

МИЛЕХИН В. Е.<sup>1</sup>, PIZANIS N.<sup>2</sup>,  
KAMLER M.<sup>2</sup>, ПЕТРОВ А. С.<sup>1</sup>,  
ЯКОВ Н.<sup>2</sup>, ЯБЛОНСКИЙ П. К.<sup>1</sup>

## Эффект ингибитора фосфодиэстеразы-5 на микроциркуляцию и гемодинамику легкого

<sup>1</sup> Кафедра госпитальной хирургии медицинского факультета Санкт-Петербургского государственного университета

<sup>2</sup> Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, West German Heart Center Essen, University Hospital Essen, Germany  
e-mail: vit\_mil@mail.ru

### Реферат

Поиск путей лечения легочной гипертензии — актуальная проблема наших дней. Ингибиторы фосфодиэстеразы-5 (ФДЭ-5) обладают селективным вазоплегическим свойством в отношении легочной ткани. Однако прямой эффект ингибиторов ФДЭ-5 на альвеолярную микроциркуляцию до сих пор не изучен. Целью данной работы являлось изучение *in vivo* эффекта ингибитора ФДЭ-5 на легочную гемодинамику и микроциркуляцию на модели крупного животного.

7 свиньям (весом 30 кг) была выполнена срединная стернотомия. Легочная микроциркуляция оценивалась при помощи ортогонально поляризованного интравитального видеомикроскопа Cytoscan™ (OPS imaging). Протокол острого эксперимента длительностью 30 минут предусматривал оценку параметров гемодинамики и микроциркуляции до введения препарата (BL) и после введения 0,15 мг/кг водного раствора ингибитора ФДЭ-5 непосредственно в легочный ствол.

В ответ на введение ингибитора ФДЭ-5 был отмечен эпизод снижения системного давления и давления в легочной артерии ( $18 \pm 0,9$  с BL  $21,5 \pm 0,8$  мм рт. ст.,  $p < 0,05$ ) с тенденцией к компенсаторному восстановлению параметров. Легочно-сосудистое сопротивление достоверно понизилось с 10-й минуты эксперимента ( $136,0 \pm 13,8$  с BL  $172,8 \pm 16,9$  в  $\text{дин} \cdot \text{с} \cdot \text{см}^{-5}$ ,  $p < 0,05$ ). Достоверно увеличилось количество капилляров с диаметром меньше 9 мкм ( $67,0$  % с BL  $88,1$  % к общему количеству,  $p < 0,001$ ). Суммарная длина капилляров на одну альвеолу увеличилась в 2 раза ( $486,3$  мкм с BL  $240,8$  мкм,  $p < 0,001$ ). Отмечено увеличение диаметра альвеол ( $91,2$  мкм с BL  $85,1$  мкм,  $p < 0,05$ ). Индекс капиллярного кровотока увеличился ( $249,2$  мкм/мкм<sup>2</sup> с BL до  $515,0$  мкм/мкм<sup>2</sup>  $p < 0,001$ ). Скорость движения эритроцитов снизилась ( $245,5 \pm 63,5$  с BL  $205,7 \pm 74,3$  мкм/с,  $p < 0,001$ ).

Был впервые продемонстрирован эффект ингибитора ФДЭ-5 на микроциркуляцию легочной ткани *in vivo*. Изменения микроциркуляции капиллярной сети альвеол позволяют выдвинуть гипотезу о том, что ингибитор ФДЭ-5 вызывает тотальную релаксацию прекапиллярных сфинктеров, тем самым качественно меняя кровообращение на уровне капиллярной сети альвеол, и объясняет причину снижения легочно-сосудистого сопротивления. Интравитальная, ортогонально поляризованная микроскопия (OPS imaging) является эффективной методикой оценки микроциркуляции *in vivo*, ее потенциальные возможности требуют дальнейшего изучения.

**Ключевые слова:** ингибиторы фосфодиэстеразы-5, легочная микроциркуляция, ортогонально поляризованный интравитальный видеомикроскоп.

Milekhin V. E.<sup>1</sup>, Pizanis N.<sup>2</sup>, Kamler M.<sup>2</sup>,  
Petrov A. S.<sup>1</sup>, Jakob H. <sup>2</sup>, Yablonsky P. K.<sup>1</sup>

## Effect PDE-5 inhibitor on pulmonary microcirculation and hemodynamic

<sup>1</sup> Department of Hospital surgery, Faculty of medicine of Saint-Petersburg State University;

<sup>2</sup> Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, West German Heart Center Essen, University Hospital Essen, Germany  
e-mail: vit\_mil@mail.ru

### Abstract

Inhibitors of PDE-5 have been proposed for the treatment of pulmonary hypertension because of their dilatative effect on the pulmonary vessels. However, effects on the pulmonary microcirculatory network has never been observed up until today. It was therefore the aim of our study to evaluate the effects of the PDE-5 INH inhibitor (Sildenafil) on the pulmonary microcirculation in a big animal model.

7 pigs (30 kg) underwent median sternotomy. The pulmonary microcirculation was assessed *in vivo* by the orthogonal polarized spectral (OPS) imaging microscope (Cytoscan™). Microcirculatory images were obtained from the parietal surface of the lung before (BL) and continuously up to 30 min after intravenous injection of 0,15 mg/kg/body weight PDE-5 INH into the pulmonary artery.

4 and 10 min after application PDE-5 INH mean pulmonary pressure ( $21 \pm 2,2$  vs.  $18,8 \pm 1,5$  mmHg, BL vs. PDE-5 INH,  $p < 0,022$ ) and mean pulmonary vascular resistance in 10, 15 and 30 min ( $136,0 \pm 13,8$ ;  $100,3 \pm 21,9$ ;  $112,8 \pm 16,9$  vs.

