

Marcin Hellmann

**Wpływ sildenafilu i treprostinilu na mikrokążenie
u ludzi zdrowych oceniany przy pomocy
laserowego skanera dopplerowskiego**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor : Prof. dr hab. med. Leszek Bieniaszewski

Wydział Lekarski

Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk 2012

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	3
1. Wstęp	5
2. Cele pracy	16
3. Materiał i Metody	17
3.1. Materiał.....	17
3.2. Substancje wazoaktywne użyte w badaniach	18
3.3. Metodyka badań	18
3.4. Sposób przedstawienia danych.....	20
3.5. Protokoły badawcze.....	21
3.5.1. Protokół 1 - Wpływ 50 mg i 100 mg sildenafilu na mikrokrążenie.....	21
3.5.2. Protokół 2 - Wpływ treprostinilu na mikrokrążenie - ocena krótkookresowa ..	23
3.5.3. Protokół 3 - Wpływ treprostinilu na mikrokrążenie - ocena długookresowa ..	26
3.6. Analiza statystyczna	27
4. Wyniki.....	28
4.1. Ocena wpływu sildenafilu na wielkość przepływu w mikrokrążeniu	28
4.2. Krótkookresowa ocena wpływu treprostinilu na mikrokrążenie.....	30
4.3. Długookresowa ocena wpływu treprostinilu na mikrokrążenie	33
4.3.1. Ocena odruchu aksonowego.....	36
5. Dyskusja.....	37
6. Wnioski.....	45
7. Streszczenie.....	46
8. Piśmiennictwo.....	48

Wykaz stosowanych skrótów

Ach: Acetylcholine - acetylocholina

AUC: Area Under the Curve - pole pod krzywą

BMI: Body Mass Index - wskaźnik masy ciała

cGMP: cyclic Guanosine Mono Phosphate - cykliczny guanozyna monofosforan

CVC: Cutaneous Vascular Conductance - skórne przewodnictwo naczyniowe

DBP: Diastolic Blood Pressure - rozkurczowe ciśnienie tętnicze

EDHF: Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor - śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący

EMLA: Eutectic Mixture of Local Anesthetics - mieszanina eutektyczna miejscowo działających anestetyków

ET-1: Endothelin-1 - endotelina 1

FMD: Flow Mediated Dilatation - wazodylatacja po niedokrwieniu

IMT: Intima Media Thickness - ocena kompleksu błona środkowa-śródbłonek

LDF: Laser Doppler Flowmetry - laserowy przepływomierz dopplerowski

LDI: Laser Doppler Imaging - laserowy skaner dopplerowski

LTH: Local Thermal Hyperemia - miejscowe przekrwienie termiczne

MAP: Mean Arterial Pressure - średnie ciśnienie tętnicze

NO: Nitric Oxide - tlenek azotu

NYHA: New York Heart Association - klasyfikacja niewydolności serca

PDE5: Phosphodiesterase type 5 - fosfodiesteraza typu 5

PGI2: Prostacycline - prostacyklina

PORH: Post-Occlusive Reactive Hyperemia - pookluzyjna reakcja przekrwienia

PU: Perfusion Unit - jednostka perfuzji

PWV: Pulse Wave Velocity - podatność naczyń tętniczych

ROI: Region of Interest - obszar zainteresowania

SBP: Systolic Blood Pressure - skurczowe ciśnienie tętnicze

SNP: Sodium Nitroprusside - nitroprusydek sodu

1. Wstęp

Choroby układu krążenia są główną przyczyną zgonów w krajach uprzemysłowionych. We wszystkich tych schorzeniach wspólną cechą są zmiany strukturalne bądź czynnościowe zachodzące w naczyniach, które powodują zaburzenia przepływu krwi [1]. Dysfunkcja śródbłonna jest kluczowym zjawiskiem w patogenezie chorób sercowo-naczyniowych i wyprzedza zmiany strukturalne w naczyniach, jak również wystąpienie objawów klinicznych [2,3].

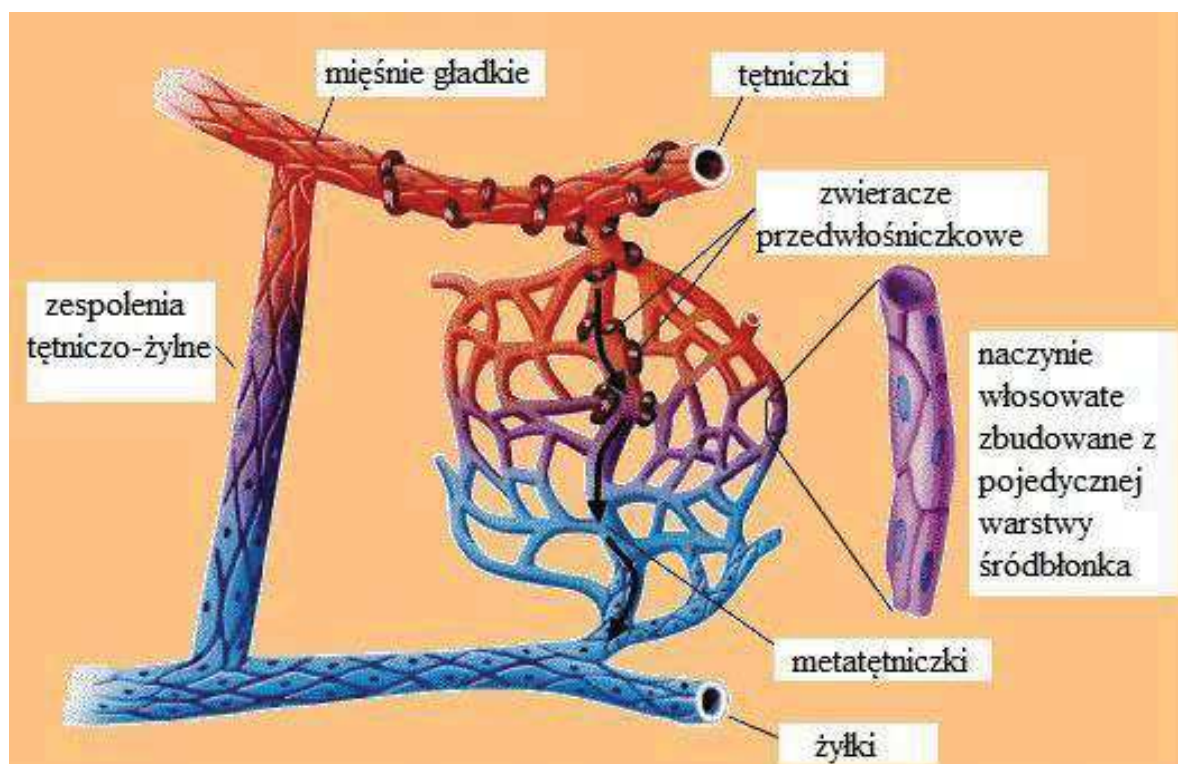
Śródbłonek reguluje napięcie ściany naczyń poprzez wydzielanie tlenku azotu (NO, nitric oxide), prostacykliny, endoteliny (ET-1, endothelin-1) oraz śródbłonkowego czynnika hiperpolaryzującego (EDHF, endothelium derived hyperpolarizing factor). Ponadto, nieuszkodzony śródbłonek hamuje agregację płytek krwi, kontroluje przepuszczalność naczyń, wpływa na migrację leukocytów oraz odpowiada za proliferację komórek mięśni gładkich. Niemniej jednak, pojęcie funkcji śródbłonna najczęściej odnosi się do zdolności uwalniania substancji wazodylatacyjnych (tlenku azotu, prostacykliny), które bezpośrednio rozkurczają mięśniówkę gładką ściany naczyniowej [2]. Dysfunkcja śródbłonna występuje na wczesnym etapie wielu chorób układu krążenia m.in. w miażdżycy i nadciśnieniu tętniczym. Jest niezależnym czynnikiem prognostycznym zdarzeń sercowo-naczyniowych w nadciśnieniu tętniczym, chorobie wieńcowej oraz niewydolności serca [4].

Możliwość precyzyjnej oceny funkcji naczyń i śródbłonna jest zatem istotna w przewidywaniu ryzyka wystąpienia oraz progresji chorób układu krążenia [3]. Istnieje wiele nieinwazyjnych i stosowanych rutynowo technik oceny stanu naczyń, wśród których wymienić należy wazodylację tętnicy ramiennej po niedokrwieniu (FMD, flow-mediated vasodilation), badanie podatności naczyń tętniczych (PWV, pulse wave velocity), czy ocenę kompleksu błona środkowa-śródbłonek (IMT, intima-media thickness). Wszystkie te metody

cechuje uznana wartość kliniczna w monitorowaniu progresji choroby lub w ocenie efektów leczenia, niemniej jednak służą one badaniu dużych i średnich naczyń nie dając wglądu w mechanizmy patofizjologiczne zachodzące w mikrokrążeniu [5,6]. Tymczasem w chorobach układowych tkanki łącznej takich jak np. twardzina układowa dochodzi głównie do dysfunkcji mikrokrążenia, która jest wczesnym objawem choroby i występuje w postaci objawu Raynauda. Ponadto, zmiany mikroangiopatyczne występują w przebiegu cukrzycy, w chorobach tętnic obwodowych oraz w przewlekłej chorobie nerek. Zaburzenia struktury i funkcji mikrokrążenia obserwuje się w chorobie wieńcowej, nadciśnieniu tętniczym, hipercholesterolemii, jak również w fizjologicznych procesach starzenia [2,6]. Coraz więcej dowodów wskazuje, iż miejscowe zaburzenie funkcji mikrokrążenia może odzwierciedlać uogólnioną dysfunkcję układu mikrokronaczyń, jak również może wyprzedzać zmiany zachodzące w dużych naczyniach. Dlatego wydaje się istotne, by w sposób nieinwazyjny móc ocenić strukturę i funkcję mikrokrążenia [3,7].

Mikrokrążenie jest częścią systemu sercowo-naczyniowego, zlokalizowaną między układem tętniczym a żylnym. Naczynia mikrokrążenia mają średnicę poniżej 200 μm , a w ich skład wchodzi tętniczki (arteriole), naczynia włosowate (kapilary), żyłki (venule) oraz zespolenia tętniczo-żylne (anastomozy). Każda z tych części posiada unikatową strukturę i funkcję. Tętniczki zbudowane są głównie z mięśniówki gładkiej i odpowiadają przede wszystkim za regulację przepływu i tym samym za dostarczanie krwi do otaczających tkanek. Naczynia włosowate posiadają bardzo cienką ścianę zbudowaną ze śródbłonna, dzięki czemu odpowiadają za wymianę tlenu, składników odżywczych, dwutlenku węgla i substancji przemiany materii między krwią a tkankami. Żyłki odprowadzają krew z kapilar w kierunku serca. Pełnią również funkcję w obronie immunologicznej organizmu i uczestniczą w wymianie makromolekuł [8]. Zespolenia tętniczo-żylne umożliwiają bezpośredni przepływ krwi z tętniczek do żyłek z pominięciem sieci kapilarnej, a więc z wykluczeniem wymiany

substancji odżywczych. Są zatem wykorzystywane w regulacji przepływu krwi a ich aktywność warunkuje temperaturę organizmu. Anastomozy są szczególnie obecne w mikrokrazeniu skórnym, gdyż narząd ten odpowiada za termoregulację ustroju. Przepływ krwi w mikrokrazeniu odbywa się zgodnie z lokalnie występującym gradientem ciśnień między częścią tętniczą a żylną. Za utrzymanie odpowiednich przepływów, umożliwiających właściwą wymianę gazów i substancji między krwią a przestrzenią pozanaczyniową odpowiada skomplikowany mechanizm autoregulacji, obejmujący aktywność śródbłonna i mięśniówki gładkiej. Ważną rolę w regulacji średnicy naczyń odgrywa śródbłonek, który wydziela wiele substancji wazodylatacyjnych (tlenek azotu, prostacyklina) oraz wazokonstrykcyjnych, takich jak endotelina [9,10].



Rysunek 1. Anatomia naczyń mikrokrazenia (opracowano na podstawie Exercise Physiology Digital Image Archive).

Mikrokrążenie jest częścią układu sercowo-naczyniowego, której badanie jest szczególnie trudne ze względu na mikroskopijne wymiary naczyń, niejednorodną morfologię oraz zróżnicowany przepływ krwi w zależności od miejsca badania [10]. Najwięcej informacji na temat budowy i fizjologii mikrokrążenia dostarczyły badania naczyń *in vitro*. Izolowane naczynia można poddawać rozciąganiu na miografie oraz badać wpływ bodźców zewnętrznych takich jak substancje wazoaktywne. Takie podejście, mimo iż inwazyjne, pozwala na ocenę reaktywności naczyń bez uwzględnienia wpływu układu nerwowego, krążących we krwi hormonów i metabolitów oraz naturalnych bodźców mechanicznych. Najlepszym przykładem tego typu badań są doświadczenia, których wyniki opublikowali w 1980 w *Nature* Furchgott i Zawadzki [11]. Wyjaśniły one funkcję regulacyjną śródbłonna naczyniowego. Badania tego typu mimo swoich niewątpliwych zalet mają również wiele ograniczeń. Przeprowadzane są w kontrolowanych warunkach, ale poza organizmem, a więc środowisko, w którym badane są naczynia nie jest naturalne. Powoduje to zatem trudność w przekładaniu obserwacji i wyników tych badań do warunków klinicznych [12].

W ciągu ostatnich dwudziestu lat udoskonalono wiele metod pozwalających badać mikrokrążenie *in vivo*. Większość z nich, jak np. metoda izotopowa czy pletyzmografia, wykorzystywana jest głównie w celach naukowych [10]. Wśród metod badania mikrokrążenia, tymi o uznanej wartości klinicznej są szeroko stosowane w diagnostyce: kapilaroskopia, wideo-kapilaroskopia, termografia, czy przezskórny pomiar prężności tlenu [13]. Mimo licznych zalet i aplikacji praktycznych powyższych technik, skupiają się one głównie na badaniach morfologicznych cech mikrokrążenia, bądź rejestracji przepływu krwi w stanie spoczynku. Ze względu na fakt, iż niedokrwienie jest przyczyną wielu patologii, zrozumienie mechanizmów regulacji przepływu krwi w mikrokrążeniu wydaje się bardzo istotne. Badanie mikrokrążenia w stanie spoczynku zwykle nie dostarcza użytecznych informacji na temat mechanizmów patofizjologicznych, a pomiary takie cechują się dużą

zmiennością czasową i przestrzenną przepływu i ciśnienia. Dlatego, funkcję mikrokrażenia powinno badać się w odpowiedzi na bodźce farmakologiczne bądź fizjologiczne, co pozwala na ocenę reaktywności naczyń [12].

