

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МЕДИЦИНА

УДК 61

Н. А. Кузубова, Е. С. Лебедева, В. П. Золотницкая, А. Н. Федин, О. Н. Титова

ВОЗМОЖНОСТИ МЕДИКАМЕНТОЗНОЙ КОРРЕКЦИИ СОСУДИСТЫХ НАРУШЕНИЙ В МАЛОМ КРУГЕ КРОВООБРАЩЕНИЯ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ (экспериментальное исследование)

ФГУ «Научно-исследовательский институт пульмонологии»; ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет им. И. П. Павлова»

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) — одна из ведущих причин заболеваемости и смертности в мире. По прогнозам, к 2020 г. это заболевание займет третье место среди причин, приводящих к смерти [1]. Современные стандартные фармакологические виды лечения ХОБЛ, такие как бронходилататоры и кортикостероиды, не позволяют эффективно влиять на течение заболевания и существенно улучшать физиологические показатели. Поэтому поиск новых направлений в лечении ХОБЛ остается актуальной задачей [2]. Одним из таких направлений может быть воздействие на сосудистые нарушения, играющие важную роль в патогенезе этого заболевания. Сосудистые повреждения начинаются с дисфункции эндотелия, которая возникает на доклиническом этапе формирования болезни и способствует прогрессированию патологического процесса не только в легочной ткани, но и на системном уровне [3, 4]. Можно полагать, что восстановление эндотелиальной регуляторной функции с помощью препаратов с ангиопротекторными свойствами окажет положительный эффект на течение ХОБЛ и позволит замедлить/предупредить ее прогрессирование. Ряд исследований свидетельствует о положительном влиянии статинов на структуру и функцию эндотелия [5–7]. Доказанными ангиопротекторными свойствами обладает сулодексид, нормализующий функцию эндотелия за счет влияния на синтез эндотелиальных факторов, метаболизм липопротеидов в сосудистой стенке, экспрессию молекул адгезии, апоптоз эндотелиоцитов.

Цель исследования состояла в выявлении сосудистых нарушений в малом круге кровообращения на стадиях формирования экспериментальной модели ХОБЛ и определении возможности их медикаментозной коррекции.

Материалы и методы. Объектом исследования служили крысы-самцы Вистар массой 180–200 г из питомника лабораторных животных «Рапполово» РАМН. Исследо-

вания проводились в соответствии с приказом МЗСР РФ № 708н от 23.08.10 «Правила лабораторной практики». Картину стадийного формирования ХОБЛ воспроизводили с помощью ингаляционного воздействия диоксида азота [8]. Крыс помещали в камеру, смонтированную в вытяжном шкафу, которая соединялась шлангом с лабораторной установкой для получения диоксида азота. В результате химической реакции нитрита натрия с серной кислотой образовывалась смесь оксидов азота. Под влиянием кислорода воздуха, содержащегося в колбе, бесцветный оксид азота переходил в наиболее стабильный желто-бурый диоксид (NO_2), который по отводной трубке нагнетался в камеру с животными. Концентрация NO_2 определялась колориметрическим методом и составляла 30–40 мг/м³. Животные ($n = 31$) на протяжении 60 дней три раза в день подвергались 30-минутным экспозициям NO_2 с интервалом между ними 30 мин. Крысы интактной группы ($n = 5$) помещались в такую же камеру, заполненную воздухом. По пять особей были выведены из опыта (путем цервикальной дислокации) после 15 и 30 дней воздействия диоксида азота для исследования реактивности легочных артерий. После 30-го дня оставшиеся животные ($n = 21$) были разделены случайным образом на три группы по 7 особей в каждой. Ежедневно (до проведения ингаляционных затравок NO_2) животные 1-й группы получали препарат розувастатин (АстраЗенека, Великобритания) (в виде взвеси через пищеводный зонд), а животные 2-й группы — внутримышечные инъекции сулодексида (Alfa Wassermann, Италия). Препараты вводились в суточной дозе, рекомендованной для человека, с учетом межвидового пересчета. Крысы 3-й группы (контрольной) не получали лечения.