172,8±16,9 dyn·s·cm<sup>-5</sup>, BL vs. PDE-5 INH, p<0,05) significantly decreased. Significantly increased amount capillaries with diameter more then 9 µm («real capillar») compere with BL (72,0 % vs. 88,1 %, p<0,001). Summary late of capillaries per alveolar square significant increased up to 202 % vs. BL (486,3 µm vs. 240,8 µm; p<0,001). Summary alveolar diameter increased (91,2 µm vs. 85,1 µm; p<0,05). Functional capillary density (FCD) increased more then two times (249,2 µm<sup>2</sup>/µm vs. BL до 515,0 µm<sup>2</sup>/µm (p<0,001). RBC velocity decreased and reached statistical difference at timepoint 10 minutes after application (244,1±63,5 vs. 205,7±73 µm/s, BL vs. PDE-5 INH, p<0,001).

Our study demonstrated for the first time the effects of PDE 5 INH on the pulmonary microcirculation. We observed a significant dilatation of the terminal capillaries with a recruitment of capillaries as evidenced by the increased FCD. These evidenced microcirculatory effects underline the clinical use of PDE-5 Inhibitors in pulmonary hypertension should be evaluated in the future.

**Keywords:** phosphodiesterase-5 inhibitor; lung microcirculation, orthogonal polarized spectral imaging.

## Введение

Определением легочной гипертензии (ЛГ) считается регистрация давления в легочной артерии, превышающее 25 мм рт. ст., при катетеризации правых отделов сердца в покое [2, 8, 29]. Доказано, что ЛГ обусловлена спазмом периферической артериальной системы и в случае прогрессирования приводит к пролиферации и ремоделированию сосудистого русла легких [14]. Прогрессирование ЛГ и, как следствие, увеличение легочного сосудистого сопротивления (ЛСС), в конечном итоге, приводят к развитию правожелудочковой сердечной недостаточности (СН) и смерти пациентов [7, 14, 22].

Основными причинами, вызывающими спазм артериол малого круга кровообращения, являются гипоксия, облитерация сосудов малого круга кровообращения, а также перегрузка сосудов малого круга давлением и объемом. При этом кардиопульмонарный рефлекс (рефлекс Китаева), играющий роль в формировании спазма, приводит к формированию функциональной, а в дальнейшем, при сохранении патологических факторов, к органической (фиксированной) ЛГ.

Терапия ЛГ основана на применении вазодилаторов различных фармакологических групп и направлена на снижение тонуса резистентных сосудов малого круга. Основной трудностью в подборе терапии является наличие у пациентов с ЛГ элементов правожелудочковой декомпенсации кровообращения, что определяет необходимость использования препаратов с преимущественным влиянием на сосуды малого круга кровообращения, без значимого системного гипотензивного эффекта.

Вследствие высокой активности фермента 5-изоформы фосфодиэстеразы (ФДЭ-5) в гладкой мускулатуре сосудов легких, применение специфического ингибитора ФДЭ-5 приводит к вазодилатации сосудов преимущественно малого круга кровообращения и в меньшей степени влияет на показатели системной гемодинамики [9]. Одним из значимых эффектов ингибитора ФДЭ-5 на легочную гемодинамику является снижение периферического ЛСС [20, 27]. Публикации A. Sebkhi и L. Zhao [26, 32] продемонстрировали, что при ЛГ, вызванной гипоксией, использование ингибитора ФДЭ-5 снимает спазм гладкой мускулатуры сосудов легких.

Фосфодиэстеразы относятся к суперсемейству ферментов инактивирующих циклический адено-

зинмонофосфат (цАМФ) и циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ), являющиеся вторичными мессенджерами простагличина и оксида азота (NO). 5-изоформа фосфодиэстеразы является основным подтипом фосфодиэстеразы, представленной в сосудах легочной ткани [26, 32]. Блокирование эффекта фосфодиэстеразы вызывает увеличение уровня цГМФ в гладкомышечных клетках сосудов, а также активирует цГМФ-опосредованную протеинкиназу, что ускоряет открытие калиевых каналов, чувствительных к кальцию, и приводит к гиперполяризации мембраны и блокированию потока кальция через кальциевые каналы L-типа, что, в конечном итоге, вызывает эффект расслабления гладкой мускулатуры легочных сосудов [1, 27]. В исследовании группы P. Fesler не был подтвержден эффект ингибитора ФДЭ-5 на артериальную сеть легких, но при этом достоверно подтверждено его влияние на общее периферическое ЛСС [6].

Оценка и использование параметров микроциркуляции внутренних органов является нерешенной в клинике задачей на сегодняшний день. Но изучение процессов микроциркуляции обладает большой потенциальной перспективой в решении клинических задач, связанных нарушением периферической циркуляции на уровне органов и тканей. В 1999 г. Groner [10] опубликовал информационную статью о новой технологии в микроскопии, получившую название «Ортогонально-поляризованная интравитальная микроскопия» (OPS imaging).

Принцип, лежащий в основе данной методики, микроскопии, основан на эпиилюминации молекулы гемоглобина в поляризованном свете с определенной длиной волны и описан D. Slaaf et al. [30]. Основным достоинством метода являлось возможность без использования флюоресцирующих красителей [13] с высокой точностью визуализировать циркуляцию крови в просвете кровеносных сосудов. Небольшие размеры и вес зонда микроскопа удобны для манипуляции и позволяют вручную позиционировать головку зонда на любой поверхности.

## Цель исследования

Изучение влияния ингибитора ФДЭ-5 на микроциркуляцию и гемодинамику легких на модели крупного животного при помощи интравитального микроскопа *in vivo*.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Материал и методы исследования

В рамках научно-исследовательского сотрудничества кафедры госпитальной хирургии Медицинского факультета СПбГУ работа выполнялась на базе лаборатории экспериментальной хирургии Университетской клиники г. Эссена (Германия). Экспериментальный протокол был проверен и утвержден Этическим исследовательским комитетом по ветеринарии Медицинской школы Эссена.

Все животные были анестезированы и оперированы исходя из требований «Principles of Laboratory and Animal Care» и «Guide for the Care and Use of Laboratory animals», подготовленных в Исследовательском институте по работе с лабораторными животными Национального института здравоохранения (NIH publication no. 85–23, revised 1985).

