

АНГИОГЕННЫЙ ЭФФЕКТ ТАДАЛАФИЛА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ КОНЕЧНОСТИ

Лавриненко К. И.¹, Маль Г. С.¹, Белоус А. С.^{1,2}, Полякова О. В.¹, Татаренкова И. А.¹

¹ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Курск;

²ФГБОУ ВПО «Курский государственный университет» Минобрнауки Российской Федерации, Курск, e-mail: kristinalavr@yandex.ru

Экспериментальная работа проведена на крысах линии Wistar. Ишемию моделировали на мышцах голени крыс. Кровообращение в конечностях оценивали с помощью лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) и гистологического исследования. Коррекцию ишемии проводили внутрижелудочным введением тадалафила в дозе 0,9 мг/кг. В группе сравнения вводили пентоксифиллин в дозе 60 мг/кг. Результаты оценивали на 21 и 28 сутки. Уровень микроциркуляции выражался в перфузионных единицах. Полученные результаты доказывают, что тадалафил улучшает перфузию ишемизированных мышц за счет стимуляции неангиогенеза; пентоксифиллин также оказывает положительное влияние на неангиогенез, но к 28 суткам уровень микроциркуляции не достигает нормальных значений. Значимый антиишемический эффект тадалафила диктует необходимость дальнейших экспериментальных и клинических испытаний с целью профилактики и лечения локальной ишемии в хирургии.

Ключевые слова: ишемия, тадалафил, неангиогенез.

ANGIOGENIC EFFECT OF CIALIS IN EXPERIMENTAL ISCHEMIA OF THE LIMB

Lavrinenko K. I.¹, Mal G. S.¹, Belous A. S.^{1,2}, Polyakova O. V.¹, Tatarenkova I. A.¹

¹Kursk State Medical University, Kursk;

²Kursk State University, Kursk, e-mail: kristinalavr@yandex.ru

Experimental work carried out on Wistar rats. Ischemia was simulated on the leg muscles of rats. The circulation in the limb was assessed using laser Doppler flowmetry (LDF) and histological examination. Correction of ischemia was carried out by intragastric introduction of tadalafil in a dose of 0.9 mg/kg. In the control group was injected with pentoxifylline in a dose of 60 mg/kg. The Results were assessed on 21 and 28 days. The level of the microcirculation was expressed in perfusion units. The results demonstrate that tadalafil improves perfusion of ischemic muscle through stimulation of neoangiogenesis; pentoxifylline also has a positive effect on angiogenesis, but on the 28th day the level of the microcirculation does not reach normal values. Significant anti-ischemic effect of cialis necessitates further experimental and clinical trials for the prevention and treatment of local ischemia in surgery.

Keywords: ischemia, tadalafil, angiogenesis.

По данным А. В. Покровского и соавт., на долю облитерирующего атеросклероза нижних конечностей в структуре сердечно-сосудистых заболеваний приходится порядка 20 %, что составляет 2–3 % от численности населения [3]. В лечении хронических облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей (ХОЗАНК) на первое место выходят хирургические методы лечения [9]. Однако реконструктивно-восстановительные операции возможны не более чем у 75 % пациентов с критической ишемией нижних конечностей [5].

Ввиду этого особое значение приобретает консервативное лечение ХОЗАНК. Согласно рекомендациям Российского общества ангиологов и сосудистых хирургов, все пациенты независимо от степени ишемии подлежат консервативному лечению [2]. На сегодняшний день существует несколько терапевтических подходов к лечению больных с

хроническими облитерирующими заболеваниями нижних конечностей, имеющих свои преимущества и недостатки. В связи с этим поиск оптимального метода консервативного ведения больных с хронической критической ишемией нижних конечностей остается важной и не до конца решенной задачей.

