

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

ПОРТНІЧЕНКО ГЕОРГІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК 612.176:(612.14+577.125+577.25)

**УЧАСТЬ СТЕРОЛРЕГУЛЯТОРНИХ БІЛКІВ (SREBP)
У РЕГУЛЯЦІЇ МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ
СЕРЦЕВО-СУДИННОЇ СИСТЕМИ ГІПЕРТЕНЗИВНИХ ЩУРІВ
ЗА УМОВ ВИСОКОХОЛЕСТЕРИНОВОЇ ДІЄТИ**

03.00.13 – Фізіологія людини й тварин

АВТОРЕФЕРАТ

Дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

Науковий керівник:

Академік НАН України, доктор медичних наук, професор

Мойбенко Олексій Олексійович

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України,
завідувач відділу загальної та молекулярної патофізіології

доктор медичних наук, професор

Досенко Віктор Євгенович

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України,
завідувач відділу загальної та молекулярної патофізіології.

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук, професор

Соловйов Анатолій Іванович

Державна установа «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»
завідувач відділу фармакології клітинних сигнальних систем та
експериментальної терапії

доктор біологічних наук, професор

Ільїн Володимир Миколайович

Національний університет фізичного виховання і спорту України
професор кафедри медико-біологічних дисциплін

Захист дисертації відбудеться «11» червня 2019 р. о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ-24, вул. Богомольця, 4

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України та на сайті інституту:

http://biph.kiev.ua/en/Specialized_Scientific_Council

Автореферат розісланий «8» травня 2019 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

кандидат біологічних наук



Любанова О.П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми

На сьогодні в світі серцево-судинні захворювання є основною причиною смертності [WorldHealthStatistics, 2016]. Водночас епідемічного статусу набула проблема ожиріння у населення розвинених країн [Ryan T. та ін., 2010], яке є складовою комплексної патології, визначеної як метаболічний синдром. Зростає актуальність клінічних та експериментальних досліджень цього захворювання, його проявів і порушень в інших органах і системах, зокрема серця [Yadav R.L. та ін., 2017], підшлункової залози [Gallo W. та ін., 2018], судин [Karjoo S., 2018]. Ключовим фактором розвитку метаболічного синдрому є порушення ліпідного обміну. Однак регуляція ліпідного обміну в серці та великих судинах є недостатньо охарактеризованою, і надто мало відомо про генетичні передумови виникнення функціональних та структурних порушень.

Ряд досліджень зауважують значення білків, що здатні зв'язувати стеролрегуляторні елементи, в фізіології й патофізіології серця, зокрема у розвитку серцевої недостатності [Park HJ та ін, 2008; Shimano H, 2009; Wende AR та ін., 2009; Sato R., 2010]. Відомо, що стеролрегуляторні транскрипційні фактори SREBP (SREBP1a, SREBP1c, SREBP2) відіграють ключову роль у внутрішньоклітинній регуляції метаболізму ліпідів, які є головним енергетичним субстратом для клітин серця. Недостатність холестерину індукує внутрішньоклітинне вивільнення SREBP, що регулює транскрипцію генів, відповідальних за ендогенний синтез ліпідів [Sato R., 2010]. Ці транскрипційні фактори мають понад 30 генів-мішеней, в тому числі, Insig-1 та HMGCoA [Horton JD та ін., 2003]. Роль SREBP-опосередкованого сигналіngu була здебільшого досліджена в клітинах печінки [Ferré P та ін., 2010, Ahmed MH та ін., 2007; Wei Q та ін., 2018; Zhong H, 2018], проте лише поодинокі роботи було присвячено дослідженню SREBP в клітинах серця. Зокрема, H.J. Park та співавт. [2008] показали зв'язок ліпідного метаболізму та парасимпатичної регуляції у кардіоміоцитах курей та мишей. SREBP також залучені до АКТ/PI3K-залежної сигналізації [Lee H та ін., 2013], яка відіграє цитопротекторну роль в міокарді. Останнім часом досліджується генетична асоціація стеролрегуляторного гена SCAP зі змінами артеріального тиску у дітей з ожирінням [Yang YD та ін, 2017]. Однак в літературі досі не охарактеризовано зміни SREBP-залежної регуляції при артеріальній гіпертензії. Також не дослідженими є експресія SREBP та його генів-мішеней в серці за умов гіперхолестеринемії.

Виходячи з цих відомостей, актуальним є визначення участі SREBP у порушеннях структури і функції серця і судин при гіперхолестеринемії та

артеріальній гіпертензії, а також їх комбінованому впливі, що визначило мету цієї роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Роботу виконано в рамках тем НДР відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України: «Системні та молекулярно-генетичні дослідження механізмів розвитку гіпертрофії та недостатності серця» (№ 0110U004753), «Генетичні та епігенетичні механізми регуляції вісцеральних функцій в нормі і при патології» (№ 0112U001477).

Мета дослідження

Встановити участь транскрипційних факторів, що з'єднуються із стерол-регуляторним елементом (SREBF1 і SREBF2), у морфологічних та функціональних змінах серцево-судинної системи спонтанно-гіпертензивних щурів (SHR) за умов високохолестеринової дієти.

Завдання роботи:

1. Оцінити зміни основних фізіологічних параметрів функціонування серцево-судинної системи за нормальних умов та за умов високохолестеринової дієти у SHR.
2. Визначити зміни ліпопротеїдного складу крові за умов високохолестеринової дієти у SHR.
3. Визначити патогістологічні зміни аорти за умов високохолестеринової дієти у SHR.
4. Визначити рівні експресії генів *SREBF1* і *SREBF2* та їх генів-мішеней *Insig-1* та *HMGcoAr* в тканинах серця нормотензивних щурів лінії Wistar та SHR за умов високохолестеринової дієти.
5. Визначити рівні експресії генів *SREBF1* і *SREBF2* та їх генів-мішеней *Insig-1* та *HMGcoAr* в тканинах печінки нормотензивних щурів лінії Wistar та SHR за умов високохолестеринової дієти.
6. Дослідити зв'язок між поліморфізмом гена *SREBF1* (rs2297508) та виникненням есенціальної артеріальної гіпертензії у дітей.

Об'єкт дослідження — функціональний стан серцево-судинної системи, а також ліпідний обмін і регуляторні механізми за умов артеріальної гіпертензії та за умов високохолестеринової дієти.