**Экспериментальный протокол.** В остром эксперименте были использованы 7 свиней (немецкая полевая) мужского пола со средним весом  $32 \pm 1,7$  кг. Премедикация у животного осуществлялась сочетанием инъекций кетамина (30 мг/кг), стреснила (2 мг/кг) и атропина (0,05 мг/кг). После интубации животного и начала искусственной вентиляции анестезия поддерживалась на фоне внутривенной непрерывной инфузии дипривана (10 мг/ч), мидазолама (1 мг/кг/ч) и фентанила (5 мг/кг/ч).

Искусственная вентиляция легких (*Fabius GS, Dräger*, Германия) проводилась в стандартизированном режиме контроля давления со скоростью 15 вдохов в минуту, при максимальном инспираторном давлении 25 мм рт. ст., фракция вдыхаемого кислорода ( $\text{FiO}_2$ ) составляла 0,5, положительное давление в конце выдоха — 5 мм рт. ст. Параметры вентиляции оставались неизменными в течение всего эксперимента.

У животных регистрировалась электрокардиограмма (ЭКГ), осуществлялся мониторинг центральной гемодинамики и газового состава крови (*Radiometer Copenhagen*, Germany) при помощи артериального катетера, имплантированного в бедренную артерию.

Параметры гемодинамики малого круга кровообращения оценивались посредством метода термомоделиции с помощью катетера Сван-Ганс (Baxter,

*Healthcare Corp., Irvine, CA*), имплантированного в легочную артерию. Для регистрации температуры тела животного использовали ректальный датчик.

После фиксации объектива микроскопа на поверхности верхней доли левого легкого и регистрации параметров исходного уровня (baseline BL) водный раствор ингибитора ФДЭ-5 — Sildenafil (*Pfizer, Pfizer Laboratories*, Sandwich, United Kingdom) вводился непосредственно в ствол легочной артерии в дозе 0,15 мг/кг. Необходимая доза препарата разводилась непосредственно перед началом эксперимента.

Контрольные измерения параметров производились на 2-й, 4-й, 10-й, 15-й и 30-й минутах эксперимента.

Оценивались следующие параметры:

- частота сердечных сокращений (ЧСС);
- среднее артериальное давление (сАД);
- среднее давление в легочной артерии (сЛАД);
- сердечный выброс (СВ);
- центральное венозное давление (ЦВД);
- легочное сосудистое сопротивление (ЛСС).

**Оценка легочной микроциркуляции (OPS imaging).** Легочная микроциркуляция регистрировалась во временных точках протокола исследования с помощью интравитального видеомикроскопа CytoscanTM (*Cytometrics, Inc., Philadelphia, Pa., USA*) (рис. 1).

Объектив микроскопа CytoscanTM был фиксирован на поверхности доли правого легкого при помощи специально сконструированной стабилизирующей насадки (рис. 2), аналог которой был предложен ранее Pries et al. [19]. Оригинальная конструкция насадки обеспечивала отсутствие компрессии на ткань легкого, а также с ее помощью осуществлялась стабилизация области наблюдения в поле зрения объектива, так как в течение всего эксперимента легкие вентилировались.

Принцип работы микроскопа CytoscanTM основан на способе построения изображения на методике эпииллюминации молекулы гемоглобина в поляризованном свете с длиной волны 548 нм, которая поглощается молекулами окси- и дезоксигемоглобина (OPS imaging). Отраженный от исследуемой поверхности



Рис. 1. Интравитальный ортогонально поляризованный видеомикроскоп CytoscanTM

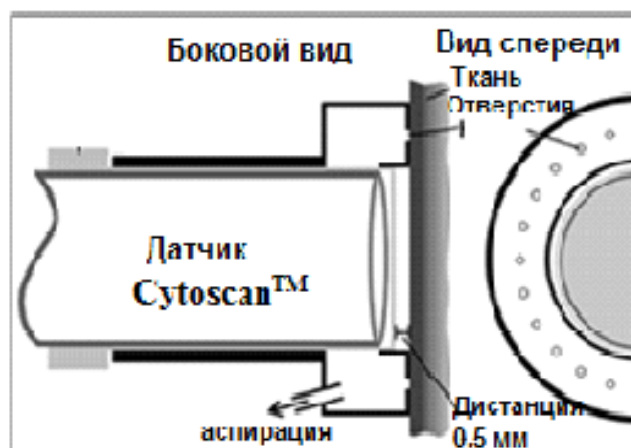


Рис. 2. Стабилизирующая насадка на объектив видеомикроскопа CytoscanTM

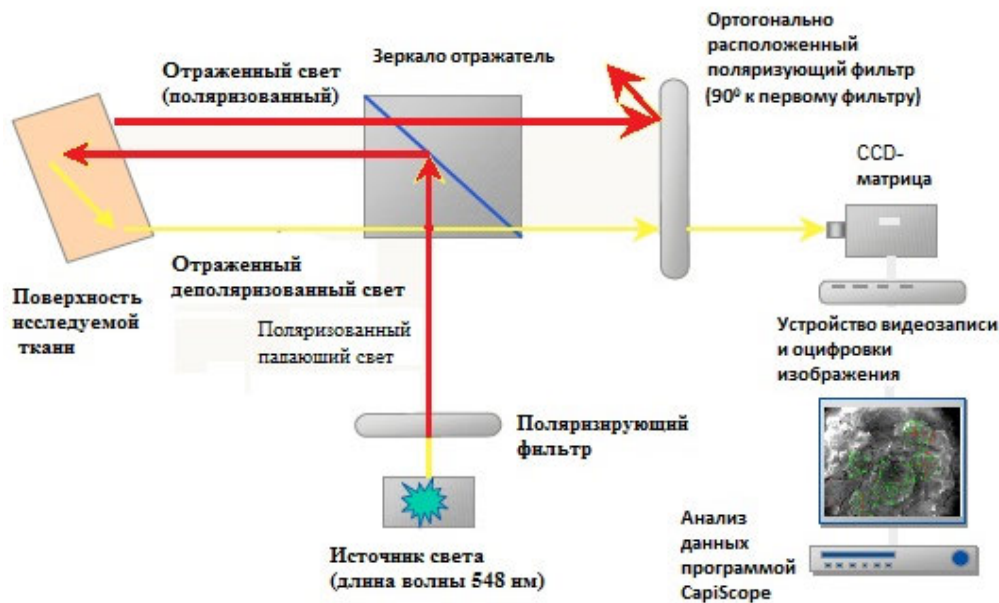


Рис. 3. Принципиальная схема работы ортогонально поляризованной микроскопии (OPS imaging)

свет возвращается к матрице микроскопа, проходя через систему второго поляризирующего фильтра, который отсекает первично поляризованный поток света, пропуская только деполаризованный свет, что увеличивает зрительный контраст между эритроцитами и прилегающими тканями (рис. 3).