Исследования легочной микроциркуляции и тонической активности легочных артерий выполняли после 15, 30 и 60 дней воздействия диоксида азота. Состояние легочной микроциркуляции оценивали с помощью специально разработанной радионуклидной методики на основе перфузионной сцинтиграфии с $\text{Tc}^{99\text{m}}$ -макроагрегатами альбумина (Macrotex, $\text{Tc}^{99\text{m}}$). Животное в состоянии поверхностного наркоза (5 % раствор хлоралгидрата внутривенно) фиксировали на специальном столике в положении на спине. Обнажали бедренную вену и с помощью инсулинового шприца медленно вводили радиофармпрепарат (РФП), объем (0,05–0,1 мл) и активность (2–5 мБк) которого рассчитывали с учетом массы тела обследуемого животного. Перфузионную сцинтиграфию легких выполняли на гамма-камере «Sigma-410S» (США, ФРГ), сопряженной с ЭВМ. Столик с животным ориентировали перед детектором гамма-камеры таким образом, чтобы центр сцинтилляционного кристалла приходился на грудную клетку крысы. После этого производили сбор информации с набором 10000 импульсов в матрице $256 \times 256 \times 1$ в режиме увеличения изображения. Анализ сцинтиграмм осуществлялся визуально и путем компьютерной обработки с помощью программы, позволяющей оценить интенсивность микроциркуляции в каждом легком. Для оценки артериовенозного шунтирования сравнивали накопление РФП в легких с накоплением в большом круге кровообращения (головном мозге, почках и т. д.). После пробуждения животных переводили в виварий, а на следующий день продолжали ингаляции диоксида азота.

Для исследования сосудистой тонической активности из легочных артерий (диаметром менее 0,5 мм) брали два образца в виде колец длиной 3–4 мм и помещали в ванночки с аэрируемым проточным раствором Кребса–Хензелейта (рН 7,3–7,4; 37,0–37,5° С; 0,6 мл/мин) при начальном напряжении покоя 500 мг и выдерживали 60 мин для установления равновесия. Для увеличения исходного тонуса за 5 мин до начала и на протяжении исследования через ванночки с препаратами легочных артерий пер-

фузировали фенилэфрин (Serva, 5 мкг/мл). Сосудистую реактивность оценивали с помощью электромеханического преобразователя смещения, определяя изометрическое сокращение (напряжение в мГ) гладких мышц изолированных колец легочных артерий. Для оценки сосудистой реактивности в ванночку с перфузатом добавляли реагенты-дилататоры в объеме 1,0 мл в течение 1 мин: изопроterenол (1,0 мкг), беклометазон (1,0 мкг), нитросорбид (10 мкг), верапамил (10 мкг). Между началом введения веществ и измерением тонического мышечного напряжения проходило 8 мин.

При обработке результатов проводили сравнение средних величин с использованием t-критерия Стьюдента и метода сравнения совокупностей с попарно связанными вариантами. Статистическую обработку проводили с использованием программы Microsoft Excel 7.0.

Результаты и обсуждение. При визуальном анализе скинтиграмм легких интактных крыс обнаруживалось относительное преобладание перфузии в правом легком, обусловленное анатомическими особенностями органов дыхания у крыс: наличием четырех долей в правом легком и одной — в левом. Наибольшее количество импульсов (пропорционально капиллярному кровообращению в малом круте) приходилось на центральные и нижние отделы обоих легочных полей с некоторым разрежением в области верхушек. На правое легкое приходилось $62,1 \pm 2,3\%$, а на левое $37,9 \pm 2,2\%$ активности РФП. Еще одной особенностью скинтиграфического образа легких крыс являлось отсутствие четко выраженной «тени» от сердца и крупных сосудов, а легкие выглядели единым комплексом (рис. 1А), что объясняется наличием расположенной центрально над поверхностью сердца добавочной доли правого легкого.