Mikrokrażenie u ludzi można oceniać w sposób nieinwazyjny przy pomocy techniki laserowo-dopplerowskiej. Metoda ta pozwala na miejscową rejestrację ukrwienia i ocenę ewentualnych zmian przepływu krwi w odpowiedzi na leki podane ogólnoustrojowo oraz testy prowokacyjne, wśród których najczęściej stosowane są: test pookluzyjnej reakcji przekrwiennej (PORH, post-occlusive reactive hyperemia), test przekrwienia termicznego (LTH, local thermal hyperemia), mikrodializa i jonoforeza substancji wazoaktywnych (głównie acetylocholino i nitroprusydku sodu) [2,3].

Pierwsze informacje o zastosowaniu techniki laserowo-dopplerowskiej w badaniach mikrokrażenia podane zostały w roku 1975 w pracy opublikowanej w *Nature* przez Sterna [14]. Za początek rozwoju tej metody uważa się konstrukcję laserowego przepływomierza dopplerowskiego (LDF, laser doppler flowmetry), który pozwala na ocenę przepływu krwi w bardzo małej objętości tkanki (1 mm^3). Pomiar odbywa się dzięki umieszczonej w obszarze badania sondzie, która emituje światło lasera i rejestruje ukrwienie. Odmianą zaletą metody LDF jest fakt, iż pomiar dokonywany jest w czasie rzeczywistym, co w połączeniu z testami stymulacyjnymi pozwala na ocenę reaktywności mikronaczyń. Aparat znalazł zastosowanie w badaniach naukowych i medycynie klinicznej. Jednak niewątpliwą wadą klasycznej punktowej rejestracji ukrwienia metodą laserowego przepływomierza dopplerowskiego okazała się zmienność przestrzenna pomiarów, wynikająca z dużej niejednorodności mikrokrażenia [2,10]. Rozwiązaniem technicznym zmniejszającym wpływ tego ograniczenia na powtarzalność pomiaru jest obrazowanie ukrwienia w większym obszarze za pomocą laserowego skanera dopplerowskiego (LDI, laser doppler imaging). Dodatkowo, nie bez

znaczenia jest fakt, że badania wykonywane za pomocą techniki LDI są bezkontaktowe, co pozwala na zastosowanie tej metody w warunkach sali operacyjnej, w diagnostyce oparzeń czy chorobach dermatologicznych. LDI jest często wykorzystywany w badaniach naukowych oceniających wpływ leków na mikrokążenie, gdyż pozwala na tworzenie dwuwymiarowych (2D) map perfuzji badanego obszaru [3].

Metoda laserowo-dopplerowska wykorzystuje monochromatyczne światło lasera o wąskim paśmie, od czerwieni do pobliza podczerwieni. Aparat emituje w głąb tkanki wiązkę promieniowania, która rozchodzi się w jej obrębie. Fotony napotykają na swej drodze poruszające się krwinki, zmieniając częstotliwość swych drgań zgodnie ze zjawiskiem Dopplera. Światło powracające jest następnie analizowane przy użyciu systemu fotodetekcji, a aparat generuje napięcie, które jest wprost proporcjonalne do prędkości i liczby przemieszczających się krwinek w obszarze badania [2,10].

Głównym ograniczeniem techniki laserowo-dopplerowskiej jest fakt, iż nie jest możliwy pomiar bezwzględnych wartości perfuzji (w ml/min). Aparat rejestruje ukrwienie w badanym obszarze tkanki w arbitralnych jednostkach perfuzji (PU) lub miliwoltach ($1 \text{ PU} = 10 \text{ mV}$). Większość autorów stara się zatem wyrażać wyniki jako przewodnictwo (CVC, cutaneous vascular conductance) dzieląc przepływ krwi przez średnie ciśnienie tętnicze (mV/mmHg). Takie podejście wydaje się być bardziej fizjologiczne, gdyż bierze pod uwagę ewentualne różnice i zmiany ciśnienia tętniczego [2].

Brak standaryzacji metodyki badań i wysokie koszty aparatury poważnie ograniczają stosowanie techniki laserowo-dopplerowskiej w rutynowej praktyce klinicznej np. do celów diagnostycznych. Bezpośrednie porównywanie wyników jest trudne ze względu na to, iż aparatura konstruowana jest przez różnych producentów. Większość zastosowań technicznych LDF i LDI dotyczy nieinwazyjnych pomiarów na powierzchni skóry. Wynika to

z faktu, iż jest to obszar łatwo dostępny, a pomiary takie nie obciążają osoby badanej. Niewątpliwie w badaniach mikrokążeń innych obszarów organizmu, jak również w badaniach śródoperacyjnych przewagę mają bezkontaktowe laserowe skanery dopplerowskie, których głowica usytuowana jest około 20 cm nad obszarem badanym [3,10].



Rysunek 2. Przykład użycia laserowego skanera dopplerowskiego w połączeniu z jonoforezą.

Laserowe skanery dopplerowskie są wykorzystywane głównie w badaniach naukowych oceniających funkcję śródbłonna i naczyń mikrokążeń. Dzięki technice jonoforezy można podawać lokalnie wiele substancji wazoaktywnych (zwykle stosuje się acetylocholinę i nitroprusydek sodu). Odpowiedź mikronaczyń na te substancje najczęściej ocenia się korzystając z LDI [15]. Połączenie tych dwóch technik pozwala w sposób nieinwazyjny prowadzić badania mikrokążeń w odpowiedzi na różne bodźce farmakologiczne [16].

Stosując nieinwazyjny laserowy skaner dopplerowski najczęściej wykorzystuje się jako model badawczy mikrokązenie skórne [6,7]. W związku z tym, technika ta jest często stosowana w ocenie wpływu substancji wazoaktywnych na mikrokązenie obwodowe. Leki można podawać systemowo, bądź miejscowo za pomocą systemu jonoforezy, a następnie badać ewentualne zmiany przepływu zachodzące w mikrokronaczeniach [2,3]. Takie badania wydają się szczególnie istotne, biorąc pod uwagę dużą grupę chorób, w których dochodzi do zaburzeń mikrokązenia. W przebiegu takich schorzeń jak cukrzyca czy przewlekła choroba nerek dysfunkcja mikronaczyń ma charakter uogólniony i często występuje jako powikłanie choroby. Natomiast, w chorobach układowych tkanki łącznej np. twardzinie układowej dochodzi do zmian w mikrokązeniu, które często wyprzedzają wystąpienie pełnoobjawowej choroby [2]. Dysfunkcja naczyń jest kluczowym elementem w patogenezie twardziny układowej. Dotyczy zarówno mikrokązenia, jak i dużych naczyń. Przy czym, miejscowe zaburzenia reaktywności mikronaczyń pod postacią objawu Raynauda występują u większości pacjentów i mogą wyprzedzać wystąpienie choroby nawet o kilka lat [17]. Za pomocą laserowego skanera dopplerowskiego i laserowej przepływometrii dopplerowskiej wykazano zmniejszenie przepływu krwi w mikrokązeniu palców rąk u pacjentów z twardziną układową [18,19]. W schorzeniach takich pożądanym byłoby wysokie miejscowe stężenie substancji rozkurczającej naczynia [20].

Możliwości leczenia zaburzeń mikrokązenia są bardzo ograniczone. W ostatnich latach podejmowano badania nad wpływem sildenafilu na mikrokązenie obwodowe [21-24]. Nie do końca wyjaśnionym problemem pozostaje skuteczna dawka leku i bezpieczeństwo jego stosowania ze względu na wpływ na duże naczynia.

Sildenafil jest selektywnym inhibitorem swoistej dla cyklicznego monofosforanu guanozyny (cGMP) fosfodiesterazy typu 5 (PDE5), enzymu, który odpowiada za rozkład cGMP.

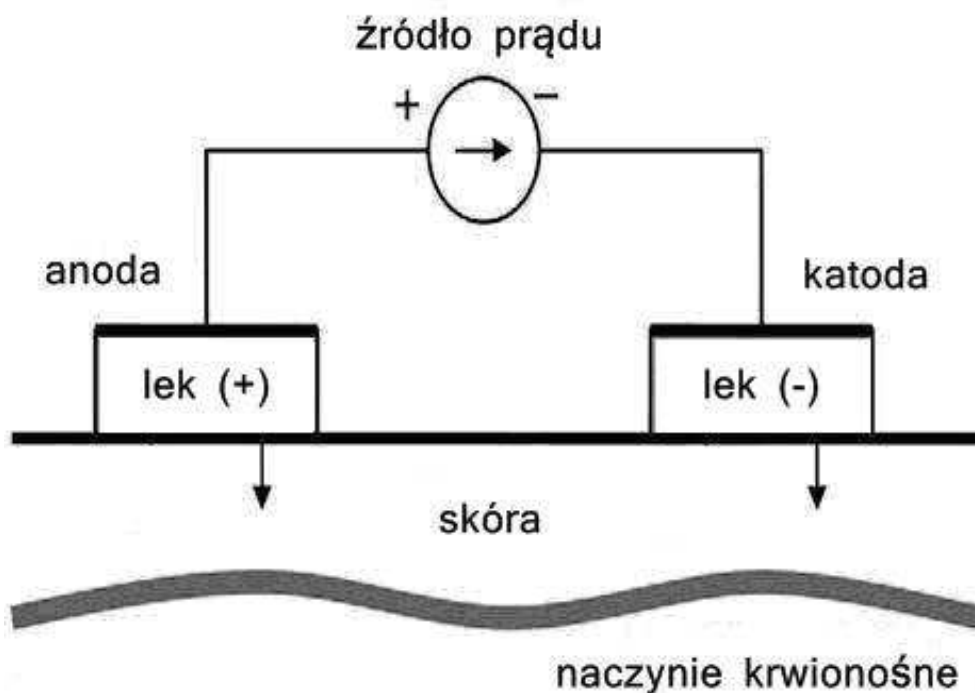
Wiadomo iż enzym ten, występuje w ciałach jamistych prącia, a także w krążeniu płucnym. Sildenafil zwiększa stężenie cGMP w komórkach mięśni gładkich ścian naczyń płucnych, co powoduje ich rozkurcz. U pacjentów z nadciśnieniem płucnym może to prowadzić do rozszerzenia naczyń płucnych, z niewielkim rozszerzeniem naczyń w krążeniu ogólnym. Sildenafil został zarejestrowany do stosowania u pacjentów dorosłych z tętniczym nadciśnieniem płucnym zakwalifikowanych do II klasy czynnościowej wg NYHA [25].

W leczeniu zaburzeń mikrokrążenia w ostatnich latach zainteresowanie budzą analogii prostacykliny. Jedynym zatwierdzonym obecnie w tym wskazaniu lekiem jest iloprost, analog prostacykliny, podawany dożylnie u pacjentów z twardziną układową [26]. Innym lekiem z tej grupy jest treprostinil podawany podskórnie.

Treprostinil jest syntetycznym analogiem prostacykliny o działaniu rozszerzającym naczynia tętnicze płucne i systemowe oraz hamującym agregację płytek krwi. W badaniach na zwierzętach wykazano, że efekt wazodylatacyjny prowadzi do zmniejszenia obciążenia następczego komór serca oraz zwiększenia indeksu sercowego i pojemności wyrzutowej serca. Stabilność chemiczna treprostinilu umożliwia podawanie go w temperaturze pokojowej w roztworze fizjologicznym. Treprostinil jest zalecany do leczenia pacjentów z tętniczym nadciśnieniem płucnym zakwalifikowanych do III i IV klasy czynnościowej wg NYHA, u których nie jest skuteczna terapia konwencjonalna [20,25].

Jednakże, pożądany efekt terapeutyczny substancji wazodylatacyjnej jest często równoważony przez poważne ogólnoustrojowe działania niepożądane związane z silnymi właściwościami rozszerzenia naczyń krwionośnych. Miejscowe podawanie tych leków pozwoliłoby na uniknięcie toksyczności systemowej oraz zwiększenie stężenia leku w obszarze docelowym [20].

Jonoforeza jest nieinwazyjną metodą miejscowej aplikacji substancji rozpuszczonych (np. leków) będących w formie zjonizowanej. Polega na przezskórnym przenikaniu jonów, które możliwe jest dzięki zastosowaniu prądu elektrycznego o małym natężeniu (maksimum 0,5 mA). Wprowadzenie cząstek obdarzonych ładunkiem elektrycznym do organizmu przez skórę jest możliwe dzięki odpowiedniemu urządzeniu emitującemu galwaniczny prąd stały. Ilość wprowadzonego leku jest wprost proporcjonalna do natężenia prądu i czasu jego przepływu. Przenikanie leku zależy również od jego stężenia, pH roztworu i właściwości fizjologicznych skóry [27].



Rysunek 3. Idea jonoforezy.

Wydaje się zatem, iż jonoforeza jest techniką szczególnie nadającą się do badania wpływu substancji wazoaktywnych na mikrokrażenie. Ponadto, mogłaby stanowić idealną drogę podania leku w chorobach mikronaczyń, w których pożądany jest efekt miejscowy.

Z przedstawionych dwóch leków, jedynie treprostinil podawany w formie podskórnej, możliwy jest do zastosowania w jonoforezie. Jak wynika z dostępnej wiedzy, badania wpływu jonoforezy analogów prostacykliny na mikrokążenie obwodowe nie przeprowadzono dotychczas u ludzi. Uzasadnieniem merytorycznym podjęcia takich badań są wyniki eksperymentu przeprowadzonego na zwierzętach. Ostatnio opublikowane badanie pokazuje, iż jonoforeza analogów prostacykliny (treprostinilu i iloprostu) zwiększyła przepływ w mikrokążeniu skórnym u szczurów wywołując długotrwały efekt nie powodując toksyczności miejscowej ani ubocznych działań ogólnoustrojowych [20].

