, в течение 10 мин. Отделившуюся плазму удаляли. Из полученного осадка эритроцитов производили забор необходимого количества и добавляли фосфатный буферный раствор ( $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) с pH 7,4 в объеме в 10 раз превосходящем объем осадка [4]. При определении влияния плазмы крови в качестве суспензионной среды использовалась бестромбоцитарная плазма. Количество ЦЭК определяли по методу J. Hladovec et al. (1978) [12], содержание ДК в плазме крови определяли по методу Гаврилова В.Б. и соавт. [2]. Содержание стабильных продуктов деградации монооксида азота в плазме крови определяли по методу Грисса. Конверсию нитратов в нитриты осуществляли цинковой пылью, обработанной аммиачным комплексом сульфата меди, которую добавляли в пробирку с исследуемой плазмой [5].

В течение исследования ни одно из опытных животных не погибло.

Цифровой материал обрабатывали статистически с использованием стандартных пакетов прикладных программ Statistica 6,0. В зависимости от характера полученных данных использовались параметрические и непараметрические статистические методы. Сравнение выборок при распределении, отличающемся от нормального, проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна-

Уитни. Для оценки корреляционной связи применялся ранговый коэффициент корреляции Spearman.

### Результаты и их обсуждение

При исследовании реологических свойств в венозной крови крыс среднее по контрольной группе значение показателя деформируемости отмытых эритроцитов оказалось равным  $36,52 \pm 1,23$  сек ( $n=19$ ,  $M \pm m$ ) (рис. 1).

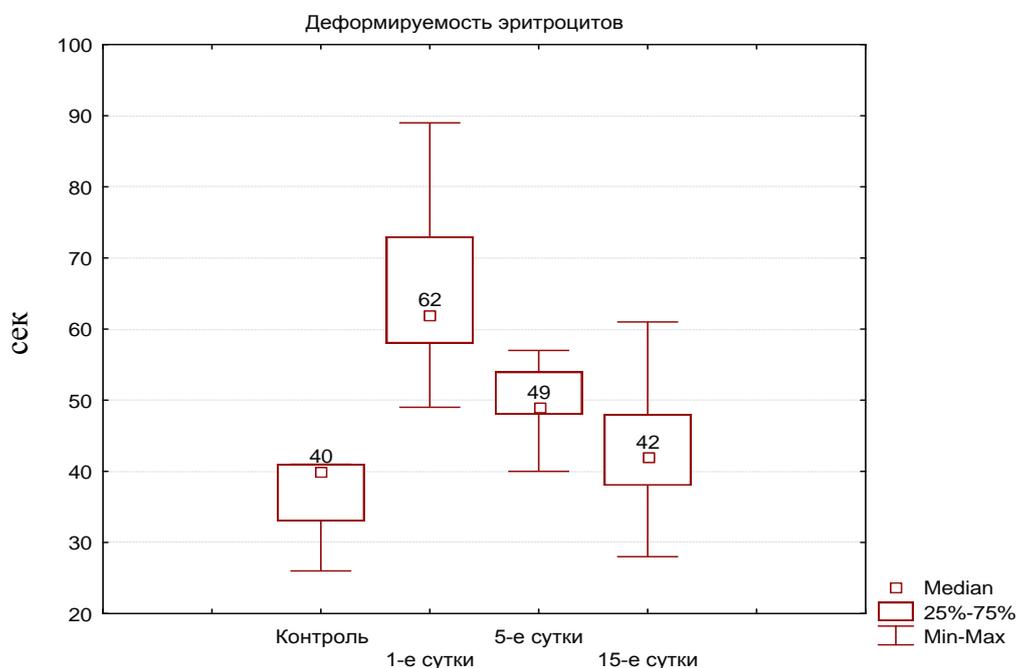


Рис. 1. Деформируемость эритроцитов у экспериментальных животных (при исследовании в буферном растворе)

В первые сутки после моделирования экспериментального венозного тромбоза определялось наиболее значительное снижение ДЭ на 76,8% ( $p < 0,001$ ) и составляла  $64,57 \pm 2,46$  сек.

На 5-е сутки ДЭ была ниже на 36,7%, чем в контроле ( $p < 0,001$ ), но выше, чем в первые сутки после моделирования тромбоза на 29,3% и равнялась  $49,94 \pm 1,01$  сек. На 15-е сутки ДЭ ока-

залась снижена на 16,7% ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем и составляла  $42,63 \pm 1,71$  сек.