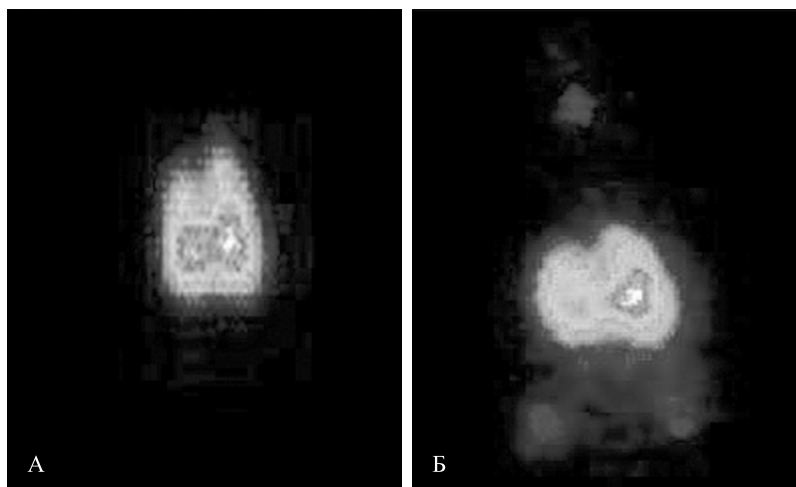


Рис. 1. А — скинтиграмма легких крысы в норме; Б — скинтиграмма легких крысы после 30 дней ингаляционного воздействия диоксида азота. Нарушения микроциркуляции, сброс крови «справаналево» по шунтам с фиксацией радиофармпрепарата в головном мозге и почках

Через 15 дней ингаляционного воздействия диоксида азота у всех обследованных крыс выявлялись диффузные нарушения микроциркуляции и локальные сегментарные изменения кровотока преимущественно в верхних отделах легких (табл. 1). Через 30 дней диффузные нарушения капиллярного кровотока носили существенно более вы-

раженный характер, а локальные изменения затрагивали не только легочные сегменты, но и добавочную, верхушечную, диафрагмальную доли правого легкого (табл. 1). У 29% крыс определялся сброс крови по шунтам в большой круг кровообращения, а процент шунтирования составил $15,4 \pm 2,7\%$ (рис. 1Б). У интактных крыс сброс крови по артериовенозным шунтам отсутствовал или составлял менее 2% от общей активности РФП.

Таблица 1. Сцинтиграфические признаки микроциркуляторных нарушений в легких крыс на этапах формирования ХОБЛ и в условиях медикаментозной коррекции

Нарушения перфузии	Длительность ингаляционного воздействия диоксида азота				
	15 дней (n=5)	30 дней (n=7)	60 дней (n=5)	60 дней + розувастатин (n=5)	60 дней + сулодексид (n=5)
Диффузные:					
— умеренно выраженные	60 %	14 %	—	—	40 %
— выраженные	40 %	57 %	40 %	40 %	60 %
— значительные	—	29 %	60 %	60 %	—
Локальные:					
— сегментарные	100 %	57 %	100 %	100 %	80 %
— долевы	—	43 %	60 %	40 %	—

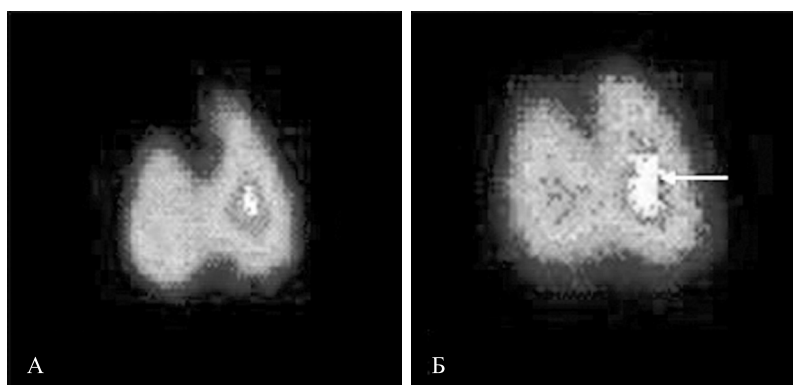


Рис. 2. Сцинтиграммы легких крысы с ХОБЛ и после лечения сулодексидом. А — 60 дней воздействия диоксида азота: ухудшение состояния микроциркуляции, диффузные и локальные нарушения кровотока. Б — 60 дней воздействия диоксида азота (лечение сулодексидом): положительная динамика микроциркуляторной функции, эффект компенсаторной гиперперфузии (стрелка)