Видеозапись исследования осуществлялась при помощи видеоманитрона JVC (HR-DD857MS SVHS NTFS). Все видеозаписи были оцифрованы и проанализированы в последующем при помощи программы видеонализа CapiScore (CapiScore Software, UK).

Альвеолы для анализа выбирались таким образом, чтобы их альвеолярная площадь максимально находилась в поле визуализации, не перекрываясь прилежащими альвеолярными артериолами и венами. Капиллярная сеть альвеол (протяженность капиллярного русла в проекции одной альвеолы) подсчитывалась при помощи программного обеспечения, в котором вручную маркировались все видимые функционирующие капилляры (капилляры, по которым наблюдалось движение эритроцитов), а также измерялся собственный диаметр альвеолярного поля.

Диаметр альвеолы определялся как среднее от суммы двух перпендикулярных линий, расположенных между двумя равноудаленными краями (рис. 4). Определение скорости движения эритроцитов в капиллярах альвеол осуществлялось при помощи программного алгоритма, но выбор интересующего капилляра осуществлялся вручную.

Для оценки изменений параметра альвеолярной перфузии мы использовали индекс капиллярного кровотока альвеол (ИККА) [24], который для каждой оцениваемой альвеолы рассчитывался по формуле:

$$\text{суммарная длина функционирующих капилляров (мкм)} / [\text{площадь альвеолы (мкм}^2\text{)} / \text{среднее значение альвеолярной площади (мкм}^2\text{)}]$$

Индекс капиллярного кровотока был описан ранее [3, 5, 16, 25] и использовался с целью оценки объемного капиллярного кровотока на определенной площади ткани. В работе W. Baumgartner et al. [3], изучавших открытие легочных капилляров на образце изолированных легких собаки, в эксперименте с перфузией легких авторы в качестве средней альвеолярной площади выбрали постоянное число (10 000 мкм<sup>2</sup>), так как средний диаметр альвеол в эксперименте с их моделью составлял 110±30 мкм. В нашем исследовании среднее значение диаметра площади альвеолы было более вариабельно и отличалось, но данная погрешность нивелировалась, так как определялся объемный кровоток на одну альвеолу. Все полученные результаты видеомикроскопии были разделены на периоды наблюдения 10 минут, 20 минут и 30 минут после введения ингибитора ФДЭ-5.

Полученные результаты были проанализированы при помощи дисперсионного анализа многократных измерений и двойного критерия Стьюдента, для сравнения пропорций использовался точный критерий Фишера, значения  $p < 0,05$  считались статистически достоверными. Нормальность распределения и однородность колебаний проверялись при помощи критерия Колмогорова-Смирнова. В случае отсутствия нормального распределения для группового сравнения использовался критерий Манна-Уитни, значения  $p < 0,05$  считались статистически достоверными. Все данные анализировались с помощью статистической программы SPSS-science (Sigma Stat 3.0 and Sigma Plot 8.0).

### Результаты исследования и их обсуждения

**Гемодинамика.** Во всех временных интервалах измерений показатели центральной гемодинамики не достигли статистически достоверного различия, за исключением среднего артериального давления (сАД), которое достоверно снизилось ко 2-й минуте после инъекции ингибитора ФДЭ-5 с тенденцией

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

к возврату к первоначальным показателям и с 15-й минуты эксперимента не имело статистически достоверной разницы с исходными параметрами (табл. 1).

Среднее легочное давление в сравнении с исходным уровнем снизилось, достигнув статистической достоверности с 4-й по 10-ю минуту наблюдения ( $18,0 \pm 0,9$  и  $18,5 \pm 0,7$  по сравнению с исходным  $21,5 \pm 0,8$ ;  $p < 0,05$ ), но имело тенденцию к восстановлению и к 30-й минуте вернулось к исходным значениям (табл. 1).

Легочное сосудистое сопротивление в течение эксперимента после введения ингибитора ФДЭ-5 снижалось и достигло статистически достоверной разницы на 10-й, 15-й и 30-й минутах наблюдения ( $136,0 \pm 13,8$ ;  $100,3 \pm 21,9$ ;  $112,8 \pm 16,9$  по отношению к исходным параметрам  $172,8 \pm 16,9$ ,  $p < 0,05$ ) (табл. 1).

**Газовый состав крови.** Парциальное давление кислорода  $pO_2$  и углекислого газа  $pCO_2$  в артериальной крови в течение всего периода наблюдения было стабильно и не претерпело каких-либо значимых изменений (рис. 6).

**Результаты оценки легочной микроциркуляции.** В ходе эксперимента, после применения ингибитора ФДЭ-5, перфузия альвеол качественно изменилась за счет резкого увеличения количества открытых капилляров на поверхности альвеол, что было отмечено визуально, еще до проведения количественного анализа. Наблюдалось явление, когда «выключенные» (не участвующие в циркуляции форменных элементов крови) альвеолярные капилляры включались в кровоток, создавая картину характерной арочной

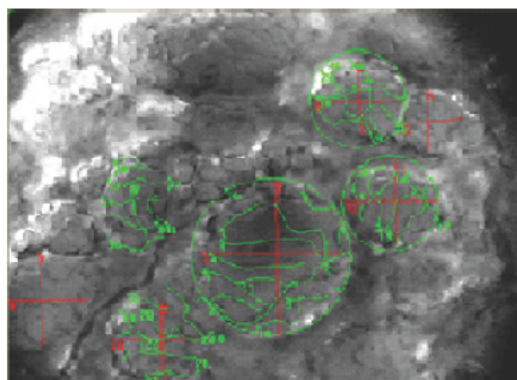


Рис. 4. Видео-анализ микроциркуляторной картинки, выполнено при помощи аналитической программой Cariscope software

сети, покрывающую всю поверхность альвеолы. При градации капилляров по их диаметру в группы до применения ингибитора ФДЭ-5 и после отмечено статистически достоверное увеличение капилляров в диапазоне диаметра менее 9 мкм («истинных капилляров») в сравнении с группой более крупных микрососудов, в которую входили прекапиллярные артериолы и посткапиллярные вены. Количество капилляров с диаметром менее 9 мкм увеличилось до 88 % по сравнению с исходным уровнем 67 % ( $p < 0,001$ ) к общему количеству микрососудов соответственно (рис. 7).

