

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

Гарбузова Вікторія Юріївна

УДК 616.391:577.162.2:612.015.3

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДАНІ ПРО РОЛЬ ПЕРОКСИДНОГО
ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ У РОЗВИТКУ КАЛЬЦИНОЗУ КРОВОНОСНИХ
СУДИН, ЗУМОВЛЕНОГО ГІПЕРВІТАМІНОЗОМ D**

03.00.13 – фізіологія людини і тварин

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2004 р.

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано на кафедрі нормальної і патологічної фізіології
Сумського державного університету.

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор

Атаман Олександр Васильович,

завідувач кафедри нормальної і патологічної фізіології
Сумського державного університету

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор,

член-кореспондент АПН України

Шевчук Віктор Григорович,

завідувач кафедри нормальної фізіології Національного медичного
університету ім. О.О.Богомольця;

доктор біологічних наук

Янчук Петро Іванович,

старший науковий співробітник відділу фармако-
фізіології НДІ фізіології ім. академіка Петра Богача

біологічного факультету Національного університету
ім. Тараса Шевченка

Провідна установа – Інститут геронтології АМН України, м.Київ.

Захист відбудеться “ 5 ” травня 2004 року о “ 14 ” годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024 Київ, вул. Богомольця 4.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

Автореферат розіслано “ 24 ” березня 2004 року.

Вчений секретар спеціалізованої вченої
ради, доктор біологічних наук

Сорокіна-Маріна З.О.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Однією з найактуальніших проблем сучасної медицини було і залишається з'ясування механізмів розвитку дистрофічних і склеротичних уражень кровоносних судин та пошук ефективних засобів їх запобігання та корекції. Сумна статистика свідчить, що тільки в Україні 60% від загального показника смертності припадає на хвороби, пов'язані з первинним ураженням кровоносних судин (інфаркт міокарда, гострі порушення мозкового кровообігу, тромбоемболічні ускладнення тощо) (Медико-демографічний атлас України, 2001). За прогнозами, переважання серцево-судинної патології в структурі захворюваності та смертності населення збережеться і в XXI столітті (Lee R.T., Libby P., 1998).

Звісна річ, однією з необхідних передумов розв'язання зазначених проблем є розширення наших уявлень про суть, характер і механізми патологічних змін, що відбуваються у стінках кровоносних судин за умов дії різних чинників, здатних ініціювати ангіосклеротичні ураження.

До таких, зокрема, належить вітамін D, високі токсичні дози якого спричинюються до розвитку кальцинозу судинної стінки – одного з типових проявів її дистрофічно-склеротичних змін (Бауман В.К., 1989; Гапон Л.П., 1992).

Існує дві основні концепції, автори яких намагаються пояснити механізми відкладання солей кальцію у тканинах стінок кровоносних судин. Прихильники першої вважають, що головною передумовою кальцифікації є ушкодження і загибель гладеньких м'язових клітин судинної стінки. Механізмами розвитку їх ушкодження за умов гіпервітамінозу D є активація пероксидного окиснення ліпідів, яка пов'язана з утворенням продуктів окиснення ерго- та холекальциферолу, та активація кальцієвих механізмів ушкодження, що також виникає за цих умов (Биць Ю.В., Пишак В.А., Атаман О.В., 1999). Прибічники другого погляду переконані в тому, що відкладанню солей кальцію передують фізично-хімічні зміни позаклітинних компонентів тканини, зумовлені головним чином загальними порушеннями гомеостазу в організмі (гіперкальціємія, гіперфосфатемія, ацидоз тощо) (Вихерт А.М., Седов К.Р., Соколова Р.И., 1970).

Мабуть, можна стверджувати, що в розвитку D-гіпервітамінозних уражень кровоносних судин велику роль відіграють обидві групи зазначених чинників. Проте, це зовсім не знімає з порядку денного питання про центральну ланку патогенезу ангіокальцинозу – яка з подій є провідною: ПОЛ чи перевантаження тканинних і клітинних структур кальцієм?

Саме з'ясуванню цієї обставини і присвячена наша робота.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконана відповідно до плану наукових досліджень Сумського державного університету і є складовою частиною науково-дослідної теми медичного факультету: "Вивчення стану здоров'я дитячого та

дорослого населення Сумської області в умовах впливу несприятливих соціальних, економічних та екологічних чинників” (р/№0101U002098).

Мета дослідження: з’ясування зв’язку між інтенсивністю процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) та кальцифікацією артеріальної і венозної стінки за умов гіпервітамінозу D.

Задачі: 1) визначити інтенсивність ПОЛ та антиоксидантну активність артеріальної і венозної стінки в динаміці розвитку гіпертавітамінозу D;

2) з’ясувати вплив агентів з різними механізмами дії (антиоксиданти, блокатори кальцієвих каналів, комплексоутворювачі) на інтенсивність ПОЛ у судинній стінці тварин з гіпервітамінозом D;

3) дослідити дію антиоксидантів, блокаторів кальцієвих каналів і комплексоутворювачів на ступінь ушкодження та кальцифікації артеріальної і венозної стінки за умов надходження в організм високих доз вітаміну D.

Об’єкт дослідження – механізми кальцифікації судинної стінки.

Предмет дослідження – участь процесів ПОЛ у механізмах кальцифікації артерій і вен за умов гіпервітамінозу D.

Методи дослідження: біохімічні методи визначення кількості проміжних (гідропероксиди ліпідів) та кінцевих (основи Шиффа) продуктів ПОЛ у тканинах кровоносних судин та плазмі крові експериментальних тварин з метою оцінки активності вільнорадикальних процесів як чинників ушкодження судинної стінки; оцінка активності антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази) – чинників, що запобігають розвиткові ліпідних механізмів ушкодження тканин кровоносних судин; визначення вмісту кальцію в структурах судинної стінки та сироватці крові з метою кількісної характеристики процесу кальцифікації; дослідження вмісту води та об’єму інулінового простору як показників ушкодження тканин кровоносних судин; статистичні методи для обробки цифрових даних.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше як інструмент аналізу механізмів розвитку кальцинозу кровоносних судин використано агенти з різними механізмами ангіопротекторної дії (антиоксиданти, блокатори кальцієвих каналів, комплексоутворювачі). Уперше показано, що чинники, які ефективно пригнічують процеси ПОЛ (антиоксиданти) за умов D-вітамінної інтоксикації у значно меншій мірі впливають на кальцифікацію кровоносних судин і, навпаки, ангіопротектори, що не впливають на інтенсивність ПОЛ у судинній стінці (комплексоутворювачі), істотно зменшують прояви кальцинозу кровоносних судин. Це дало підстави для висновку про те, що немає прямого патогенетичного зв’язку між інтенсивністю процесів ПОЛ у судинній стінці та ступенем кальцифікації її структур.

У роботі дістала подальший розвиток концепція про механізми високої резистентності вен до розвитку дистрофічних уражень. Зокрема, показано, що венозні судини, на відміну від

артеріальних, мають значно вищу активність антиоксидантних ферментів, що, можливо, й зумовлює високу стійкість вен до ушкодження.

Практичне значення одержаних результатів. Здобуті результати дають підстави стверджувати, що процеси ушкодження судинної стінки та її кальцифікації не є процесами строго взаємозумовленими. Це розширює наукові уявлення про те, що в основі патогенезу дистрофічно-склеротичних уражень кровоносних судин можуть лежати різні механізми.

Одержані в роботі дані свідчать про те, що ангіопротектори з різними точками докладання своєї дії по-різному впливають на різні прояви уражень судинної стінки. Цю обставину слід мати на увазі, коли йдеться про вибір ефективних фармакологічних засобів захисту судинної стінки від кожного конкретного типу її ушкодження.

Теоретичні положення дисертації впроваджено в навчальний процес на кафедрі нормальної і патологічної фізіології Сумського державного університету, кафедрах нормальної фізіології Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова і Тернопільської державної медичної академії ім. І.Я. Горбачевського, кафедрах патологічної фізіології Одеського державного медичного університету, Львівського державного медичного університету ім. Данила Галицького, Харківського державного медичного університету, Української медичної стоматологічної академії.