Тадалафил – селективный конкурентный ингибитор фосфодиэстеразы 5-го типа (ИФДЭ 5), который препятствует разрушению циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), усиливает сосудорасширяющий эффект оксида азота (NO). Особенности его фармакодинамики избирательного воздействия на различные типы ФДЭ были призваны нивелировать те негативные моменты, которые ограничивали применение силденафила. Новый препарат имеет более длительный период полувыведения (17,5 против 4 часов у силденафила), что обеспечивает его воздействие на организм пациента на протяжении 36 часов после приема [7]. Имеются отдельные публикации о пролонгации эффекта тадалафила до 48 часов. Его фармакокинетика не зависит от приема пищи и алкоголя [7]. Тадалафил наиболее избирательно действует на ФДЭ-5 и оказывает меньшее, чем силденафил, действие на ФДЭ-6 – изофермент, содержащийся в сетчатке глаза, при блокировании которого возникают нарушения цветоощущения; и на ФДЭ-1, содержащиеся в яичках, следовательно, не угнетает сперматогенез [8].

Целью настоящего исследования явилось изучение фармакологической эффективности тадалафила (сиалис, EliLilly) в терапии хронической ишемии нижних конечностей.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проводились на крысах линии «Wistar» массой 230–260 г. Для исследования взяты крысы без внешних признаков заболевания, прошедшие карантинный режим вивария Курского государственного медицинского университета. Животных распределяли по группам (не менее 10 крыс в группе) путем стратифицированной рандомизации со стратификацией по массе тела, условиям содержания и питания, а также по проводимым операциям и манипуляциям.

Экспериментальные животные были представлены следующими группами:

- 1) интактные животные (n=20);
- 2) ложнооперированные животные (n=20);
- 3) моделирование ишемии мышц голени (n=20), контрольная группа;
- 4) моделирование ишемии мышц голени+пентосифиллин (n=20), группа сравнения;
- 5) моделирование ишемии мышц голени+тадалафил (n=20), опытная группа.

Ложнооперированная группа формировалась животными, которым под наркозом в условиях антисептики разрезали кожу вдоль бедра по внутренней поверхности, выделяли

сосудисто-нервный пучок бедра, и затем рану ушивали непрерывным швом.

Хроническую ишемию конечности моделировали под наркозом, фиксируя животное в положении «на спине». На внутренней поверхности бедра тщательно выстригали шерсть, место операции обрабатывали 70 % раствором спирта и осуществляли разрез кожи вдоль бедра по внутренней поверхности. Выделив элементы сосудисто-нервного пучка, отделяли артерию от вены и нерва, и затем, наложив лигатуру у места ее начала, до отхождения а. saphena (под паховой связкой), которая является аналогом глубокой бедренной артерии человека. Перевязывали и пересекали а. saphena. Выделяли подколенную артерию и начальные отделы артерий голени (передняя и задняя большеберцовые артерии) и пересекали, не перевязывая. Бедренную артерию пересекали на 3 мм ниже наложенной ранее лигатуры. Удаляли участок магистрального сосуда, включающий бедренную, подколенную артерию и начальные отделы передней и задней большеберцовых артерий. Ретроградного кровотока не наблюдалось. Рана на бедре ушивалась непрерывным швом [1].

Исходя из результатов, полученных при анализе литературных данных, в применяемой нами модели возможности компенсаторного восстановления регионарного кровообращения, как наиболее информативные расценены 28 сутки, а 21 рассматривались как промежуточные [4].

Коррекцию ишемии мышц проводили у животных 4-й группы внутрижелудочным введением пентоксифиллина в дозе 60 мг/кг ежедневно в течение 28 дней, 5-й группы – тадалафила (сиалис, EliLilly) в дозе 0,9 мг/кг 1 раз в сутки ежедневно в течение 28 дней. Дозы препаратов пересчитаны по общепринятой формуле межвидового переноса доз по Freireich M. et al. и Улановой И.П. и др.

Уровень микроциркуляции в мышцах голени определяли с помощью оборудования производства компании Biopacsystems: полиграфа MP100 с модулем лазерной доплеровской флоуметрии LDF100C и инвазивного игольчатого датчика TSD144 на 21 и 28 сутки. Регистрация и обработка результатов лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) производилась с помощью программы AcqKnowledge версии 3.8.1, значения микроциркуляции выражались в перфузионных единицах (ПЕ). На 21 и 28 сутки производился вывод 50 % (n=10) животных из каждой группы. Уложив наркотизированное животное на правый бок, иссекали участок кожи на передне-латеральной поверхности левой голени, обнажали мышцы. Датчик устанавливали строго перпендикулярно к поверхности мышцы, исключая возникновение воздушной прослойки и пересыхание мышцы. Уровень микроциркуляции регистрировали в пяти точках: середина мышцы, точки на 3–4 мм выше, ниже, латеральнее и медиальнее от первой. Запись кривой уровня микроциркуляции проводили в течение 30 секунд в каждой точке. Из полученных пяти значений рассчитывали

среднее, вносили в протокол и принимали за уровень микроциркуляции в мышцах голени у данного животного. Из 10 полученных значений рассчитывали среднее, которое принимали за уровень микроциркуляции в данной группе животных на данном сроке исследования.