При исследовании реологических свойств в венозной крови крыс среднее по контрольной группе значение показателя ДЭ в плазме составило  $65,53 \pm 1,16$  сек ( $n=19$ ,  $M \pm m$ ) (рис. 2).

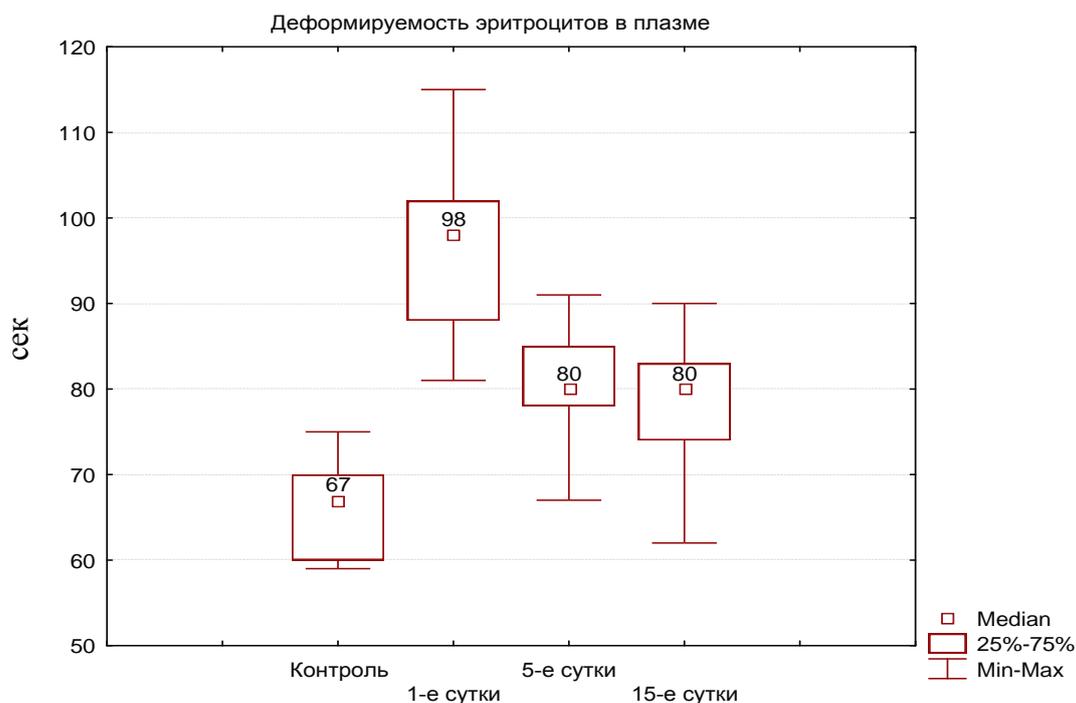


Рис. 2. Деформируемость эритроцитов у экспериментальных животных (при исследовании в плазме)

В первые сутки после моделирования венозного тромбоза в эксперименте при определении влияния плазмы крови ДЭ оказалось снижена на 47,9% ( $p < 0,001$ ) и составила  $96,94 \pm 2,2$  сек. На 5-е и 15-е сутки ДЭ была ниже, чем в контрольной группе на 22,9% ( $p < 0,001$ ) и 19,8% ( $p < 0,001$ ), но повысилась по сравнению со значениями, обнаруженными в первые сутки после

моделирования тромбоза на 16,9% и 19% и равнялась  $80,52 \pm 1,41$  сек и  $78,52 \pm 1,54$  соответственно.

Следовательно, при венозном тромбозе наблюдается снижение деформируемости эритроцитов.

Таким образом, проведенные исследования показали, что при моделировании экспериментального тромбоза изменяются реологические свой-

ства крови, в частности деформируемость эритроцитов, что может приводить к нарушению микроциркуляции.

В венозной крови крыс контрольной группы концентрация ДК составляла  $108,96 \pm 7,84$  нМ/г липидов ( $n=13$ ,

$M \pm m$ ) (рис. 3), содержание  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  оказалось равным  $37,31 \pm 1,99$  ( $n=15$ ,  $M \pm m$ ) (рис. 4), количество ЦЭК составило  $28,63 \pm 0,82$  клеток/100 мкл ( $n=30$ ,  $M \pm m$ ) (рис. 5).