2. Cele pracy

Celem pracy było zbadanie wpływu sildenafilu, inhibitora fosfodiesterazy typu 5, podanego systemowo (*per os*) na mikrokążenie obwodowe u ludzi zdrowych. Ze względu na możliwe efekty uboczne związane z systemowym stosowaniem substancji wazodylatacyjnej, w pracy postanowiono również ocenić wpływ treprostinilu, analogu prostacykliny, na mikrokążenie podając go miejscowo przy pomocy systemu jonoforezy. Według dostępnej wiedzy, nigdy wcześniej nie badano wpływu jonoforezy analogów prostacykliny na mikrokążenie obwodowe u ludzi. Zmiany przepływu w mikronaczyniach rejestrowano nieinwazyjnym laserowym skanerem dopplerowskim. W pracy oceniano również tolerancję miejscową jonoforezy treprostinilu oraz reakcję systemową na podawane substancje wazoaktywne monitorując ciśnienie tętnicze podczas trwania badań.

3. Materiał i Metody

Badania przeprowadzono w Centre d'Investigation Clinique INSERM, Centre Hospitalier Universitaire Grenoble we Francji. Wszystkie protokoły badawcze uzyskały akceptację lokalnej komisji bioetycznej (Grenoble Institutional Review Board - IRB n°6705).

3.1. Materiał

W badaniach uczestniczyło 30 zdrowych (normotensyjnych i nieotyłych) ochotników obu płci w wieku powyżej 18 lat (kobiety stanowiły 53,3% populacji badanej, a mężczyźni 46,7%). W każdym z trzech protokołów badawczych brało udział po 10 osób. Kryteria wykluczające z protokołu badawczego stanowiły: okres ciąży i karmienia piersią, obecność schorzeń przewlekłych (cukrzyca, nowotwór, niewydolność krążenia, niewydolność oddechowa, przewlekła choroba nerek, niewydolność wątroby, nadciśnienie płucne), regularne przyjmowanie jakichkolwiek leków, alergia na lokalne anestetyki, palenie tytoniu, nadużywanie alkoholu. Do badania nie zostały również włączone osoby ze zmianami skórnymi w obrębie przedramienia. Każdy ochotnik włączony do badania został poinformowany o celu badania i jego przebiegu oraz świadomie podpisał zgodę na uczestnictwo uzyskując jednocześnie prawo do wycofania się z badania w każdej chwili.

Tabela 1. Charakterystyka badanych zdrowych ochotników.

Zmienna	Protokół 1	Protokół 2	Protokół 3
Liczebność grupy	10	10	10
Proporcja płci (K:M)	6 : 4	5 : 5	5 : 5
Wiek (lata)	22,9 ± 5,3	28,8 ± 8,9	22,7 ± 1,9
BMI (kg/m ²)	21,4 ± 2,8	23,4 ± 2,8	23,3 ± 4,7
SBP (mmHg)	117,8 ± 13,9	117,9 ± 10,6	126,8 ± 14,1
DBP (mmHg)	70,6 ± 10,3	68,6 ± 10,2	72,4 ± 11,6

3.2. Substancje wazoaktywne użyte w badaniach

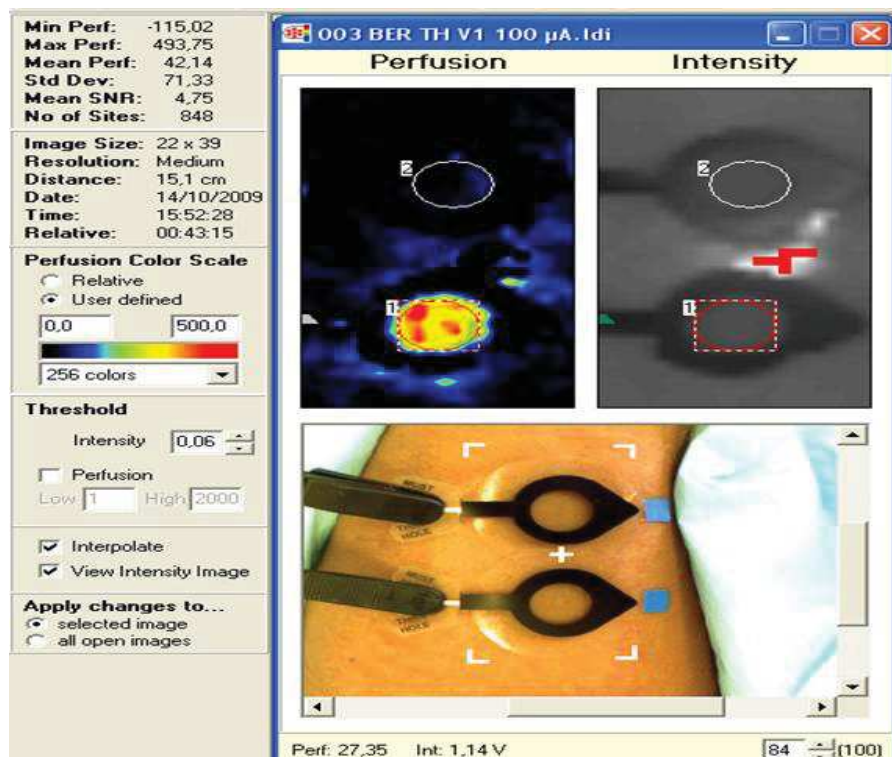
W badaniu stosowano sildenafil (Revatio®, Pfizer, Paryż, Francja) doustnie w dawce 50 mg oraz 100 mg. Drugim użytym lekiem był treprostynil, który aplikowano miejscowo stosując system jonoforezy. Stosowano 1 mg/ml roztwór (masa molowa, $M = 390,513 \text{ g/mol}$) treprostynilu (Remodulin®, Bioprojet Pharma, Paryż, Francja). Treprostynil był testowany w trzech różnych stężeniach. Roztwór treprostynilu (1 mg/ml) został rozcieńczony w 0,9% NaCl dziesięciokrotnie - 0,1 mg/ml (250 μM), stukrotnie - 0,01 mg/ml (25 μM) oraz tysiąckrotnie - 0,001 mg/ml (2,5 μM). Odczyn pH roztworu treprostynilu wynosił 6,5 nadając się tym samym do aplikacji skórnej.

W doświadczeniach z jonoforezą, zastosowano również izotoniczny roztwór chlorku sodu 0,9% NaCl (Aguettant, Lyon, Francja). Został on użyty jako kontrola oraz jako rozpuszczalnik, ze względu na to, iż 0,9% NaCl powoduje mniejszą niespecyficzną wazodylatację w skórze ludzkiej spowodowaną odruchem aksonowym niż woda destylowana [28], co zostało potwierdzone w badaniach na zwierzętach [20]. Wszystkie roztwory zostały przygotowane *ex tempore*.

3.3. Metodyka badań

Badania u zdrowych ochotników przeprowadzono w pozycji leżącej na plecach, w stałej temperaturze otoczenia $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, przy normalnej wilgotności powietrza 50-75%, po godzinnym okresie adaptacji. Przed rozpoczęciem badania, przedramię zostało unieruchomione za pomocą specjalnej poduszki próżniowej. Stosowanie jej pozwala zmniejszyć ilość artefaktów związanych z poruszaniem badanego obszaru podczas rejestracji przepływu w mikrokrażeniu metodą laserowo-dopplerowską [29]. Badania mikrokrażenia wykonano za pomocą laserowego skanera dopplerowskiego (aparatury PeriScan PIM 3 System, Perimed, Järfälla, Szwecja). Głowica lasera była umieszczana 20 cm powyżej badanego

obszaru przedramienia. Rozdzielczość pomiaru została ustawiona jako średnia. Światło lasera skanowało wybrany obszar przez 1 minutę. Do przezskórnego wprowadzenia leków wykorzystywano aparat i sondy do jonoforezy (Perilont System, Perimed, Järfälla, Szwecja). Elektrody pasywne wchodzące w skład systemu do jonoforezy były umieszczone w odległości około 15 cm od elektrod aktywnych, czyli sond do jonoforezy. Jonoforezę substancji aktywnej i 0,9% NaCl przeprowadzano przez 20 minut przy użyciu prądu o natężeniu 20 μ A. Każda z sond do jonoforezy zawierała 360 μ L roztworu leku. W badaniach użyto również sondy ogrzewającej (P457, Perimed, Järfälla, Szwecja), żeby doprowadzić do przekrwienia termicznego. Maksymalny rozkurcz naczyń skórnych występuje w temperaturze między 42°C a 44°C [30]. Rejestracja przepływu po okresie przekrwienia termicznego wykonywana była celem określenia maksymalnego przepływu w mikrokrążeniu. W czasie eksperymentu ciśnienie tętnicze i akcja serca osoby badanej były monitorowane za pomocą fotopletyzmografii (Nexfin, Bmeye, Amsterdam, Holandia).



Rysunek 4. Laserowy skaner dopplerowski pozwala tworzyć mapy perfuzji badanego obszaru.

3.4. Sposób przedstawienia danych

Wyniki analizowano przy pomocy oprogramowania LDPIwin (Perimed, Järfälla, Szwecja) po wcześniejszym określeniu rozmiaru obszaru zainteresowania (ROI, region of interest). W przypadku powyższych badań ROI stanowiły miejsca umieszczenia sond do jonoforezy o powierzchni 1,2 cm². Przepływ krwi został wyrażony w arbitralnych jednostkach perfuzji (PU, perfusion units). Wyniki przedstawiono jako skórne przewodnictwo naczyniowe (CVC, cutaneous vascular conductance). CVC odpowiada wartościom przepływu mierzonym w PU podzielonym przez średnie ciśnienie tętnicze (MAP, mean arterial pressure) wyrażone w mmHg. Taki sposób wyrażenia przepływu krwi wydaje się bardziej fizjologiczny, gdyż bierze pod uwagę ewentualne różnice i zmiany ciśnienia tętniczego [2,3]. CVC wyrażono jako procent przepływu spoczynkowego (%BL, baseline), bądź jako procent maksymalnego przepływu (%CVCmax), który osiągany jest poprzez ogrzewanie naczyń od 42°C do 44°C (przekrwienie termiczne). Następnie, procentowe zmiany wielkości przepływu krwi w mikrokrażeniu przedstawiono jako pole pod krzywą (AUC, area under the curve).

3.5. Protokoły badawcze

Badania wpływu leków na mikrokrążenie zostały przeprowadzone na zdrowych ochotnikach według przedstawionych poniżej trzech protokołów:

Protokół 1 – przeznaczony był do oceny krótkotrwałego wpływu sildenafilu na mikrokrążenie

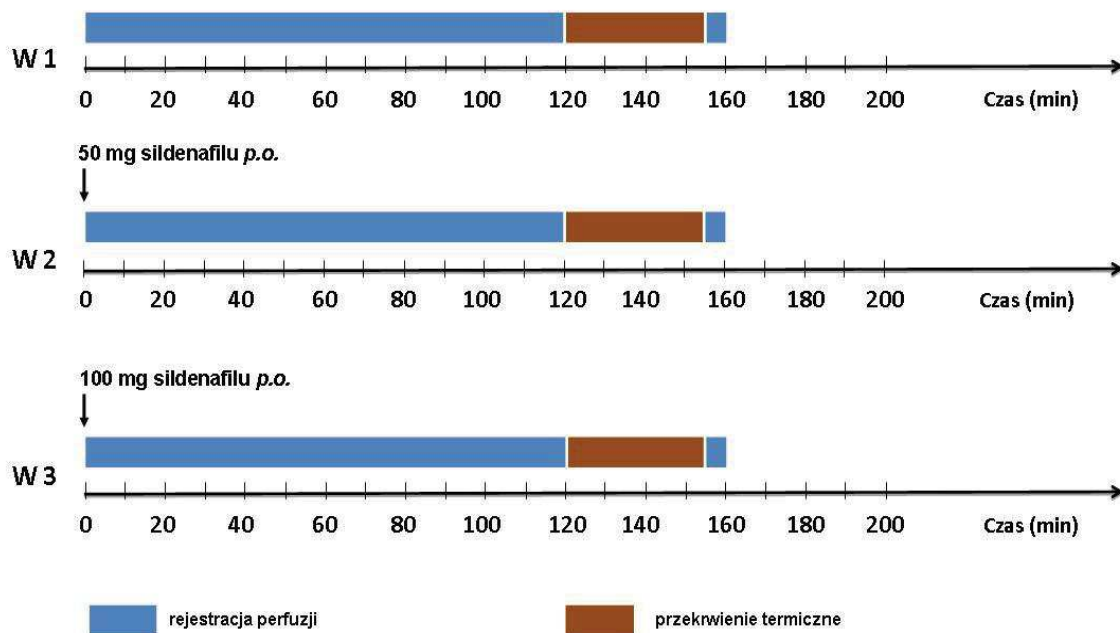
Protokół 2 i 3 – oceniały krótko- i długookresowy wpływ na mikrokrążenie treprostinilu aplikowanego miejscowo zarówno bez użycia jak i z wykorzystaniem systemu jonoforezy

W każdym z protokołów badawczych wizyta inicjacyjna (W0) była poświęcona badaniu podmiotowemu i przedmiotowemu wraz z pomiarem ciśnienia tętniczego krwi i wykonaniem elektrokardiogramu. Następnie, stwierdzano czy ochotnik spełnia kryteria włączenia do protokołu. Na każdą kolejną wizytę osoby badane stawały się na czezo. Etapy badania przewidujące rejestrację przepływu – trzy w protokole 1, dwa w protokole 2 oraz jeden w protokole 3- odbywały się w okresie tygodnia z tolerancją 2 dni. Ostatnia wizyta (Wx), zamykająca badanie przeznaczona była ocenie ewentualnych skutków ubocznych związanych z przeprowadzonym protokołem badawczym i odbywała się po tygodniu od zakończenia eksperymentu.

3.5.1. Protokół 1 - Wpływ 50 mg i 100 mg sildenafilu na mikrokrążenie

Na rysunku 5 przedstawiono schemat rejestracji przepływu w czasie wizyt W1, W2 oraz W3. Podczas pierwszej wizyty badawczej (W1) oceniano przepływ spoczynkowy w mikrokrążeniu. Druga wizyta badawcza (W2) była poświęcona badaniu perfuzji w mikronaczyniach obwodowych po podaniu 50 mg sildenafilu *per os*. Podczas trzeciej wizyty (W3) badano przepływ w mikrokrążeniu po podaniu 100 mg sildenafilu *per os*.