Столь значимое увеличение количества функционирующих капилляров вызывало изменение интегративных показателей микроциркуляции (табл. 2).

Среднее значение длины всех открытых капилляров на одну альвеолу достоверно увеличилось до 202 % в сравнении с исходным уровнем ( $486,3 \pm 458,1$  мкм против  $240,8 \pm 197,9$  мкм; среднее  $\pm 25$  %,  $p < 0,001$ ).

Индекс капиллярного кровотока альвеол (ИККА) после введения ингибитора ФДЭ-5 статистически достоверно увеличился (с  $249,2 \pm 188,0$  мкм/мкм<sup>2</sup> до  $515,0 \pm 442,9$  мкм/мкм<sup>2</sup>; среднее  $\pm 25$  %,  $p < 0,001$ ).

Скорость движения эритроцитов после введения ингибитора ФДЭ-5 снизилась и достигла статистически достоверной разницы с 10-й минуты наблюдения (с  $245,5 \pm 63,5$  мкм/с до  $205,7 \pm 74,3$  мкм/с, среднее  $\pm 25$  %,  $p < 0,001$ ).

Неожиданной находкой стало увеличение среднего значения диаметра альвеол ( $91,2 \pm 85,3$  мкм против  $85,1 \pm 76,5$  мкм; среднее  $\pm 25$  %,  $p < 0,05$ ).

Целью данного исследования являлась оценка прямого эффекта ингибитора ФДЭ-5 на легочную гемодинамику и альвеолярную микроциркуляцию на модели крупных животных *in vivo*. Был использован ингибитор 5-изоформы фосфодиэстеразы – Sildenafil, производства компании Pfizer (Pfizer Laboratories, Sandwich, United Kingdom), предоставленный в виде инфузионного раствора 50 мг в 50 мл физиологического раствора.

Для оценки микроциркуляции легочной ткани был использован относительно новый метод интравитальной ортогонально поляризованной видеомикроскопии — OPS-imaging, что позволило оценить изменения показателей микроциркуляции *in vivo* без использования флуоресцентных красителей [24]. Следует отметить, что данный вид интравитальной микроскопии позволяет оценить субплевральную

### Изменения гемодинамических показателей

Таблица 1

| Показатель       | BL              | 2 мин            | 4 мин            | 10 мин           | 15 мин          | 30 мин          |
|------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| ЧСС (уд/мин)     | $80,8 \pm 6,5$  | $84,0 \pm 6,3$   | $88,4 \pm 6,7$   | $86,5 \pm 5,0$   | $86,6 \pm 5,2$  | $85,8 \pm 6,0$  |
| сАД (мм рт. ст.) | $64,6 \pm 2,4$  | $50,5 \pm 1,7^*$ | $51,6 \pm 1,7^*$ | $54,0 \pm 3,0^*$ | $59,3 \pm 1,1$  | $61,4 \pm 0,7$  |
| СВ (л/мин)       | $3,44 \pm 0,31$ | $3,15 \pm 0,17$  | $3,50 \pm 0,67$  | $3,35 \pm 0,20$  | $3,56 \pm 0,07$ | $3,48 \pm 0,12$ |
| ПСС (мм рт. ст.) | $12,9 \pm 1,2$  | $12,8 \pm 0,8$   | $11,6 \pm 1,2$   | $12,6 \pm 1,2$   | $13,3 \pm 0,8$  | $13,3 \pm 0,8$  |

Здесь и далее: ЧСС — частота сердечных сокращений; сАД — среднее артериальное давление; СВ — сердечный выброс; ПСС — периферическое сосудистое сопротивление. Гемодинамические показатели, все значения среднего  $\pm$  SD,  $n=7$ ; \* — достоверный против начального,  $p < 0,05$  (BL — исходное значение).

## Изменения показателей альвеолярной микроциркуляции

Таблица 2

| Показатель                                                     | Среднее | 25 %  | 75 %  | P-значения (p) |
|----------------------------------------------------------------|---------|-------|-------|----------------|
| Суммарная длина открытых капилляров (мкм)                      |         |       |       |                |
| Исходный уровень                                               | 240,8   | 197,9 | 284,6 | p<0,001        |
| нФДЭ-5                                                         | 486,3*  | 458,1 | 561,2 |                |
| Диаметр альвеол (мкм)                                          |         |       |       |                |
| Исходный уровень                                               | 85,1    | 76,5  | 93,1  | p<0,05         |
| нФДЭ-5                                                         | 91,2*   | 85,3  | 98,1  |                |
| Индекс капиллярного кровотока альвеолы (мкм <sup>2</sup> /мкм) |         |       |       |                |
| Исходный Уровень                                               | 249,2   | 188,0 | 348,7 | p<0,001        |
| нФДЭ-5                                                         | 515,0*  | 442,9 | 592,4 |                |

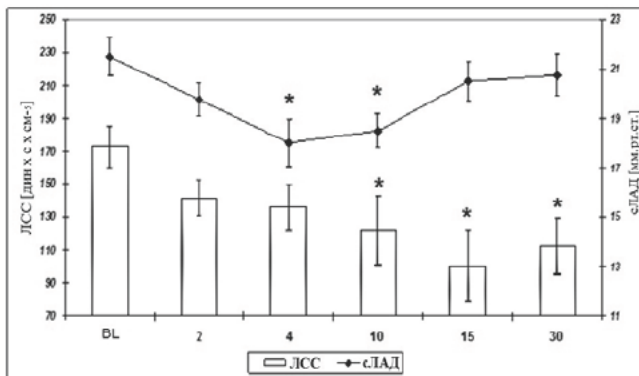


Рис. 5. График динамики изменения сЛАД и ЛСС. Среднее легочное артериальное давление (мм рт. ст.) и легочное сосудистое сопротивление (дин×с×см-5), все значения среднего ± стандартное отклонение, n=7; \* — статистическая достоверность к исходным данным, p<0,05

капиллярную сеть, которая имеет отличия от внутренней капиллярной сети альвеол [11]. Однако в публикации Short [28] продемонстрировано, что изменения кровотока субплевральных капилляров происходят аналогично внутрилегочным, что позволяет экстраполировать полученные результаты на всю микроциркуляторную сеть легкого.