Предмет дослідження — зміни параметрів кардіогемодинаміки, генетичних й біохімічних показників ліпідного обміну в тканинах серця і печінки за умов артеріальної гіпертензії та за умов високохолестеринової дієти.

Наукова новизна

В роботі вперше досліджено вплив високохолестеринової дієти на функцію серцево-судинної системи за умов артеріальної гіпертензії. Показано

протективний ефект високохолестеринової дієти за умов артеріальної гіпертензії, що проявилось в порівняно кращих показниках параметрів функціонування серцево-судинної системи. Водночас нами вперше виявлено та охарактеризовано зміни у рівнях експресії генів *SREBF1* та *SREBF2* та їх генів-мішеней *Insig-1* та *HMGcoA* редуктази в клітинах серця, як за умов артеріальної гіпертензії, так і за умов високохолестеринової дієти. Також нами вперше було змодельовано і виявлено в ході гістологічних досліджень стінки аорти перші ознаки атерогенезу у щурів за умов артеріальної гіпертензії та високохолестеринової дієти.

Теоретичне та практичне значення роботи

Дані, отримані в ході роботи, мають як теоретичну (фундаментальну) цінність, так і практичну. Визначення змін функціонального стану серцево-судинної системи в умовах сполученої дії факторів є внеском до фундаментальних відомостей щодо стеролрегуляторних механізмів регуляції ліпідного обміну при артеріальній гіпертензії, гіперхолестеринемії, в тому числі аліментарного походження. Одержані результати є засадою для наступних досліджень спільного впливу цих чинників і покращення розуміння роботи серцево-судинної системи, компенсаторних механізмів, які задіяні при зміні ліпідного складу крові і артеріального тиску, а також розвитку адаптації до змінених умов існування організму. Дослідження спільного впливу чинників є необхідною умовою для розуміння реакцій організму на фактори, що можуть сукупно впливати на нього в середовищі існування.

Практична цінність отриманих даних полягає в створенні засад для розробки й корекції методів профілактики й лікування захворювань серцево-судинної системи, з огляду на синдромокомплекс метаболічного синдрому. Отримані відомості можуть бути впроваджені в навчальний процес освітніх закладів біологічного, медичного, педагогічного та спортивного профілю, зокрема, в такі дисципліни, як фізіологія, патофізіологія, кардіологія, ендокринологія, основи безпеки життєдіяльності, дієтологія та валеологія тощо.

Особистий внесок здобувача

Здобувачем спільно з науковим керівником було сформульовано мету і задачі дослідження, розроблено експериментальну модель і протоколи проведення досліджень, сформульовано висновки. Здобувач особисто проводив всі етапи експериментальної роботи: моделювання експериментального впливу, визначення параметрів кардіогемодинаміки, ліпідної формули, експресії генів, аналіз й статистичну обробку даних. Ряд експериментів було проведено спільно зі співробітниками Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, які є співавторами опублікованих робіт.

Апробація результатів дисертації

Результати роботи доповідалися на профільних наукових форумах: VII Пленумі Українського наукового товариства патофізіологів та науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 110-річчю з дня народження М.Н. Зайка «Інтегративні механізми патологічних процесів: від експериментальних досліджень до клінічної практики», 11-12 жовтня 2018 р. (Полтава); Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Вікові та хронобіологічні аспекти медицини і фармації», 4-5 жовтня 2018 р. (Чернівці); ESC Congress 2017, 26-30 Aug 2017 (Barcelona, Spain); 51st Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation, 17th - 19th May 2017 (Genoa, Italy); VI Chronic Hypoxia Symposium, Oct 10 - 16, 2016, (LaPaz, Bolivia); Frontiers in CardioVascular Biology 2016 (Barcelona, Spain); VII Національному конгресі патофізіологів України з міжнародною участю «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції», присвяченій пам'яті академіка НАНУ О.О. Мойбенка, 5-7 жовтня 2016 р., (Харків); 25th Anniversary of the FEPS, 168th Anniversary of French Physiological Society, June 29th – July 1st 2016 (Paris, France); Third young physiologists and biophysicists conference: “Physiology: from molecules to the body” Kyiv, 2013; VI Національному конгресі патофізіологів України з міжнародною участю, 3-5 жовтня 2012 р. (Сімферополь-Місхор).

Публікації

Матеріали дисертації опубліковано у 17 наукових працях, в тому числі 8 статтях у наукових журналах, а також 9 тезах доповідей, в тому числі 5 – на зарубіжних конференціях.

Структура та обсяг дисертації

Дисертація складається із вступу, основної частини (огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, 5 розділів результатів досліджень, аналізу результатів та їх обговорення), висновків та списку використаних джерел (156 найменувань). Робота викладена на 145 сторінках машинописного тексту та проілюстрована 72 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Розділ **Матеріали і методи досліджень** присвячений опису методів використаних для виконання поставлених в роботі завдань. В експериментальній частині роботи були використані щури (самці, вік 6 міс., вага 303 ± 40 г) лінії Wistar (n=32) та спонтанно-гіпертензивні щури лінії SHR (n=28), розподілені на 4 групи: 1) Wistar (n=16, стандартна дієта), 2) Wistar (n=16, 3% холестеринова дієта), 3) SHR (n=12, стандартна дієта), 4) SHR (n=16, 3% холестеринова дієта).

Дослідження проводили згідно з вимогами Гельсінської декларації (2004), Конвенції про права людини і біомедицину (ETS-164), Загальної декларація про біоетику і права людини (2005), Основ законодавства України про охорону здоров'я (ст. 45), Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідницьких або інших наукових цілей (1986), Закону України № 3447-IV, Наказу МОН від 01.03.2012 № 249 та інших вимог діючого законодавства України та світу з питань біомедичної етики.

Експериментальна модель була створена шляхом поєднання артеріальної гіпертензії у спонтанно-гіпертензивних щурів та впливу на них високохолестеринової дієти з 3%-вим вмістом холестерину (Sigma, США) протягом 4 тижнів. Гіпертензивний статус щурів (показник артеріального тиску більше 150 мм. рт. ст.) було підтверджено перед експериментом за допомогою сфігмоманометра S-2 («HSE» Німеччина). Суміш для вигодовування тварин створювалася шляхом збагачення стандартного повнораціонного комбінованого корму віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця холестерином (Sigma).