Забор исследуемой мышцы для морфологического исследования осуществляли по окончании процедуры ЛДФ. Для этого рассекали собственную фасцию голени, мышцу мобилизовали, отсекали от мест прикрепления, а затем фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина.

Для статистической оценки полученных данных использовали методы параметрической статистики. Значимость различий между группами определяли с помощью t-критерия Стьюдента для зависимых выборок. Достоверными считали различия между сравниваемыми значениями с уровнем значимости 95 % ($p < 0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение

Среднее значение уровня микроциркуляции в интактной мышце голени крыс составляет 527 ± 13 ПЕ. Полученный результат значимо не отличается от результатов, полученных другими авторами, использовавшими данную модель. При гистологическом исследовании миоциты образуют плотные пучки, в толще которых проходят полнокровные вены и артериолы, содержащие единичные эритроциты. Просветы сосудов широкие, эндотелиальные клетки без патологических изменений.

В группе ложнооперированных животных среднее значение уровня микроциркуляции в мышцах левой голени на всех сроках не имеет достоверных отличий от показателей в группе интактных животных (519 ± 13 ПЕ на 21-е сутки, $p = 0,66$; 521 ± 16 на 28-е сутки, $p = 0,77$). При гистологическом исследовании отличий от строения интактных мышц также не выявлено.

В группе моделирования ишемии мышц голени уровень микроциркуляции на всех сроках достоверно ниже значений в интактной мышце (325 ± 3 ПЕ на 21-е сутки, $p < 0,05$; 371 ± 2 ПЕ на 28-е сутки, $p < 0,05$). На 21 сутки ишемии пораженная мышца макроскопически выглядела набухшей с крупными участками серовато-коричневатого цвета. Гистологически крупные участки представляли собой очаги организующегося некроза с резорбцией некротических волокон и разрастанием грануляционной ткани. На 28 сутки мышца выглядела гипотрофичной, а цвет мышцы приближался к нормальному. Гистологически участки резорбируемого некроза были значительно меньше, вблизи которых встречались пучки атрофированных мышечных волокон. В микроциркуляторном русле наблюдались полнокровие и новообразование единичных капилляров.

В группе животных, пролеченных пентоксифиллином, отмечалось увеличение уровня микроциркуляции по сравнению с контрольной группой. Пентоксифиллин оказывает

положительное влияние на неоангиогенез, но к 28 суткам уровень микроциркуляции не достигает нормальных значений (353 ± 5 ПЕ на 21-е сутки, $p < 0,05$; 415 ± 2 ПЕ на 28-е сутки, $p < 0,05$).

Коррекция тадалафилом способствовала достоверному повышению уровня регионарного кровотока в ишемизированной мышце голени крыс по сравнению с показателями в третьей группе на соответствующем сроке (443 ± 5 ПЕ на 21-е сутки, $p < 0,05$; 832 ± 4 ПЕ на 28-е сутки, $p < 0,05$). Уровень микроциркуляции в данной группе на 21-е сутки приближался к показателю в группе интактных животных, а на 28-е сутки значительно превосходил его. Макроскопически ишемизированная мышца в опытной группе на 21-е и 28-е сутки эксперимента не отличалась по цвету и виду от мышц интактных крыс. Гистологически некротические изменения в мышцах не обнаруживались, лишь в некоторых участках встречались мелкие очаги атрофирующихся миоцитов с пролиферацией клеток; отмечалось усиленное новообразование капилляров, более выраженное на 28 сутки эксперимента.