Через 60 дней в контрольной группе крыс, не получавших лечения, преобладали значительные диффузные и локальные (сегментарные и долевы) нарушения легочной перфузии (табл. 1, рис. 2А). Лечение животных розувастатином не сказалось на состоянии микроциркуляции в легких, которое практически не отличалось от контрольной группы (табл. 1). У крыс, получавших инъекции сулодексида, выявлялась отчетливая положительная динамика микроциркуляции легких: у большинства определялись диффузные нарушения и только у 40% крыс — сегментарные дефекты перфузии (табл. 1, рис. 2Б). Отмечалось перераспределение кровотока, выявлялись зоны гиперперфузии в сохранных сегментах легких. Феномен артериовенозного шунтирования не был отмечен ни в 1-й, ни во 2-й группе.

Таким образом, уже после 15-дневной экспозиции диоксида азота (острая стадия) выявлялись отчетливые признаки диффузных и локальных нарушений микроциркуляции, которые нарастали к 30 дню (подострая стадия) и сопровождались эффектом артериовенозного шунтирования крови в легких. В последующие 30 дней (стадия хронизации) нарушения перфузии в контрольной группе продолжали нарастать с преобладанием значительных диффузных и локальных изменений. Сходная картина выраженных расстройств легочной микроциркуляции наблюдалась и в группе животных, получавших розувастатин. В то же время лечение животных сулодексимом, проводимое на стадии хронизации патологического процесса, оказало заметное положительное влияние на состояние капиллярного кровотока в легких. Эффект гиперперфузии (открытие резервной капиллярной сети в сохранных участках легких) развивался постепенно, приводя к компенсаторному усилению микроциркуляции в легких.

Исследование сосудистой реактивности показало, что длительное воздействие диоксида азота приводит к постепенному нарушению функционирования практически всех медиаторных систем стенки легочных артерий. По мере увеличения экспозиции диоксидом азота отмечалось снижение дилатационного эффекта на гладкую мышцу легочных артерий всех использованных реагентов-дилататоров. Изопротеренол и беклометазон уже после 15 дней ингаляции NO_2 оказывали достоверно ($p < 0,05$) меньший эффект на гладкомышечный тонус легочных артерий (рис. 3). Снижение сосудорасширяющего влияния нитросорбида отчетливо проявилось после 30-дневной, а блокатора Са-каналов верапамила — после 60-дневной экспозиции диоксида азота (рис. 3). На стадии формирования ХОБЛ (60 дней NO_2) наблюдалось максимальное ($p < 0,05$) снижение величины расслабления гладкой мышцы легочных артерий в ответ на все использованные вазодилататоры по сравнению с интактными животными: изопротеренола — на 40% ($p < 0,05$), беклометазона — на 31% ($p < 0,05$), нитросорбида — на 27% ($p < 0,05$) и верапамила — на 14% ($p < 0,05$).

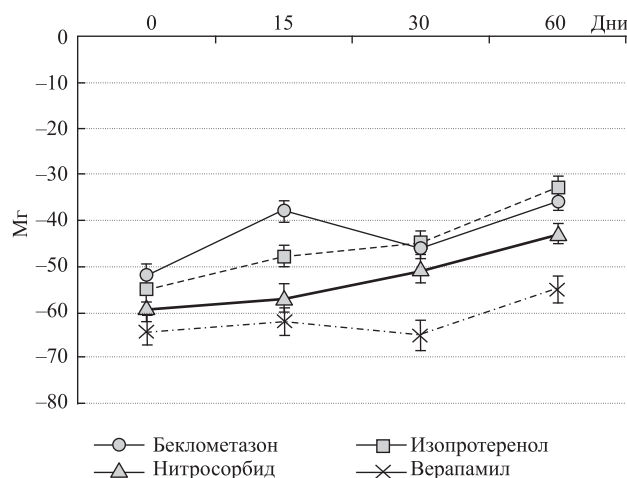


Рис. 3. Изменение реактивности гладких мышц легочных артерий крыс под влиянием различных фармакологических агентов на этапах формирования ХОБЛ.