Визначення **параметрів кардіогемодинаміки** проводилося за допомогою чутливих до змін тиску й об'єму мікрокатетерів (SPR-838; Millar Instruments, Houston, TX). Щурів наркотизували уретаном (1,5 г/кг), після чого через праву сонну артерію ретроградно вводили мікрокатетер в порожнину лівого шлуночка серця. Дані реєстрували й аналізували за допомогою спеціалізованого програмного забезпечення (ADInstruments, Millar Instruments, Houston, TX). Відносні величини об'єму конвертували в абсолютні згідно з рекомендаціями виробника.

Ліпідний склад крові визначали стандартними методами за допомогою біохімічного аналізатора BioSystemA25 (Bio-Systems SA, Іспанія).

Індекс маси серця вираховували як відношення ваги серця (мг) до ваги тіла (г).

Ліпідна інфільтрація тканин аорти була визначена у заморожених зрізах дуги аорти товщиною 10-12 мкм, забарвлених OilRed (Sigma-Aldrich) з використанням світлового мікроскопа Nikon (Японія).

Для **електронної мікроскопії** кардіоміоцити фіксували у 2% розчині параформальдегіда і 1% розчині тетроксиду осмію та вміщували в епоксидну смолу (Fluka, США). Ультратонкі зрізи контрастували уранілацетатом та цитратом свинцю і аналізували за допомогою електронного мікроскопа JEOL 100CX (Японія).

Виділення РНК із тканин серця та печінки щурів проводили із використанням фенол-хлороформової екстракції. Отримана високомолекулярна

нативна РНК високої чистоти ($OD_{260/280nm}$ 2.0) використовувалася для проведення зворотної транскрипції.

Зворотну транскрипцію проводили із використанням First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва), застосовуючи 1,2-1,5 мкг загальної РНК та випадковий гексамерний праймер. Отриману внаслідок зворотної транскрипції одноланцюгову ДНК використовували для кількісної оцінки експресії генів із використанням полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі із застосуванням специфічних праймерів для відповідних генів.

ПЛР-ампліфікація генів *SREBF-1*, *SREBF-2*, *Insig-1* та *HMGCoAr* проводилася з використанням SYBRGreen PCR MasterMix, ампліфікацію здійснювали за допомогою термоциклера “7500 Fast Real-Time PCR System”. Аналіз отриманих даних проводився за допомогою 7500 Fast Real-time PCR Software.

Дослідження поліморфізмів *SREBF* проводилося у дітей з есенціальною артеріальною гіпертензією (84 дитини віком від 9 до 17 років), що проходили лікування в Київському міському центрі діагностики та лікування вегетативних функцій у дітей на базі дитячої клінічної лікарні №6 м. Києва (кафедра педіатрії №4 Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця, завідувач – член-кор. АМН України Майданник В.Г.). Відбір крові проводився кваліфікованими спеціалістами в клінічних умовах із використанням стерильних моноветів виробництва фірми „Sarstedt” (Німеччина) із дотриманням вимог медичної асептики та антисептики та інформованої згоди батьків на використання крові для генетичних досліджень. ДНК виділяли з цільної крові із використанням наборів DIAtom DNA Prep («Isogene», Росія). Алельний поліморфізм гена *SREBF* (rs2297508) визначали за допомогою 7500 Fast Real-Time PCR System.

Для **статистичного аналізу** було використано за умови нормального розподілу та гомоскедантичності вибірок – однофакторний дисперсійний аналіз з апостеріорними попарними t-тестами з post hoc поправкою Геймса-Хоуела. В інших випадках використовувся аналіз Краскела-Уолеса з апостеріорними попарними тестами Манна-Уїтні з поправкою Бонфероні.

Результати дослідження та їх обговорення

Зміни у функціонуванні серцево-судинної системи, ліпідного метаболізму та експресії його ключових генів-регуляторів у тварин за умов артеріальної гіпертензії

В ході експериментальної роботи виявлено погіршення показників роботи серцево-судинної системи у спонтанно-гіпертензивних щурів порівняно з нормотензивним контролем (щури Wistar). Так, було встановлено статистично достовірне зменшення показників насосної функції серця, погіршення

систолічної й діастолічної функції (табл.): хвилинного об'єму крові, ударного об'єму, ударної роботи, кінцево-систолічного тиску, максимальної швидкості зміни тиску в лівому шлуночку, кінцево-діастолічного об'єму, максимальної швидкості розслаблення міокарду, кінцево-діастолічного тиску, ізоволюмічної константи розслаблення лівого шлуночка Тау, артеріальної жорсткості, тощо.

Таблиця. Кардіогемодинамічні параметри у щурів Wistar та SHR за умов стандартної та високохолестеринової дієти ($M \pm SE$).

Показник	Wistar	Wistar холестеринова дієта	SHR	SHR холестеринова дієта
Кількість серцевих скорочень (уд/хв)	363,4 \pm 18,1	320,4 \pm 17,8*	308,6 \pm 10,4*	288,2 \pm 14,7*#
Кінцево-систолічний об'єм (мкл)	493,9 \pm 37,9	329,6 \pm 18,6*	434,3 \pm 58,2*	530,4 \pm 64*#
Кінцево-діастолічний об'єм (мкл)	682,4 \pm 40,9	493,1 \pm 65,7*	460,4 \pm 45,9*	614,4 \pm 75,2*#
Кінцево-систолічний тиск (мм.рт.ст)	95,4 \pm 5	128,2 \pm 15,2*	110,9 \pm 3*	96,5 \pm 5,3#
Кінцево-діастолічний тиск (мм.рт.ст)	1,3 \pm 1,7	2,6 \pm 1,7*	5,7 \pm 2,7*	5,2 \pm 1,1*
Ударний об'єм (мкл)	254,4 \pm 31,5	201,5 \pm 51,7*	77,2 \pm 19,5*	133,3 \pm 30,1*#
Хвилинний об'єм крові (мкл/хв)	9337,0 \pm 12923,1	62423,5 \pm 14449,6*	23698 \pm 6071,8*	40080,4 \pm 11055,4*#
Ударна робота (мм.рт.ст*мкл)	14978 \pm 3193,7	12896,4 \pm 2863,5*	4929,1 \pm 1785,7*	8772,3 \pm 1932,8*#
Артеріальна жорсткість (мм.рт.ст/мкл)	0,4 \pm 0,04	0,9 \pm 0,2*	2 \pm 0,4*	1,06 \pm 0,2*#
Максимальна швидкість зміни тиску (мм.рт.ст/сек)	9337,3 \pm 855,9	11484,2 \pm 464,5*	7169,5 \pm 314,2*	6524,3 \pm 1046,3*#
Максимальна швидкість розслаблення міокарду (мм.рт.ст/сек)	-9221,5 \pm 981,1	-6579,6 \pm 806,0*	-6810,9 \pm 315,2*	-6353,9 \pm 962,2*#
Тау за Вайсом (мсек)	7,8 \pm 0,4	9,6 \pm 1,4*	10 \pm 1,02*	10,6 \pm 0,8*#
Лівошлуночкова максимальна жорсткість (у.о.)	1,4 \pm 0,2	2,9 \pm 0,7	3,8 \pm 0,5*	2,3 \pm 0,4