Особистий внесок здобувача. Автором проведено патентний та інформаційний пошук, визначено мету і завдання дослідження, методичні підходи. Здобувач самостійно виконав експериментальні дослідження, провів статистичну обробку, науковий аналіз та узагальнення одержаних результатів, оформлення останніх у вигляді таблиць, діаграм та графіків, сформулював та опублікував основні положення дисертації та висновки.

Апробація результатів дисертації. Основні матеріали дисертації обговорено на III Національному Конгресі патофізіологів України, (Одеса, 2000), Пленумі товариства патофізіологів України (Одеса, 2002), Міжнародній науково-практичній конференції “Сучасні методи наукових досліджень в морфології та патології ” (Полтава, 2003), V, VI та VII Міжнародних Конгресах студентів та молодих учених (Тернопіль, 2001, 2002, 2003), Міжнародній медичній конференції студентів і молодих учених (Дніпропетровськ, 2001), підсумкових наукових конференціях Сумського державного університету (Суми, 2001, 2003).

Публікації. Основний зміст дисертаційної роботи відображено у 12 наукових роботах, з них 4 – у фахових наукових журналах, решта – у матеріалах конференцій та конгресів. 10 наукових робіт опубліковано за одноособовою участю автора.

Структура і обсяг дисертації. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, викладення результатів та їх обговорення, підсумків, висновків, списку використаних літературних джерел, що налічує 259 джерел, з яких 157 вітчизняних та 102 іноземних. Робота викладена на 136 сторінках, містить 17 таблиць та 14 рисунків.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ

Матеріали та методи дослідження. Дослідження виконано на 75 кролях обох статей масою від 1800 до 2600 г, віком 6-8 місяців. Тварин утримували в стандартних умовах віварію. З метою моделювання ушкодження судинної стінки тваринам вводили високі дози вітаміну D у шлунок через зонд (0,125% олійний розчин з розрахунку 10000 МО/кг). Використана в роботі доза перевищувала добову потребу кролів у вітаміні D у 1000 разів і спричинювала розвиток підгострої інтоксикації.

Для з'ясування провідної ланки в механізмі ушкодження судинної стінки за умов D-вітамінної інтоксикації використовували поєднане введення препаратів:

- 1) вітаміну D₂ (0,125% олійний розчин ергокальциферолу з розрахунку 10000 МО/кг у шлунок через зонд) та вітаміну E (10% олійний розчин токоферолу ацетату з розрахунку 50мг/кг у шлунок через зонд);
- 2) вітаміну D₂ (0,125% олійний розчин ергокальциферолу з розрахунку 10000 МО/кг у шлунок через зонд) та ніфедипіну (з розрахунку 30мг/кг у шлунок через зонд);
- 3) вітаміну D₂ (0,125% олійний розчин ергокальциферолу з розрахунку 10000 МО/кг у шлунок через зонд) та натрієвої солі етан-1-гідрокси-1,1-дифосфонової кислоти (ЕГДК) (з розрахунку 130мг/кг у шлунок через зонд за 2 години до введення ергокальциферолу).

Через 24 години після останнього введення препаратів тварин забивали за допомогою повітряної емболії й одразу проводили забір матеріалу для досліджень. Об'єктами вивчення були: грудна аорта, черевна аорта, легенева артерія й задня порожниста вена.

Ліпіди з тканин кровоносних судин виділяли за Foch J. і співавт. (1957). *Накопичення гідропероксидів* (ГПЛ) у полієнових ліпідах оцінювали за характерними для дієнових кон'югатів УФ-спектром поглинання розчину ліпідів у метанол-гексані (5:1). Коефіцієнт молярної екстинції при максимальній довжині хвилі 232 нм приймався рівним $2,1 \cdot 10^4$ моль⁻¹ · см⁻¹ (Bolland J.L., Koch H.P., 1945). *Вміст Шиффових основ* (ШО) визначали спектрофотометрично (максимум збудження флюоресценції – 360 нм, максимум випромінювання – 420-440 нм) (Csallany A.S., Ayal K.L., 1976).

Активність глутатіонпероксидази (ГП) визначали за методом Pinto R.E. та Bartley W.(1969) в модифікації Кругликової Г.А. та Штутман Ц.М. (1976). Як окиснювальний субстрат використовували пероксид водню. Активність оцінювали за різницею між кількістю відновленого глутатіону в контрольній пробі (без H₂O₂) та дослідній (Sedlak J., Lindsey R.H., 1968). *Активність каталази* (КТ) визначали спектрофотометрично (Корольок М.А. та співавт, 1988) за її здатністю гальмувати утворення забарвленого комплексу з солями молібдену. *Активність супероксиддисмутази* (СОД) визначали за відсотком блокування відновлення нітросинього тетразолію (Fried R., 1975).

Об'єм інулінового простору оцінювали дифеніламіновим методом (Браун А.Д, 1937). Аналіз вмісту кальцію проводили спектрофотометрично в атомно-абсорбційному режимі.

Матеріал статистично опрацьовано з використанням параметричних (М – середня арифметична, m – помилка середньої арифметичної, Р – вірогідність розбіжностей середніх величин) і непараметричних (критерій U Вількінсона-Манна-Уїтні, ТМФ – точний метод Фішера для чотирьохпольної таблиці) критеріїв статистики. Використання непараметричних критеріїв статистики дозволило з'ясувати суттєві відмінності в тих випадках, коли параметричні критерії їх не виявляли.

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Інтенсивність ПОЛ та антиоксидантна активність стінок кровоносних судин у динаміці розвитку гіпервітамінозу D.

За умов гіпервітамінозу D активація процесів ПОЛ у судинній стінці пов'язана з утворенням продуктів аутоокиснення ерго- та холекальциферолу (Бауман В.К., 1989)

Проведене вивчення інтенсивності ПОЛ у стінках кровоносних судин виявило приблизно однаковий вміст ГПЛ та ШО в стінці артерій і вен інтактних тварин (табл. 1,2).

З'ясовано, що вже на 1-шу добу введення тваринам високих доз ергокальциферолу відбувається зростання кількості проміжних та кінцевих продуктів ПОЛ у стінці всіх вивчених судин. Це свідчить про здатність вітаміну D взаємодіяти як із структурами артерій, так і вен, ініціюючи при цьому процес їх ушкодження, а значить і артеріальна, і венозна стінка є чутливими до дії токсичних доз вітаміну D. Проведений аналіз змін вмісту ГПЛ та ШО в стінках кровоносних судин у динаміці розвитку гіпервітамінозу D демонструє залежність інтенсивності ПОЛ від типу судин. В артеріальних судинах вміст ГПЛ поступово збільшувався протягом всього експерименту (табл.1) і на 14-у добу D-вітамінної інтоксикації зростав у грудній аорті в 7,5 разів, у черевній - в 6,2, у легеневій артерії - в 5 разів проти контролю.

Вміст ШО починав зростати в грудній та черевній аорті на 3-ю добу експерименту, у легеневій артерії – на 7-му (табл.2) і був у грудній аорті – в 16,6, у черевній – в 13,6, у легеневій артерії - в 10,4 раза більшим, ніж у контролі.

У венозній тканині продукти ПОЛ накопичувались повільніше (табл. 1,2). Збільшившись на початку експерименту, кількість ГПЛ достовірно не змінювалася протягом першого тижня дослідів і лише на 7-му добу введення ергокальциферолу зафіксовано зростання цього показника на 72% проти 1-ї доби. Зростання вмісту ШО у венозній тканині відбулося лише на 14-у добу (у 8,2 раза проти контрольних значень).

Таблиця 1. Вміст ГПЛ в стінках кровоносних судин кролів у динаміці розвитку гіпервітамінозу D (нмоль/мг ліпідів; $M \pm m, n=6$)

Об'єкт дослідження	Кон-троль (I група)	Введення вітаміну D				P ₁	P ₂	P ₃
		1 доба (II група)	3 доби (III група)	7 діб (IV група)	14 діб (V група)			
Грудна аорта	23,20 ± 2,88	35,07 ± 4,20*	53,72 ± 7,00*	102,73 ± 8,50*	172,95 ± 11,30*	>0,05	<0,05	<0,05
Черевна аорта	23,90 ± 2,35	36,03 ± 3,38*	51,13 ± 8,00*	91,38 ± 7,42*	148,73 ± 12,04*	>0,05	<0,05	<0,05
Легенева артерія	22,05 ± 2,36	30,83 ± 2,68*	41,92 ± 6,43*	77,67 ± 7,42*	109,60 ± 7,02*	>0,05	<0,05	>0,05
Задня порожниста вена	20,06 ± 1,93	28,77 ± 3,00*	28,62 ± 4,26*	49,58 ± 7,40*	75,27 ± 12,85*	>0,05	<0,05	>0,05

Примітка: * - статистично достовірні розбіжності відносно контролю ($p < 0,05$);

P₁ - статистично достовірні розбіжності між II та III групами тварин;

P₂ - статистично достовірні розбіжності між III та IV групами тварин;

P₃ - статистично достовірні розбіжності між IV та V групами тварин.