В ходе выполнения исследования большое внимание было уделено калибровке методики оценки параметров микроциркуляции. С этой целью интравитальный микроскоп Cytoscan™, а также аналитическое программное обеспечение CapiScore (CapiScope Software, UK) было калибровано при помощи специальной микроскопической шкалы (Carl Zeiss, USA), что позволило подтвердить достоверность полученных результатов до десятых долей мкм. Следует отметить, что в самом методе измерения параметров капиллярного русла при помощи интравитального микроскопа Cytoscan™ заложен ряд конструктивных ограничений, которые лимитируют глубину и точность измерения на уровне сотых мкм, но не имеют принципиального значения на полученные результаты. Программное обеспечение для анализа микроциркуляции CapiScore software имеет ограничения в оценке реального размера капилляров до десятых долей мкм при оценке скорости движения эритроцитов. При получении картинки визуализации движения эритроцитов в проекции капилляров, мы

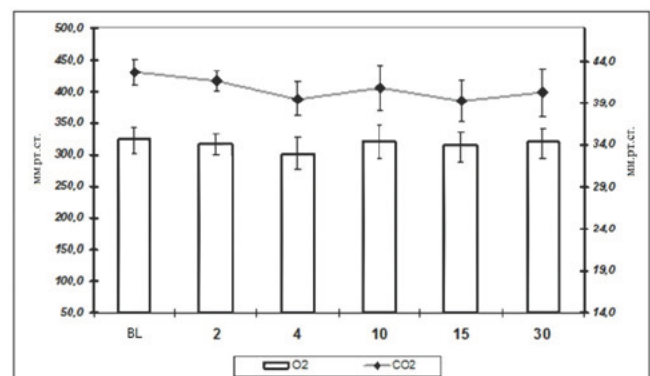
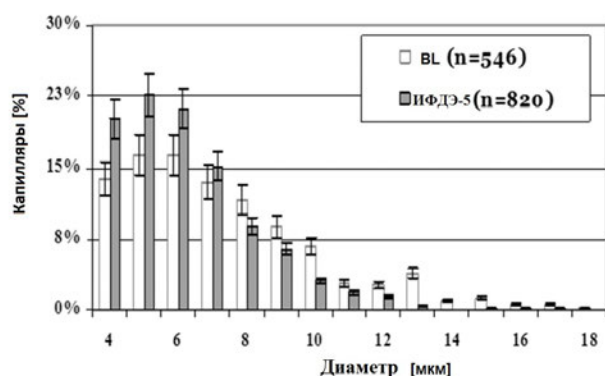


Рис. 6. Динамика изменений показателей газового состава крови. Парциальное давление O<sub>2</sub> (pO<sub>2</sub>) (мм рт. ст.) и CO<sub>2</sub> (pCO<sub>2</sub>) (мм рт. ст.) в крови; все значения среднего ± стандартное отклонение, n=7

в реальности наблюдали визуализацию движения молекул гемоглобина и дезоксигемоглобина в проекции капиллярного русла, что требовало учитывать погрешность в достоверности измерения диаметра капилляра, равной расстоянию между данными молекулами и собственной стенкой сосуда [25]. Свою роль играла геометрическая деформация эритроцитов при прохождении альвеолярных капилляров за счет особого строения капиллярной сети альвеол, эритроцит оказывается «распластан» над поверхностью альвеолы, что приводит к завышению капиллярного диаметра в пределах десятых долей мкм.

В данной работе был впервые визуализирован прямой эффект водного раствора ингибитора ФДЭ-5 на легочную микроциркуляцию. Количественный анализ диаметра альвеолярных капилляров, их суммарной длины и соотношение к площади поверхности альвеол позволили сделать следующие выводы. Результатом введения ингибитора ФДЭ-5 явилось качественное изменение альвеолярной микроциркуляции. Наблюдавшийся визуальный эффект полного открытия всей сети капиллярного русла альвеолы может быть объяснен тотальной релаксацией прекапиллярных мышечных сфинктеров, что обусловило эффект вовлечения «спящих» капилляров. Эта гипотеза может объяснить статистически достоверное увеличение количества открытых капилляров



**Рис. 7.** График количественного распределения капилляров по их диаметру. Демонстрирует количественное распределение капилляров в зависимости от их диаметра, отражает соотношение сосудов определенного диаметра к общему количеству в %. Белые столбцы отражают исходные данные; серые столбцы — данные, полученные после применения ингибитора ФДЭ-5

(микрососудов диаметром менее 9 мкм), суммарной длины капилляров на одну альвеолу, а также ИКК.