Тадалафил стимулирует неоваскулогенез в ишемизированной мышце голени крысы. Свидетельством этого являются результаты ЛДФ и морфологического исследования. Уровень микроциркуляции в ишемизированных мышцах голени животных опытной группы на 21 сутки приближается к показателям в группе интактных животных, а на 28 сутки значительно выше. То есть можно говорить о том, что компенсаторное восстановление регионарного кровообращения в ишемизированных мышцах животных опытной группы произошло до 28-х суток эксперимента.

Ангиогенез – рост новых кровеносных сосудов – важный процесс, происходящий в организме человека, как в норме, так и при различных патологических состояниях, представляет собой динамический процесс пролиферации, миграции и дифференциации эндотелиальных клеток, требует активного взаимодействия эндотелиальных клеток, межклеточного матрикса, окружающих клеточных элементов. Применение тадалафила дает возможность стимулировать естественные механизмы ангиогенеза.

Природа создала универсальный фосфодиэстеразный механизм взаимосвязей биохимических процессов, обеспечивающих жизнедеятельность клетки и организма в целом. Свидетельством тому стали открытия последних десятилетий, показавшие возможность применения ингибиторов ФДЭ 5-го типа при различных заболеваниях и патологических состояниях. Важность дальнейшего изучения данного механизма подтверждает тот факт, что запланирован и начат целый ряд рандомизированных исследований по применению ингибиторов ФДЭ 5 в клинической практике, не связанной с эректильной дисфункцией. Последующий их анализ покажет, насколько этот механизм универсален [6].

Вывод

Полученные результаты в группе животных, получавших пентоксифиллин, позволяют констатировать положительное влияние на неоангиогенез, но к 28 суткам уровень микроциркуляции не достигает нормальных значений. Коррекция тадалафилом способствовала достоверному повышению уровня регионарного кровотока в ишемизированной мышце голени крыс по сравнению с показателями в контрольной группе на соответствующем сроке. Уровень микроциркуляции в данной группе на 21-е сутки приближался к показателю в группе интактных животных, а на 28-е сутки значительно превосходил его. Полученные данные подтверждают фармакологическую эффективность тадалафила, а совокупность косвенных и прямых данных свидетельствует в пользу того, что в основе данного эффекта лежит индукция ангиогенеза и улучшение кровообращения в дистальных отделах конечностей.

Список литературы

1. Артющкова Е. Б., Пашков Д. В., Покровский М. В. и др. Возможности фармакологической коррекции хронической ишемии конечности в эксперименте // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2008. – Т. 71, № 3. – С. 23-25.
2. Багдасарян А., Зудин А. Базисная терапия хронических облитерирующих заболеваний артерий нижних конечностей // Врач. – 2009. – № 5. – С. 56-58.
3. Диагностика и лечение пациентов с критической ишемией нижних конечностей: Российский консенсус // Совещание экспертов рабочей группы / под пред. А. В. Покровского. – М., 2002. – 40 с.
4. Колесник И. М., Лазаренко В. А., Покровский М. В. Влияние фармакологического preconditionирования силденафилом и варденафилом на состояние микроциркуляторного русла в ишемизированной скелетной мышце // Курский научно-практический вестник «Человек и здоровье». – 2015. – № 1. – С. 83-86.
5. Покровский А. В., Зотиков А. Е. Перспективы и действительность в лечении артеросклеротических поражений аорты. – М.: ИПС, 1996. – 189с.
6. Beyer S., Speich R., Fischler M. et al. Long-term experience with oral or inhaled vasodilator combination therapy in patients with pulmonary hypertension // Swiss. Med. Wkly. – 2005. – V. 135. – P. 114–118.
7. Block G, et al. Efficacy and safety of Tadalafil for the treatment of erectile dysfunction: results of integrated analysis. J. Urol 2002; 169: 1332-36.

8. Gamidov S. I., Sotnikova E. M., Gasanov R. V. Prevention of erectile dysfunction in patients with metabolic syndrome. *Urologia* 2007;(5):44-8. Russian. (Гамидов С. И., Сотникова Е. М., Гасанов Р. В. Профилактика эректильной дисфункции у больных с метаболическим синдромом // *Урология* 2007; 5: 44-49).
9. Giuffrida G. F., Longhi F., De Monti M. et al. Ischaemia critica agli arti inferiori: patogenesi, clinica e terapia: Risultati della nostra esperienza su 337 casi // *Minerva Cardioangiol.* – 1993; 41(6): 239–247.