* - статистично достовірна різниця порівняно з групою Wistar на стандартній дієті ($p < 0,05$); # - статистично достовірна різниця порівняно з групою SHR на стандартній дієті ($p < 0,05$).

Ліпідний склад крові у SHR на стандартній дієті достовірно не відрізнявся від нормотензивних тварин (рис. 1), однак варто зазначити тенденцію до

збільшення індексу атерогенності у SHR і відповідно припустити певну залежність ліпідного метаболізму від артеріальної гіпертензії.

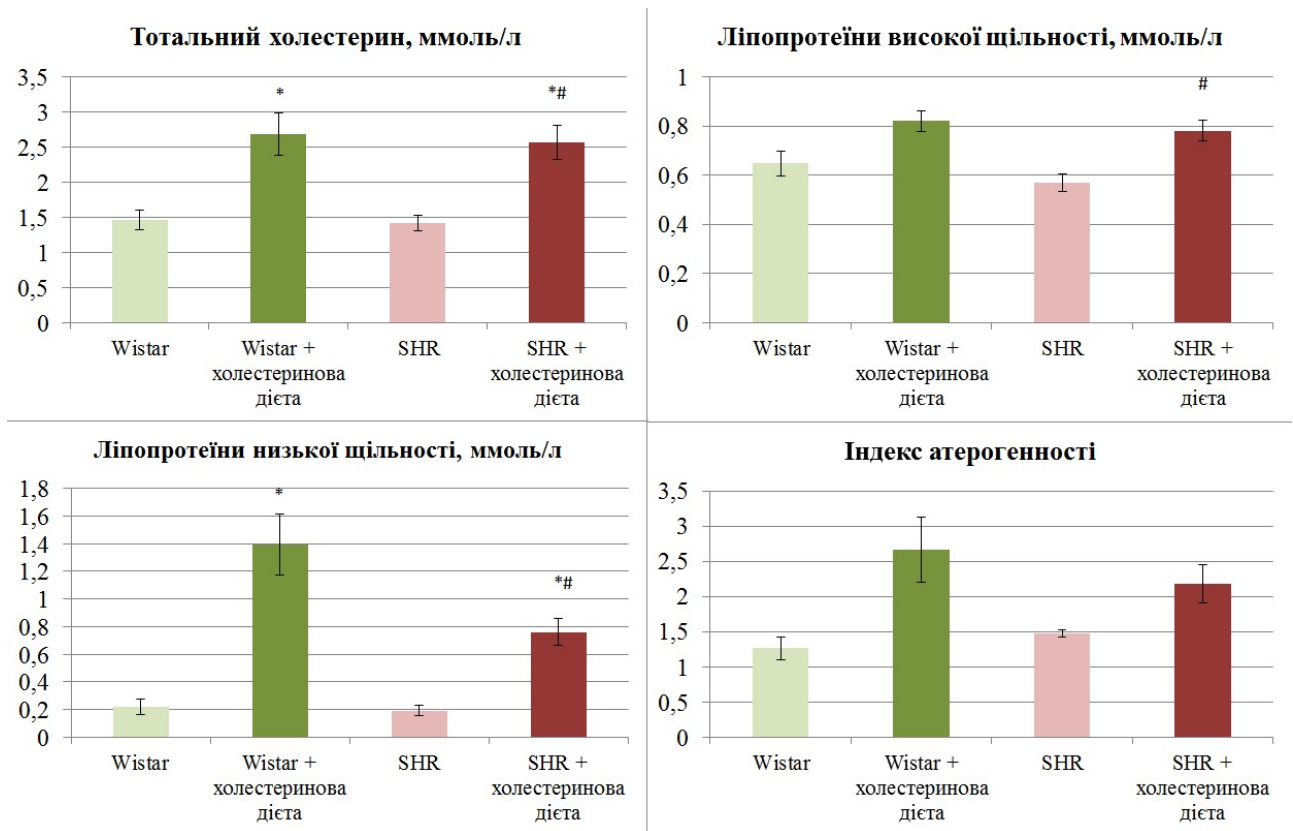


Рис.1. Ліпідограма щурів лінії Wistar та SHR на стандартній та високохолестериновій дієті. * - статистично достовірна різниця порівняно з групою Wistar на стандартній дієті ($p < 0,05$); # - статистично достовірна різниця порівняно з групою SHR на стандартній дієті ($p < 0,05$).

Незважаючи на відсутність вірогідних змін у ліпідограмі, експресія стеролрегуляторних білків та їх генів-мішеней у SHR на стандартній дієті була істотно зміненою (рис. 2). Так, експресія генів-регуляторів ліпідного метаболізму *SREBF1* та *SREBF2* була меншою в серцях SHR, водночас експресія гена-мішені *SREBF1* – *Insig1* була в 11 разів більшою, ніж у нормотензивних тварин. Однак в печінці SHR експресія *SREBF1* була більшою, ніж у Wistar, водночас підвищеною була й експресія генів-мішеней. Одержані дані можуть свідчити, що у SHR, навіть за відсутності значних змін рівня холестеринемії при стандартній дієті інтенсифікувалося функціонування стеролрегуляторних білків та їх генів-мішеней, особливо в тканині печінки. У серці зазначені механізми при тривалій артеріальній гіпертензії зазнавали супресії на рівні експресії мРНК генів *SREBF1* та *SREBF2*, що можна розцінювати як компенсаторну регуляцію.