Как известно, капиллярный кровоток увеличивается в условиях, которые приводят к повышению легочного кровенаполнения, давления или в условиях гипоксии. В данном эксперименте эти факторы были исключены, давление в малом круге, как и газовый состав крови, контролировались и не могли спровоцировать полученные изменения альвеолярного кровотока. В ответ на введение ингибитора ФДЭ-5 мы наблюдали увеличение капиллярной сети альвеол более чем в два раза, что было подтверждено увеличением ИКК до (204 %) в 2 раза. Сравним полученные результаты с результатами исследования Baumgartner [3] которые использовали для вовлечения капилляров в кровоток постепенное повышение легочного венозного давления. Авторы в своем эксперименте при помощи роторного насоса, прокачивая кровь на модели изолированного легкого собаки, так же они использовали иной метод оценки микроциркуляции — видеомикроскопию, что объясняет разницу в полученных результатах. Тем не менее ИКК при легочном венозном давлении в 40 мм рт. ст. (максимальное в их эксперименте) составил 378 мкм/мкм<sup>2</sup>. Авторами подчеркивалось, что в 86 % альвеол вовлечение капилляров не произошло полностью. В нашем эксперименте ИКК после введения ингибитора ФДЭ-5 достигал значения 515 мкм/мкм<sup>2</sup> с тотальным открытием всего периферического русла. Безусловно, необходимо дальнейшее изучение эффекта ингибитора ФДЭ-5 на легочную микроциркуляцию, а также необходимо определение минимально эффективной дозировки препарата для полного вовлечения альвеолярных капилляров в легочный кровоток.

Скорость движения эритроцитов в капиллярной сети альвеол после применения ингибитора ФДЭ-5 снизилась с  $245,5 \pm 63,5$  до  $205,7 \pm 74,3$  мкм/с и достигла статистической достоверности. Более того, непосредственно после введения ингибитора ФДЭ-5 первые 5 минут в поле зрения микроскопа визуализи-

ровался феномен парадоксального, «маятникообразного» кровотока в капиллярной сети альвеол. Одним из возможных объяснений снижения скорости эритроцитов в капиллярах альвеол является резкое снижение циркуляторного объема и, соответственно, преднагрузки на левый желудочек за счет депонирования крови в сосудистом русле малого круга кровообращения. Следует также учитывать вазоплегические свойства ингибитора ФДЭ-5, а также вероятность увеличения шунтирования крови в системе легочного кровообращения, что косвенно подтверждается снижением системного и легочного артериального давления с момента введения препарата.

Неожиданной находкой в эксперименте стало достигшее статистическо достоверности увеличение среднего диаметра альвеол после введения ингибитора ФДЭ-5. Полученный результат гипотетически может быть объяснен тем, что ингибитор ФДЭ-5 теоретически может обладать эффектом на ранее описанные гладкомышечные клетки в стенках альвеол, отличающиеся от гладкомышечных клеток сосудов, но схожих с ними по строению [17]. Их назначение на сегодняшний момент не изучено, однако допускается их участие в регуляции вентиляционно-перфузионного соотношения. Активность этих клеток была выявлена Sebkhi [26], обнаружившим реактивность ФДЭ после гипоксии, локализирующуюся не только в легочных сосудах, но и в клетках альвеолярных стенок. Данный эффект ингибитора ФДЭ-5 на диаметр альвеол требует дальнейшего изучения и имеет перспективу применения в различных аспектах пульмонологии.

Результаты изменения макрогемодинамических показателей продемонстрировали эффективность использования ингибитора ФДЭ-5 для снижения ЛСС. Следует отметить, что в первые минуты после введения ингибитора ФДЭ-5 было отмечено значимое снижение сАД и сЛАД (табл. 1) с восстановлением к исходным параметрам, в отличие от ЛСС, которое сохраняло статистически достоверные низкие показатели до конца эксперимента (30 мин). Такое обратимое изменение параметров системной гемодинамики объясняется также резким снижением преднагрузки на левый желудочек за счет депонирования крови в системе малого круга кровообращения. К 10-й минуте эксперимента компенсаторные механизмы, в том числе увеличение ЧСС, привели к увеличению объема и компенсации параметров сАД и сЛАД при сохраняющемся низком ЛСС.

Селективное влияние ингибиторов ФДЭ-5 на легочную гемодинамику достаточно активно изучается во всем мире, как на животных [6, 18, 26, 32, 33], так и у человека [9, 12, 15, 20, 21, 23, 27, 31]. В этих исследованиях был продемонстрирован и изучен эффект улучшения перфузии легочной ткани за счет снижения периферического ЛСС, но в нашей работе мы впервые продемонстрировали эффект ингибитора ФДЭ-5 на альвеолярную перфузию с количественной оценкой изменений микроциркуляции на уровне капиллярного русла. Наблюдавшееся нами тотальное вовлечение в капиллярный кровоток ранее не функционировавших альвеолярных капилляров позволяет

выдвинуть гипотезу о прямом эффекте ингибитора ФДЭ-5 на релаксацию прекапиллярных сфинктеров. Данный эффект дает возможность в перспективе его изучения и использования по-иному взглянуть на лечение ЛГ в клинике.

### Заключение

В данной работе мы впервые продемонстрировали эффект внутривенной формы ингибитора ФДЭ-5 на микроциркуляцию альвеол *in vivo*. Наблюдавшиеся нами изменения микроциркуляции на уровне капиллярной сети альвеол позволяют предполагать,

что ингибитор ФДЭ-5 вызывает релаксацию прекапиллярных сфинктеров, тем самым качественно изменяя кровообращение альвеол и снижая легочное сосудистое сопротивление.

Обнаруженный в нашем эксперименте эффект ингибитора ФДЭ-5 на стенку альвеол требует дальнейшего изучения и несет потенциально новые возможности в лечении хронических заболеваний легких. Интравитальная ортогонально поляризованная микроскопия (OPS imaging) является эффективной и достоверной методикой оценки альвеолярной микроциркуляции *in vivo*.