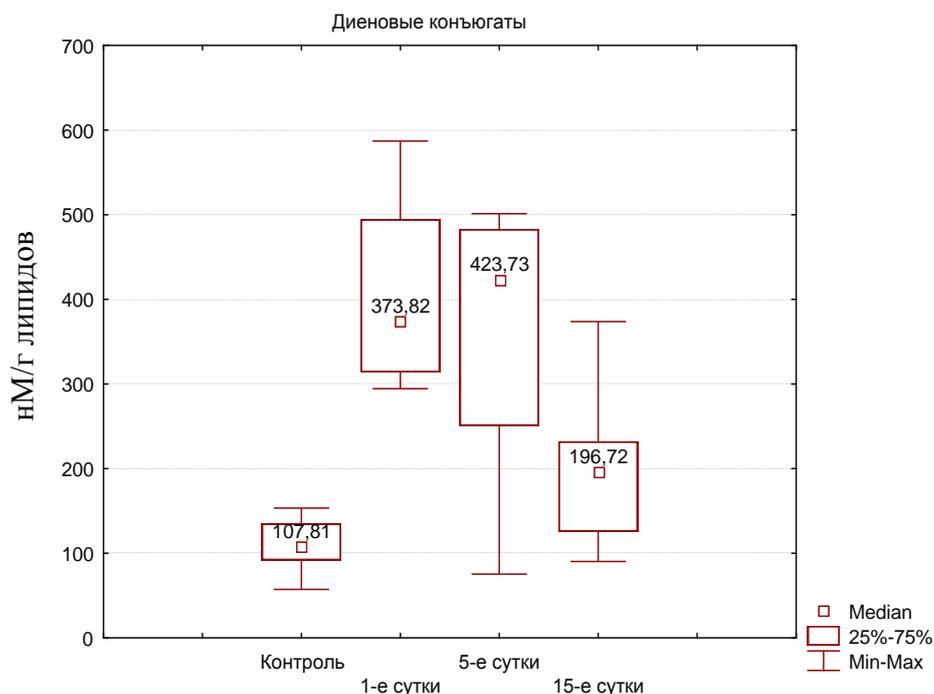


Рис. 3. Содержание диеновых конъюгатов в венозной крови у экспериментальных животных

В первые сутки экспериментального тромбоза концентрация ДК возросла в 2,6 раза ( $p < 0,001$ ) по сравнению с контролем и равнялась  $399,64 \pm 28,49$  нМ/г липидов. Статистической значимости различий концентраций ДК на 1-е и 5-е сутки после моделирования венозного тромбоза не было ( $p < 0,001$ ). На 15-е сутки после введения тромбина концентрация ДК

возрастала на 77,5%, по сравнению со значениями обнаруженными в контрольной группе и составляла  $193,39 \pm 20,52$  нМ/г липидов ( $p < 0,05$ ).

Содержание  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  в первые сутки экспериментального венозного тромбоза снижалось на 8,9%, и составляло  $33,96 \pm 1,99$  мкМ/л. Через 5 суток содержание  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  статистически не отличалось от показателей в