По оси ординат: снижение напряжения гладких мышц легочных артерий (мг); по оси абсцисс: длительность воздействия диоксида азота (дни).

Лечебный эффект сулодексида проявился в усилении расслабления гладкой мышцы легочных артерий при воздействии β -адреномиметика изопротеренола: $-44,4 \pm 3,6$ мг, у нелеченных крыс $-33,6 \pm 3,9$ мг ($p < 0,05$) (рис. 4). Наибольшее расслабление вызывал донатор оксида азота нитросорбид ($-57,9 \pm 3,9$ мг, в контроле $-43,1 \pm 3,5$ мг, $p < 0,05$), что практически не отличалось от реакции легочных артерий интактных крыс ($-59,8 \pm 4,1$ мг) (рис. 4). Реакция легочных артерий на введение блокатора Са-каналов верапамила и кортикостероида беклометазона, напротив, была менее выражена, чем в контроле: $-36,3 \pm 2,8$ и $-26,7 \pm 2,3$ мг, в контроле соответственно $-55,0 \pm 3,2$ мг ($p < 0,05$) и $-35,9 \pm 1,3$ мг ($p < 0,05$) (рис. 4).

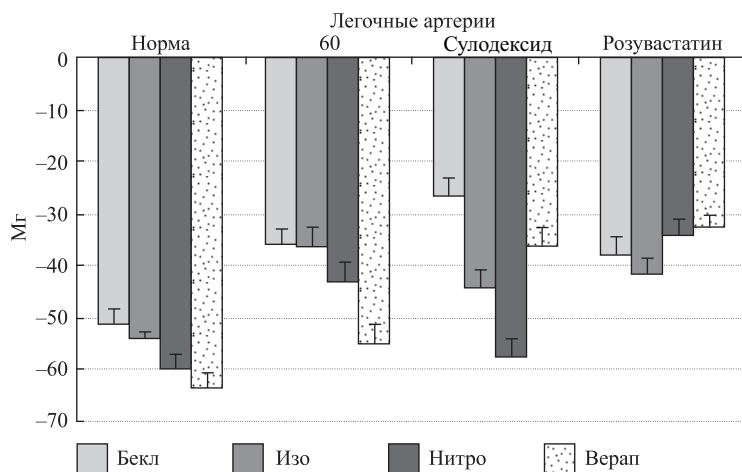


Рис. 4. Изменение реактивности гладких мышц легочных артерий под влиянием реагентов-вазодилаторов у крыс с ХОБЛ («60») и после лечения сулодексидом и розувастатином.

По оси ординат — тоническое напряжение гладких мышц в мг; «норма» — интактные крысы; «бекл» — беклометазон; «изо» — изопротеренол; «нитро» — нитросорбид; «верап» — верапамил.

В группе крыс, леченных розувастатином, только эффект изопротеренола на легочные артерии был сравним с группой, получавшей инъекции сулодексида: тоническое напряжение легочных артерий составило $-41,4 \pm 3,7$ мг ($p < 0,05$ в сравнении с контролем) (рис. 4). Величины расслабления гладких мышц легочных артерий в ответ на введение в перфузат нитросорбида и верапамила были значительно меньше не только в сравнении с группой 2, но и с контролем: $-33,9 \pm 3,5$ и $-32,8 \pm 2,2$ мг ($p < 0,05$) (рис. 4). Беклометазон вызывал расслабление гладких мышц легочных артерий такое же, как в контроле ($-37,9 \pm 3,1$ мг, $p > 0,05$) (рис. 4).

