

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 D ДЛЯ ПОДДЕРЖАНИЯ
ГУМОРАЛЬНОГО ГОМЕОСТАЗА В УСЛОВИЯХ
АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ**

АВТОРЕФЕРАТ
БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

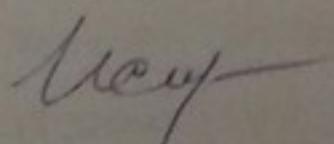
Студентки 4 курса 421 группы

Направления 06.03.01 Биология

Биологического факультета

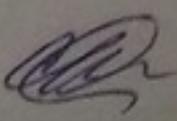
Рябовой Марины Кареновны

Научный руководитель
Доцент кафедры физиологии
человека и животных, к. б. н.

4 0 6 . 1 8 

Т.Д. Искра

Зав. кафедрой физиологии
человека и животных
д.б.н., доцент

4 0 6 . 1 8 

О.В. Семячкина-Глушковская

Саратов 2018

Введение. Как известно, одной из главнейших причин нарушения гуморального гомеостаза организма является длительное психоэмоциональное напряжение, которое возникает в условиях стрессовой ситуации. При сильном, а также продолжительном стрессе возникает множество психосоматических заболеваний: психические, сердечно-сосудистые, заболевания системы органов пищеварения, или повышается риск в их появлении.

Свободнорадикальные реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ) постоянно протекают во всех организмах. Такие реакции способствуют обновлению мембранных липидов и поддержанию гуморального гомеостаза. Чрезмерная активация ПОЛ, а также изменение антиоксидантных систем является не специфической реакцией организма на стрессовое воздействие, что является причиной развития многих патологических состояний, в частности артериальной гипертензии.

В этой связи становится важным исследование антиокислительных свойств различных веществ, одним из которых является витамин D. Он играет важную роль для поддержания гуморального гомеостаза, так как его недостаток ведет к нарушению минерального обмена, иммунной системы, возникновению воспалительных заболеваний, а так же ряда сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе артериальной гипертензии (АГ). Однако в научной литературе, практически отсутствуют сведения о влиянии витамина на показатели перекисного окисления липидов (малоновый диальдегид, диеновые конъюгаты, каталаза, пероксидаза) у животных в норме и под воздействием различных стрессорных факторов, в частности социальных.

Данная проблема является достаточно актуальной на сегодняшний день, поэтому очень важно изучить механизмы влияния различных веществ, в частности витамина D, на общий гомеостаз организма. Новые данные позволят разработать новые терапевтические методы и позволят дать новый толчок в развитии современной медицины.

В связи с этим была поставлена следующая цель – изучить действие витамина D на оксидантные свойства и антиоксидантную активность крови самцов крыс в норме и в модели стресс – индуцированной артериальной гипертензии.

Для достижения данной цели были сформулированы следующие задачи :

1. Изучить изменение гемодинамических показателей (среднего артериального давления и частоты сердечных сокращений) при формировании стресс-индуцированной артериальной гипертензии у крыс в условиях высокой популяционной плотности.

2. Исследовать влияние ежедневного приема холекальциферола на развитие стресс-индуцированной артериальной гипертензии.

3. Исследовать оксидантный статус крови крыс в условиях формирования АГ при введения водного раствора холекальциферол.

4. Оценить эффективность длительного применения холекальциферола на показатели антиоксидантной защиты.

Структура и объем работы. Дипломная работа состоит из введения, 3 глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований и их обсуждение), заключения, выводов, списка цитированной литературы. Список литературы включает 48 источников на русском и английском языках. работа изложена на 42 страницах машинописного текста.

Основное содержание работы. В обзоре литературы дипломной работы описаны современные представления об участии перекисного окисления липидов в патогенезе АГ, описаны основные эффекты витамин D на организм, показаны влияния витамина D гуморальный гомеостаз. В разделе, посвященном материалам и методам исследования, представлена информация об объектах исследования и методах, использованных в ходе выполнения экспериментов.