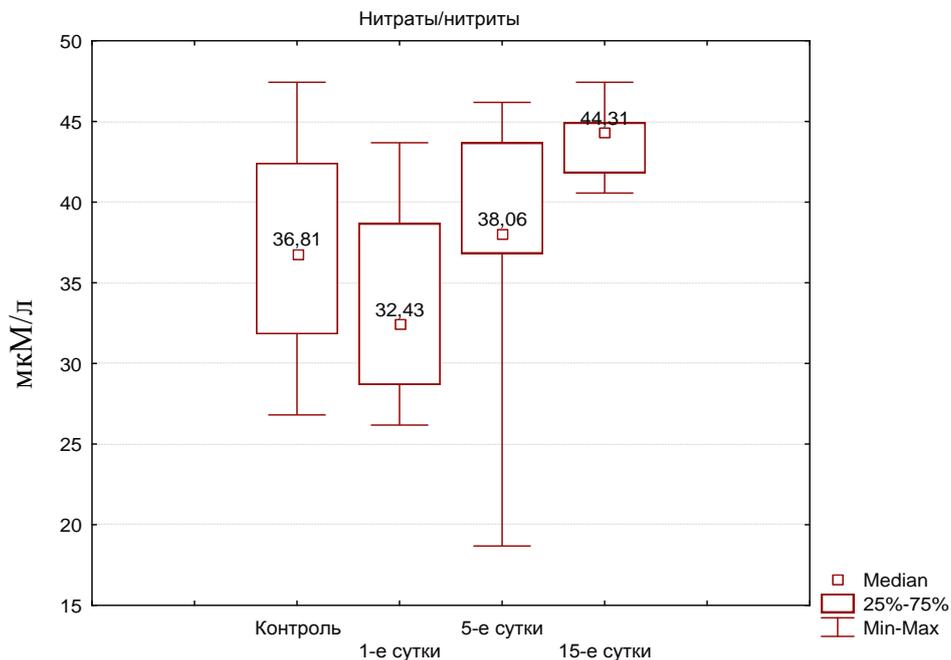


Рис. 4. Содержание нитратов/нитритов в венозной крови у экспериментальных животных

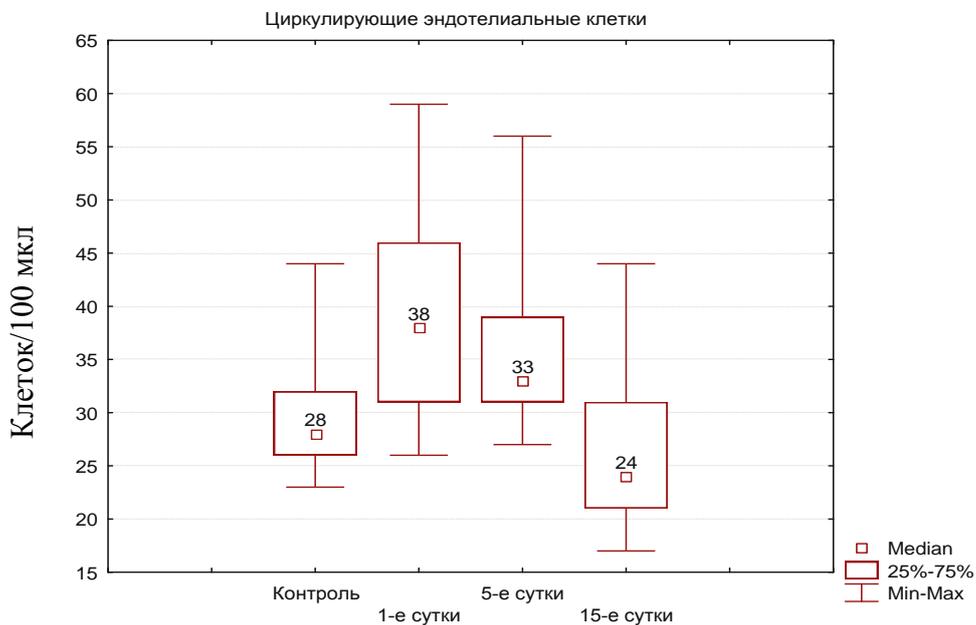


Рис. 5. Содержание циркулирующих эндотелиоцитов в венозной крови у экспериментальных животных

контрольной группе, но повышалось на 7,2% по сравнению со значениями в 1-е сутки после введения тромбина и равнялось  $36,39 \pm 2,41$  мкМ/л. На 15 сутки экспериментального моделирования венозного тромбоза содержание  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  оказалось выше на 16,7% и 19,7% чем в контроле ( $p < 0,05$ ) и на 5-е сутки соответственно и составляло  $43,55 \pm 1,92$  мкМ/л.

Наиболее значительное увеличение содержания ЦЭК определялось в первые сутки после экспериментального моделирования тромбоза на 40,7% ( $p < 0,005$ ) и составляло  $40,27 \pm 1,15$  клеток/100 мкл. Через 5 суток содержание ЦЭК было на 18,4% выше ( $p < 0,05$ ), чем в контроле, но ниже, чем в первые сутки после моделирования венозного тромбоза на 15,2% и равнялось  $33,9 \pm 0,89$  клеток/100 мкл. На 15-е сутки количество ЦЭК возвращалось к значениям, обнаруженным в контрольной группе  $26,04 \pm 1,08$  клеток/100 мкл ( $p < 0,5$ ).