Po godzinnym okresie adaptacji w stałej temperaturze otoczenia $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, na powierzchni skóry przedramienia umieszczono okrągłą sondę, której powierzchnia stanowiła obszar do analizy perfuzji w mikronaczyniach. Przez pierwsze 5 minut oceniano przepływ spoczynkowy w mikrokrążeniu, a następnie podano doustnie sildenafil, po czym rejestrowano perfuzję badanego obszaru przez kolejne 120 minut. Pod koniec badania, w miejscu analizy przepływu umieszczono okrągłą sondę ogrzewającą. W celu uzyskania wazodylatacji maksymalnej, skórę przedramienia ogrzewano miejscowo w temperaturze 42°C przez 30 minut i kolejne 5 minut w 44°C [31,32]. Następnie, ponownie włączono laserowy skaner dopplerowski na 5 minut, by ocenić zmianę przepływu w mikrokrążeniu po zastosowaniu przekrwienia termicznego.

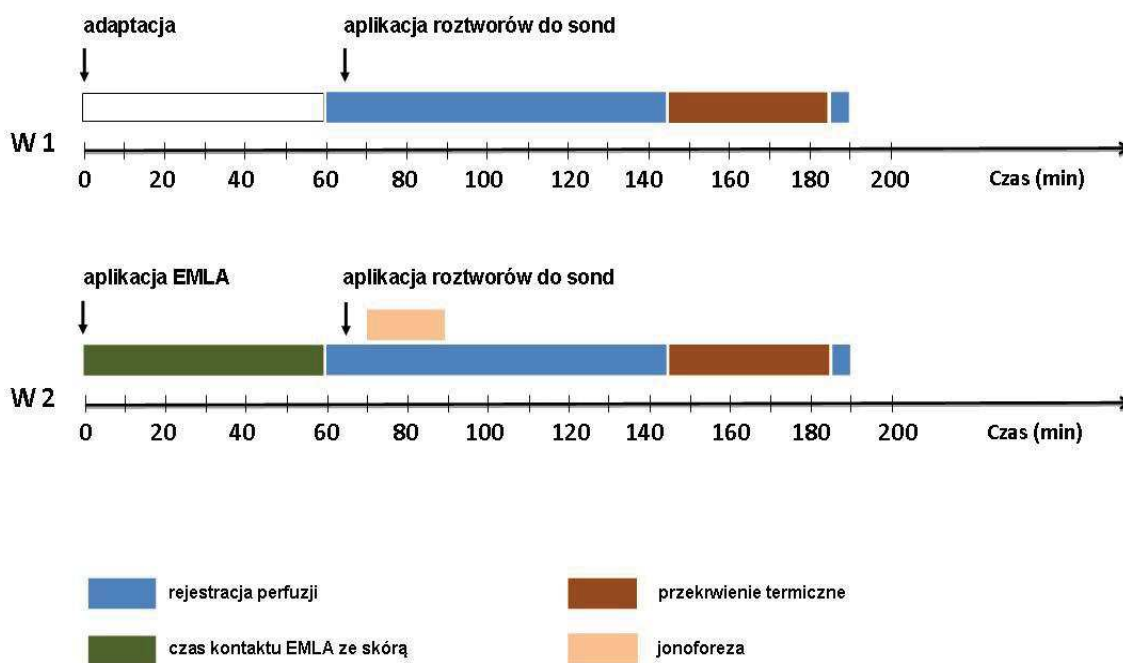


Rysunek 5. Schemat badania w protokole 1.

3.5.2. Protokół 2 - Wpływ treprostinilu na mikrokrążenie - ocena krótkookresowa

Protokół ten przeznaczony był do oceny znaczenia jonoforezy różnych stężeń treprostinilu na wielkość perfuzji mikrokrążenia.

Podczas pierwszej wizyty badawczej (W1) oceniano zmiany przepływu w mikrokrążeniu po jednoczesnym podaniu treprostinilu w stężeniach: 2,5 μM , 25 μM , 250 μM i 0,9% NaCl w różnych obszarach skóry przedramienia. Roztwór 0,9% NaCl służył w tym badaniu jako kontrola. Druga wizyta (W2) była poświęcona ocenie wpływu tych samych stężeń treprostinilu na wielkość zmian przepływu w tych samych lokalizacjach skóry przedramienia po zastosowaniu jonoforezy przez okres 20 minut. Podczas tej wizyty obszary wybrane do aplikacji treprostinilu były uprzednio poddane 60 minutowemu działaniu preparatu EMLA.



Rysunek 6. Schemat badania w protokole 2.

Aplikacja treprostinilu bez użycia jonoforezy – wizyta W1

Po godzinnym okresie adaptacji w stałej temperaturze otoczenia $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, na powierzchni przedramienia rozmieszczono losowo cztery okrągłe sondy do jonoforezy niepodłączone do generatora prądu. Powierzchnia każdej sondy wynosiła $1,2\text{ cm}^2$ a jej pojemność równała się $360\text{ }\mu\text{L}$. Przez pierwsze 5 minut oceniano przepływ spoczynkowy w mikrokrażeniu, Następnie, sondy zostały odpowiednio wypełnione roztworami $2,5\text{ }\mu\text{M}$, $25\text{ }\mu\text{M}$ i $250\text{ }\mu\text{M}$ treprostinilu oraz $0,9\%$ NaCl. Przez pierwsze 5 minut oceniano przepływ spoczynkowy w mikrokrażeniu, a następnie rejestrowano perfuzję badanego obszaru przez 80 minut od momentu umieszczenia sond. Pod koniec eksperymentu, zastosowano przekrwienie termiczne, w celu określenia wazodylatacji maksymalnej. Następnie, ponownie włączano LDI na 5 minut, by zarejestrować zmiany przepływu w mikrokrażeniu po wykonanym teście.

Jonoforeza treprostinilu – wizyta W2

Przed rozpoczęciem badania, w czterech miejscach wybranych wcześniej do jonoforezy zaaplikowano na 60 minut 1 g kremu zawierającego lidokainę i prylokainę (EMLA®, AstraZeneca, 1 g kremu zawiera 25 mg lidokainy i 25 mg prylokainy). Następnie, na powierzchni przedramienia rozmieszczono losowo cztery okrągłe sondy do jonoforezy i wypełniono je roztworami $2,5\text{ }\mu\text{M}$, $25\text{ }\mu\text{M}$ i $250\text{ }\mu\text{M}$ treprostinilu oraz $0,9\%$ NaCl. Następnie, dokonano rejestracji przepływu spoczynkowego w mikrokrażeniu przez 5 minut, po czym rozpoczęto jonoforezę $20\mu\text{A}$ przez 20 minut. Rejestrację przepływu w mikrokrażeniu prowadzono przez 80 minut od momentu rozpoczęcia jonoforezy. Pod koniec eksperymentu, stosowano przekrwienie termiczne. Następnie, włączano LDI na 5 minut, by ocenić zmianę przepływu w mikrokrażeniu po zastosowanym teście.

Na rysunku 7 przedstawiony został układ pomiarowy wykorzystywany w badaniu. Cztery sondy do jonoforezy (A) podłączone do źródła zasilania (B) zostały umieszczone na wewnętrznej powierzchni prawego przedramienia zdrowego ochotnika. Przepływ krwi w mikrokrążeniu rejestrowano za pomocą laserowego skanera dopplerowskiego (C) na obszarze, na którym zostały umieszczone sondy do jonoforezy. Ciśnienie tętnicze krwi i akcja serca były monitorowane za pomocą fotopletyzmografii (D). Elektrody pasywne (E) wchodzące w skład systemu do jonoforezy były umieszczone w odległości około 15 cm od elektrod aktywnych, czyli sond do jonoforezy.



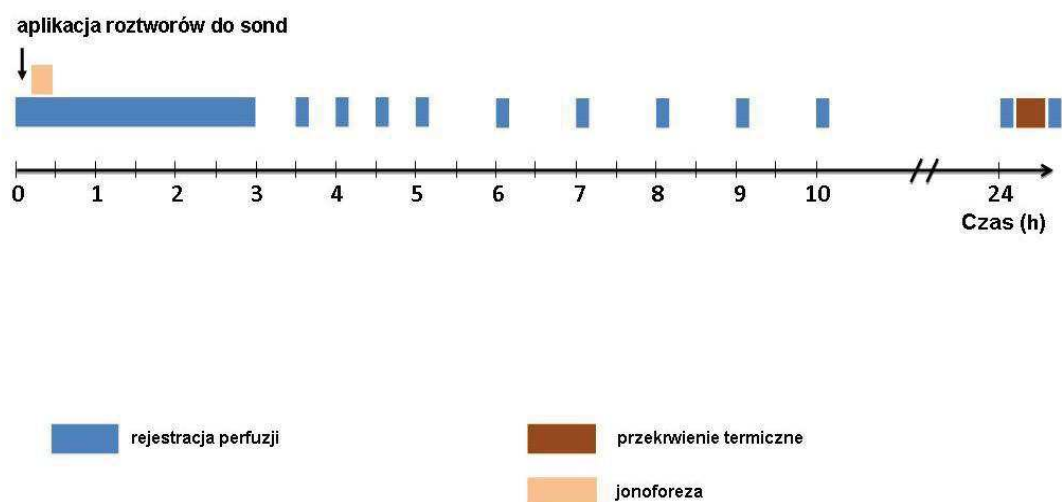
Rysunek 7. Układ pomiarowy z zastosowaniem laserowego skanera dopplerowskiego i jonoforezy.

3.5.3. Protokół 3 - Wpływ treprostinilu na mikrokążenie - ocena długookresowa

Protokół ten przeznaczony był do oceny czasu utrzymywania się zmian w wielkości przepływu w mikrokążeniu po aplikacji treprostinilu z użyciem jonoforezy.

Protokół przewidywał tylko jedną wizytę badawczą, podczas której oceniano przepływ w mikrokążeniu po zastosowaniu jonoforezy treprostinilu w stężeniach 2,5 μM , 25 μM i 250 μM oraz 0,9% NaCl. Odmiennie, niż w protokole 2, w miejscach wybranych do jonoforezy nie stosowano preparatu EMLA.

Przepływ spoczynkowy w mikrokążeniu oceniano przez 5 minut, po czym rozpoczęto jonoforezę 20 μA przez 20 minut. Rejestrację ukrwienia prowadzono w sposób ciągły do 3 godziny od aplikacji treprostinilu. Podczas kolejnych dwóch godzin w równych odstępach czasu dokonano czterech 10-minutowych rejestracji przepływu. W ciągu następnych 5 godzin 10-minutowe rejestracje dokonywane były co godzinę. Ostatniej rejestracji przepływu dokonano po 24 godzinach od rozpoczęcia badania.



Rysunek 8. Schemat badania w protokole 3.

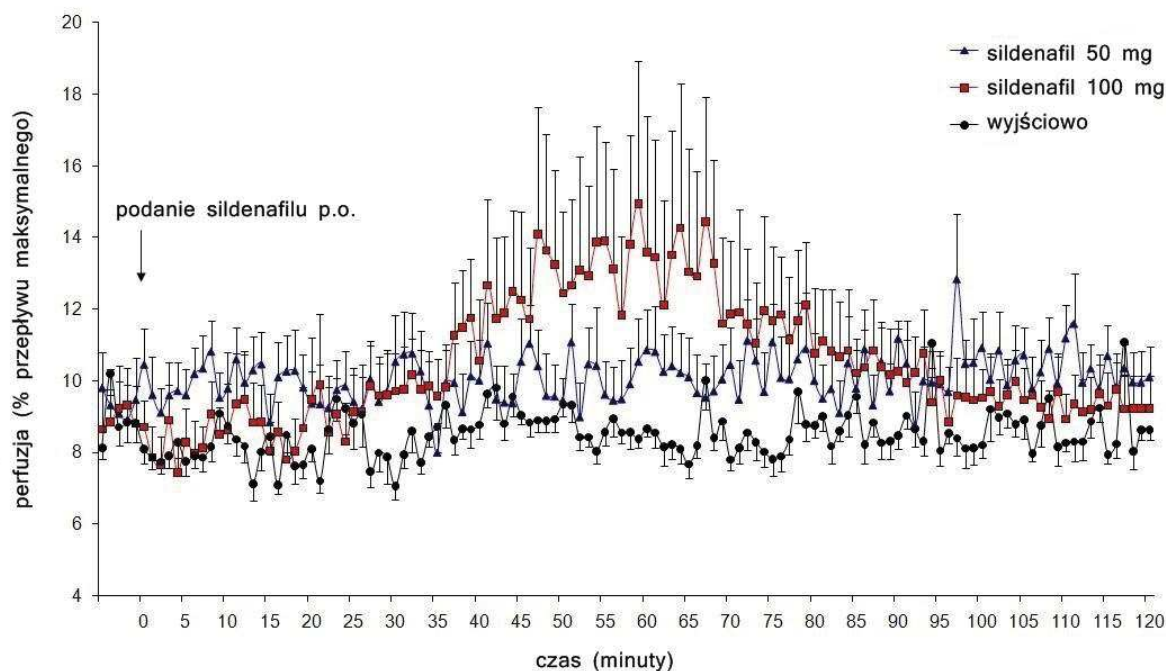
3.6. Analiza statystyczna

Zmienne o charakterze ciągłym przedstawiono jako średnią arytmetyczną \pm odchylenie standardowe (SD), natomiast zmienne kategoryczne wyrażono w procentach (%). Przeprowadzono analizę rozkładu normalnego (test Shapiro-Wilka) oraz analizę jednorodności wariancji (test Levena'a). Zmienne o rozkładzie zgodnym z rozkładem normalnym analizowano metodami parametrycznymi. Porównania pola pod krzywą (AUC) dokonano stosując analizę wariancji (ANOVA) dla powtarzanych pomiarów i test t-Studenta dla prób zależnych (oraz test post-hoc Tukeya). Zmienne, których rozkład odbiegał od rozkładu normalnego, analizowano metodami nieparametrycznymi stosując test Friedmana dla zmiennych zależnych oraz test kolejności par Wilcoxon dla dwóch prób zależnych. W pracy przyjęto poziom istotności statystycznej $p < 0,05$. Analizy statystycznej dokonano przy użyciu oprogramowania SPSS wersja 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