2. Материал и методы

2.1 Объекты исследования

Исследования выполнены на 40 самцах, белых беспородных взрослых крыс на кафедре физиологии человека и животных СГУ. Все экспериментальные процедуры проводились в соответствии с принципами Хельсинской декларации о гуманном отношении к животным Национального института США и в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных [47]. Крыс содержали при температуре 25 ± 2 °С, влажности 56% и 12/12 часовом цикле свет/темнота. В эксперименте использовали 40 самцов белых беспородных крыс средней массой тела (220-230) г. Животных разделили на четыре группы: три экспериментальных и одна контрольная (n=10)

Схема эксперимента:

1. Контрольные животные, содержащиеся в нормальных условиях и получавшие полноценное питание (К);
2. Крысы, содержащиеся в нормальных условиях и получавшие водный раствор (Colecalciferol) per os в дозе 2500 ЕД (+D);
3. Крысы, находившиеся в условиях стресс – индуцированной артериальной гипертензии, модель перенаселение (СИАГ);
4. Крысы, проживанию в условиях модели стресс – индуцированной артериальной гипертензии и получавшие водный раствор (Colecalciferol) per os в дозе 2500 ЕД (СИАГ+D);

Модель стресс-индуцированной гипертензии при перенаселении.

Стресс-индуцированную АГ у экспериментальных крыс моделировали методом длительного пребывания (4 месяца) в условиях высокой популяционной плотности («перенаселения»).

Для соблюдения правил содержания животных небольшими группами крысы должны проживать в клетке в следующем соотношении площади и массы тела: $\text{см}^2 / \text{г массы тела} = 1$. В данной модели использовали проживание животных в условиях высокой популяционной плотности, когда указанное

соотношение было ($\text{см}^2 / \text{г}$ массы тела = 0,3), то есть в три раза превышающее нормативы.

Измерение уровня АД и ЧСС проводили в соответствии со стандартной операционной процедурой прямой регистрации сигналов кровяного давления.

Методы исследования

Метод определения АД и ЧСС

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, оснащенный датчиками кровяного давления (MLT0699, PowerLab, ID Instruments).

С этой целью за сутки до экспериментов животным вживлялся полиэтиленовый катетер в аорту через левую ветвь сонной артерии под общей анестезией.

Перед началом каждого опыта крысы адаптировались к экспериментальной обстановке в течение 30 мин.

С целью проведения фармакологических тестов животным под общей анестезией имплантировали полиэтиленовый катетер в верхнюю полую вену через наружную яремную вену. Крыс брали в эксперимент через сутки после операции.

Для оценки эффективности применения витамина D при формировании стресс-индуцированной АГ мы определяли показатели перекисного окисления липидов (малоновый диальдегид, диеновые конъюгаты, каталаза, пероксидаза), как показатели гуморального гомеостаза.

Полученные результаты обработаны методами статистики с применением t-критерия Стьюдента. Для установления достоверности различий вариационных рядов определяли показатель достоверности различий и по

таблице Стьюдента находили величину отклонения. Различия считали достоверными при вероятности различий, превышающей 95 %.

С целью изучения эффектов витамина D на поддержание гуморального гомеостаза в условиях АГ была создана модель стресс индуцированной артериальной гипертензии. В ходе создания модели нами были сформирована 4 группы из взрослых самцов беспородных крыс: контрольная (n=10), группа крыс, содержащихся в условиях перенаселения (n=10); группа крыс, которые находились в стандартных условиях и им ежедневно вводили водный раствор холикальциферол в дозе 2500 ЕД, (n=10); крысы, получающие ежедневно водный раствор холикальциферол в дозе 2500 ЕД и находящиеся в условиях повышенной популяционной плотности (n=10). Длительность эксперимента составила 4 месяца. Контрольные группы составляли здоровые животные, не подвергающиеся стрессу.

Перед экспериментом все группы крыс были прооперированы. Животным вживлялся полиэтиленовый катетер в аорту через левую ветвь сонной артерии под общей анестезией. На протяжении всего эксперимента животным ежемесячно проводились контрольные измерения уровня АД и ЧСС в соответствии со стандартной операционной процедурой прямой регистрации сигналов кровяного давления.

Высокий показатель ср. АД отмечен на 4-м месяце эксперимента, в группе стресс – индуцированной артериальной гипертензии (СИАГ), который составил 149 мм рт. ст., тогда как аналогичный показатель в контроле составил 109 мм рт. ст. ($P < 0,05$). Уровень ЧСС повысился до 444 ± 14 уд/мин против 382 ± 14 уд/мин в контроле, $p < 0,05$, что свидетельствует о формировании устойчивой АГ.