Полученные данные указывают, что при экспериментальном венозном тромбозе наблюдалось повышение в крови циркулирующих эндотелиальных клеток, снижение содержания нитратов/нитритов и повышение концентрации ДК.

### Результаты и их обсуждение

Значительное повышение уровня ЦЭК достоверно коррелирует с

увеличением концентрации ДК в 1-е сутки экспериментального венозного тромбоза. Коэффициент корреляции между ЦЭК и ДК составляет  $R = 0,47$  ( $p < 0,05$ ). Зарегистрированное увеличение количества ЦЭК в острую стадию венозного тромбоза приходится на период активации ПОЛ. ДК являются высокотоксичными для клеток организма продуктом ПОЛ и представляют собой маркер активности этого процесса. В результате усиления ПОЛ возможно прямое повреждающее действие токсичными продуктами окисления на клетки эндотелия вследствие изменения проницаемости мембран и окислительной модификации клеточных структур.

Полученные данные указывают также и на изменение секреции NO при венозном тромбозе. Как следствие этого нарушаются иницируемые им реакции, что приводит к нарушению прооксидантно-антиоксидантного равновесия организма и регуляции кислород-транспортной функции крови. Именно NO-продуцирующая функция эндотелия оказывается наиболее ранимой. Причиной этому является высокая нестабильность молекулы NO. Нарушение синтеза NO и развивающееся вследствие этого снижение его биологической активности – являются одной из причин прогрессирования дисфункции эндотелия.

Таким образом, окислительный стресс создает все условия для воз-

никновения дисфункции эндотелия и характеризуется нарушением образования NO и снижением его биодоступности. Активация процессов перекисного окисления липидов происходит на фоне выраженной десквамации эндотелия.

На 5-е сутки моделирования венозного тромбоза снижение деформируемости эритроцитов в плазме коррелирует с повышением уровня диеновых конъюгатов. Коэффициент корреляции между значениями составляет  $R=0,67$  ( $p<0,05$ ). В связи с этим можно предположить, что на 5-е сутки экспериментального венозного тромбоза на снижение деформируемости эритроцитов оказывают влияние и плазменные факторы. Снижение ДЭ связано с нарушением вязкостно-эластических свойств эритроцитов под влиянием перекисного окисления липидов, так как коэффициент корреляции между ДК и ДЭ составляет  $R=0,71$  ( $p<0,001$ ). В данных условиях окислительное повреждение эритроцитов сопровождается изменениями белкового и липидного компонентов клеточных мембран. Мембранные белки образуют путём взаимодействия с тиольными радикалами более высокомолекулярный компонент, который затрудняет конформационные изменения мембранных протеинов. Это вызывает изменение вязкоэластичности мембран и ДЭ. Кроме того, потеря мембранных липидов, повы-

шение жесткости билипидного слоя приводит к изменению липидного состава клеточных мембран эритроцитов. Это, в свою очередь, может вести к функциональной неполноценности эритроцитов, которые будут не способны значительно изменять свою форму и размеры при движении по капиллярам, что приведет к замедлению кровотока и к формированию кислородной недостаточности с последующим критическим нарушением клеточного метаболизма.

Кроме того, повышенная жесткость биологических мембран эритроцитов является одним из факторов, приводящих к травматическому повреждению эндотелия венозных сосудов, что сопровождается отрывом клеток эндотелия от базальной мембраны, и подтверждалось в исследовании увеличением количества циркулирующих в крови эндотелиоцитов. Коэффициент корреляции между ЦЭК и ДЭ в 1-е сутки в плазме составляет  $R=0,38$ , в буферном растворе  $R=0,41$  ( $p<0,05$ ). Травматизация эндотелиального монослоя может приводить к деэндоотелизации поверхности сосудистой стенки и запускает механизмы, приводящие к дисфункции эндотелиальной системы, играющей важную роль в регуляции кровообращения.

Таким образом, при экспериментальном моделировании венозного тромбоза изменяется гомеостаз, проявляющийся снижением ДЭ, дис-

функцией эндотелия, которая характеризуется повреждением его целостности, нарушением функциональной способности, изменением синтеза NO и накоплением продуктов ПОЛ. Выявленные изменения ДЭ, показателей окислительного стресса и числа ЦЭК указывают на дисбаланс в многоуровневой системе равновесия организма при данной патологии, следовательно, можно предположить, что описанные механизмы являются звеньями патогенеза острого тромбоза глубоких вен.