4. Wyniki

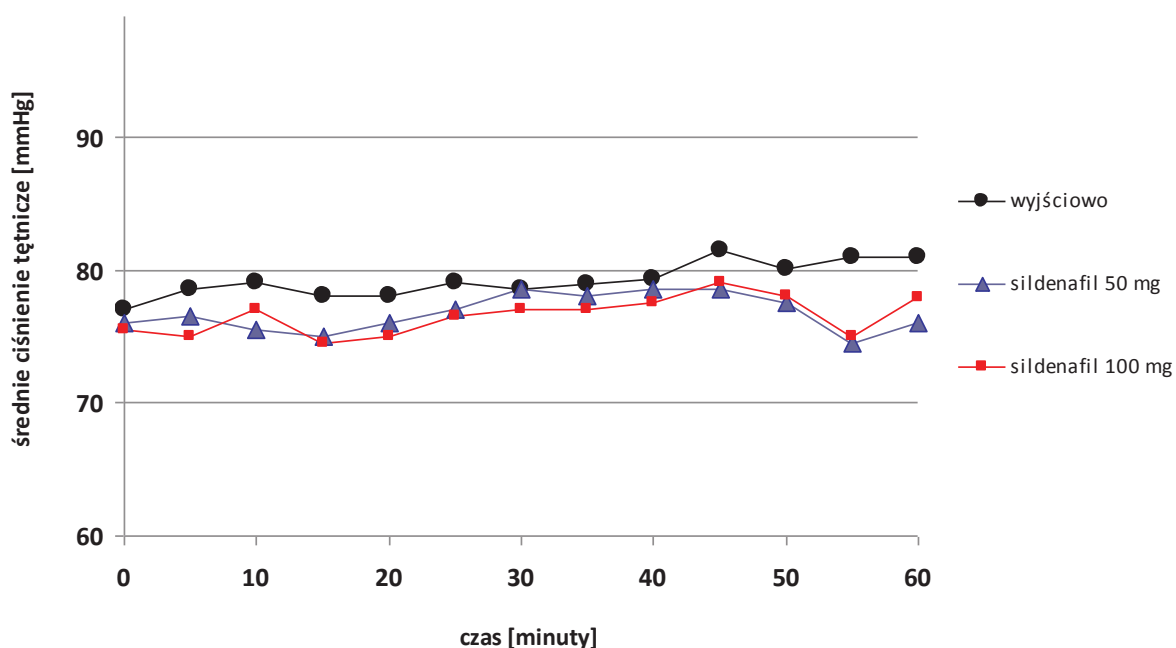
4.1. Ocena wpływu sildenafilu na wielkość przepływu w mikrokrążeniu

Wielkość maksymalnego przepływu w mikrokrążeniu zarejestrowana w okresie 120 minut badania bez użycia leku wyniosła $8,5 \pm 1$ %CVCmax. Maksymalny przepływ w mikrokrążeniu po przyjęciu sildenafilu w dawce 50 mg wynosił $10,5 \pm 3,5$ %CVCmax, co nie różniło się w sposób istotny statystycznie od wartości wyjściowej. Z kolei, badanie przeprowadzone z zastosowaniem sildenafilu w dawce 100 mg wykazało istotny statystycznie ($p < 0,03$) wzrost wartości przepływu maksymalnego do $14,9 \pm 10,2$ %CVCmax. Maksymalne wartości przepływu stwierdzano w czasie około 60 minut od przyjęcia leku w dawce zarówno 50 mg jak i 100 mg.



Rysunek 9. Wpływ sildenafilu podanego *per os* na przepływ w mikrokrążeniu wyrażony jako procent przepływu maksymalnego.

W trakcie przeprowadzanych badań zgodnie z protokołem, nie odnotowano poważnych efektów ubocznych u żadnej z badanych osób. U trzech z badanych ochotników wystąpiły bóle głowy, zaczerwienienie skóry twarzy i uczucie gorąca. Średnie ciśnienie tętnicze oceniane w okresie 1 godziny po podaniu leku uległo istotnemu statystycznie obniżeniu względem wartości zmierzonych bez podawania leku o $2,1 \pm 2,2$ mmHg po przyjęciu 50 mg ($p < 0,01$) oraz $2,6 \pm 1,2$ mmHg po 100 mg sildenafilu ($p < 0,01$).

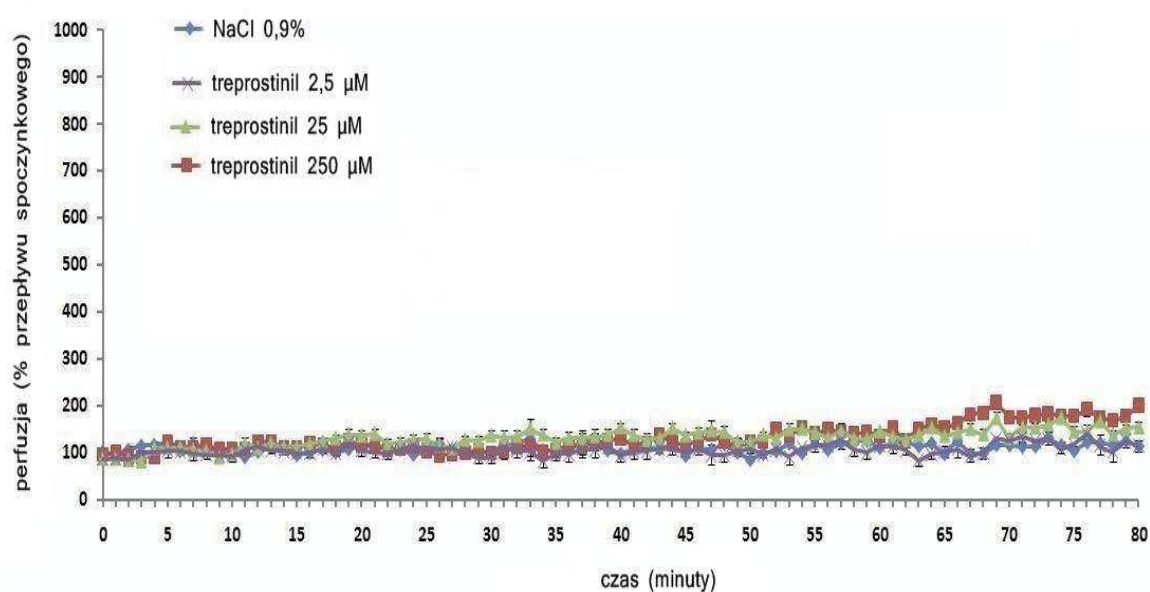


Rysunek 10. Wpływ sildenafilu podanego *per os* na średnie ciśnienie tętnicze.

4.2. Krótkookresowa ocena wpływu treprostinilu na mikrokrążenie

Aplikacja treprostinilu bez użycia jonoforezy – W1

Porównanie wielkości przepływu w mikrokrążeniu podczas aplikacji treprostinilu (stężenia: 2,5 μM , 25 μM i 250 μM) oraz 0,9% roztworu NaCl wyrażonych jako pole pod krzywą (AUC) nie wykazało istotnych statystycznie różnic ($p=0,24$) związanych z rodzajem roztworu (Tabela 2).



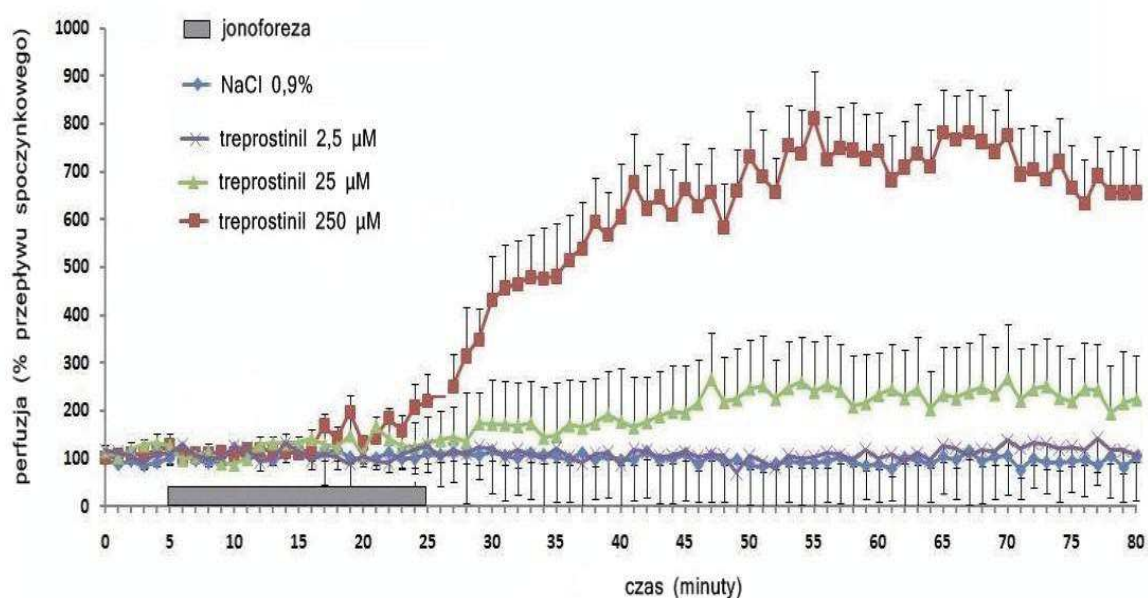
Rysunek 11. Przepływ w mikrokrążeniu, wyrażony jako procent przepływu spoczynkowego, w czasie aplikacji 2,5 μM , 25 μM i 250 μM treprostinilu i 0,9% NaCl bez użycia jonoforezy.

Tabela 2. Wielkość AUC dla % zmian przepływu w mikrokrążeniu w czasie aplikacji 2,5 μM , 25 μM i 250 μM treprostinilu i 0,9% NaCl bez użycia jonoforezy.

Zmienna	0,9% NaCl	2,5 μM	25 μM	250 μM	Test
AUC 0-80min [%BL*min]	778 \pm 1567	401 \pm 2772	2506 \pm 3550	2479 \pm 1567	Friedmana 0,24

Aplikacja treprostinilu z zastosowaniem jonoforezy – W2

Porównanie wielkości przepływu w mikrokrążeniu podczas aplikacji treprostinilu (stężenia: 2,5 μM , 25 μM i 250 μM) oraz 0,9% roztworu NaCl (Rysunek 12) wyrażonych jako pole pod krzywą (AUC) wykazało istnienie istotnych statystycznie różnic ($p=0,007$) związanych z rodzajem roztworu. Średnia wielkość AUC określona dla zmian w wielkości przepływu spoczynkowego w mikrokrążeniu podczas aplikacji treprostinilu w stężeniu 2,5 μM nie była istotnie statystycznie różna od AUC określonego dla analizy zmian przepływu podczas aplikacji 0,9% NaCl. Podobna analiza przeprowadzona dla 25 μM oraz 250 μM roztworu treprostinilu wykazała istotne ($p<0,01$) zwiększenie AUC. Ponadto wykazano, że wpływ 250 μM roztworu treprostinilu na wielkość zmian przepływu spoczynkowego był istotnie większy od każdego z pozostałych roztworów.



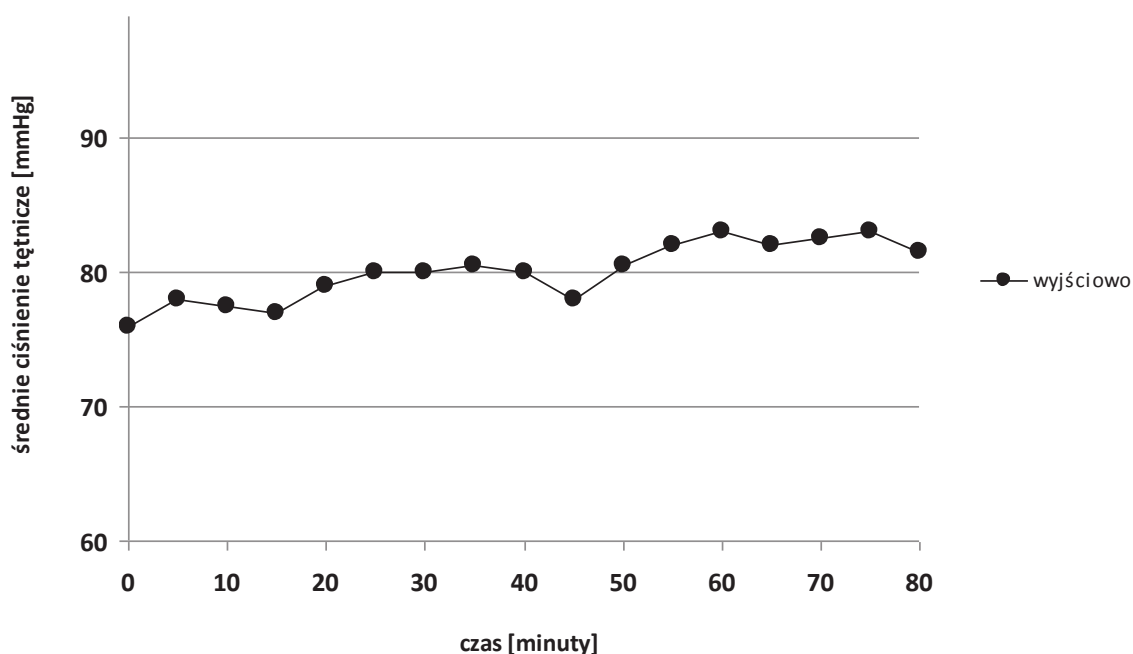
Rysunek 12. Przepływ w mikrokrążeniu, wyrażony jako procent przepływu spoczynkowego, w czasie aplikacji 2,5 μM , 25 μM i 250 μM treprostinilu i 0,9% NaCl z wykorzystaniem jonoforezy.

Tabela 3. Wielkość AUC dla % zmian przepływu w mikrokrążeniu w czasie aplikacji 2,5 μM , 25 μM i 250 μM treprostinilu i 0,9% NaCl z wykorzystaniem jonoforezy.