Таким образом, уже на ранней стадии формирования экспериментальной модели ХОБЛ (15 дней) отмечалось ухудшение функционального состояния сосудистого русла легких, что проявлялось в нарушениях капиллярного кровотока и снижении реакционной способности гладких мышц легочных артерий. По мере удлинения экспозиции диоксидом азота нарушения легочной микроциркуляции нарастали, распространяясь не только на сегменты, но и на доли легких. В процессе формирования ХОБЛ снижался дилатационный резерв легочных артерий, что нашло отражение в значимом снижении амплитуды расслабления гладких мышц в ответ на воздействие сосудорасширяющих препаратов с различным механизмом действия. Одной из причин этих нарушений яв-

ляется дисфункция эндотелия, отвечающего за регуляцию сосудистого тонуса, ремоделирование сосудистой стенки, рост гладкомышечных клеток посредством секреции биологически активных веществ — вазоконстрикторов (эндотелин-1, ангиотензин II, кислородные радикалы и др.) и вазодилаторов (оксид азота, эндотелиальный фактор гиперполяризации и др.) [9, 10]. При эндотелиальной дисфункции баланс продукции эндотелием сосудорасширяющих и сосудосуживающих субстанций меняется, в результате чего уменьшается эндотелийзависимая релаксация [4, 10]. У больных ХОБЛ нарушения вазорегулирующей функции эндотелия возникают уже на ранней стадии заболевания и прогрессируют по мере утяжеления состояния и формирования хронического легочного сердца. Так, в плазме крови пациентов с 2 стадией ХОБЛ установлено повышение концентрации эндотелина-1 — важнейшего маркера функциональной активности эндотелия [11]. Эндотелин-1 активирует рецепторы на гладкомышечных клетках, вызывая стойкую вазоконстрикцию и пролиферацию средней оболочки мелких сосудов, стимулирует синтез провоспалительных цитокинов, поддерживая персистенцию хронического воспаления, усиливает адгезию тромбоцитов и образование микротромбов [12, 13].

Поиск средств, восстанавливающих регуляторную функцию эндотелия в целях профилактики и лечения ХОБЛ, остается актуальной проблемой. Применение таких вазодилаторов, как простаноиды, антагонисты рецепторов эндотелина-1, ингибиторы фосфодиэстеразы-5, на ранней стадии формирования ХОБЛ (у больных с давлением в легочной артерии < 40 мм рт. ст.) не оказывало благоприятного эффекта на течение заболевания и могло привести к ухудшению газообменной функции легких [10]. Исследования влияния статинов на вазорегулирующую функцию эндотелия у пациентов с ХОБЛ единичны, а их результаты из-за методологических ограничений позволяют лишь предположительно говорить о способности статинов замедлять прогрессирование заболевания [14, 15]. Как показали результаты проведенного исследования, применение розувастатина у животных с экспериментальной ХОБЛ не оказало положительного эффекта на состояние легочной микроциркуляции и реактивности гладких мышц легочных артерий, которое практически не отличалось от контрольной группы, не получавшей лечения. Дилататорная реакция легочных артерий крыс, получавших розувастатин, наблюдалась только в ответ на воздействие β -адреномиметика изопротеренола, что можно связать с восстановлением чувствительности β_2 -адренорецепторов сосудистой стенки, десенситизированных в процессе длительного воздействия диоксида азота.

Результатом лечения животных с ХОБЛ сулодексидом было улучшение легочной микроциркуляции с включением в кровоток резервных зон и исчезновением долевого нарушения перфузии. Кроме того, отмечалось увеличение дилататорного компонента сосудистого тонуса легочных артерий, что выражалось в усилении реакции расслабления в ответ на введение изопротеренола и, особенно, нитросорбида. По всей видимости, можно говорить о восстановлении под влиянием сулодексида NO-зависимого механизма расслабления гладких мышц легочных артерий до уровня интактных животных и частичном восстановлении β -адренергической вазодилатации. Положительный эффект сулодексида может быть обусловлен улучшением функционального состояния эндотелиоцитов и, возможно, подавлением синтеза эндотелина-1.

