

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра физиологии человека и животных

**ЭФФЕКТЫ ВИТАМИНА D3 НА УРОВЕНЬ АРТЕРИАЛЬНОГО
ДАВЛЕНИЯ И ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫЕ МЕХАНИЗМЫ
ВАЗОРЕЛАКСАЦИИ У КРЫС**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2 курса 241 группы

Направления 06.04.01. Биология

Биологического факультета

Аль Кассаб Валид Махди Муслим

Научный руководитель:

Зав. кафедрой физиологии человека

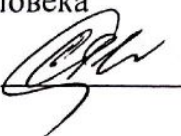
и животных, д.б.н., доцент



О.В. Семячкина-Глушковская

Зав. кафедрой физиологии человека

и животных, д.б.н., доцент



О.В. Семячкина-Глушковская

Саратов 2017

Введение. Артериальная гипертензия сегодня - это одно из наиболее распространенных заболеваний, частота встречаемости которого в популяции разных стран составляет 30-45% и увеличивается с возрастом. Дефицит витамина D рассматривают как новую «эпидемию» в мире. В последние годы опубликован ряд экспериментальных и клинических исследований, подтверждающих роль витамина D в сложном механизме формирования артериальной гипертензии, а его дефицит рассматривают как фактор риска развития артериальной гипертензии и ее осложнений. Разработаны модели на животных по развитию артериальной гипертензии, вызванной острым дефицитом витамина D. Однако, в обзорных работах приводятся весьма противоречивые данные относительно роли витамина D в поддержании гипертензивного статуса. Остро дискуссионными остаются вопросы относительно механизмов, лежащих в основе витамин- D-зависимых изменений в уровне артериального давления и развития артериальной гипертензии.

Целью исследования явилось изучение содержания 25-гидроксивитамина D (25 (ОН) D) и оксида азота, эндотелийзависимой вазодилатации сосудов у крыс в условиях хронической стресс-индуцированной артериальной гипертензии и влияния ежедневного приема холекальциферола на эти показатели.

Для решения поставленной цели нами были сформулированы следующие задачи:

1. Изучить изменение гемодинамических показателей (среднего артериального давления и частоты сердечных сокращений) при формировании стресс-индуцированной артериальной гипертензии.
2. Оценить связь между механизмами развития артериальной гипертензии и содержанием витамина D в крови крыс.
3. Изучить продукцию оксида азота и эндотелийзависимую вазорелаксацию в процессе формирования артериальной гипертензии.

4. Изучить влияние фармакологического замещения содержания витамина D на развитие артериальной гипертензии.

Исследования проводили на базе кафедры физиологии человека и животных Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского. Исследование проводили на 136 половозрелых беспородных белых крысах-самцах массой 200-250 г. Животных содержали в условиях вивария на стандартном рационе. Все экспериментальные процедуры проводили в соответствии с принципами Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным и в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных Национального института США.

Регистрацию гемодинамических параметров – среднего артериального давления (ср. АД) и частоты сердечных сокращений (ЧСС) у бодрствующих крыс осуществляли на компьютерно-вычислительном комплексе для прямой регистрации кровяного давления у мелких животных с программным обеспечением Chart 4, оснащенным датчиками кровяного давления (MLT0699, PowerLab, ID Instruments).

Показатели АД, витамина D и NO оценивали каждый месяц по мере формирования гипертензивного статуса у крыс.

Определение содержания в крови общего витамина D (нг/мл) проводили методом иммуноферментного анализа с применением набора RAT 25OH VITAMIN D TOTAL ELISA (Cat. No.: RISO22R).

Определение концентрации NO (мкг/мл) проводили спектрофотометрическим методом с использованием реактива Грисса-Илосвая на спектрофотометре «СФ-2000 Био» по интенсивности окраски при длине волны 583 нм.

Выпускная квалификационная работа состоит из введения, основной части, выводов, заключения, списков используемых источников. Основная

часть включает обзор литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования.