Zmienna	0,9% NaCl	2,5 μM	25 μM	250 μM	Test Friedmana
AUC 0–80min [%BL*min]	133 \pm 2407	970 \pm 2706	7084 \pm 7704#	31897 \pm 24390*	0,007

*p < 0,01 względem wszystkich grup; #p < 0,01 względem 0,9% NaCl

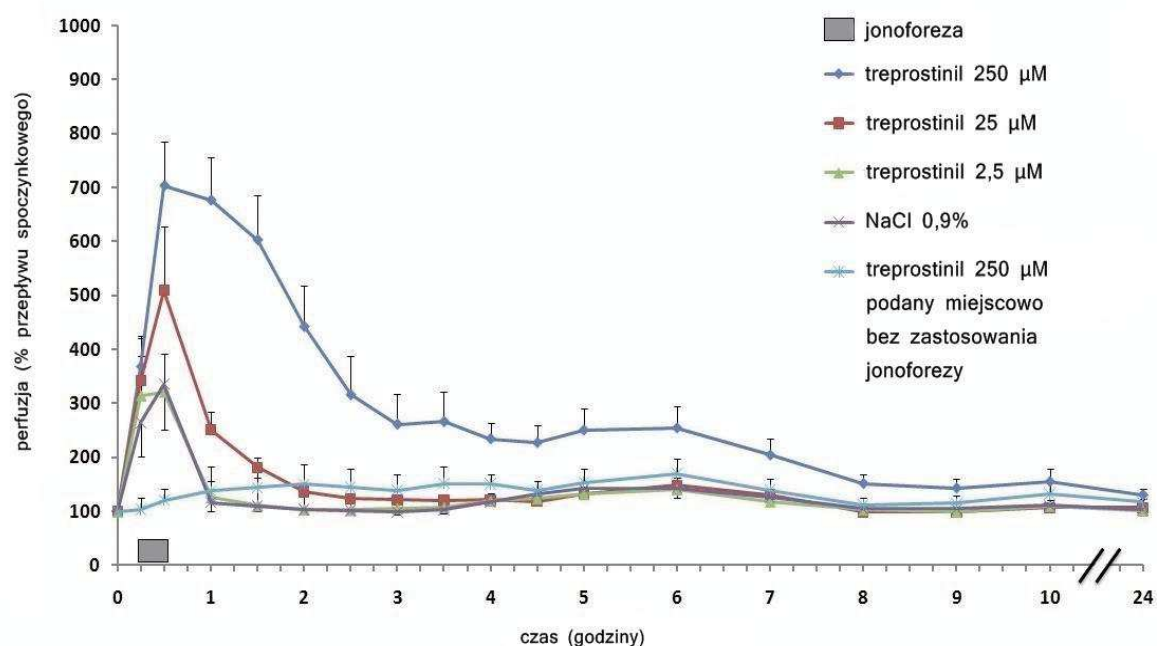
W trakcie przeprowadzanych badań nie odnotowano żadnych poważnych efektów ubocznych związanych z przyjętym protokołem. Średnie ciśnienie tętnicze podczas trwania całego eksperymentu nie zmieniało się w sposób istotny (Rysunek 13). W miejscu jonoforezy treprostinilu o stężeniu 250 μM i 25 μM u sześciu z badanych osób zaobserwowano wystąpienie rumienia skórno, który ustąpił po kilku godzinach.



Rysunek 13. Średnie ciśnienie tętnicze podczas trwania i po zakończeniu jonoforezy treprostinilu.

4.3. Długookresowa ocena wpływu treprostinilu na mikrokrążenie

Porównanie wielkości przepływu w mikrokrążeniu podczas aplikacji treprostinilu (stężenia: 2,5 μM , 25 μM i 250 μM) oraz 0,9% roztworu NaCl (Rysunek 14) wyrażonych jako pole pod krzywą (AUC) wykazało istnienie istotnych statystycznie różnic ($p < 0,001$) związanych z rodzajem roztworu. Po 24 godzinach przepływ we wszystkich badanych sytuacjach powrócił do wartości przepływu spoczynkowego.



Rysunek 14. Przepływ w mikrokrążeniu, wyrażony jako procent przepływu spoczynkowego, w czasie aplikacji 2,5 μM , 25 μM i 250 μM treprostinilu i 0,9% NaCl z wykorzystaniem jonoforezy oraz 250 μM treprostinilu bez użycia jonoforezy.

Ponadto, wzrost przepływu w mikrokrążeniu wyrażony jako pole pod krzywą dla roztworu treprostinilu o stężeniu 250 μM (AUC 0-10h 1773 \pm 835 %BL*h) był istotnie statystycznie większy ($p = 0,005$) w porównaniu ze zmianami w przepływie spowodowanymi tym samym roztworem, ale zaaplikowanym bez użycia jonoforezy (AUC 0-10h 360 \pm 593 %BL*h).

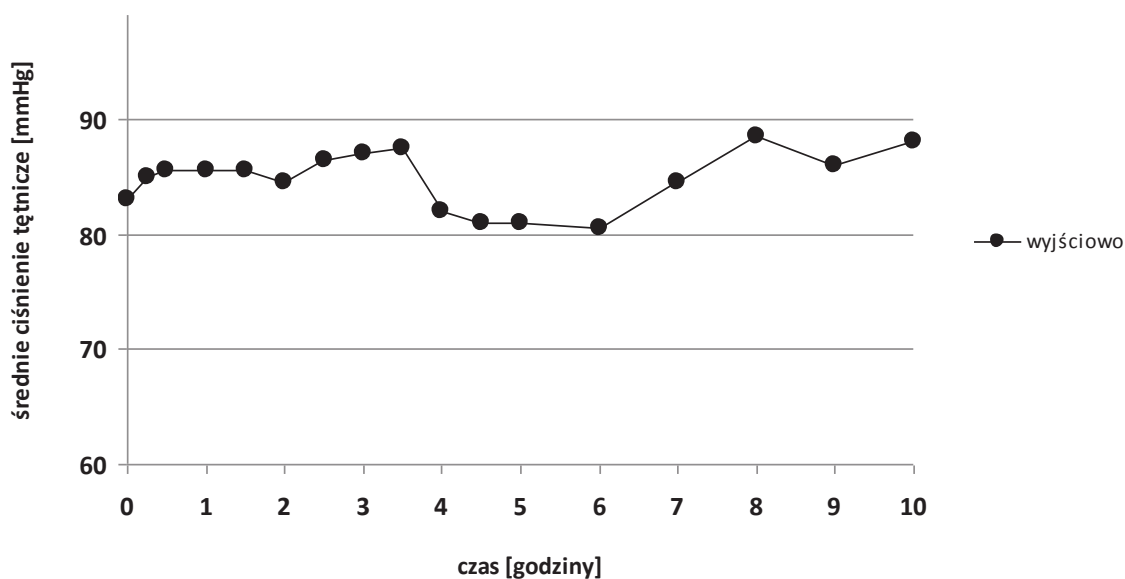
Szczyt maksymalnego działania (PEAK) badanych roztworów w przedstawionym schemacie badawczym występował w 30 minucie. Stwierdzono zależność maksymalnego efektu naczyniowego od stężenia badanego roztworu. Maksymalna zmiana wielkości przepływu dla treprostinilu o stężeniu 250 μM różniła się w sposób istotny statystycznie ($p=0,005$) od wielkości określonych dla pozostałych roztworów z wyjątkiem treprostinilu w stężeniu 25 μM .

Tabela 4. Wielkość AUC dla % zmian przepływu w mikrokrażeniu w czasie aplikacji 2,5 μM , 25 μM i 250 μM treprostinilu i 0,9% NaCl z wykorzystaniem jonoforezy.

Zmienna	0,9% NaCl	2,5 μM	25 μM	250 μM	Test Friedmana
AUC 0-10h [%BL*h]	285 \pm 288	273 \pm 247	488 \pm 287	1773 \pm 835*	<0,001
PEAK [%BL]	335 \pm 274	320 \pm 192	509 \pm 354	703 \pm 246#	<0,001

*p = 0,005 względem wszystkich grup; #p = 0,005 względem wszystkich grup z wyjątkiem 25 μM

W trakcie przeprowadzanych badań nie odnotowano żadnych poważnych efektów ubocznych związanych z przyjętym protokołem. Średnie ciśnienie tętnicze podczas trwania całego eksperymentu nie zmieniało się w sposób istotny (Rysunek 15). W miejscu jonoforezy treprostinilu o stężeniu 250 μM i 25 μM u czterech z badanych osób zaobserwowano wystąpienie rumienia skórno, który ustąpił po kilku godzinach.

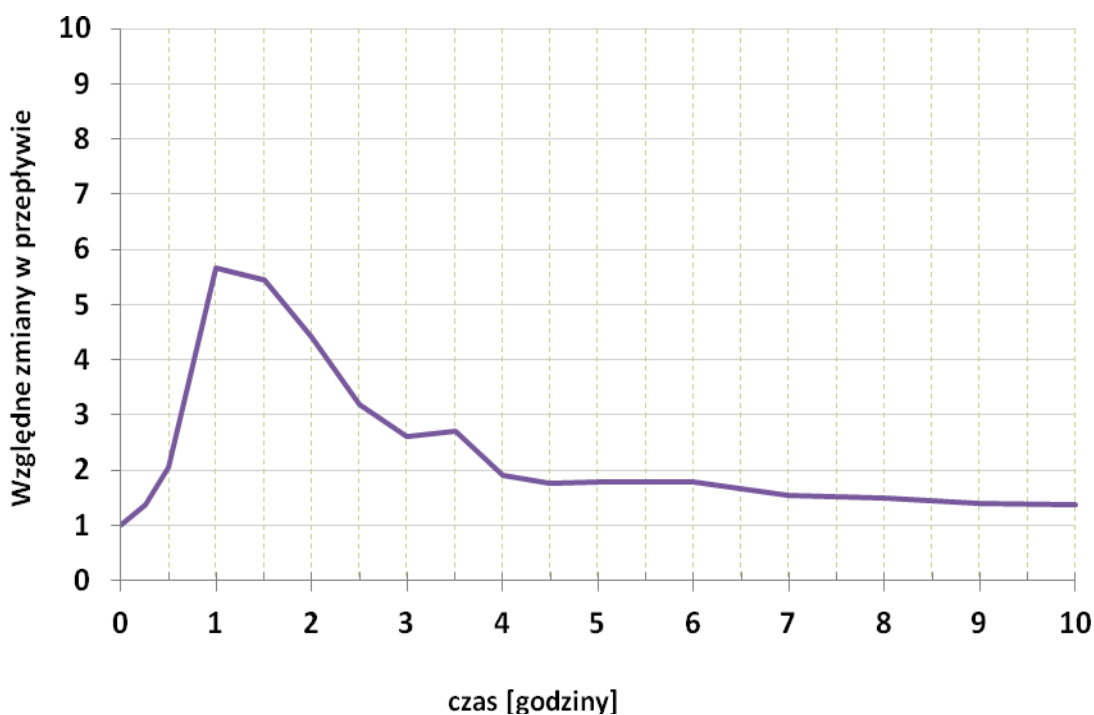


Rysunek 15. Średnie ciśnienie tętnicze podczas trwania i po zakończeniu jonoforezy treprostinilu.

4.3.1. Ocena odruchu aksonowego

Ocenę efektu odruchu aksonowego przeprowadzono na podstawie interpretacji wyników uzyskanych w protokole 3 (Rysunek 16). Dla wszystkich badanych z zastosowaniem jonoforezy roztworów obserwowano występowanie maksymalnych zmian przepływu w 30 minucie od rozpoczęcia eksperymentu. Przyjmując, że zmiany przepływu w czasie jonoforezy 0,9% NaCl są spowodowane odruchem aksonowym poddano analizie dane opisujące zmiany przepływu w czasie aplikacji 0,9% NaCl oraz 250 μ M treprostynilu względem przepływu spoczynkowego.

W celu oceny wpływu odruchu aksonowego na czas wystąpienia maksymalnego efektu treprostynilu, dla kolejnych punktów czasowych określono iloraz zmian w przepływie spoczynkowym zależnych od treprostynilu w stężeniu 250 μ M oraz od 0,9% NaCl.



Rysunek 16. Zmiany w przepływie spoczynkowym zależne od treprostynilu w stężeniu 250 μ M wyrażone względem odpowiednich zmian dla 0,9% NaCl.

5. Dyskusja

Metoda laserowo-dopplerowska stworzyła nowe możliwości nieinwazyjnej i powtarzalnej oceny zmian perfuzji mikrokrążenia [33], będącego obiektem zainteresowania coraz większej grupy fizjologów i farmakologów. Badania mikrokrążenia, poza możliwością poznania nowych mechanizmów regulacji fizjologicznych, pozwalają również wyciągać wnioski o charakterze klinicznym i stwarzają perspektywy zastosowania dokonanych obserwacji w terapii [3,12].

Mikrokrążenie skórne jest najczęściej wykorzystywanym modelem badawczym w technice laserowo-dopplerowskiej. Coraz więcej dowodów wskazuje na to, że mikronaczynia skórne mogą służyć jako model badawczy do oceny globalnej funkcji mikrokrążenia. Z przedstawionych w literaturze badań wynika, iż obszar skóry jest reprezentatywny dla mikrokrążenia w innych narządach min. nerkach [34-36]. Wyniki badań opublikowanych przez Saxa i wsp. pozwoliły na wykazanie równoległości zaburzeń mikrokrążenia wieńcowego i dysfunkcji mikrokrążenia obwodowego [37]. Ponadto, Ijzerman i wsp. w 2003 roku wykazali, iż u pacjentów z podwyższonym ryzykiem choroby wieńcowej występują również zaburzenia mikrokrążenia skórnoego. Pozwala to na przyjęcie założenia, że mikrokrążenie skórne jest prawidłowym modelem do badania relacji między czynnikami ryzyka sercowo-naczyniowego oraz funkcją mikronaczyń [38]. Warto zauważyć, że mikrokrążenie skórne było wielokrotnie wykorzystywane jako model służący do oceny mechanizmów naczyniowych w wielu stanach chorobowych takich jak nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, przewlekła choroba nerek, niewydolność serca czy w twardzina układowa [7].

Walorem badania mikrokrążenia skórnoego *in vivo* jest możliwość oceny funkcji naczyń w naturalnym środowisku, w którym występują złożone współzależności między układem

nerwowym, śródbłonkiem i mięśniami gładkimi naczyń. Wszystkie te mechanizmy kontrolują napięcie naczyń i tym samym odpowiadają za regulację przepływu krwi [12].

Badanie mikrokrażenia w warunkach podstawowych rzadko dostarcza informacji na temat mechanizmów patofizjologicznych, gdyż najczęściej cechuje się dużą zmiennością czasową i przestrzenną. Wartość poznawcza badań nad mechanizmami regulacyjnymi mikrokrażenia istotnie wzrasta po zastosowaniu testów stymulacyjnych opartych na prowokacji fizjologicznej bądź farmakologicznej [12].