При формировании ХОБЛ патологический процесс захватывает не только бронхиальную и респираторную зоны легких, но и сосудистую систему. Васкулярные повреждения возникают на самой ранней стадии ХОБЛ, нарастают по мере прогрессирования

болезни, формируя морфологический субстрат для развития легочной гипертензии и хронического легочного сердца. Проведенные исследования показали перспективность использования в качестве корректора нарушенной эндотелиальной функции препарата сулодексид. Отличительной особенностью эффекта сулодексида является восстановление NO-медиаторной системы эндотелия и ее регулирующего влияния на тонус легочных артерий. Преобладание эндотелийзависимой релаксации сосудов легких сопровождается улучшением легочного капиллярного кровотока и включением в циркуляцию резервных сосудистых зон. Можно полагать, что использование медикаментозных эндотелийпротективных средств на ранней стадии ХОБЛ (а не только на этапе далеко зашедшего патологического процесса) окажет более значимый терапевтический эффект на течение заболевания и позволит замедлить/предупредить развитие вторичной легочной гипертензии и хронического легочного сердца — важнейших причин инвалидизации и смертности пациентов с этой патологией.

Литература

1. Anderson C. K., Mori M., Bjermer L. et al. Alterations in lung cell populations in patients with chronic obstructive pulmonary disease // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010. Vol. 181, N 3. P. 206–217.
2. Morjaria J. B., Malerba M., Polosa R. Biologic and pharmacologic therapies in clinical development for the inflammatory response in COPD // *Drug Discovery Today*. 2010. Vol. 15, N 9–10. P. 396–405.
3. Кузубова Н. А., Перлей В. Е., Гичкин А. Ю. и др. Влияние ингаляционной глюкокортикоидной терапии на эндотелиальную функцию и состояние легочно-сердечной гемодинамики у больных хронической обструктивной болезнью легких // *Пульмонология*. 2007. № 5. С. 84–87.
4. Chhabra S. K., Gupta M. Coexistent chronic obstructive pulmonary disease-heart failure: mechanisms, diagnostic and therapeutic dilemmas // *Indian J. Chest Dis. Allied Sci.* 2010. Vol. 52, N 4. P. 225–338.
5. Merx M. W., Weber C. Statins in the intensive care unit // *Curr. Opin. Crit. Care*. 2006. Vol. 12, N 4. P. 309–314.
6. Blamoum A. I., Batty G. N., Debari V. A. et al. Statins may reduce episodes of exacerbation and the requirement for intubation in patients with COPD: evidence from a retrospective cohort study // *Int. J. Clin. Pract.* 2008. Vol. 62, N 9. P. 1373–1378.
7. Walsh G. Statins as emerging treatments for asthma and chronic obstructive pulmonary disease // *Expert Rev. Resp. Med.* 2008. Vol. 2, N 3. P. 329–335.
8. Данилов Л. Н., Лебедева Е. С., Кузубова Н. А. и др. Патент № 2360296 «Способ моделирования хронической обструктивной болезни легких» // *Бюл.* № 18. 27.06.2009.
9. Дисфункция эндотелия. Причины, механизмы, фармакологическая коррекция / под ред. проф. Н. Н. Петрищева. СПб.: СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, 2003. 184 с.
10. Zakyntinos E., Daniil Z., Papanikolaou J., Makris D. Pulmonary hypertension in COPD: pathophysiology and therapeutic targets // *Curr. Drug Targets*. 2011. Vol. 12, N 4. P. 501–513.
11. Илькович М. М., Кузубова Н. А. Патогенез хронической обструктивной болезни легких // *Хроническая обструктивная болезнь легких* / под ред. А. Г. Чучалина. М.: Атмосфера, 2008. С. 82–112.
12. Сироткин С. А., Прибылов С. А. Системная дисфункция эпителия у больных хронической обструктивной болезнью легких // *Биомед. ж-л Medline.ru*. 2007. Т. 8. ст. 5. С. 41–48.
13. Naeije R. Pulmonary hypertension and right heart failure in chronic obstructive pulmonary disease // *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2005. Vol. 2, N 1. P. 20–22.
14. Soyseth V., Brekke P. H., Smith P. et al. Statin use is associated with reduced mortality in COPD // *Eur. Respir. J.* 2007. Vol. 29, N 2. P. 279–283.
15. Janda S., Park K., Fitz Gerald J. M. Statins in COPD // *Chest*. 2009. Vol. 136, N 3. P. 734–743.

Статья поступила в редакцию 7 декабря 2011 г.