Научная новизна и значимость заключается в том, что имеющееся небольшое число исследований и их противоречивость при оценке взаимосвязей биомаркеров витамина D с показателями функции эндотелия и ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, указывают на необходимость дальнейшего изучения и углубления представлений о механизмах влияния витамина D в частности на функцию эндотелия, что позволит патогенетически обосновать назначение препаратов витамина D.

Результаты исследования.

В ходе создания модели стресс-индуцированной артериальной гипертензии нами были сформированы группы крыс, проживающие в условиях повышенной популяционной плотности и контрольная группа. Выбор данных видов социального стресса обусловлен как их широкой распространенностью в обществе, так и стремлением приблизить экспериментальные условия к естественным причинам происхождения АГ.

В каждой группе ср. АД и ЧСС регистрировались через 1 месяц, через 2 месяца, через 3 месяца и через 4 месяца после помещения крыс в условия перенаселения. Число животных в группах распределилось следующим образом: для животных, находящихся в условиях перенаселения - ($n=10$); контрольную группу ($n=10$) составляли здоровые животные, не подвергающиеся стрессу.

Изучены значения ср. АД, ЧСС и содержания витамина D в крови у крыс через 1, 2, 3 и 4 месяца эксперимента по моделированию стресс-индуцированной АГ.

Так, у экспериментальных крыс через 4 месяца хронического стресса отмечалось развитие АГ, что подтверждается достоверным увеличением ср. АД (149 ± 3 мм рт. ст. против 109 мм рт. ст. в контроле) и ЧСС (444 ± 14 уд/мин против 382 ± 14 уд/мин соответственно, $p < 0,05$).

У гипертензивных крыс произошло достоверное снижение - на 46% ($p < 0,05$) содержания витамина D. Аналогичные изменения наблюдались со стороны продукции NO, которая снизилась на 56% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Содержание NO в крови составило в среднем $0,17 \pm 0,01$ мкг/мл, что было ниже по сравнению с интактными животными, у которых содержание NO составило в среднем $0,38 \pm 0,02$ мкг/мл.

У нормотензивных крыс (НК) введение ацетилхолина привело к снижению ср. АД на $58 \pm 5\%$, что подтверждает сохранность эндотелийзависимой вазодилатации сосудов у интактных животных. В группе гипертензивных крыс (ГК), напротив, не наблюдалось статистически значимых изменений ср. АД в ответ на введение ацетилхолина – динамика составила $8 \pm 1\%$, что подтверждает развитие дисфункции эндотелия на фоне хронически высокого АД.

Результаты влияния фармакологического замещения содержания витамина D на исследуемые показатели в группах НК+D3 и ГК+D3 говорят о том, что длительное, т.е. на протяжении всего срока формирования, повышенного АД у крыс, ежедневное применение холекальциферола в дозе 2500 МЕ оказывало терапевтический эффект на ср. АД, содержание NO и витамина D в крови. Так, в группе ГК+D3 уровень ср. АД достоверно снизился на 15% ($p < 0,05$), содержание витамина D и NO увеличилось на 29% ($p < 0,05$) и 70% ($p < 0,05$) соответственно. Однако, несмотря на явные улучшения исследуемых показателей, тем не менее, они не достигли нормальных значений. Отметим, что у НК применение холекальциферола не оказывало влияния ни на уровень ср. АД, ни на содержание витамина D и NO в крови крыс.

Исследование эффектов длительного применения холекальциферола на эндотелийзависимую вазорелаксацию выявило аналогичные результаты, т.е. фармакологическое замещение содержания витамина D оказывало терапевтические воздействия у гипертензивных, но не у нормотензивных крыс. Сосудистая чувствительность к ацетилхолину не изменилась у НК, но

существенно улучшилась - на 34% ($p < 0,05$) у ГК, что по выраженности реакции было в 4,3 раза выше ($p < 0,05$) по сравнению с группой ГК не принимавших холекальциферол.