Отже, вже з 3-ї доби і до кінця експерименту простежується різниця у вмісті продуктів ПОЛ не тільки між артеріями та венами, а й між окремими типами артеріальних судин.

Залежно від кількості ГПЛ та ШО досліджені судини було поділено на 3 групи: 1) грудна та черевна аорта (вміст найбільший), 2) легенева артерія (вміст середній), 3) задня порожниста вена (вміст найменший).

Отримані результати узгоджуються із даними О.В. Атамана (1990) та Ю.В. Биця (1973), які вивчали стійкість артеріальних і венозних судин до розвитку ушкоджень при дії різноманітних патогенних чинників і розмістили кровоносні судини за резистентністю до ураження в такій послідовності: порожниста вена > легенева артерія > черевна аорта > грудна аорта.

Резистентність тканин до розвитку пероксидних механізмів ураження визначається потужністю антиоксидантних систем. У зв'язку з чим було вивчено активність антиоксидантних ферментів судинної стінки: ГП, СОД, КТ.

Звертає на себе увагу той факт, що навіть у контрольній групі тварин тканина задньої порожнистої вени має більш високу, порівняно з артеріальною тканиною, глутатіонпероксидазну,

супероксиддисмутазу та каталазу активність. Крім того, активність вивчених ферментів на всіх етапах експерименту у венозних судинах була більшою, ніж в артеріальних.

Таблиця 2. Інтенсивність флюоресценції ШО в стінках кровоносних судин кролів у динаміці розвитку гіпервітамінозу D (відн.од./ мг ліпідів; $M \pm m$, n=6)

Об'єкт дослідження	Кон-троль (I група)	Введення вітаміну D				P ₁	P ₂	P ₃
		1 доба (II група)	3 доби (III група)	7 діб (IV група)	14 діб (V група)			
Грудна аорта	6,32 ± 0,84	7,18 ± 0,64	12,67 ± 1,92*	25,65 ± 4,07*	104,8 ± 31,04*	>0,05	<0,05	<0,05
Черевна аорта	6,40 ± 0,73	7,18 ± 0,86	12,65 ± 1,52*	24,60 ± 3,34*	86,83 ± 23,72*	>0,05	<0,05	<0,05
Легенева артерія	5,95 ± 0,60	5,37 ± 0,57	9,22 ± 2,10	17,38 ± 3,34*	62,03 ± 15,82*	>0,05	<0,05	<0,05
Задня порожниста вена	5,80 ± 0,69	5,87 ± 0,76	7,73 ± 1,34	10,68 ± 2,65	47,38 ± 18,07*	>0,05	>0,05	>0,05

Примітка: див табл. 1.

За нашими даними, у відповідь на дію високих доз вітаміну D у тканині артерій спостерігається зниження активності антиоксидантних ферментів, тоді як у венозній – зростання (рис. 1,2,3).

Вивчення антиоксидантної активності підтвердило неоднаковий характер змін у судинах різних типів. Так, у грудній та черевній аорті активність всіх вивчених ферментів починала знижуватись на 7-му добу дослідження, у легеневій артерії каталазна активність – на 7-му, а супероксиддисмутазна та глутатіонпероксидазна – на 14-ту добу. Виявлене зниження активності антиоксидантних ферментів вказує на зсув динамічної рівноваги між системами антиоксидантного захисту та ПОЛ у бік переваги останнього і демонструє важливу роль цього механізму в формуванні ушкодження артеріальної стінки за умов D-вітамінної інтоксикації.

Протилежна тенденція спостерігалася в тканині задньої порожнистої вени – активність всіх вивчених ферментів у ній зростала (КТ і ГП починаючи з 3-ї доби, СОД – з 14-ої доби), а кількість продуктів ПОЛ була найменшою (табл. 1,2).

Це дає підстави для висновку про те, що у венозних судинах негайно реалізуються механізми обмеження і ліквідації первинних проявів ушкодження і, ймовірно, більша потужність антиоксидантних систем поряд з іншими факторами (різні механізми трофіки, рівень енергетичного обміну) є однією з причин більшої резистентності вен до дії патогенних чинників.

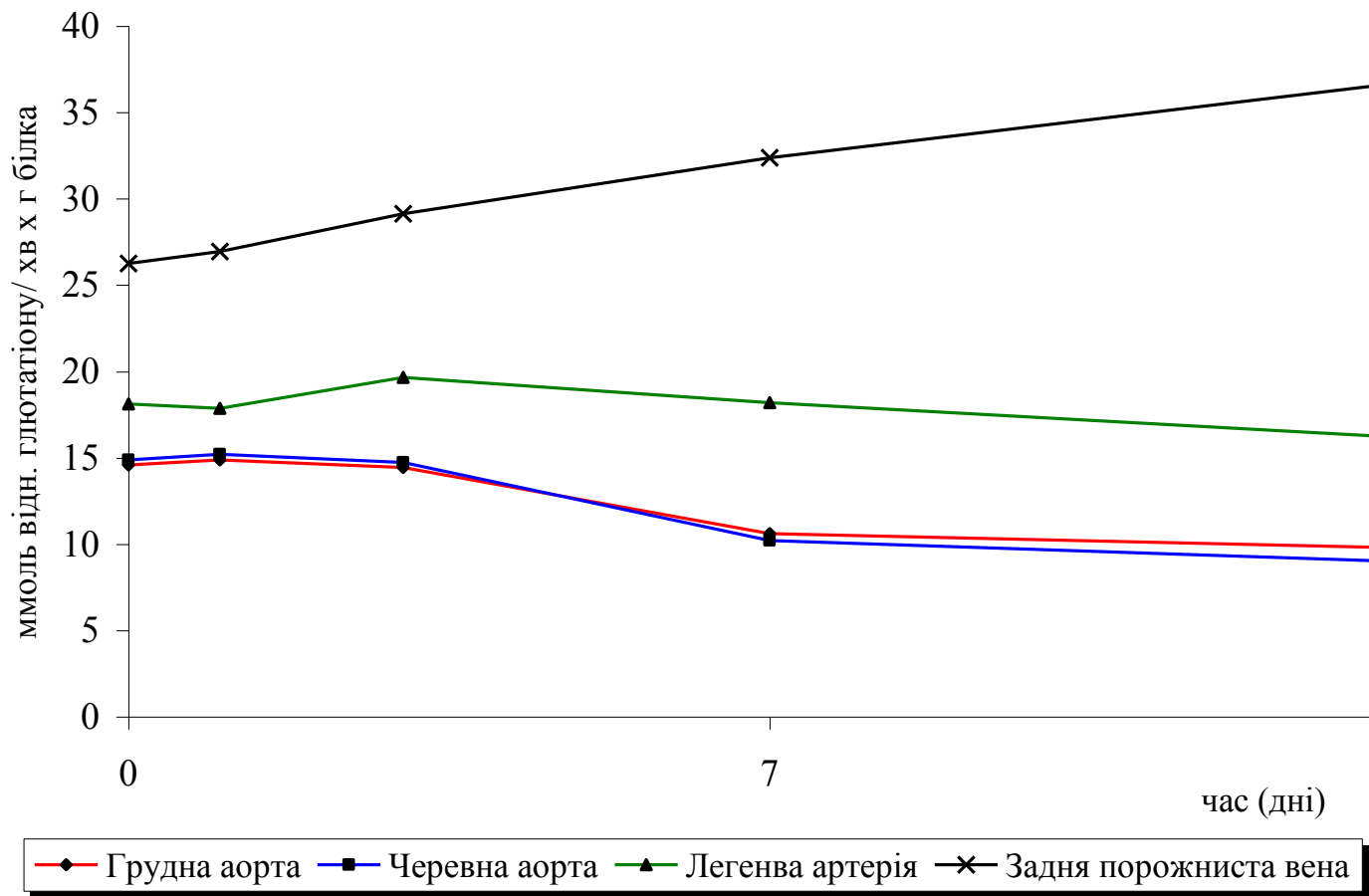


Рис. 1 Активність глутатіонпероксидази в судинній стінці кролів у динаміці розвитку гіпервітамінозу D