Введение водного раствора (Colecalciferol) здоровым крысам не оказывает особого влияния на уровень ср. АД и ЧСС, о чем свидетельствуют полученные нами данные, так уровень ср. АД в группе +D составил 111 мм рт. ст. против

109 мм рт. ст. в контроле и ЧСС - 392 уд/мин против 382 уд/мин соответственно ($p < 0,05$).

Таким образом, достоверного отличия исследуемых гемодинамических показателей в контрольной группе и группе, которой вводили водный раствор холикальциферол не установлено.

Введение крысам водного раствора (Colecalciferol), сглаживает симптоматику стресс-индуцированной АГ и у крыс, находящихся в условиях высокой популяционной плотности, что подтверждается достоверно меньшими гемодинамическими показателями по сравнению с группой СИАГ, так ср. АД составило 127 мм рт. ст. против 149 мм рт. ст. и ЧСС - 414 уд/мин против 444 уд/мин соответственно ($p < 0,05$).

С целью выявления механизмов воздействия витамина D на развитие АГ мы изучали основные показатели перекисного окисления липидов.

Процессы перекисного окисления липидов играют важную роль в нормальном функционировании клетки и выступают как клеточные звенья ответной реакции организма на стрессорные состояния. Стресс приводит к усиленной активации процессов перекисного окисления липидов. Соответственно, повышается уровень свободнорадикальных продуктов таких как малоновый диальдегид и диеновый конъюгат, что свидетельствует о снижении активности антиоксидантной системы. Все это оказывает токсическое действие на организм, ведет к повреждению тканей и органов организма, в том числе и развитию артериальной гипертензии.

Пероксидазы, группа ферментов класса оксидоредуктаз; катализируют окисление различных полифенолов, алифатических и ароматических аминов, а также жирных кислот, цитохрома, глутатиона с помощью перекиси водорода (H_2O_2) или органических перекисей.

По результатам проведенного эксперимента видно, что в группе СИАГ содержание пероксидазы значительно меньше (на 39%) по сравнению с контрольной группой, ($0,18 \pm 0,017$ ммоль/л*с. против $0,11 \pm 0,008$ ммоль/л*с).

Активность пероксидазы в группе СИАГ+D оказалась выше, чем в группе СИАГ и составила $0,15 \pm 0,008$ ммоль/л*с против $0,11 \pm 0,008$ ммоль/л*с, что свидетельствует о положительном эффекте витамина D.

Введение водного раствора (Colecalciferol) здоровой группе крыс никакого заметного эффекта не наблюдается, вероятнее всего он просто включается в общие процессы метаболизма.

Таким образом, витамин D оказал положительное воздействие на активность ферментов-антиоксидантов, что способствует устойчивости и выносливости самцов крыс к стрессу.

Каталаза - фермент, который разлагает образующуюся в процессе биологического окисления перекись водорода на воду и молекулярный кислород ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$), а также окисляет в присутствии перекиси водорода низкомолекулярные спирты и нитриты, участвует в тканевом дыхании и изменение ее активности является сигналом наличия стресс-реакций в организме.

По результатам проведенного эксперимента видно, что в группе СИАГ содержание каталазы значительно меньше (на 61%) по сравнению с контрольной группой ($2,41 \pm 0,128$ мкат/л против $6,18 \pm 0,102$ мкат/л) $p < 0,05$.

Активность каталазы в группе СИАГ+ D оказалась выше, чем в группе СИАГ, (составило $5,17 \pm 0,240$ мкат/л против $2,41 \pm 0,128$ мкат/л), из чего следует, что витамина D оказывает положительный эффект. В группе +D показатель активности каталазы оказался несколько выше, чем аналогичный показатель в контрольной группе - $7,19 \pm 0,750$ мкат/л против $6,18 \pm 0,102$ мкат/л.

Анализируя полученные данные видно, что витамин D повышает активность ферментов-антиоксидантов, то есть участвует в механизмах защиты организма в процессе формирования стресс-индуцированной АГ.

Диеновые конъюгаты, являются первичными продуктами ПОЛ и относятся к токсическим метаболитам, которые оказывают повреждающее действие на липопротеиды, белки, ферменты и нуклеиновые кислоты, и их уровень в крови повышается при длительном действии стрессорных факторов.

С этой целью после завершения эксперимента, мы определили уровень диеновых конъюгатов в эритроцитах крови крыс. Так, в группе СИАГ установлено, что содержание диеновых конъюгатов было выше, чем в контрольной группе: против $7,09 \pm 0,210$ мкмоль/л против $12,45 \pm 0,530$ мкмоль/л, что объясняется нарушением липидного обмена под действием стрессорных факторов.