Выводы

1. Развитие артериальной гипертензии у крыс было обнаружено через 4 месяца хронического стресса, что подтверждалось достоверным увеличением среднего артериального давления и частоты сердечных сокращений.
2. На фоне развития артериальной гипертензии произошло достоверное снижение содержания витамина D на 46% по сравнению с контролем.
3. Обнаружено, что на фоне хронически высокого АД в группе гипертензивных крыс развивается дисфункция эндотелия и снижается продукция NO у гипертензивных крыс.
4. Выявлен терапевтический эффект фармакологического замещения витамина D на развитие артериальной гипертензии, что проявилось в снижении ср. АД, а также увеличении содержания NO и витамина D в крови и улучшении сосудистой чувствительности к ацетилхолину.

Заключение. Результаты исследования показали, что развитие стресс-индуцированной АГ сопровождается подавлением эндотелиальной функции сосудов, что выражалось в снижении как содержания NO в крови, так и эндотелийзависимой вазорелаксации при введении ацетилхолина. Полученные научные данные согласуются с сформировавшейся концепцией о нарушении эндотелиального механизма расслабления сосудов при формировании гипертензивного статуса.

Для исследования роли витамина D в развитии АГ, нами были проделаны эксперименты, разделенные на две стадии. На первом этапе выполнения экспериментальных исследований была произведена оценка содержания и изменения уровня витамина D в крови половозрелых крыс на фоне формирования гипертензивного статуса. Результаты наглядно показали, что высокие значения АД, соответствующие АГ, сопровождаются развитием дефицита витамина D. Эти результаты органично согласуются с

литературными данными ряда авторов, в которых показано снижение витамина D у гипертензивных объектов. На других моделях АГ, в частности, на спонтанно гипертензивных крысах, показано, что на фоне развития АГ у животных формируется дефицит продукции основного активного метаболита витамина D, что сопровождается подавлением эндотелийзависимого сокращения аорты за счет снижения концентрации свободного кальция в цитозоле эндотелиальных клеток.

Второй этап экспериментов был направлен на поиск ответа на вопрос: Возможно, ли фармакологическим замещением витамина D проводить коррекцию его дефицита и ассоциированных с этим сосудистых нарушений? Решение второй задачи реализовывалось за счет определения таких показателей, как ср. АД, содержание 25 (ОН) D и NO в крови крыс на фоне ежедневного длительного применения холекальциферола в дозе 2500 МЕ, что, по данным ряда исследований, является наиболее эффективной дозой для вспомогательной терапии АГ. Дополнительный прием холекальциферола осуществляли в течении 4 месяцев, т.е. на протяжении всего срока формирования гипертензивного статуса у крыс. Было показано, что в условиях нормы холекальциферол не оказывал каких-либо эффектов на указанные показатели. Напротив, у гипертензивных крыс данная терапия приводила к снижению ср. АД, улучшению эндотелийзависимой вазорелаксации и повышению продукции NO. Это согласуется с существующими экспериментальными данными, свидетельствующими о том, что антигипертензивные эффекты витамина D проявляются за счет улучшения функции эндотелия (путем повышения активности эндотелиальной NO-синтазы, снижения эндотелиальных молекул адгезии, через противовоспалительные свойства), подавления активности ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, оксидативного стресса и ряда геномных механизмов его влияния.

Фармакологическое замещение дефицита витамина D у гипертензивных крыс, несмотря на значительные терапевтические эффекты в отношении ср.

АД и показателей эндотелиальной функции сосудов, не достаточно для эффективного лечения АГ.

Применение холекальциферола у ГК в дозе 2500 МЕ/сутки приводит к снижению среднего АД, улучшению показателей эндотелиальной функции сосудов и можем быть важным вспомогательным инструментом в антигипертензивной терапии, что требует дальнейших, более детальных исследований.

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized loop followed by a few smaller strokes.