W ostatnim czasie metoda laserowo-dopplerowska znajduje coraz większe zastosowanie w badaniach mikrokrażenia. Ze względu na możliwość badania większego obszaru tkanki jak również bezkontaktowość pomiarów i większą ich powtarzalność, laserowe skanery dopplerowskie zaczynają wypierać klasyczne przepływomierze laserowo dopplerowskie. Poza badaniami naukowymi, techniki laserowo dopplerowskie mogłyby stanowić dobre narzędzie diagnostyczne w schorzeniach dermatologicznych (np. stanach zapalnych lub zmianach nowotworowych), w których występują wyraźne zmiany mikroukrwienia. Z uwagi na to, iż występujące zaburzenia dotyczą zwykle większych obszarów, jak również często ulegają infekcjom, zdecydowanie lepsze w badaniach diagnostycznych wydają się być bezkontaktowe laserowe skanery dopplerowskie [10]. Ponadto, laserowy skaner dopplerowski doskonale nadaje się do oceny reaktywności mikrokrażenia obwodowego po zastosowaniu różnych testów prowokacyjnych [3,12].

Laserowy skaner dopplerowski pozwala tworzyć mapy perfuzji badanego obszaru, co daje możliwość oceny wpływu substancji wazoaktywnych na mikrokrażenie [3]. Badania takie są szczególnie cenne biorąc pod uwagę liczne stany chorobowe, w których dochodzi do zaburzeń mikrokrażenia. Takie badania mają szczególną wartość poznawczą w schorzeniach, takich jak choroba Raynauda czy twardzina układowa, gdzie zaburzenie mikroukrwienia ma charakter

miejscowy i dotyczy skóry. Najczęściej stosowane systemowe podawanie substancji rozszerzających naczynia, tak w badaniach naukowych, jak i działaniach terapeutycznych, ma swoje ograniczenia, ze względu na często występujące działania niepożądane, związane z wpływem tych leków na duże naczynia.

W celu uniknięcia działania systemowego substancji wazoaktywnych, ich wpływ na mikrokążenie można badać stosując jonoforezę. Technika ta dzięki zastosowaniu prądu elektrycznego o małym natężeniu pozwala na miejscową aplikację leku [27,39,40]. Jonoforeza substancji wazoaktywnych jest często wykorzystywana w badaniach naukowych nad mikrokążeniem. Służy jako test farmakologiczny do oceny reaktywności mikronaczyń. Technika pozwala na miejscowe wprowadzenie leku w sposób nieinwazyjny, a ewentualne zmiany przepływu krwi w mikrokążeniu w odpowiedzi na podaną substancję można rejestrować za pomocą technik laserowo-dopplerowskich. Jonoforeza acetylocholin (Ach) i nitroprusydku sodu (SNP) w połączeniu z laserowym skanerem dopplerowskim są szeroko stosowane w ocenie reaktywności naczyń i funkcji śródbłonna mikrokążenia [41,42]. Acetylocholina łącząc się z receptorem muskarynowym (M3) na komórkach endotelialnych pośredniczy w rozkurczu naczyń w mechanizmie zależnym od śródbłonna, powodując wzrost produkcji tlenku azotu (NO), który odpowiada za wazodylatację [2,3]. Natomiast, SNP jest egzogennym donorem NO, który aktywuje cyklazę guanylanową cytozolową, powodując wzrost stężenia cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP), który jest wtórnym przekaźnikiem, a nasilenie jego produkcji prowadzi do zmian fosforylacji różnych białek komórkowych. Defosforylacja lekkich łańcuchów miozyny powoduje rozkurcz mięśni gładkich naczyń [43]. W związku z tym, SNP jest wykorzystywany w celu oceny mechanizmu wazodylatacji niezależnej od śródbłonna [2,3].

System transdermalnej aplikacji leku ma wiele zalet m.in. pozwala uniknąć efektu pierwszego przejścia przez wątrobę, jak również zmniejsza ilość efektów ubocznych stosowanej terapii. Ponadto, jonoforeza jest metodą nieinwazyjną i pozwala na szybkie oraz kontrolowane podawanie wybranej dawki leku [27,44,45]. Z terapeutycznego punktu widzenia, jonoforeza może stanowić alternatywę w stosunku do systemowego podawania leków. Szczególnie przydatna mogłaby być w chorobach przebiegających z zaburzeniem mikrokrążenia, w których pożądane byłoby wysokie miejscowe stężenie leku (np. choroba Raynauda, twardzina układowa, czy cukrzyca). Jonoforeza substancji wazoaktywnych była przedmiotem wielu doniesień naukowych pokazujących, iż miejscowe podawanie acetylocholin, czy nitroprusydku sodu tą metodą zwiększa przepływ w mikrokrążeniu skórnym u ludzi. Niektórzy badacze sugerują również, iż jonoforeza substancji wazodylatacyjnych mogłaby stanowić formę terapii w obwodowych zaburzeniach mikrokrążenia, np. w przebiegu twardziny układowej [46,47]. Jednakże, najczęściej stosowana w jonoforezie substancja rozkurczająca naczynia, nitroprusydek sodu, ma krótki okres półtrwania i szybko przemijający efekt działania [43,48].

Jonoforeza znalazła już kilka zastosowań klinicznych. Metoda ta jest aktualnie stosowana w leczeniu nadmiernej potliwości. Wykorzystuje się ją również w systemach do szybkiego znieczulenia miejscowego (Lidosite®) z użyciem lidokainy i epinefryny. Epinefryna zmniejsza przepływ krwi i tym samym zmniejsza klirens lidokainy. W leczeniu ostrych bólów pooperacyjnych może być wykorzystywane urządzenie Ionsys® pozwalające na jonoforezę fentanylu [46].

Badania przeprowadzone na zwierzętach, wykazały, że jonoforeza analogów prostacykliny, iloprostu i treprostynilu prowadzi do długotrwałego wzrostu wielkości przepływu krwi w mikrokrążeniu obwodowym u szczurów, nie powodując obniżenia ciśnienia tętniczego ani

innych działań ubocznych o charakterze ogólnoustrojowym [20]. Iloprost, analog prostacykliny stosowany systemowo jest obecnie jedynym lekiem zatwierdzonym w terapii zaburzeń mikrokrążenia w przebiegu twardziny układowej [26]. Jednakże, mimo niewątpliwych korzyści terapeutycznych powoduje wiele ogólnoustrojowych efektów ubocznych, związanych z silnymi właściwościami wazodylatacyjnymi. Najczęściej obserwuje się bóle głowy, tachykardię oraz obniżenie ciśnienia tętniczego [20]. Według dostępnej wiedzy, nigdy wcześniej nie badano wpływu jonoforezy analogów prostacykliny na mikrokrążenie obwodowe u ludzi.

Celem niniejszej rozprawy była ocena zmian w przepływie w mikrokrążeniu zdrowych osób pod wpływem inhibitora fosfodiesterazy typu 5 - sildenafilu oraz analogu prostacykliny - treprostynilu. Ze względu na możliwe efekty uboczne związane z systemowym stosowaniem treprostynilu w przyjętych protokołach badawczych zastosowano aplikację tego leku przy pomocy systemu jonoforezy.

W pierwszej części pracy oceniano wpływ sildenafilu na mikrokrążenie obwodowe w obszarze skóry przedramienia u ludzi zdrowych stosując do oceny przepływu krwi nieinwazyjny laserowy skaner dopplerowski. Na podstawie przeprowadzonych badań, wykazano, iż podanie sildenafilu w dawce 50 mg *p.o.* - nie powoduje, zaś 100 mg *p.o.* - powoduje istotny statystycznie wzrost perfuzji mikrokrążenia w stosunku do wartości spoczynkowych. Maksymalna wartość przepływu występowała po 60 minutach od momentu podania leku, co odpowiada czasowi do osiągnięcia maksymalnego stężenia leku w osoczu [50]. Czas powrotu przepływu do wartości spoczynkowych wynosił 120 minut. Monitorowanie ciśnienia tętniczego krwi podczas trwania eksperymentu wykazało podobne obniżenie średniego ciśnienia tętniczego tak po 50 mg, jak i 100 mg sildenafilu po upływie

około jednej godziny po podaniu leku. Trzech z badanych zdrowych ochotników raportowało wystąpienie bólów głowy, zaczerwienia skóry twarzy i uczucia gorąca.

Pomimo, niewątpliwych korzyści ze stosowania sildenafilu i możliwości zastosowania go w terapii zaburzeń mikrokroążenia obwodowego np. u pacjentów z twardziną układową, systemowe podawanie tego leku wiąże się z szeregiem działań niepożądanych, wśród których najczęściej występują: hipotensja, bóle głowy oraz napadowe zaczerwienienie skóry twarzy połączone z uczuciem gorąca (tzw. flushing).

Krótkotrwały wpływ sildenafilu na mikrokroążenie skórne był już wcześniej obserwowany u chorych z zaburzeniami tego obszaru naczyniowego. Park i wsp. wykazali w badaniu oceniającym przepływ włosniczkowy, że sildenafil podany doustnie zwiększa przepływ spoczynkowy i pookluzyjną reakcję przekrwioną po godzinie o 47% u pacjentów z angiograficznie potwierdzoną chorobą wieńcową [51]. Fries i wsp. wykazali zwiększenie przepływu krwi w mikrokroążeniu palców rąk po 4-tygodniowym stosowaniu 50 mg sildenafilu dwa razy dziennie u pacjentów z objawem Raynauda. Niemniej jednak u czterech badanych osób wystąpiły bóle głowy, a trzy osoby raportowały uczucie gorąca i zaczerwienienie skóry twarzy związane z silnym działaniem wazodylatacyjnym sildenafilu [52]. Z kolei, Kumana i wsp. udowodnili, że sildenafil zwiększył ukrwienie i zmniejszył objawy bólowe u pacjentów z ostrym niedokrwieniem palców [53]. Podobnie, Kumar i wsp. stwierdzili, że sildenafil poprawia parametry badania termograficznego i zmniejsza nasilenie objawu Raynauda u pacjentów z twardziną układową, nie powodując efektu hipotensyjnego manifestującego się klinicznie [54].

W drugiej części podjętych badań (protokół 2) oceniano wpływ treprostinilu na mikrokroążenie obwodowe w obszarze skóry przedramienia u ludzi zdrowych zarówno bez jak

i z zastosowaniem miejscowego systemu podawania leku za pomocą jonoforezy. Zmiany perfuzji w naczyniach oceniano nieinwazyjnym laserowym skanerem dopplerowskim.

Zaplanowany układ badań pozwolił na wykazanie, że treprostynil podany miejscowo bez zastosowania jonoforezy nie wywołuje istotnego statystycznie wzrostu przepływu w mikrokrażeniu niezależnie od stężenia roztworu leku (2,5–25–250 μM) w porównaniu do efektu 0,9 % NaCl. Powtórzenie tego samego schematu badawczego z zastosowaniem systemu do jonoforezy pozwoliło na wykazanie istotnego efektu wazodylatacyjnego dla treprostynilu w stężeniach 25 μM i większych. Potwierdza to zasadność użycia jonoforezy w celu oceny działania leku na mikrokrażenie. Analiza badań przeprowadzonych na podstawie protokołu 2 wykazała, iż u badanych osób efekt wazodylatacyjny treprostynilu utrzymywał się 60 minut po zakończeniu jonoforezy. W eksperymencie tym zastosowano krem zawierający lidokainę i prylokainę (EMLA®). Preparat ten został użyty w celu zniesienia odruchu aksonowego, który występuje podczas jonoforezy i polega na niespecyficznym rozkurczu naczyń mikrokrażenia wskutek podrażnienia skóry prądem [55,56]. Nie występowanie zmian w wielkości przepływu w mikrokrażeniu po jonoforezie 0,9% NaCl stanowi potwierdzenie zniesienia odruchu aksonowego wskutek zastosowanego preparatu EMLA. Pozwala to również na wnioskowanie, że efekt działania treprostynilu oceniony w tym schemacie badawczym nie był spowodowany przez odruch aksonowy.

W kolejnym etapie badań - w protokole 3 - podjęto próbę oceny czasu utrzymywania się efektu wazodylatacyjnego po zastosowaniu jonoforezy treprostynilu w stężeniach użytych w protokole 2. Ten eksperyment badawczy został przeprowadzony bez wcześniejszego zastosowania preparatu EMLA, w związku z ewentualną perspektywą zastosowania jonoforezy jako metody leczniczej. W eksperymencie obserwowano szczyt przepływu w 30 minucie we wszystkich miejscach, w których zastosowano jonoforezę

(włącznie z 0,9% NaCl), poza miejscem aplikacji 250 μ M treprostynilu bez zastosowania jonoforezy.

Wielkość maksymalnej zmiany przepływu była zależna od stężenia leku. Dla wszystkich badanych z zastosowaniem jonoforezy roztworów obserwowano występowanie maksymalnych zmian przepływu w 30 minucie od rozpoczęcia eksperymentu. Obserwowano również istotne zwiększenie wielkości przepływu dla 0,9% NaCl. Sugeruje to, iż obserwowana wazodylatacja pod wpływem treprostynilu jest również zależna od odruchu aksonowego. Przyjmując, że zmiany przepływu w czasie jonoforezy 0,9% NaCl są spowodowane odruchem aksonowym poddano analizie dane opisujące zmiany przepływu w czasie aplikacji 0,9% NaCl oraz 250 μ M treprostynilu względem przepływu spoczynkowego. Analiza względnych zmian przepływu treprostynilu w stężeniu 250 μ M oraz od 0,9% NaCl pozwoliła na wykazanie, że maksymalny efekt leku występuje po upływie 1 godziny i utrzymuje się powyżej 2-krotności efektu obserwowanego dla jonoforezy 0,9% NaCl przez okres 4 godzin.

Na podstawie przeprowadzonych badań, wykazano brak wpływu treprostynilu na mikrokążenie, gdy został on zaaplikowany bez zastosowania jonoforezy. Wykazano także, że jonoforeza 250 μ M treprostynilu powoduje istotne zwiększenie przepływu krwi w mikrokążeniu nie wywołując ani miejscowych ani systemowych działań ubocznych.

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że miejscowa aplikacja treprostynilu za pomocą jonoforezy może być rozważana jako alternatywna metoda podawania tego leku, która pozwala na zwiększenie jego lokalnego stężenia i uniknięcie działań niepożądanych.

6. Wnioski

1. Sildenafil, inhibitor fosfodiesterazy typu 5, podany doustnie w dawce 100 mg zwiększa przepływ w mikrokrażeniu obwodowym u ludzi zdrowych.
2. Średnie ciśnienie tętnicze oceniane w okresie 1 godziny po podaniu 50 mg i 100 mg sildenafilu uległo istotnemu statystycznie obniżeniu względem wartości zmierzonych bez podawania leku.
3. Treprostinil, analog prostacykliny, podany miejscowo bez użycia jonoforezy, nie wywołuje istotnego statystycznie wzrostu przepływu w mikrokrażeniu niezależnie od stężenia roztworu leku.
4. Treprostinil w stężeniu 250 μM podany miejscowo metodą jonoforezy wywołuje istotny wzrost przepływu w mikrokrażeniu obwodowym u ludzi zdrowych.
5. Jonoforeza treprostinilu nie spowodowała miejscowych ani systemowych efektów ubocznych. Średnie ciśnienie tętnicze podczas trwania całego eksperymentu nie zmieniało się w sposób istotny.

7. Streszczenie

Choroby układu krążenia są główną przyczyną zgonów w krajach uprzemysłowionych. Istnieje wiele technik rutynowo stosowanych do oceny dużych i średnich naczyń. Tymczasem w przebiegu cukrzycy, nadciśnienia tętniczego, niewydolności nerek, czy choroby wieńcowej dochodzi do uogólnionej dysfunkcji mikrokrążenia. W chorobach układowych tkanki łącznej zaburzenia tego obszaru naczyniowego często bywają pierwszym objawem choroby. Ze względu na mikroskopijne wymiary naczyń, niejednorodną morfologię oraz zróżnicowany przepływ krwi, mikrokrążenie jest częścią układu krążenia, której badanie jest szczególnie trudne. Niewielka dostępność metod badawczych jest jednym z powodów braku postępu w opracowaniu i weryfikacji skuteczności leczenia zaburzeń mikrokrążenia w schorzeniach takich jak twardzina układowa czy choroba Raynauda.

Celem pracy było zbadanie wpływu sildenafilu, inhibitora fosfodiesterazy typu 5, podanego systemowo na mikrokrążenie obwodowe u ludzi zdrowych. Ze względu na możliwe efekty uboczne związane z systemowym stosowaniem substancji wazodylatacyjnej, w pracy postanowiono również zbadać wpływ treprostinilu, analogu prostacykliny, podając go miejscowo przy pomocy systemu jonoforezy. W pracy oceniano tolerancję miejscową jonoforezy treprostinilu oraz reakcję systemową na podawane substancje monitorując ciśnienie tętnicze podczas trwania badań.

Grupę badaną stanowiło 30 zdrowych ochotników obu płci w wieku powyżej 18 lat. Do oceny wpływu substancji wazoaktywnych na mikrokrążenie obwodowe wybrano skórę przedramienia. Zmiany przepływu w mikronaczyńkach rejestrowano przy pomocy nieinwazyjnego laserowego skanera dopplerowskiego. Substancje wazoaktywne podawano miejscowo stosując system jonoforezy.

W badaniu wykazano, iż sildenafil podany doustnie w dawce 100 mg zwiększa przepływ w mikrokrazeniu obwodowym u ludzi zdrowych, wywołując istotne statystycznie obniżenie ciśnienia tętniczego względem wartości zmierzonych bez podawania leku. Ponadto, wykazano, że treprostinil w stężeniu 250 μM podany miejscowo metodą jonoforezy wywołuje istotny wzrost przepływu w mikrokrazeniu obwodowym u ludzi zdrowych. Miejscowa aplikacja analogu prostacykliny nie spowodowała miejscowych ani systemowych efektów ubocznych.

8. Piśmiennictwo

1. Neubauer-Geryk J, Bieniaszewski L. Metody oceny funkcji naczyń – pletyzmografia. *Choroby Serca i Naczyń* 2009, 6 : 184-187.
2. Cracowski JL, Minson CT, Salvat-Melis M, Halliwill JR. Methodological issues in the assessment of skin microvascular endothelial function in humans. *Trends in Pharmacological Sciences* 2006, 27 : 503-508.
3. Turner J, Belch JJ, Khan F. Current concepts in assessment of microvascular endothelial function using laser Doppler imaging and iontophoresis. *Trends in cardiovascular medicine* 2008, 18 : 109-116.
4. Deanfield J, Donald A, Ferri C et al. Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *Journal of Hypertension* 2005, 23 : 7-17.
5. Neubauer-Geryk J, Bieniaszewski L. Metody oceny funkcji śródbłonna – Wazodylatacja tętnicy ramiennej po niedokrwieniu. *Choroby Serca i Naczyń* 2007, 4 : 190-196.
6. Holowatz LA, Thompson-Torgerson CS, Kenney WL. The human cutaneous circulation as a model of generalized microvascular function. *Journal of Applied Physiology* 2008, 105: 370-372.
7. Minson CT. Thermal provocation to evaluate microvascular reactivity in human skin. *Journal of Applied Physiology* 2010, 109 : 1239-1246.

8. Tuma RF, Duran WN, Ley K. Handbook of Physiology – Microcirculation. Academic Press, Second Edition 2008.
9. Konturek S. Fizjologia człowieka tom 2 -Układ krążenia. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego 2001.
10. Maniewski R, Liebert A. Metoda laserowo-dopplerowska w badaniach mikrokrążenia krwi. Akademicka Oficyna Wydawnicza EXIT, Warszawa 2003.
11. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 1980, 228 : 373-376.
12. Tesselaar E, Sjöberg F. Transdermal iontophoresis as an in-vivo technique for studying microvascular physiology. Microvascular Research 2011, 81 : 88-96.
13. Maga P. Badania mikrokrążenia. rozdz. w Choroby Wewnętrzne pod red. A. Szczeklika. Medycyna Praktyczna, Kraków 2011, 128-129.
14. Stern MD. In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering. Nature 1975, 254 : 56-58.
15. Henricson J, Nilsson A, Tesselaar E, Nilsson G, Sjöberg F. Tissue viability imaging: Microvascular response to vasoactive drugs induced by iontophoresis. Microvascular Research 2009, 78 : 199-205.
16. Droog E, Henricson J, Nilsson G, Sjöberg F. A protocol for iontophoresis of acetylcholine and sodium nitroprusside that minimises nonspecific vasodilatory effects. Microvascular Research 2004, 67 : 197-202.

17. Herrick AL. Vascular function in systematic sclerosis. *Current Opinion in Rheumatology* 2000, 12 : 527-33.
18. Anderson ME, Moore TL, Lunt M, Herrick AL. Digital iontophoresis of vasoactive substances as measured by laser Doppler imaging—a non-invasive technique by which to measure microvascular dysfunction in Raynaud’s phenomenon. *Rheumatology* 2004, 43 : 986-991.
19. Clark S, Dunn G, Moore T, Jayson M, King TA, Herrick AL. Comparison of thermography and laser Doppler imaging in the assessment of Raynaud’s phenomenon. *Microvascular Research* 2003, 66 : 73-76.
20. Blaise S, Roustit M, Millet C, Ribuoat C, Boutonnat J, Cracowski JL. Cathodal iontophoresis of treprostinil and iloprost induces a sustained increase in cutaneous flux in rats. *British Journal of Pharmacology* 2011, 162 : 557-565.
21. Colglazier CL, Sutej PG, O'Rourke KS. Severe refractory fingertip ulcerations in patient with scleroderma: successful treatment with sildenafil. *The Journal of Rheumatology* 2005, 32 : 2440-2442.
22. Fries R, Shariat K, von Wilmowsky H, Böhm M. Sildenafil in the treatment of Raynaud’s phenomen resistnant to vasodilatory therapy. *Circulation* 2005, 112 : 2980-2985.
23. Gore J, Silver R. Oral sildenafil for the treatment of Raynaud’s phenomenon and digital ulcers secondary to systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2005, 64 : 1387.

24. Levien TL. Phosphodiesterase inhibitors in Raynaud's phenomenon. *The Annals of Pharmacotherapy* 2006, 40 : 1388-1393.
25. Becla L, Osińska B, Malottki K. Bozentan, epoprostenol, iloprost, sildenafil i treprostynil w leczeniu tętniczego nadciśnienia płucnego. Analiza efektywności kliniczne. Agencja Oceny Technologii Medycznych, Warszawa 2009.
26. Wigley FM, Seibold JR, Wise RA, McCloskey DA, Dole WP. Intravenous iloprost treatment of Raynaud's phenomen and ischemic ulcers secondary to systematic sclerosis. *The Journal of Rheumatology* 1992, 19 : 1407-1414.
27. Kalia YN, Naik A, Garrison J, Guy RH. Iontophoretic drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2004, 56: 619-658.
28. Durand S, Fromy B, Bouye P, Saumet JL, Abraham P. Current-induced vasodilation during water iontophoresis (5 min, 0.10 mA) is delayed from current onset and involves aspirin sensitive mechanisms. *Journal of Vascular Research* 2002, 39 : 59-71.
29. Roustit M, Blaise S, Cracowski JL. Sodium nitroprusside iontophoresis on the finger pad does not consistently increase skin blood flow in healthy controls and patients with systematic sclerosis. *Microvascular Research* 2009, 77 : 260-264.
30. Charkoudian N. Skin blood flow in adult humans thermoregulation: how it works, when it does not, and why. *Mayo Clinic Proceedings* 2003, 78 : 603-612.
31. Boignard A, Salvat-Melis M, Carpentier PH, Minson CT, Grange L, Duc C, Sarrot-Reynauld F, Cracowski JL. Local hyperhemia to heating is impaired in secondary Raynaud's phenomenon. *Arthritis Research & Therapy* 2005, 7 : 1103-1112.

32. Cracowski JL, Roustit M. Local thermal hyperemia as a tool to investigate human skin microcirculation. *Microcirculation* 2010, 17 : 79-80.
33. Roustit M, Cracowski JL. Non-invasive assessment of skin microvascular function in humans: an insight into methods. *Microcirculation* 2012, 19 : 47-64.
34. Coulon P, Constans J, Gosse P. Impairment of skin blood flow during post-occlusive reactive hyperemia assessed by laser Doppler flowmetry correlates with renal resistive index. *Journal of Human Hypertension* 2012, 1 : 56-63.
35. Stewart J, Kohen A, Brouder D, Rahim F, Adler S, Garrick R, Goligorsky MS. Noninvasive interrogation of microvasculature for signs of endothelial dysfunction in patients with chronic renal failure. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 2004, 6 : 2687-2696.
36. McIntyre CW, John SG, Jefferies HJ. Advances in the cardiovascular assessment of patients with chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2008; 6 : 383-391.
37. Sax FL, Cannon RO, 3rd, Hanson C, et al. Impaired forearm vasodilator reserve in patients with microvascular angina. Evidence of a generalized disorder of vascular function? *New England Journal of Medicine* 1987, 317 : 1366-1370.
38. IJzerman RG, de Jongh RT, Beijik MA, van Weissenbruch MM, Delemarre-van de Waal HA, Serné EH, Stehouwer CD. Individuals at increased coronary heart disease risk are characterized by an impaired microvascular function in skin. *European Journal of Clinical Investigation* 2003, 33 : 536-542.

39. Kajimoto K, Yamamoto M, Watanabe M, Kigasawa K, Kanamura K, Harashima H, Kogure K. Noninvasive and persistent transfollicular drug delivery system using a combination of liposomes and iontophoresis. *International Journal of Pharmaceutics* 2011, 403 : 57-65.
40. Kumar MG, Lin S. Transdermal Iontophoresis: Impact on Skin Integrity as Evaluated by Various Methods. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 2008, 25 : 381-401.
41. Droog EJ, Henricson J, Nilsson GE, Sjöberg F. A protocol for iontophoresis of acetylcholine and sodium nitroprusside that minimises nonspecific vasodilatory effects. *Microvascular Research* 2004 67 : 197-202.
42. Tesselaar E, Henricson J, Jonsson S, Sjöberg F. A Time-Response Model for Analysis of Drug Transport and Blood Flow Response during Iontophoresis of Acetylcholine and Sodium Nitroprusside. *Journal of Vascular Research* 2009, 46 : 270-277.
43. Trajder A, Abramczyk A. Nitroprusydek sodu - w dorażnym obniżaniu ciśnienia tętniczego. *Współczesna analiza leku. Nadciśnienie Tętnicze* 2004, 8 : 185-190
44. Dixit N, Bali V, Baboota S, Ahuja A, Ali J. Iontophoresis – an approach for controlled drug delivery: a review. *Current Drug Delivery* 2007, 4 : 1-10.
45. Costello CT and Jeske AH, Iontophoresis: applications in transdermal medication delivery. *Physical Therapy* 1995, 75 : 554-563.
46. Murray AK, Herrick AL, Gorodkin RE, Moore TL, King TA. Possible therapeutic use of vasodilator iontophoresis. *Microvascular Research* 2005, 69 : 89-94.

47. Murray AK, Moore TL, King TA, Herrick AL. Vasodilator iontophoresis—a possible new therapy for digital ischaemia in systemic sclerosis? *Rheumatology* 2008, 47 : 76-79.
48. Blaise S, Hellmann M, Roustit M, Isnard S, Cracowski JL. Oral sildenafil increases sodium nitroprusside iontophoresis induced skin hyperaemia in healthy volunteers. *British Journal of Pharmacology* 2010, 160 : 1128-1134.
49. Sieg A, Wascotte V, Diagnostic and therapeutic applications of iontophoresis. *Journal of Drug Targeting* 2009, 17 : 690-700.
50. Wright PJ. Comparison of phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors. *International Journal of Clinical Practice* 2006, 60 : 967-975.
51. Park JW, Mrowietz C, Chung N, Jung F. Sildenafil improves cutaneous microcirculation in patients with coronary artery disease: a monocentric, prospective, double-blind, placebo-controlled, randomized cross-over study. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 2004, 31 : 173-183.
52. Fries R, Shariat K, von Wilmowsky H, Bohm M. Sildenafil in the treatment of Raynaud's phenomenon resistant to vasodilatory therapy. *Circulation* 2005, 112 : 2980-2985.
53. Kumana CR, Cheung GTY, Lau CS. Severe digital ischaemia treated with phosphodiesterase inhibitors. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2004, 63 : 1522-1524.
54. Kumar N, Griffiths B, Allen J. Thermographic and symptomatic effect of a single dose of sildenafil citrate on Raynaud's phenomenon in patients with systemic sclerosis: a potential treatment. *Journal of Rheumatology* 2006, 33 : 1918-1919.

55. Cracowski JL, Lorenzo S, Minson CT. Effects of local anaesthesia on subdermal needle insertion pain and subsequent tests of microvascular function in human. *European Journal of Pharmacology* 2007, 559 : 150-154.
56. Roustit M, Simmons GH, Carpentier P, Cracowski JL. Abnormal digital neurovascular response to local heating in systemic sclerosis. *Rheumatology* 2008, 47 : 860-864.