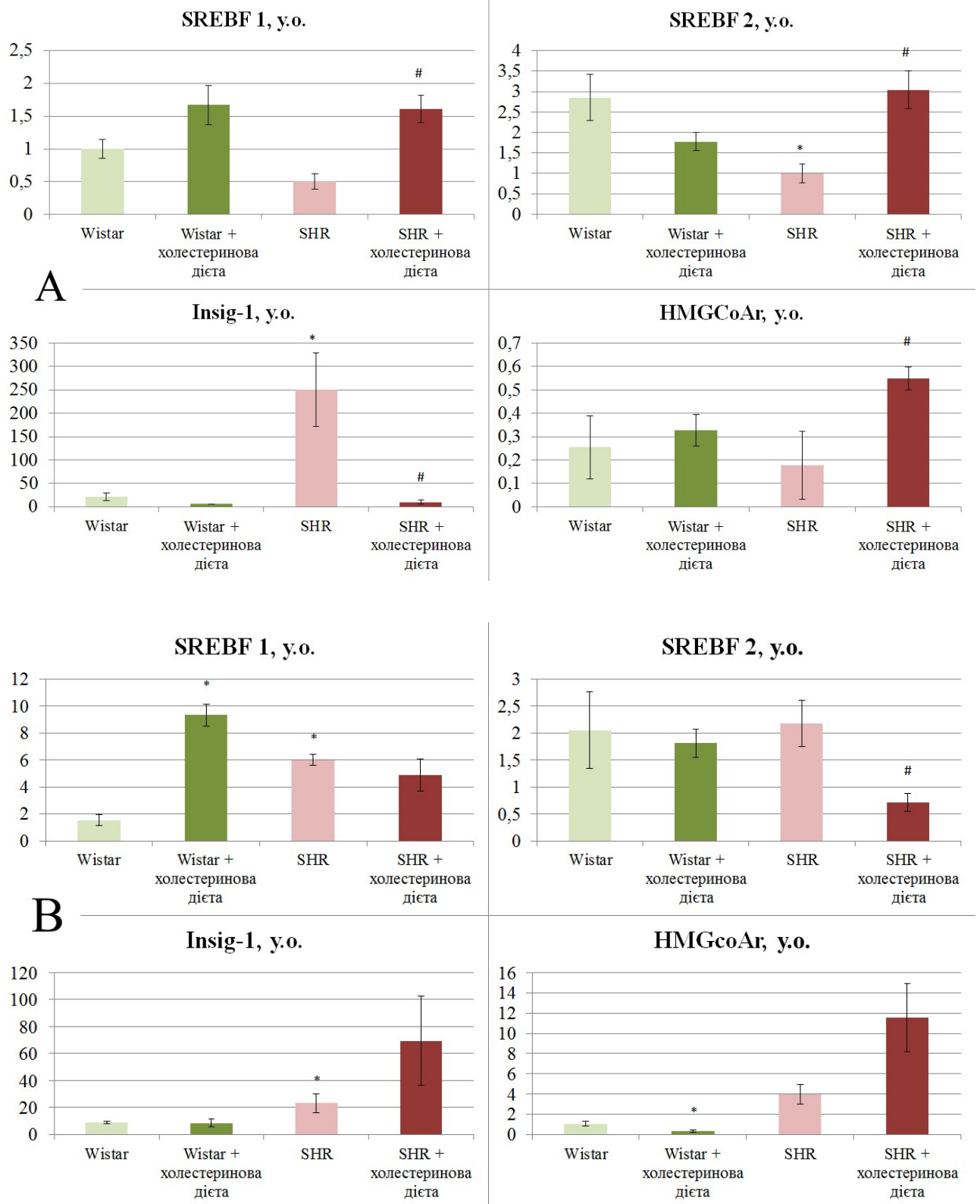


Рис.2. Експресія генів *SREBF1* та *SREBF2*, а також їх генів-мішеней *Insig1* та *HMGCoAr* в тканинах серця (А) та печінки (В) щурів Wistar та SHR. * - статистично достовірна різниця порівняно з групою Wistar на стандартній дієті ($p < 0,05$); # - статистично достовірна різниця порівняно з групою SHR на стандартній дієті ($p < 0,05$).

Гістологічні та ультраструктурні дослідження показали вогнищеві пошкодження стінки аорти у SHR. Спостерігалися ознаки відшарування ендотелію, потовщення стінки аорти, окремих шарів гладеньком'язових клітин, інтими тощо (рис. 3). Наявність таких змін можна оцінити як фактор ризику, який може слугувати тригером запуску компенсаторного обмеження транскрипції генів *SREBF1* та *SREBF2* в серці.