#### Выводы

1. При экспериментальном моделировании острого тромбоза глубоких вен происходит снижение деформируемости эритроцитов, повышение в крови уровня циркулирующих эндотелиальных клеток, накопление ДК – маркера перекисного окисления липидов.

2. Активация показателей процессов перекисного окисления липидов и снижение деформируемости эритроцитов являются факторами, ассоциирующимися с повреждением эндотелия при венозном тромбозе.

3. Для оценки состояния венозного русла при остром тромбозе глубоких вен дополнительным критерием, отражающим тяжесть повреждения эндотелия, могут служить концентрация диеновых конъюгатов, число циркулирующих эндотелиоцитов и деформируемость эритроцитов.

#### Литература

1. Баркаган З.С. Основы диагностики нарушений гемостаза / З.С. Баркаган, А.П. Момот. – М., 1999. – 246 с.

2. Изменение диеновых конъюгатов в плазме по ультрафиолетовому поглощению гептановых и изопропиловых экстрактов / В.Б.Гаврилов [и др.] // Лабораторное дело. – 1998. – №2. – С. 60-64.

3. Зинчук В.В. Деформируемость эритроцитов: физиологические аспекты / В.В. Зинчук // Успехи физиологических наук. – 2001. – №3. – С. 66-78.

4. Козловский В.И. Фильтрационные методы исследования деформируемости эритроцитов / В.И. Козловский, Е.С. Атрощенко, И.В. Петухов. – Витебск, 1996. – 15 с.

5. 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.

6. Новиков А.Н. Возможные механизмы эндотелиотропных эффектов микронизированной очищенной фракции флавоноидов / А.Н. Новиков // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2013. – №3. – С. 86-92.

7. Небылицин Ю.С. Показатели окислительного стресса и циркулирую-

щих эндотелиоцитов в разные стадии тромбоза глубоких вен нижних конечностей / Ю.С. Небылицин, С.А. Сушков, А.П. Солодков // Новости хирургии. – 2007. – №2. – С. 24-31.

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

9. Профилактика и лечение тромбозомболических осложнений в травматологии и ортопедии: практ. пособие / Е.Д. Белоенко [и др.]. – Минск: ООО В.И.З.А. ГРУПП, 2006. – 174 с.

10. Калинин Р.Е. Эмболоопасность острого восходящего тромбофлебита поверхностных вен нижних конечностей / Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, М.В. Нарижный // Рос. медико-биол. вестн. им. акад. И.П. Павлова. – 2011. – №2. – С. 10-11.

11. Banerjee R. The diagnostic relevance of red cell rigidity / R. Banerjee, K. Nageshwari, R.R. Puniyani // Clin. Hemorheol Microcirc. – 1998. – Vol. 19,

№1. – P. 21-24.

12. Hladovec J. Circulating endothelial cells as a sign of vessels wall lesions / J. Hladovec // Physiologia bohemoslovaca. – 1978. – Vol. 27. – P. 140-144.

13. Michiels C. Endothelial cell reponses to hypoxia: initiation of a cascade of cellular interactions / C. Michiels, T. Arnould, J. Remabe // J. Biophys. Biophys. Acta. – 2000. – Vol. 1497, № 1. – P. 1-10.

14. Parthasarathi K. Capillary recruitment in response to tissue hypoxia and its dependence on red blood cell deformability / K. Parthasarathi, H.H. Lipowsky // Am. J. Physiol. – 1999. – Vol. 277, №6 (Pt 2). – P. 2145-2157.

15. Van-Gelder J.M. Erythrocyte aggregation and erythrocyte deformability modify the permeability of erythrocyte enriched fibrin network / J.M. Van-Gelder, C.H. Nair, D.P. Dhall // Thromb. Res. – 1996. – Vol. 1, № 82. – P. 33-42.

---

#### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Небылицин Ю.С. – канд. мед. наук, доц. кафедры общей хирургии Витебского государственного ордена Дружбы народов медицинского университета, г. Витебск, Республика Беларусь.

E-mail: nebylicin.uravgm@mail.ru.

Сушков С.А. – канд. мед. наук, доц., проректор по научно-исследовательской работе УО "Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет".

Козловский В.И. – д-р мед. наук, проф. УО "Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет".