

© ЕЛЬЧАНИНОВА С.А., КОРЕНЯК Н.А., ЗОЛОВКИНА А.Г.,
МАКАРЕНКО В.В.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРЕРЫВИСТОЙ
НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПОКСИТЕРАПИИ НА ЭНДОТЕЛИЙ МИКРОСОСУДОВ
У БОЛЬНЫХ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ**

С.А. Ельчанинова, Н.А. Кореняк, А.Г. Золовкина, В.В. Макаренко

Алтайский государственный медицинский университет, ректор – проф.,
д.м.н. В.М. Брюханов; кафедра биохимии и клинической лабораторной
диагностики, зав. – д.б.н., проф. С.А. Ельчанинова; Центр системной биологии
университета Чикаго, Иллинойс, США, ректор – проф., PhD R.J. Zimmer.

***Резюме.** В исследовании показано, что снижение артериального давления (АД) у больных артериальной гипертензией (АГ) под воздействием курса прерывистой нормобарической гипокситерапии (ПНГ) сопровождается транзиторным повышением концентрации в крови васкулярного эндотелиального фактора роста (VEGF). Кроме того, в эксперименте на культуре эндотелиоцитов микрососудов легких человека показано, что концентрация VEGF в клеточной среде увеличивается под воздействием ПНГ. Предполагается, что механизм гипотензивного эффекта ПНГ при АГ включает прямое влияние гипоксии на продукцию эндотелиоцитами VEGF, способного усиливать регенерацию поврежденного эндотелия. Это согласуется с ранее установленным авторами снижением концентрации маркеров повреждения эндотелия у больных АГ после курса ПНГ.*

***Ключевые слова:** артериальная гипертензия, прерывистая нормобарическая гипокситерапия, эндотелий, васкулярно-эндотелиальный фактор роста.*

Артериальная гипертензия (АГ) является одной из основных причин потери трудоспособности и смертности взрослого населения в Российской Федерации

и в мире [1]. Согласно современной концепции о ведущей роли дисфункции эндотелия в патогенезе АГ [2] основной задачей терапевтического воздействия при данном синдроме является достижение целевых уровней артериального давления (АД) с учетом коррекции функции эндотелия [7]. При этом одновременно с поиском новых медикаментозных воздействий, модулирующих эндотелиальную функцию, все большее внимание привлекают немедикаментозные методы лечения АГ, способные, в отличие от фармпрепаратов, воздействовать на адаптивный потенциал сердечно-сосудистой системы. К числу таких методов относится прерывистая нормобарическая гипокситерапия (ПНГ) [8].

Эффективность использования ПНГ при заболеваниях системы кровообращения подтверждается устойчивым снижением АД после курсовых воздействий, их антиангинальном эффекте и улучшении кровотока в магистральных мозговых артериях у больных АГ [5,8]. В последнее время интенсивно изучаются механизмы коррекции ПНГ патогенетических нарушений, связанных с дисфункцией эндотелия. Показано, в частности, что после курса ПНГ у больных АГ в крови снижается концентрация маркеров повреждения эндотелия [3]. Ранее нами было зарегистрировано повышение концентрации васкулярного эндотелиального фактора роста (VEGF) в крови здоровых добровольцев под воздействием курса ПНГ [4]. Данные изменения могут рассматриваться как стимул для активации пролиферации эндотелиоцитов, а, следовательно, восстановления поврежденного при АГ эндотелия. Для проверки гипотезы об участии системы регуляции VEGF в механизме эффектов ПНГ у больных АГ одной из задач нашей работы стала оценка динамики концентрации VEGF в плазме крови больных АГ. Известно, что основным источником VEGF являются эндотелиоциты [12], поэтому второй задачей работы была проверка возможности прямого воздействия ПНГ на эндотелиоциты в эксперименте на культуре эндотелиальных клеток.

Материалы и методы

В исследование было включено 62 больных эссенциальной АГ (32 – женщины, 30 – мужчин) 1-3 степени I-II стадии по классификации Всемирной организации здравоохранения и Всероссийского научного общества кардиологов (2004) в возрасте 48 ± 6 лет в период ухудшения течения АГ. Критериями исключения были стенокардия, хроническая сердечная недостаточность II б-3 стадий, а также инсульт, инфаркт миокарда, коронарная реваскуляризация в анамнезе. Подбор медикаментозной терапии проводили индивидуально, в соответствии с рекомендациями ВОЗ и ВНОК (2004), уровнем АД, частотой сердечных сокращений и переносимостью препарата. Фармакотерапия включала наиболее рациональные комбинации антигипертензивных препаратов различных классов (β -блокаторы+диуретики; β -блокаторы+антагонисты кальция; диуретики+антагонисты кальция; ингибиторы АПФ+антагонисты кальция). В контрольную группу вошли 30 практически здоровых участников исследования (12 – мужчин и 18 – женщин) в возрасте $41,2 \pm 3,5$ год.

Больных включали в исследование при госпитализации в кардиологическое отделение МУЗ "Городская больница №1" г. Барнаула. На этапе следовавшего за лечением в стационаре амбулаторного наблюдения при достижении целевых значений АД на фоне гипотензивной фармакотерапии пациенты были рандомизированы на две группы. Первая группа включала 32 пациента, прошедших в последующем курс ПНГ (группа «ПНГ»); вторая группа – 30 пациентов, не проходивших ПНГ (группа «без ПНГ»). Курс ПНГ, состоявший из 13-16 ежедневных сеансов продолжительностью 25-60 минут, проводили согласно рекомендациям Минздрава РФ с использованием аппарата «Гипоксикатор ЭВЕРЕСТ-1» («Климби», Россия). Сеанс состоял из 5-10 циклов длительностью 8-13 минут, в которых вдыхание через маску гипоксической газовой смеси с содержанием кислорода 10-12 об.% чередовалось с вдыханием атмосферного воздуха в циклическом режиме.

В первые дни госпитализации, за 1-3 дня до ПНГ, через 4-5 дней после курса ПНГ у больных группы «ПНГ» и через 3 недели после рандомизации у больных

группы «без ПНГ» оценивали клинические симптомы, уровень АД по Н.С. Короткову. Кроме того, проводили суточное мониторирование АД (СМАД) с использованием монитора DemoDrB (ADC, США). До воздействия, а затем через сутки, двое, четверо и четырнадцать суток после последнего сеанса ПНГ в сыворотке крови определяли концентрацию VEGF методом иммуноферментного анализа с использованием реагентов Cytimmune Sciences Inc. (USA), включающих мышиные моноклональные антитела к человеческому VEGF.

Для исследования эффектов ПНГ *in vitro* была использована первичная культура клеток эндотелия микрососудов легких человека (ЭМСЛЧ, HMVE-L), полученная от Lonza Walkersville, Inc. (США). По нашему мнению, ЭМСЛЧ являются адекватным объектом для исследований эффектов ПНГ, поскольку эндотелий микрососудов (артериол и капилляров) имеет важное значение в образовании VEGF, обладая при этом большей чувствительности к снижению содержания кислорода в крови по сравнению с эндотелием венозных сосудов. Это заключение нашло подтверждение и в наших предварительных исследованиях, в которых, в частности, была выявлена большая резистентность эндотелиоцитов артерий легких человека (венозный тип) к воздействию постоянной и прерывистой гипоксии по сравнению с эндотелием микрососудов легких.

Культура ЭМСЛЧ выращивалась в пластиковых чашках Петри с использованием стандартной жидкой среды для эндотелиоцитов Clonetics EGM-2-MV BulletKit (Lonza Walkersville, Inc., США), в атмосфере, содержащей 21 об.% кислорода. Для оценки эффектов ПНГ были использованы ЭМСЛЧ седьмого-девятого пассажа, достигшие 95-100 % конfluenceности.

Воздействие ПНГ проводили в инкубаторе "Steri-Cult 200 Incubator" (Thermo Scientific, США) с использованием двух типов готовых и нагретых до 37°C газовых смесей (Aurora Inspir., США): нормоксическую (20 об.% O₂, 5 об.% CO₂, 75 об.% N₂) и гипоксическую (1 об.% O₂, 5 об.% CO₂, 94 об.% N₂). Воздействие включало три одночасовых сеанса ПНГ, каждый из которых

состоял из шести циклов чередования пятиминутной нормоксии и пятиминутной гипоксии. Повтор сеанса проводили после одночасового периода нормоксии. Длительность нормоксии между сеансами была подобрана в предварительных экспериментах с учетом времени восстановления морфологии клеток и сохранения жизнеспособности культуры, оцениваемой по восприятия красителя трепанового синего.

Измерения концентрации VEGF методом иммуноферментного анализа в культуральной среде проводили с использованием тест-системы фирмы Santa Cruse Ltd (США).

Статистический анализ результатов выполняли с использованием программы Sigma Stat 3.1. (Systat Software Inc., 2004, США). Сравнение средних значений проводили по критерию Стьюдента-Ньюмена-Кейлса.

Результаты и обсуждение

Как показали исследования, стандартная комплексная гипотензивная фармакотерапия, назначенная в соответствии с индивидуальными особенностями пациентов, приводила к снижению уровня АД до верхней границы целевых значений (табл.). При последующем сочетании терапии гипотензивными препаратами с ПНГ отмечалось снижение АД до нормального уровня.

По данным СМАД на всех этапах исследования изменения как сАД, так и дАД у больных были аналогичны изменениям клинического АД. При госпитализации была повышена вариабельность как дневного, так и ночного АД: $28,5 \pm 2,2$ мм рт.ст. против $10,2 \pm 1,3$ в контроле ($p < 0,001$), $19,5 \pm 1,6$ мм рт.ст. против $9,5 \pm 0,9$ в контроле ($p < 0,001$) для среднесуточных сАД и дАД соответственно. Стабилизация АД на уровне целевых значений под воздействием фармакотерапии сопровождалась уменьшением вариабельности сАД и дАД на 24% и 17% соответственно. Курс ПНГ вызывал снижение этого показателя дополнительно на 31% для сАД и на 25% – для дАД. Пациенты, не прошедшие курс ПНГ, не имели значимых изменений вариабельности АД.

Согласно ряду исследователей в период острого массивного повреждения эндотелия возможно нарастание уровня VEGF в плазме крови [11], что связывают с попаданием в кровь компонентов цитоплазмы эндотелиоцитов при их повреждении [9]. Этим можно объяснить выявленный нами повышенный уровень VEGF в крови больных АГ, который мы наблюдали при госпитализации (рис. 1).

Снижение АД под воздействием фармакотерапии сопровождалась снижением концентрации VEGF в плазме крови больных АГ, что, вероятно, отражает ослабление повреждения эндотелиоцитов. Повышение VEGF в первые сутки после курса ПНГ сменялось ее снижением к третьим суткам, после чего на пятые сутки отмечалось ее повторное возрастание. Снижение концентрации VEGF до исходных значений происходило к 14-ым суткам после курса ПНГ. Следует отметить, что повышение в крови концентрации VEGF после ПНГ не сопровождалось гипертонической реакцией или ухудшением самочувствия больных. Две фазы ответа, обусловлены разными механизмами, последовательно сменяющимися друг друга: первый пик может быть следствием транзиторного слабовыраженного повреждения эндотелиоцитов активными формами кислорода [10], тогда как второй развивается вследствие усиления биосинтеза VEGF в ответ на это повреждение.

Эта гипотеза нашла подтверждение в экспериментах *in vitro* с использованием культуры ЭМСЛЧ при оценке концентрации VEGF в культуральной среде при ПНГ. Как видно на рисунке 2 первый сеанс не сопровождался существенным изменением содержания VEGF, в то время как после второго и третьего сеанса ПНГ наблюдалось значительное увеличение концентрации фактора. Этот эффект ПНГ, также отмеченный нами на первом этапе исследования у больных АГ, может быть связан с активацией биосинтеза VEGF эндотелиоцитами при гипоксии [10, 12]. Примечательно, что уровень VEGF, после трех сеансов ПНГ с общей длительностью курса пять часов, был почти в два раза выше, чем после воздействия постоянной гипоксии на ЭМСЛЧ

в течение шести часов. Это может свидетельствовать о более выраженной стимуляции продукции VEGF при ПНГ по сравнению с постоянной гипоксией.

Таким образом, у больных АГ в период стабильного течения заболевания при АД на уровне целевых значений дополнение стандартной гипотензивной фармакотерапии курсом ПНГ приводит к снижению систолического и диастолического АД, уменьшению вариабельности АД, частоты эпизодов его повышения. Можно предполагать, что механизм этих гемодинамических изменений включает прямой эффект интермиттирующей гипоксии на продукцию VEGF эндотелиоцитами.

Работа выполнена при содействии государственного фонда США им. Fulbright. Авторы выражают благодарность доктору Prabhakar N., Nanduri J., Ying-Jie N. и др. сотрудникам лаборатории прерывистой гипоксии Центра системной биологии университета Чикаго за помощь в освоении технологии работы с культурой клеток.

EFFECTS OF INTERMITTENT HYPOXIC THERAPY ON MICROVASCULAR ENDOTHELIUM IN PATIENTS WITH ARTERIAL HYPERTENSION

S.A. Elchaninova, N.A. Korenyak, A.G. Zolovkina, V.V. Makarenko

Altai State Medical University, Department of Biochemistry and Clinical laboratory diagnostics; Center for System Biology, University of Chicago, IL, USA.

A course of intermittent hypoxic therapy (IHT) decreased arterial blood pressure (BP) and transiently increased blood concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with arterial hypertension (AH). IHT elicited augmentation of VEGF in human lung microvascular endothelial cells culture medium. We consider that direct impact of hypoxia on VEGF production by endothelial cells increasing regeneration of damaged endothelium causes a hypotensive effect of IHT in patients with AH. It agrees with our previous data showing decreased blood

concentration of markers of endothelial injury in patients with AH after a course of ИТ.

Key words: arterial hypertension, intermittent hypoxic therapy, endothelium, vascular endothelial growth factor.

Литература

1. Гогин Е.Е. // Гипертоническая болезнь. – М., 1997. – С.76-93.
2. Гомазков О.А. Эндотелин в кардиологии: молекулярные, физиологические и патологические аспекты // Кардиология. – 2001. – №2. – С.50-58.
3. Ельчанинова С.А., Кореньяк Н.А., Павловская Л.И. и др. К вопросу о механизмах гипотензивного эффекта прерывистой нормобарической гипоксии при артериальной гипертензии // Прерывистая нормобарическая гипокситерапия. – М., 2005. – Т.4 – С. 33-38.
4. Ельчанинова С.А., Кореньяк Н.А., Павловская Л.И. и др. Вазкулярный эндотелиальный фактор роста и основной фактор роста фибробластов в периферической крови: влияние интервальной гипоксической гипоксии // Физиология человека. – 2004. – Т.29, №3. – С. 72-75.
5. Ельчанинова С.А., Кореньяк Н.А., Смагина И.В. и др. Влияние интервальной гипоксии на оксидативный гомеостаз больных дисциркуляторной энцефалопатией на фоне гипертонической болезни // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2002. – № 11. – С. 29-32.
6. Меерсон Ф.З. Адаптация стресс и профилактика. – М.: Наука, 1981. – 278 С.
7. Соболева Г.Н., Иванова О.В., Карпов Ю.А. Влияние различных лекарственных препаратов на функцию эндотелия // Тер. архив. – 1997. – №9. – С.80-83.

8. Чижов А.Я., Потиевская В.И. Прерывистая нормобарическая гипоксия в профилактике и лечении гипертонической болезни. – М.: Изд. Университета Дружбы народов, 2002. – С. 9-19.
9. Tsai W.C., Li Y.H., Huang Y.Y., Lin C.C. et al. Plasma vascular endothelial growth factor as a marker for early vascular damage in hypertension // *Clin Sci (Lond)*. – 2005. – № 109. – P.39-43.
10. Ferrara N., Terri D.-S. The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor // *Endocrine Reviews*. – 1997. – Vol.18, №1. – P.4-25.
11. Hassan A., Hunt B.J., O'Sullivan M. et al. Markers of endothelial dysfunction in lacunar infarction and ischaemic leukoaraiosis // *Brain*. – 2003. – Vol.126, №2. – P. 424-432.
12. Manalo D. J., Rowan A., Lavoie T. et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1 // *Blood*. – 2005. – Vol. 105, №2 – P. 659-667.