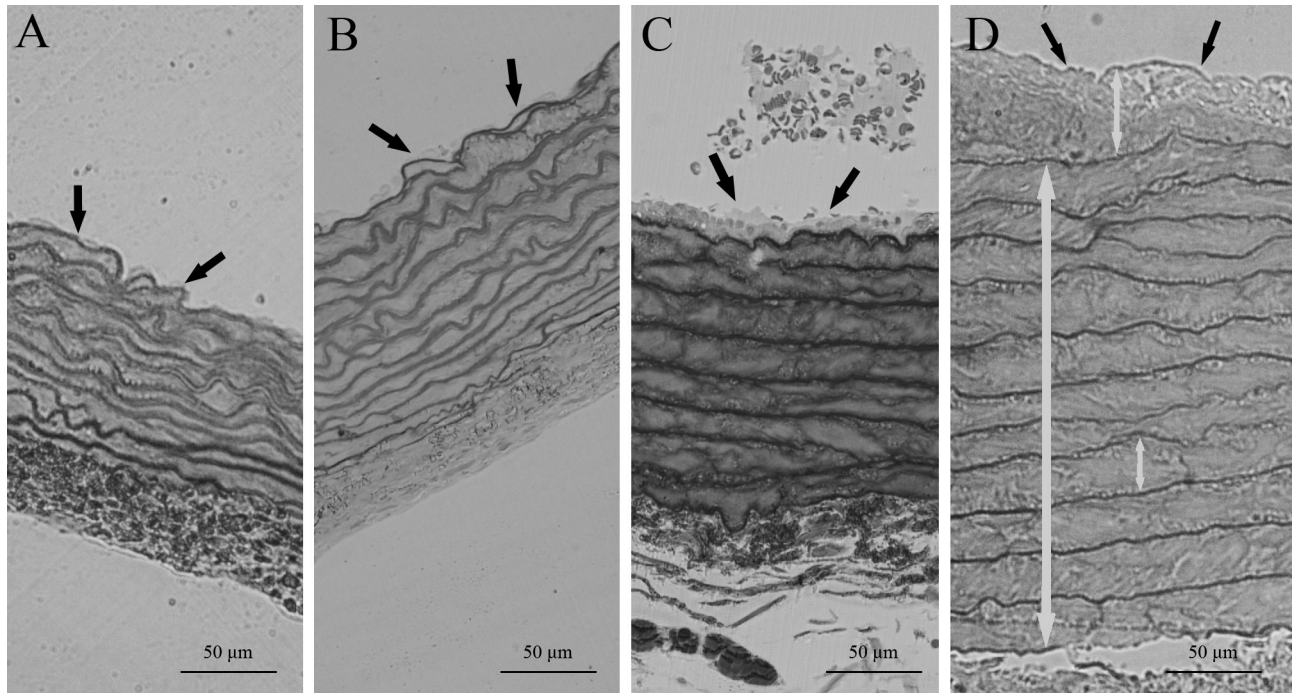


Рис.3. Напівтонкі зрізи зразків стінки аорти щурів Wistar на стандартній (A) та високохолестериновій (B) дієті та SHR на стандартній (C) та високохолестериновій (D) дієті. Зміни люмінальної поверхні (темні стрілки), потовщення інтими, медії та окремого шару гладеньком'язових клітин (світлі стрілки). Зб.*200

Отримані дані свідчать про системний вплив артеріальної гіпертензії на організм, зокрема зміни регуляції ліпідного метаболізму. Іншим важливим моментом є порушення нормальної організації стінки аорти, що є важливим патогенетичним фактором.

Зміни у функціонуванні серцево-судинної системи, ліпідного метаболізму та експресії його ключових генів-регуляторів у тварин за умов високохолестеринової дієти

Високохолестеринова дієта зумовила різну реакцію у щурів Wistar та SHR. Так, у щурів Wistar під дією холестеринового навантаження погіршилися параметри кардіогемодинаміки, зокрема, показники насосної, систолічної та діастолічної функції (табл.). Водночас у SHR високохолестеринова дієта парадоксально покращила функції серцево-судинної системи (насосну та меншою мірою діастолічну, див. табл.). Поясненням цьому може бути

зменшення артеріальної жорсткості при вживанні високохолестеринової дієти у SHR на відміну від Wistar, що зумовило зменшення постнавантаження й відповідно покращення кардіогемодинаміки.

Більша стійкість SHR до холестеринового навантаження прослідковується і в дослідженнях ліпідного складу крові. Вживання високохолестеринової дієти призводило до виразного зростання холестеринемії, в тому числі показників загального холестерину та його фракцій, у щурів обох ліній (див. рис. 1). Водночас зміни ліпідного складу крові у SHR були менш виражені, особливо обмежувалося зростання холестерину ЛПНЩ (див. рис.1).

Вплив холестеринової дієти значним чином відбився й на експресії мРНК *SREBF1* та *SREBF2*, у SHR в серцях значно підвищилася експресія обох генів (див. рис. 2). У щурів Wistar зміни експресії не були статистично вірогідними, однак експресія *SREBF2* знижувалася, що є логічною відповіддю на збільшення рівня екстрацелюлярного холестерину. Разом з тим активність гена-мішені *HMGCoAr* також зростала у SHR, що може свідчити про парадоксальну активацію синтезу холестерину. Отже, у них на відміну від Wistar спостерігалися ознаки порушення нормальної регуляції ліпідного метаболізму в клітинах серця.

В печінці SHR спостерігалось зменшення експресії мРНК *SREBF1* та *SREBF2* і значне підвищення активності їх генів-мішеней (рис. 2).

Гістологічні й ультраструктурні дослідження аорти також виявили суттєву різницю ліній тварин у реакції на високохолестеринову дієту. У щурів Wistar була дещо потовщена інтима (рис. 3), зокрема, за рахунок вип'ячувань базальної мембрани, формувалися вакуолоподібні утворення з інсудатом всередині, крім того, змінювалася орієнтація ендотеліоцитів. Однак, ці структурні зміни у Wistar не мали патологічного характеру. Водночас у SHR раніше наявні зміни у стінці аорти поглибилися: зросла кількість вогнищ пошкоджень, спостерігалися порушення ендотеліоцитарної вистілки аж до повної десквамації ендотеліоцитів, міграція гладеньком'язових клітин, наявність мононуклеарних клітин в інтимі, й загалом процеси деградації в інтимі.

При дослідженні ліпідної інфільтрації стінки аорти у Wistar не було виявлено специфічного забарвлення, проте у SHR на стандартній дієті було показано невеликий ступінь інфільтрації, а після дії холестеринової дієти інфільтрація значно зросла (рис. 4).

Одержані експериментальні дані дозволяють припустити, що артеріальна гіпертензія є значним фактором у розвитку патологічних процесів у стінці судин внаслідок дії високохолестеринової дієти. Парадоксальне покращення гемодинамічних параметрів й менша чутливість до впливу холестеринемії, як

вже вище було зазначено, може пояснюватися зменшенням артеріальної жорсткості, яка, в свою чергу, зумовлена пошкодженням стінки аорти й розвитком патологічних процесів. Збільшення ліпідної інфільтрації цих зон разом з ультраструктурними порушеннями дає змогу припустити початок атерогенезних перетворень.