### Литература

1. Archer, S. L. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase / S. L. Archer [et al] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1994. — № 92. — P. 7583–7587.
2. Badesch, D. B. Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension / D. B. Badesch [et al] // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 2009. — № 54 (Suppl.). — P. S55 – S66.
3. Baumgartner, W. A. Jr. Heterogeneous capillary recruitment among adjoining alveoli / W. A. Jr. Baumgartner // *J. Appl. Physiol.* — 2003. — № 95. — P. 469–476.
4. C.Hsia, C. Red cell distortion and conceptual basis of diffusing capacity estimates: finite element analysis / C. Hsia, C. Chuong, R. Johnson // *Journal of Applied Physiology*. — 1997. — Vol. 83. — № 4. — P. 1397–1404.
5. Cape, R. L. Distribution of pulmonary capillary transit times in recruited networks / R. L. Capen [et al] // *J. Appl. Physiol.* — 1990. — № 69. — P. 473–478.
6. Fesler, P. Effects of sildenafil on hypoxic pulmonary vascular function in dogs / P. Fesler [et al] // *J. Appl. Physiol.* — 2006. — № 101. — P. 1085–1090.
7. Fukumoto, Y. Recent progress in the treatment of pulmonary arterial hypertension: Expectation for rho-kinase inhibitors / Y. Fukumoto, S. Tawara, H. Shimokawa // *Tohoku J. Exp. Med.* — 2007. — № 211. — P. 309–320.
8. Galie, N. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension / N. Galie [et al] // *Eur. Heart J.* — 2009. — № 30. — P. 2493–2537.
9. Ghofrani, H. A. Differences in hemodynamic and oxygenation responses to three different phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized prospective study / H. A. Ghofrani [et al] // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 2004. — № 44. — P. 1488–1496.
10. Groner, W. Orthogonal polarization spectral imaging: a new method for study of the microcirculation / W. Groner [et al] // *Nat. Med.* — 1999. — № 5 (10). — P. 1209–1212.
11. Guntheroth, W. G. Pulmonary microcirculation: tubules rather than sheet and post / W. G. Guntheroth, D. L. Lutchel, I. Kawabori // *J. Appl. Physiol.* — 1982. — № 53. — P. 510–515.
12. Hanson, W. L. Site of recruitment in the pulmonary microcirculation / W. L. Hanson [et al] // *J. Appl. Physiol.* — 1989. — № 66. — P. 2079–2083.
13. Harris, A. G. The Cytoscan Model E-II, a new reflectance microscope for intravital microscopy: comparison with the standard fluorescence method / A. G. Harris [et al] // *J. Vasc. Res.* — 2000. — № 37 (6). — P. 469–476.
14. Humbert, M. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension / M. Humbert // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 2004. — № 43 (Suppl S). — P. 13S–24S.
15. Humpl, T. Beneficial Effect of Oral Sildenafil Therapy on Childhood Pulmonary Arterial Hypertension / T. Humpl [et al] // *Circulation*. — 2005. — № 111. — P. 3274–3280.
16. Jaryszak, E. M. Measuring the response time of pulmonary capillary recruitment to sudden flow changes / E. M. Jaryszak // *J. Appl. Physiol.* — 2000. — № 89. — P. 1233–1238.
17. Kapanci, Y. «Contractile interstitial cells» in pulmonary alveolar septa: a possible regulator of ventilation/perfusion ratio / Y. Kapanci [et al] // *The Journal of cell biology*. 1974; 60: 375–392.
18. Lee, K. C. Administration of a low dose of sildenafil for 1 week decreases intrahepatic resistance in rats with biliary cirrhosis: the role of NO bioavailability / K. C. Lee [et al] // *Clin. Sci. (Lond.)*. — 2010. — № 119 (1). — P. 45–55.
19. Lindert, J. OPS Imaging of human microcirculation: A short technical report / J. Lindert [et al] // *J. Vasc. Res.* — 2002. — № 39. — P. 368–372.
20. Michelakis, E. Oral sildenafil is an effective and specific pulmonary vasodilator in patients with pulmonary arterial hypertension / E. Michelakis [et al] // *Circulation*. — 2002. — № 105. — P. 2398–2403.
21. Michelakis, E. D. Long-term treatment with oral sildenafil is safe and improves functional capacity and hemodynamics in patients with pulmonary arterial hypertension / E. D. Michelakis [et al] // *Circulation*. — 2003. — № 108. — P. 2066–2069.
22. Miura, Y. Identification of new prognostic factors of pulmonary hypertension / Y. Miura [et al] // *Circ. J.* — 2010. — № 74. — P. 1965–1971.
23. Park, J. W. Sildenafil improves cutaneous microcirculation in patients with coronary artery disease: a monocentric, prospective, double-blind, placebo-controlled, randomized cross-over study / J. W. Park [et al] // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* — 2004. — № 31 (3). — P. 173–183.
24. Pizanis, N. PDE-5 inhibitor donor intravenous preconditioning is superior to supplementation in standard preservation solution in experimental lung transplantation / N. Pizanis [et al] // *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* — 2007. — № 32 (1). — P. 42–47.
25. Presson, R. G. Jr. Pulmonary capillaries are recruited during pulsatile flow / R. G. Jr. Presson // *J. Appl. Physiol.* — 2002. — № 92. — P. 1183–1190.
26. Sebkhii, A. Phosphodiesterase Type 5 as a Target for the Treatment of Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

/ A. Sebkh [et al] // *Circulation*. — 2003. — № 107. — P. 3230–3235.

27. Shekerdemian, L. Intravenous sildenafil lowers pulmonary vascular resistance in a model of neonatal pulmonary hypertension / L. Shekerdemian // *Am. J. of Respiratory and Critical Care*. — 2002. — № 165. — P. 1098–1103.

28. Short, A. C. Pulmonary capillary diameters and recruitment characteristics in subpleural and interior networks / A. C. Short [et al] // *J. Appl. Physiol.* — 1996. — № 80. — P. 1568–1573.

29. Simonneau, G. Updated clinical classification of pulmonary hypertension / G. Simonneau [et al] // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 2009. — № 54 (Suppl). — P. S43–S54.

30. Slaaf, D. W. A versatile incident illuminator for intravital microscopy / D. W. Slaaf [et al] // *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* — 1987. — № 6 (4). — P. 391–397.

31. Wilkins, M. R. Sildenafil versus endothelin receptor antagonist for pulmonary hypertension (SERAPH) study / M. R. Wilkins [et al] // *Am. J. of Respiratory and Critical Care*. — 2005. — № 171. — P. 1292–1298.

32. Zhao, L. Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension / L. Zhao // *Circulation*. — 2001. — № 104. — P. 424–428.

33. Zhao, L. Beneficial effects of phosphodiesterase 5 inhibition in pulmonary hypertension are influenced by natriuretic Peptide activity / L. Zhao [et al] // *Circulation*. — 2003. — № 107 (2). — P. 234–237.