При введении водного раствора (Colecalciferol) группе крыс СИАГ+D содержание диеновых конъюгатов оказалось ниже по сравнению с группой СИАГ - $12,45 \pm 0,53$ мкмоль/л против $10,14 \pm 0,210$ мкмоль/л, что так же указывает на положительный эффект витамина D.

Введение водного раствора (Colecalciferol) здоровой группе крыс содержание диеновых конъюгатов отличалось от контрольной группы не значительно ($7,09 \pm 0,210$ мкмоль/л до $8,12 \pm 0,500$ мкмоль/л).

Таким образом, витамин D практически не оказывает никакого влияния на синтез первичных продуктов перекисного окисления в крови здоровых животных, при этом оказывает значительный положительный эффект на липидный обмен крыс, подвергавшихся стрессу.

Малоновый диальдегид один из конечных продуктов перекисного окисления липидов. Возникает в организме при деградации полиненасыщенных жиров активными формами кислорода и служит показателем наличия оксидантного стресса в клетке.

Согласно полученным нами данным, в группе СИАГ содержание МДА оказалось достоверно выше относительно показателей контрольной группы - $7,22 \pm 0,320$ мкмоль/л против $22,14 \pm 1,360$ мкмоль/л, что свидетельствует о наличии стрессорных реакций в организме крыс.

В группе СИАГ+D было установлено, что содержание МДА в крови крыс было ниже чем в группе СИАГ, то есть $22,14 \pm 1,360$ мкмоль/л против $9,15 \pm 0,530$ мкмоль/л, что свидетельствует о положительном влиянии витамина D на антиоксидантную защиту клетки.

При введении водного раствора (Colecalciferol) здоровым крысам содержание МДА в крови оказалось выше по сравнению с контрольной группой ($8,57 \pm 0,840$ мкмоль/л против $7,22 \pm 0,320$ мкмоль/л, ($p < 0,05$). Скорее всего, это было вызвано тем, что витамин D включился в метаболические процессы организма и не оказал заметного эффекта.

Таким образом, витамин D при стрессе поддерживает липидный обмен в организме самцов крыс, понижает содержание радикальных продуктов ПОЛ и повышает активность антиоксидантной системы.

Выводы:

1. При формировании стресс-индуцированной артериальной гипертензии в условиях высокой популяционной плотности отмечался устойчивый повышенный базальный уровень гемодинамических показателей, который соответствует гипертензивному уровню, так уровень ср. АД составил 149 мм рт ст, а ЧСС 444 уд/мин.

2. Введение крысам *per os* водного раствора холекальциферола, сглаживает симптоматику стресс-индуцированной АГ у крыс, находящихся в условиях высокой популяционной плотности, так уровень ср. АД равен 127 мм рт. ст, а ЧСС 414 уд/мин.

3. Введение водного раствора холекальциферола крысам, находящимся в условиях социального стресса снижает уровень продуктов ПОЛ в крови (МДА, ДК) по сравнению с крысами, не получающими витамин D.

4. Длительное применение водного раствора Colecalciferol повышает активность антиоксидантной системы, что способствует устойчивости и выносливости самцов крыс к стрессу.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Dyadyk, A. I. Arterial Arterial hypertension in modern clinical practice / A.I. Dyadyk, A.E. Bagriy // К: 000 «People in white». 2014. С. 206.
2. Манахова Р.С. К вопросу изучения перекисного окисления липидов / «Известия Оренбургского государственного аграрного университета». Оренбург, 2011. С. 231-234.
3. Мальцев С.В. Метаболизм витамина D и пути реализации его основных функций / С.В. Мальцев, Г.Ш. Мансурова // «Практическая медицина». Казань, 2014. № 9. С. 12-18.
4. Denollet J. I. Causes the disc to distract from Europe a large sample / J.I. Denollet, C.C. Pedersen, M. Maine // Department of cardiology, University of Utrecht medical center, the Netherlands. Utrecht, 2017. С. 179-184.
5. Черкасов А.Д. Физиологические причины развития сердечно-сосудистых заболеваний. Артериальная гипертензия и методы ее предотвращения / А.Д. Черкасов, В.Б. Петухов, Е.Н. Петрова // НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина. Москва, 2017. С. 18-26.

Редкоф