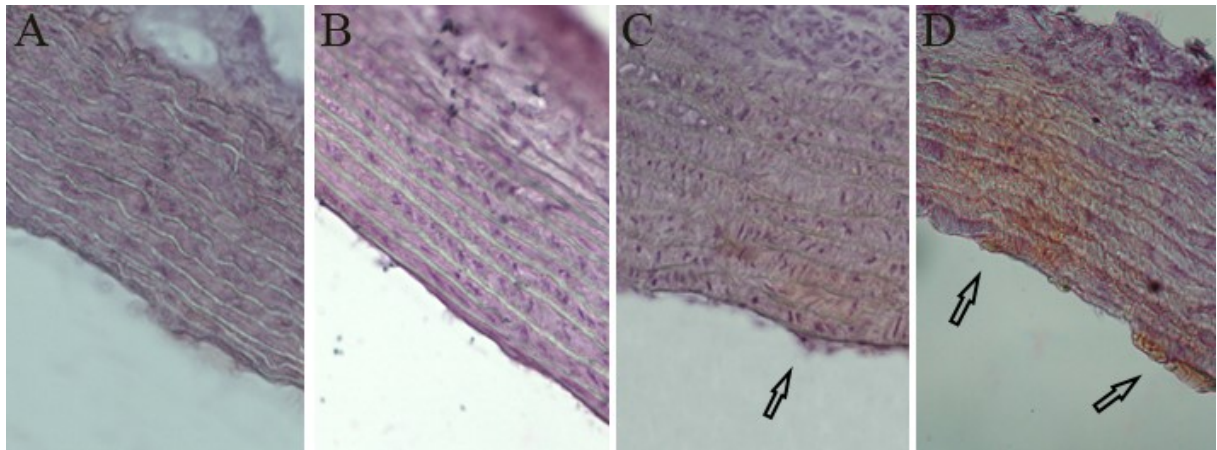


Рис.4. Напівтонкі зрізи зразків стінки аорти щурів Wistar на стандартній (A) та високохолестериновій (B) дієті та SHR на стандартній (C) та високохолестериновій (D) дієті. Забарвлення Oil-Red та гематоксином. Ознаки ліпідної інфільтрації (червоне забарвлення). Зб.*200

Визначення зв'язку між поліморфізмом гена SREBF1 та виникненням артеріальної гіпертензії

Окремою частиною дослідження було встановлення взаємозв'язку між поліморфізмом гена *SREBF1* та розвитком артеріальної гіпертензії, що потребувало проведення досліджень на людях. В ході дослідження не встановлено вірогідних відмінностей між розподілом алелей гена *SREBF1* у здорових та хворих на есенціальну артеріальну гіпертензію дітей популяції України (С:G, здорові 46%:54%, хворі 40%:60%, $p>0.05$), що спростовує роль цього поліморфізму як спадкового фактора, водночас не виключає участі в патогенезі інших поліморфізмів *SREBF1*.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі за допомогою експериментальних досліджень на щурах зі спонтанною гіпертензією та впливом високохолестеринової дієти встановлено особливості змін кардіогемодинаміки, структури серця та судин, змін та генетичної регуляції ліпідного обміну, асоційованих з окремою та спільною дією факторів постнавантаження та екзогенної гіперхолестеринемії, а

також в популяційному дослідженні не підтверджено роль поліморфізму гена *SREBF* у розвитку есенціальної артеріальної гіпертензії у дітей.

1. За умов артеріальної гіпертензії виявлено порушення кардіогемодинаміки: значне зменшення показників насосної функції, зокрема, ХОК – на 74%, погіршення систолічної й діастолічної функції серця щурів, а також зростання артеріальної жорсткості в 4,8 разів. При впливі високохолестеринової дієти у щурів Wistar погіршилися параметри насосної, систолічної та діастолічної функції. Водночас у SHR високохолестеринова дієта покращила функції серцево-судинної системи за насосною (збільшення ХОК на 69%) та меншою мірою діастолічною функцією серця. Також виявлено зменшення артеріальної жорсткості на 47%, що є значним фактором у зменшенні постнавантаження на серцевий м'яз.
2. Ліпопротеїдний склад крові не змінювався за умов артеріальної гіпертензії. Вживання екзогенного холестерину призводило до гіперхолестеринемії, однак зростання вмісту холестерину і його фракцій було меншим у SHR, особливо холестерину ЛПНЩ – у 2,9 рази порівняно з 5,2 рази у Wistar.
3. У SHR виявлено морфологічні зміни у будові аорти (потовщення стінки аорти та інтими, вогнищеві порушення ендотеліоцитарної вистілки, набряк, ліпідна інфільтрація). За умов високохолестеринової дієти у SHR виявлено більш виразні зрушення порівняно з Wistar: зростання товщини інтими та співвідношення інтима/медіа, збільшення ділянок ураження, міграцію гладеньком'язових клітин, зростання кількості ліпідних включень в тканинах стінки аорти.
4. Артеріальна гіпертензія призводила до супресії генів *SREBF1* та *SREBF2* в клітинах міокарда, на 49% та 65%, відповідно, при цьому експресія гена-мішені *Insig-1* у SHR була у 10 разів вищою, ніж у щурів Wistar. За умов високохолестеринової дієти вдвічі збільшувалася експресія генів *SREBF1* та *SREBF2* в клітинах міокарда SHR, водночас спостерігалася зменшення на 96% експресії *Insig1* і зростання у 3 рази експресії *HMGcoAr*. У міокарді Wistar зростала експресія лише *SREBF1* (на 66%), встановлено зменшення на 73% експресії *Insig1*, а експресія *HMGcoAr* зростала на 28%.
5. В клітинах печінки SHR експресія гена *SREBF1* була більшою в 2.9 рази, а генів *Insig-1* та *HMGcoAr* в 1.6 та 2.7 разів, відповідно. За умов високохолестеринової дієти у щурів Wistar встановлено зростання у 5 разів експресії гена *SREBF1*, а експресія *HMGcoAr* знижувалася на 71%. У SHR за впливу високохолестеринової дієти встановлено зниження на

18% експресії *SREBF1* і на 67% експресії *SREBF2*. а також триразове зростання експресії генів *Insig1* та *HMGCoAr*, що може вказувати на несприятливе зростання холестеринового синтезу.