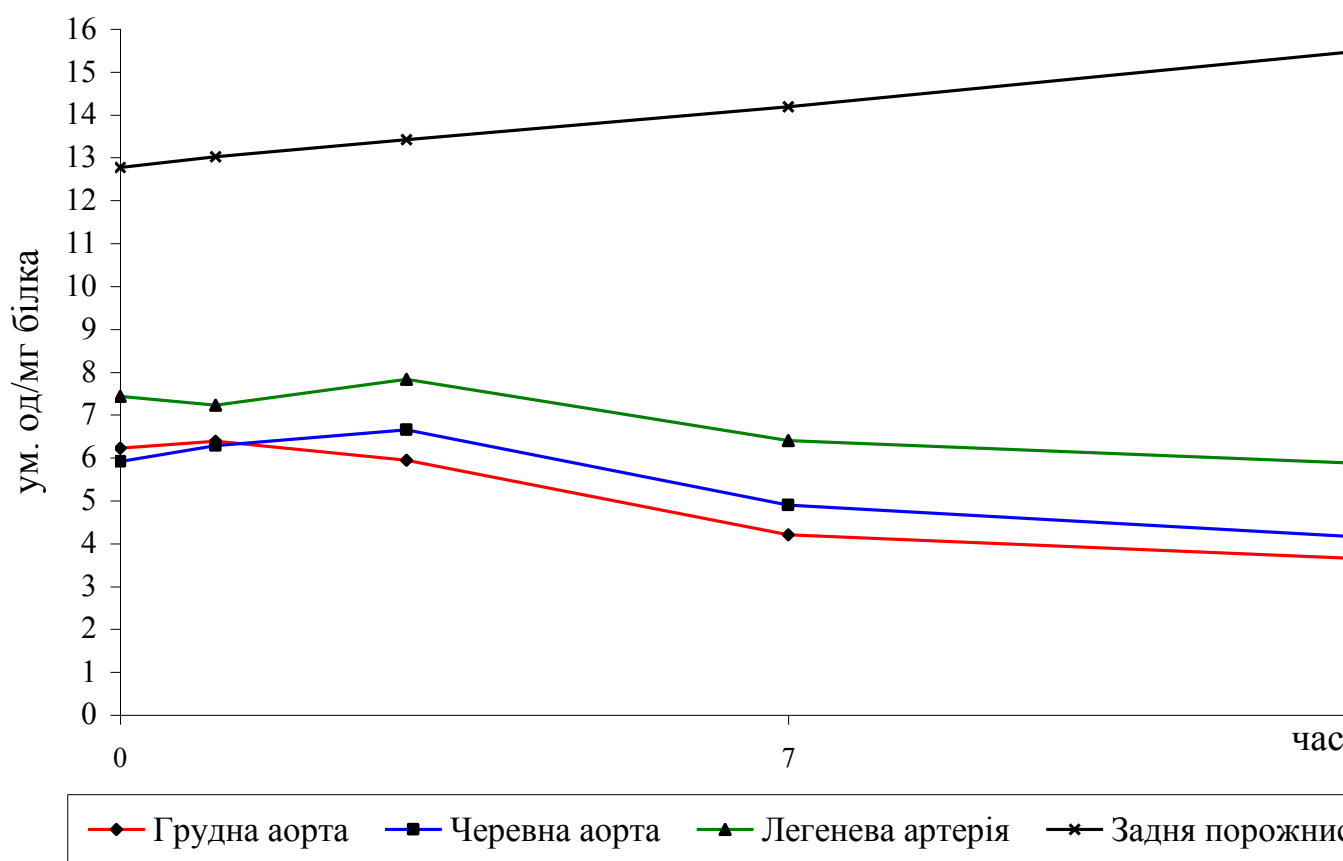


Рис. 2 Активність супероксиддисмутази в судинній стінці кролів у динаміці розвитку гіпервітамінозу D

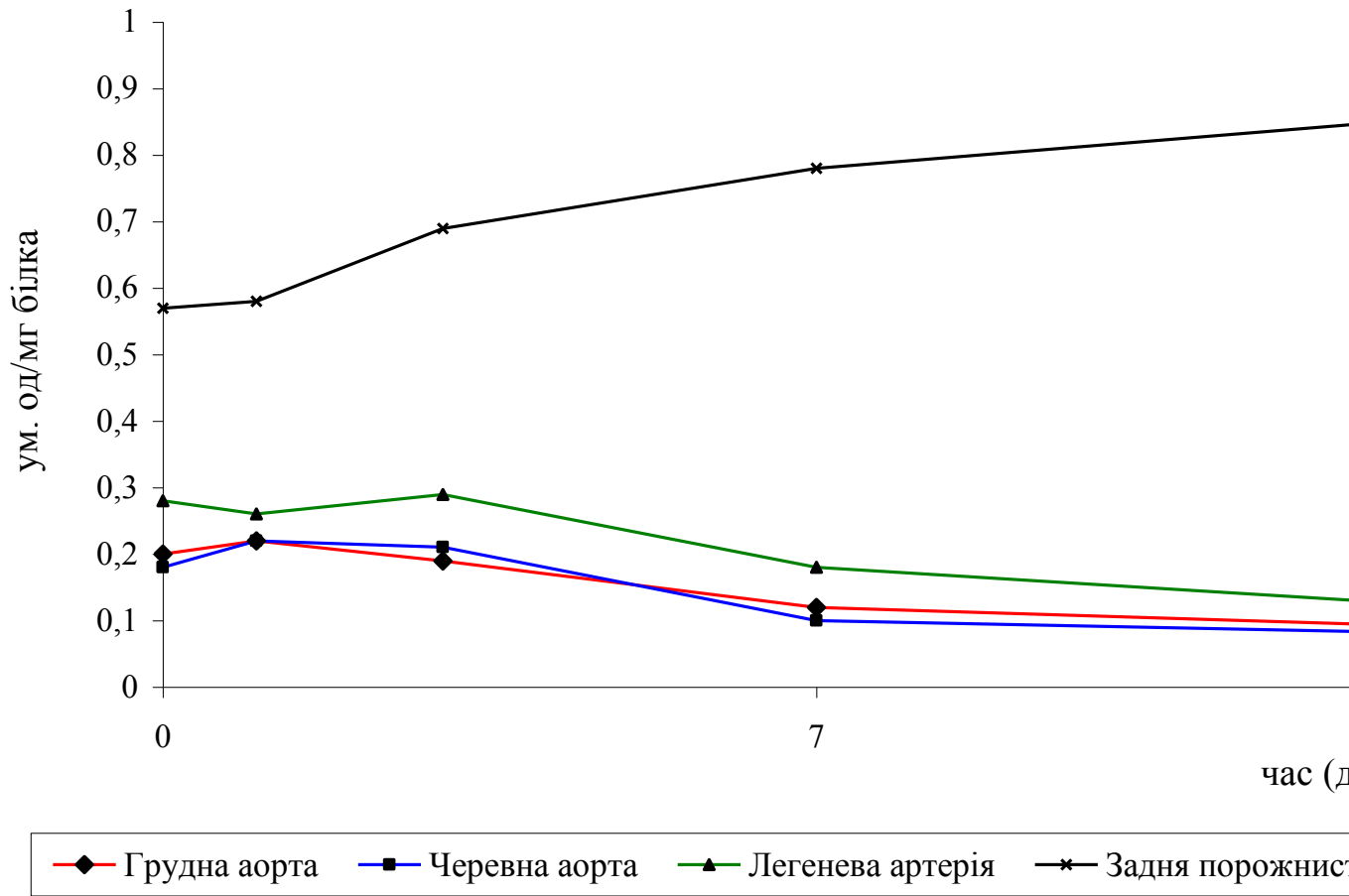


Рис. 3 Активність каталази в судинній стінці кролів у динаміці розвитку гіпервітамінозу D

Вплив ангіопротекторів з різними механізмами дії на інтенсивність ПОЛ у стінках кровоносних судин за умов D-вітамінної інтоксикації

Оскільки за умов гіпервітамінозу D провідними механізмами ушкодження судинної стінки є активація ПОЛ і перевантаження клітин кальцієм, то сприяти обмеженню ушкодження можуть антиоксиданти, БКК і комплексоутворювачі, з-поміж них для дослідження нами було обрано вітамін E, ніфедипін та ЕГДК.

Отримані нами дані свідчать, що під впливом токоферолу в усіх типах судин D-гіпервітамінозних тварин вміст ГПЛ знижувався: у грудній аорті в 2,25 раза, у черевній - в 2,79 раза, у легеневій артерії - в 2,5 раза і в порожнистій вені - в 2,57 раза, як порівняти з групою D-гіпервітамінозних тварин (рис. 4).

Під впливом токоферолу в судинній стінці знижувався і вміст кінцевих продуктів ПОЛ. У грудній аорті цей показник зменшувався в 3,53 раза, в черевній – в 3,88 раза, у легеневій артерії – у 5,16 раза, у задній порожнистій вені – у 5,73 раза проти групи D-гіпервітамінозних тварин, які не отримували вітаміну E (рис. 5). Подібні зміни спостерігали й інші автори при вивченні

пероксидного атероартеріосклерозу (Воскресенський О.Н., Девяткина Т.А., 1978; Воскресенський О.Н., Бобирев В.Н., 1981).

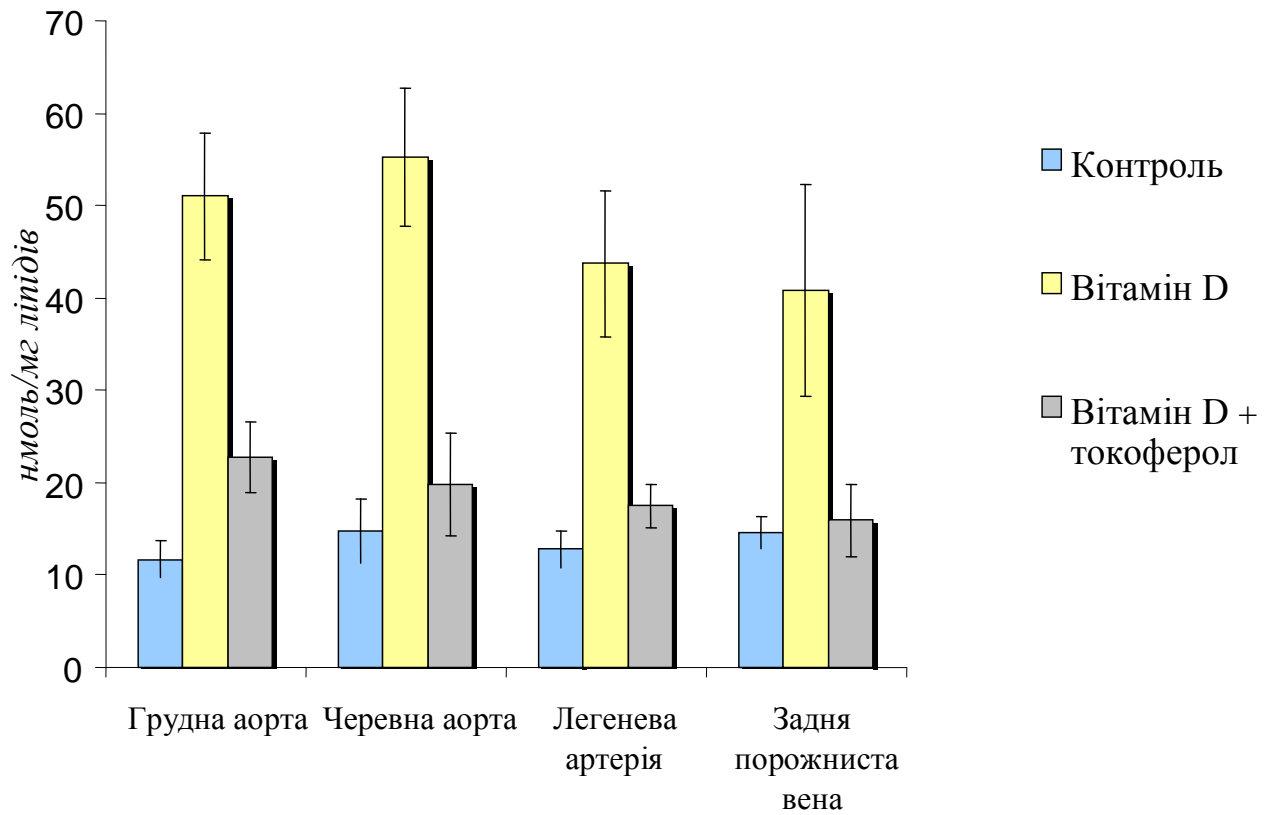


Рис. 4 Вплив токоферолу на вміст ГЛЛ у стінці кровоносних судин за умов гіпервітамінозу D

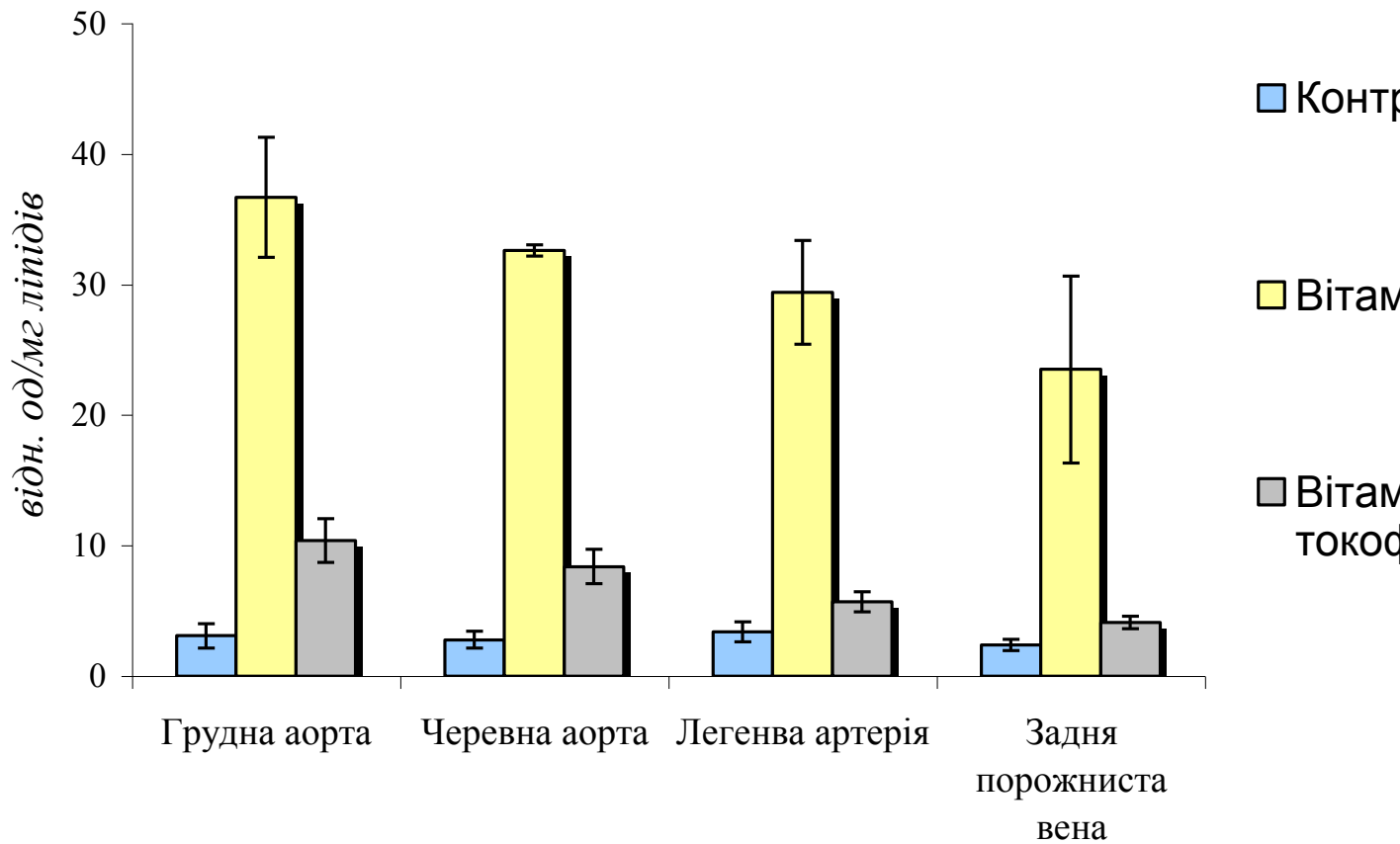


Рис. 5 Вплив токоферолу на вміст Шиффових основ у стінці кровоносних судин за умов гіпервітамінозу D

Зниження рівня ГПЛ та ШО в судинній стінці за умов D-вітамінної інтоксикації під впливом токоферолу свідчить про уповільнення процесів ПОЛ.

Токоферол має різносторонній вплив на ліпідне ушкодження клітин. Він безпосередньо інактивує вільні радикали, здійснює структурний захист мембранних фосфоліпідів, підвищує в клітинах активність ГП і СОД (Абрамова М.И., Оксенгенлер Г.И., 1985; Бурлакова Е.Б., Крашаков С.А., Храпова Н.Г., 1998; Денисов Л.Н., Лобарева Л.С., Якушева Е.О., 1994). У судинній стінці захисний вплив токоферолу пов'язаний з його гіпохолестеролемічними та антиагрегантними ефектами, здатністю коригувати ліпідний склад плазми крові, запобігати деструкції еластинових волокон та колагену, пригнічувати проліферацію ГМК, зменшувати проникність ендотелію (Орехов А.Н., 1991; Тихазе А.К., 1999).

За отриманими нами даними за умов поєднаного введення ніфедипіну і ергокальциферолу вміст ГПЛ та ШО мав тенденцію до зниження, але достовірно не відрізнявся від групи D-гіпервітамінозних тварин.

За даними інших авторів БКК сприяють уповільненню процесів ПОЛ у тканинах, обмежують розвиток їх ушкодження (Глушко Л.В., 1991; Ланкін В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н., 2000).

Ймовірно, обране нами D-гіпервітамінозне ушкодження викликає значне ураження судинної стінки, і за цих умов БКК не мають суттєвого впливу на її захист.

У серії дослідів по вивченню впливу комплексоутворювачів на інтенсивність процесів ПОЛ у судинній стінці розбіжності за вмістом проміжних та кінцевих продуктів ПОЛ між групами D-гіпервітамінозних тварин і тварин, які поряд з ергокальциферолом отримували ЕГДК виявились статистично недостовірними. Отримані дані свідчать про те, що за умов D-вітамінної інтоксикації ЕГДК не впливає на інтенсивність ПОЛ у судинній стінці.

Таким чином, за впливом на інтенсивність ПОЛ у тканинах кровоносних судин D-гіпервітамінозних тварин вивчені фармакологічні агенти можна розмістити в такій послідовності: вітамін E > ніфедипін > ЕГДК.

Характеристика деяких ознак D-гіпервітамінозних уражень кровоносних судин за умов застосування фармакологічних агентів ангіопротекторної дії.

Доведено, що однією з ранніх ознак ураження судинної стінки за умов D-вітамінної інтоксикації є розвиток набряку (Hass, 1958). Для оцінки цього явища в роботі було використано визначення об'єму інулінового простору (ОІП) та процентного вмісту води в тканинах артеріальних і венозних судин.

Дія ергокальциферолу на кровоносні судини супроводжується зростанням ОІП в усіх вивчених артеріях і задній порожнистій вені тварин (табл 3). Підвищення цього показника склало: у грудній аорті – 17%, у черевній – 20%, у легеневій артерії – 16%, у порожнистій вені – 10% як порівняти з контролем.

Було також виявлено незначне зростання вмісту води в артеріальних судинах. Так, у грудній та черевній аорті цей показник збільшився на 4%, у легеневій артерії – на 3% проти контролю. У стінці задньої порожнистої вени він достовірно не відрізнявся від контрольних величин. Таким чином, у вивчених венозних судинах, порівняно з артеріальними, зростання ОІП було найменшим, а вміст води залишався на рівні контролю. Ці дані узгоджуються з вище викладеними фактами і даними літератури про те, що зазначений тип судин є більш резистентним до ушкоджувального впливу вітаміну D.

Поряд з наведеними вище дослідженнями нами проведено гістологічне вивчення артеріальних і венозних судин кролів за умов уведення їм вітаміну D у дозі 10000 МО/кг протягом 14 діб. Гістологічні дослідження виражених дегенеративних змін у стінці вивчених судин не виявили, за винятком незначного потовщення інтими в аортальних судинах деяких тварин.

Однією з найхарактерніших ознак ураження кровоносних судин за умов гіпервітамінозу D є кальцифікація судинної стінки (Атаман О.В., 2001). У результаті проведених нами експериментів з'ясовано, що за умов уведення тваринам вітаміну D вміст кальцію збільшувався в усіх

досліджуваних судинах (табл. 4). Так, у грудній аорті він виріс у 13 разів, у черевній – в 9 разів, у легеневій артерії – в 7 разів, у задній порожнистій вені – в 3 рази.

Таблиця 3. Об'єм інулінового простору в стінці кровоносних судин D-гіпервітамінозних тварин за умов дії токоферолу, ніфедипіну та ЕГДК(мл/100 г вологої тканини; M±m, n=6)

Об'єкт	Контроль	вітамін D	вітамін D + токоферол	вітамін D + ніфедипін	вітамін D + ЕГДК
Грудна аорта	43,53±0,83	58,43±1,03*	51,27±0,64* ▲	53,38±0,81* ▲	56,87±1,05*
Черевна аорта	47,38±0,39	58,92±1,03*	52,22±0,66* ▲	54,33±0,76* ▲	57,17±0,53*
Легенева артерія	44,18±0,36	50,22±0,74*	45,30±0,68* ▲	46,72±0,48* ▲	49,07±0,92*
Задня порожниста вена	42,83±0,33	47,57±0,55*	43,17±0,58▲	43,80±0,70▲	45,58±0,49* ▲

Примітка: *– статистично достовірні розбіжності відносно контролю (P<0,05);

▲ – статистично достовірні розбіжності відносно групи D-гіпервітамінозних тварин (P<0,05).

У результаті вивчення впливу агентів з різними механізмами дії на показники, що характеризують ушкодження вдалося з'ясувати ряд закономірностей. Результати проведених нами дослідів підтверджують дані інших авторів про те, що антиоксиданти пригнічують розвиток ураження судинної стінки. Так, під впливом токоферолу в кровоносних судинах D-гіпервітамінозних тварин ОПІ знижувався в середньому на 11%, процентний вміст води – на 3% проти групи кролів з D-вітамінною інтоксикацією. Ніфедипін виявляв менший, але виражений вплив. Його застосування сприяло зниженню ОПІ на 8% та вмісту води на 2% в усіх досліджених судинах. І насамкінець ЕГДК на зазначених показників не впливала. Таким чином, за умов D-вітамінної інтоксикації найбільш ефективно запобігає зростанню показників, що характеризують ураження (ОПІ, вміст води, ГПЛ і ШО) вітамін Е. Ніфедипін має менший вплив. ЕГДК практично не впливає на зазначених показників.

Таблиця 4. Вміст кальцію в судинній стінці D-гіпервітамінозних кролів за умов дії токоферолу, ніфедипіну та ЕГДК (ммоль/г сухої тканини; M±m, n=6)

Об'єкт	Контроль	Вітамін D	Вітамін D + токоферол	Вітамін D + ніфедипін	Вітамін D + ЕГДК
Грудна аорта	0,35±0,05	4,52±0,64	3,25±0,53	1,51±0,30*	0,86±0,15*

Черевна аорта	0,45±0,10	4,11±0,81	2,72±0,18	1,77±0,23*	1,12±0,16*
Легенева артерія	0,25±0,05	2,16±0,18	1,83±0,20	1,05±0,15*	0,66±0,12*
Задня порожниста вена	0,15±0,03	0,45±0,10	0,32±0,08	0,36±0,05	0,22±0,03

Примітка: * - статистично достовірні розбіжності відносно групи

D-гіпервітамінозних тварин ($p < 0,05$).

Вивчення впливу обраних агентів на рівень кальцію в судинній стінці дало протилежні результати. За умов поєднаного введення вітаміну Е з ергокальциферолом тенденція до зниження вмісту кальцію в тканині судин статистично не підтверджена. Ніфедипін сприяв зменшенню вмісту кальцію в артеріях у середньому в 2,5 раза і не впливав на цей показник у венах. Застосування ЕГДК призводило до значного зниження вмісту кальцію в усіх вивчених судинах: у грудній аорті – в 5,3 раза, у черевній – в 3,7 раза, у легеневій артерії – в 3,3 раза, у порожнистій вені – у 2,1 раза проти групи D-гіпервітамінозних тварин (табл. 4).

Отже, за впливом на інтенсивність кальцифікації судинної стінки вивчені фармакологічні агенти можна розмістити в такій послідовності : ЕГДК > ніфедипін > вітамін Е.

Таким чином, за умов D-вітамінної інтоксикації чинники, які сприяють зниженню вмісту продуктів ПОЛ, ОП та вмісту води в тканинах кровоносних судин, не впливають на рівень кальцію в них (токоферол). Разом з тим, застосування ангіопротекторів, які суттєво не впливають на показники, що характеризують ушкодження, призводить до значного зниження вмісту кальцію в судинних стінках (ЕГДК).

Аналіз результатів дослідів по вивченню впливу агентів з різними механізмами ангіопротекторної дії на інтенсивність ПОЛ та кальцифікації стінок кровоносних судин дозволив прийти до важливого висновку про те, що за умов гіпервітамінозу D між процесами ушкодження судинної стінки та її кальцифікацією не існує прямого взаємозумовленого зв'язку. Зміни, які виникають в стінках кровоносних судин при ушкодженні високими дозами ергокальциферолу, створюють умови для їх кальцифікації. А сама кальцифікація, що виникає, започатковує і підсилює ушкодження.

Дані отримані нами свідчать про те, що процеси ушкодження і кальцифікації стінок кровоносних судин відбуваються паралельно, підсилюють один одного і наслідком їх є важка судинна патологія – артеріосклероз Менкеберга (рис. 6).



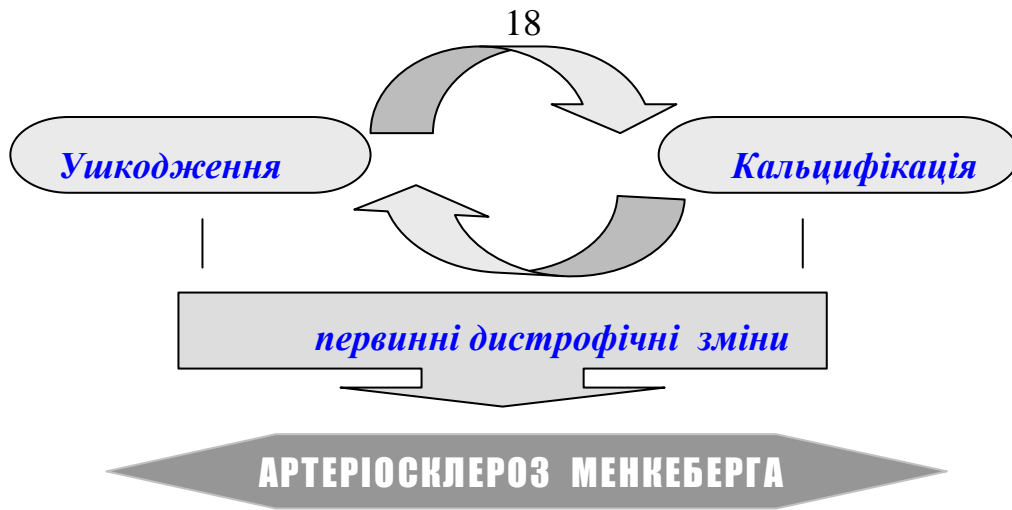


Рис. 6 Схема зв'язку між ушкодженням і кальцифікацією судинної стінки за умов гіпервітамінозу D

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення і спроба нового розв'язання проблеми зв'язку між ушкодженням судинної стінки та її кальцифікацією. Зокрема, наведені експериментальні дані щодо ролі пероксидного окиснення ліпідів у розвитку кальцинозу кровоносних судин за умов гіпервітамінозу D та коригуючих впливів з різними механізмами дії.

1. Введення тваринам високих доз вітаміну D (10000 МО/кг) протягом 14 днів супроводжується зростанням у стінках кровоносних судин вмісту проміжних і кінцевих продуктів пероксидного окиснення ліпідів. Інтенсивність накопичення гідропероксидів ліпідів і Шиффових основ у різних судинах різна: в артеріях вона значно вища, ніж у венах.

2. У відповідь на дію токсичних доз ергокальциферолу в тканинах артеріальних судин відбувається зниження активності антиоксидантних ферментів - глутатіонпероксидази, супероксиддисмутази і каталази, тимчасом як у венозній стінці активність зазначених ферментів зростає. Більша потужність антиоксидантних систем у венозній тканині може бути одним з чинників більшої стійкості вен до D-гіпервітамінозних уражень.

3. Застосування токоферолу (50мг/кг) веде до істотного зменшення вмісту гідропероксидів ліпідів і Шиффових основ в артеріальних і венозних стінках D-гіпервітамінозних тварин. Ніфедипін (30мг/кг) має значно менший вплив на вивчені показники ПОЛ, тоді як етан-1-гідрокси-1,1-дифосфонова кислота (ЕГДК) (130мг/кг) не впливає на інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів у судинній стінці.

4. За умов гіпервітамінозу D токоферол і ніфедипін істотно обмежують ушкодження судинної стінки, про що свідчить зменшення об'єму інулінового простору та вмісту води в тканинах кровоносних судин. ЕГДК на ці показники не впливає.

5. Використання ЕГДК за умов D-вітамінної інтоксикації веде до значного зниження рівня кальцію в судинній стінці. Ніфедипін сприяє зменшенню вмісту кальцію в тканині артерій і не впливає на його рівень у венах. Токоферол не чинить впливу на зазначеного показника.

6. За умов гіпервітамінозу D фармакологічні агенти, які обмежують ушкодження судинної стінки (токоферол, ніфедипін), у меншій мірі впливають на рівень кальцію в ній, а чинники, які пригнічують відкладання кальцію в тканині кровоносних судин (ЕГДК) не впливають на показники, що характеризують ушкодження.

7. За умов D-вітамінної інтоксикації не існує прямого патогенетичного зв'язку між процесами ушкодження судинної стінки та її кальцифікацією.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ

1. Гарбузова В.Ю. Інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантна активність артеріальної і венозної стінки в динаміці розвитку гіпервітамінозу D // Фізіологічний журнал. – 2002. – Т. 48, №1.– С 87-90.
2. Гарбузова В.Ю. Вплив ніфедипіну, вітаміну Е та бісфосфонатів на інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів в артеріальних та венозних стінках за умов гіпервітамінозу D // Фізіологічний журнал. – 2002. – Т. 48, №6.– С 70-73.
3. Гарбузова В.Ю. Вплив ангіопротекторів з різними механізмами дії на об'єм інулінового простору, вміст води та кальцію в стінці кровоносних судин за умов гіпервітамінозу D // Вісник проблем біології і медицини. - 2002.– № 11-12.– С. 7-12.
4. Гарбузова В.Ю. Вплив високих доз вітаміну D на інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів у плазмі крові кролів // Вісник проблем біології і медицини. - 2003.– № 1.– С. 7-8
5. Атаман О.В., Гарбузова В.Ю., Наумко Р.Ф. Експериментальне вивчення резистентності венозних судин до розвитку атеросклеротичних уражень // Фізіологічний журнал. – 2000. – Т. 46, №2, додаток. - С 3-4.
6. Гарбузова В.Ю. Інтенсивність процесів ПОЛ в артеріальній і венозній стінці в динаміці розвитку гіпервітамінозу D // Матеріали ІХ науково-практичної конференції мед. факультету Сум ДУ “Сучасні проблеми клінічної та експериментальної медицини” Суми, 23-25 квітня 2001р. – Суми. 2001. – С.100-101.
7. Гарбузова В.Ю. Антиоксидантна активність артеріальної і венозної стінки в динаміці розвитку гіпервітамінозу D // Матеріали V Міжнародного Конгресу студентів і молодих учених Тернопіль, 10-12 травня 2001р. – Тернопіль. – 2001. – С.153.
8. Гарбузова В.Ю. Вплив антиоксидантів та антагоністів кальцію на інтенсивність процесів ПОЛ в судинній стінці за умов гіпервітамінозу D // Матеріали Міжнародної наукової

- конференції студентів і молодих вчених “Актуальні проблеми клінічної і теоретичної медицини” Дніпропетровськ, 27-29 вересня 2001р. – Дніпропетровськ. – 2001. – С.182.
9. Атаман О.В., Гарбузова В.Ю., Наумко Р.Ф. Експериментальне вивчення механізмів кальцифікації стінок кровоносних судин // Фізіологічний журнал. – 2002. – Т. 48, № 4.– С. 81.
 10. Гарбузова В.Ю. Інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) в судинній стінці під впливом ніфедипіну, вітаміну Е та бісфосфонатів за умов гіпервітамінозу D // Матеріали VI Міжнародного Конгресу студентів і молодих учених Тернопіль, 21-23 травня 2002р. – Тернопіль. – 2002. – С.222.
 11. Гарбузова В.Ю. Вплив ангіопротекторів з різними механізмами дії на розвиток кальцифікації судинної стінки за умов гіпервітамінозу D // Матеріали II Республіканської науково-практичної конференції студентів та молодих вчених “Сучасні проблеми клінічної та теоретичної медицини” Суми, 23-25 квітня 2003р.– Суми –2003. – С. 3-4.
 12. Гарбузова В.Ю. Вплив вітаміну Е, ніфедипіну та бісфосфонатів на інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) в плазмі крові кролів за умов гіпервітамінозу D // Матеріали VII Міжнародного Конгресу студентів і молодих учених Тернопіль, 21-23 травня 2003р. – Тернопіль. – 2003. – С.197.

Анотація

Гарбузова В.Ю. Експериментальні дані про роль пероксидного окиснення ліпідів у розвитку кальцинозу кровоносних судин, зумовленого гіпервітамінозом D.–Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 – фізіологія людини і тварин. – Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ, 2004.

Дисертацію присвячено експериментальному дослідженню ролі пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) у розвитку кальцинозу кровоносних судин за умов D-вітамінної інтоксикації. Показано, що введення кролям високих доз ергокальциферолу (10000 МО/кг) призводить до активації процесів ПОЛ, збільшенню процентного вмісту води, об'єму інулінового простору та рівня кальцію в тканинах кровоносних судин, причому найбільших значень вивчені показники

сягали в артеріальних стінках. З'ясовано, що в артеріях у відповідь на дію токсичних доз вітаміну D активність антиоксидантних ферментів (глутатіонпероксидази, супероксиддисмутази, каталази) зменшується, а в стінці вен – зростає. Це може бути однією з причин більшої резистентності вен до розвитку ушкодження.

Встановлено, що фармакологічні агенти, які обмежують ушкодження стінки кровоносних судин (токоферол), що проявляється в зниженні рівня продуктів ПОЛ, води та об'єму інулінового простору, не впливають на рівень кальцію в них, а чинники, які пригнічують відкладання кальцію (натрієва сіль етан-1-гідрокси-1,1-дифосфонової кислоти) не впливають на показники, що характеризують ушкодження.

Таким чином, проведені експериментальні дослідження свідчать про те, що за умов гіпервітамінозу D не існує прямого патогенетичного зв'язку між процесами ушкодження судинної стінки та її кальцифікацією.

Ключові слова: пероксидне окиснення ліпідів, кальциноз, гіпервітаміноз D, кровоносні судини.

Аннотація

Гарбузова В.Ю. Экспериментальные данные о роли перекисного окисления липидов в развитии кальциноза кровеносных сосудов в условиях гипервитаминоза D. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.13 – физиология человека и животных. – Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев, 2004.

Диссертация посвящена экспериментальному исследованию роли перекисного окисления липидов (ПОЛ) в развитии кальциноза кровеносных сосудов при гипервитаминозе D. Впервые как инструмент анализа механизмов развития кальцификации сосудистой стенки использованы агенты с разными механизмами ангиопротекторного действия (антиоксиданты, блокаторы кальциевых каналов, комплексообразователи).

Воспроизведение повреждения сосудистой стенки осуществляли путем введения кроликам рег ос витамина D в дозе 10000 МЕ/кг. В качестве корригирующих влияний были использованы: витамин E (50 мг/кг), нифедипин (30 мг/кг), натриевая соль этан-1-гидрокси-1,1-дифосфоновой кислоты (ЕГДК) (130 мг/кг). Объектами изучения были: грудная аорта, брюшная аорта, легочная артерия и задняя полая вена.

Показано, что введение кроликам высоких доз эргокальциферола (10000 МЕ/кг) приводит к активации процессов ПОЛ, увеличению процентного содержания воды, объема инулинового пространства и уровня кальция в тканях кровеносных сосудов, причем наибольших значений изученные показатели достигали в артериальных стенках. Выяснено, что в артериях в ответ на

действие токсических доз витамина D активность антиоксидантных ферментов (глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы, каталазы) уменьшается, а в стенке вен увеличивается. Данный фкт свидетельствует о том, что в венозных сосудах немедленно реализуются механизмы ограничения и ликвидации первичных проявлений повреждения. Вероятно, большая мощность антиоксидантных систем, наряду с другими факторами (разные условия гемодинамики, механизмы трофики, уровень энергетического обмена) является одной из причин большей резистентности вен к действию патогенных влияний.

Установлено, что при гипervитаминозе D токоферол (50мк/кг) вызывает существенное снижение уровня продуктов ПОЛ, воды и объема инулинового пространства в тканях кровеносных сосудов; нифедипин имеет гораздо меньшее влияние на эти показатели, в то время как ЕГДК на них не влияет. Выявлено противоположное действие использованных ангиопротекторов на содержание кальция в сосудистой стенке D-гипervитаминозных животных. ЕГДК способствовала значительному уменьшению уровня кальция во всех изученных сосудах, нифедипин вызывал его уменьшение в артериях, тогда как токоферол на этот показатель не влиял. Таким образом, в условиях D-витаминной интоксикации фармакологические агенты, которые ограничивают повреждение стенки кровеносных сосудов (токоферол) в меньшей мере влияют на уровень кальция в ней, а факторы, которые угнетают отложение кальция (ЕГДК) не влияют на показатели, которые характеризуют повреждение.

Проведенные экспериментальные исследования свидетельствуют о том, что при гипervитаминозе D не существует прямой патогенетической связи между процессами повреждения сосудистой стенки и ее кальцификацией.

Ключевые слова: перекисное окисление липидов, кальциноз, гипervитаминоз D, кровеносные сосуды.

Annotation

Garbuzova V.Y. Experimental data on the role of lipid peroxide oxidation in the development of blood vessel calcinosis in the state of hipervitaminosis D.

Dissertation for awarding scientific degree of candidate of biological sciences, specialization 03.00.13 – physiology of human and animals. – institute of physiology named after A.A. Bogomolets, Ukraine National Academy of Sciences, Kyiv, 2004.

The thesis is devoted to the experimental investigation of the roles of lipid peroxide oxidation (LPO) during the development of blood vessel calcinosis under hipervitaminosis D. Administration of high doses of ergocalciferol (10000 U/kg) to the rabbits is shown to lead to the LPO processes activation, increase of water content percentage, inulin space volume and calcium level in the blood vessel tissues. These indices achieved the highest values in the arterial walls. It is determined that the antioxidant enzyme

activity (glutathionperoxidase, superoxiddismutase, catalase) reduces in the arteries in response to the action of vitamin D toxic doses, but in the vein walls it increases. This can be one of the causes of greater vein resistance to the damage. It is established that pharmacologic agents which restrict the damage of blood vessel wall (tocopherol) do not influence on the calcium level in the vein wall. This becomes apparent in the reduction of LPO product level, water and inulin space volume. But factors which depress calcium deposition (sodium salt ethan-1-hydroxi-1,1 difosfonic acid) do not influence on the indices which characterize the damage. Thus the conducted experimental investigation confirms that there is no direct pathogenic connection between the processes of vein wall damage and its calcification.

Key words: lipid peroxide oxidation, calcinosis, hipervitaminosis D, blood veins.