6. Встановлено, що розподіл частот алельних варіантів гена *SREBF1* у практично здорових осіб та дітей із есенціальною артеріальною гіпертензією в популяції України не відрізняється. Це не підтверджує асоціацію змін поліморфізму гена *SREBF1* (rs2297508) та виникнення артеріальної гіпертензії.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Портніченко Г.В. Зміни ліпідного обміну та експресії регуляторних білків в умовах середньогір'я / Портніченко Г.В., Портніченко В.І., Бічекуєва Ф.Х., Бакуновський О.М., Василенко М.І., Портніченко А.Г. // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. - 2011. - №2. - С. 101-103. *(Здобувачем проведено біохімічні та молекулярні дослідження в складі робочої групи, статистичний аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, написано статтю).*
2. Гончаров С.В. Вплив кверцетину на протеасомну активність в аорті та серці щурів зі спонтанною гіпертензією / Гончаров С.В., Портніченко Г.В., Тумановська Л.В., Пашевін Д.О., Кузьменко М.О., Мойбенко О.О., Досенко В.Є.. // Фізіологічний журнал. - 2014. - Т. 60, № 3. - С. 3-10. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження в складі робочої групи, аналіз отриманих результатів, прийнято участь у написанні статті).*
3. Лапікова-Бригінська Т.Ю. Вікові зміни структури і функції серця у спонтанно-гіпертензивних щурів / Лапікова-Бригінська Т.Ю., Гончаров С.В., Портніченко Г.В., Тумановська Л.В., Портніченко А.Г., Досенко В.Є., Мойбенко О.О. // Вісник морфології. – 2014. – 20, №2. – С.383-388. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження в складі робочої групи, аналіз отриманих результатів, прийнято участь у написанні статті).*
4. Portnychenko A.H. Cardiac hypoxic remodeling and preconditioning impact on protein kinase B (Akt) expression in left and right heart ventricles / Portnychenko A.H., Lapikova-Bryhinska T.Yu., Vasylenko M.I., Portnichenko H.V., Maslov L.N., Moibenko O.O. // International Journal of Physiology and Pathophysiology. 2014. – 5, №4. – P. 345-354. *(Здобувачем проведено молекулярні дослідження, аналіз отриманих результатів, прийнято участь у написанні статті).*
5. Лінник О.О. Порушення скоротливої активності кардіоміоцитів за дії доксорубіцину / Лінник О.О., Древицька Т.І., Тарасова К.В., Портніченко Г.В., Досенко В.Є., Маньковська І.М. // Фізіологічний журнал. – 2016. – 62, №6. - С. 65-71. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження в складі робочої групи, прийнято участь у написанні статті).*

6. Портніченко Г.В. Взаємозв'язок між поліморфізмом гену SREBF1 та виникненням есенціальної артеріальної гіпертензії у дітей в українській популяції / Портніченко Г.В., Досенко В.Є. // Патологія, реабілітація, адаптація. – 2017. – 15, №4. – С. 210-212. *(Здобувачем проведено молекулярно-генетичні дослідження, аналіз отриманих результатів, написано статтю).*
7. Balatskyi V.V. Cardiospecific deletion of α E-catenin leads to heart failure and lethality in mice / Balatskyi V.V., Macewicz L.L., Gan A.M., Goncharov S.V., Pawelec P., Portnichenko G.V., Lapikova-Bryginska T.Y., Navrulin V.O., Dosenko V.E., Olichwier A., Dobrzyn P., Piven O.O. // PflugersArch - Eur J Physiol. – 2018. – 470, №10. – P. 1485-1499. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження в складі робочої групи, статистичний аналіз та інтерпретацію отриманих результатів, прийнято участь у написанні статті).*
8. Portnichenko G.V. Cholesterol-rich diet induced improvement of hemodynamic system indices in SHR / Portnichenko G.V., Goncharov S.V., Stroy D.O., Dosenko V.E. // Фізіологічний журнал. – 2019. – 65, №2. – С. 68-75. *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, аналіз отриманих результатів, написано статтю).*

які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Портніченко Г.В. Зміни обміну ліпідів та експресії регуляторних білків при впливі високогірної гіпоксії / Портніченко Г.В., Бічекуєва Ф.Х., Бакуновський О.М., Портніченко А.Г., Портніченко В.І. // VI Національний конгрес патофізіологів України з міжнародною участю, Сімферополь-Місхор, 3-5 жовтня 2012 р. – Таврійський мед.-біол. вісник, 2012. – Т.15, №3, ч.2. – С. 370.
2. Portnichenko H.V. P476 SREBF1, SREBF2 and their target genes expression is different in Wistar and SHR rats under high cholesterol treatment conditions / Portnichenko H.V, Goncharov S.V., Tumanovska L.V , Stroy D.O., Moibenko O.S., Kuzmenko M.O., Moibenko O.O., Dosenko V.E. // Cardiovascular research. – 2014. - 103 (suppl_1). – P. S87.
3. Goncharov S. Hypotensive effect of quercetin is possibly mediated by down-regulation of immunotropeasome subunits in aorta of spontaneously hypertensive rats / Goncharov S., Portnichenko G.V., Tumanovska L.V., Goshovska Y.V., Lapikova-Bryhinska T.U., Nagibin V.S., Dosenko V.E.. // Cardiovascular Research. – 2016.- 111. – P. S114.
4. Goncharov S. Quercetin prevents cardiac hypertrophy, fibrosis and lipidosis in spontaneously hypertensive rats and inhibits proteasomal activity / Goncharov S., Portnichenko G., Tumanovska L., Goshovska Y., Dosenko V. // Acta Physiologica. - 2016. – 217. P. 36-37.
5. Портніченко А.Г. Молекулярні механізми розвитку та попередження патологічних процесів у серцево-судинній системі та їх вікові особливості / Портніченко А.Г., Лапікова-Бригінська Т.Ю., Портніченко Г.В., Гончаров

- С.В., Василенко М.І., Гарматіна О.Ю., Запара Ю.О., Гур'янова В.Л., Мойбенко О.О. // Тези доп. VII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції», присвяченого пам'яті академіка НАНУ О.О. Мойбенка, 5-7 жовтня 2016 р., Харків. – Вид НФАУ, 2016. – С. 184.
6. Portnychenko A. Rebuilding of carbohydrate and lipid metabolism under hypoxia: regularities and therapeutic possibilities / Portnychenko A., Portnichenko V., Lapikova-Bryhinska T., Nosar V., Vasylenko M., Portnichenko H. Abstr. VI Chronic Hypoxia Symposium, Oct 10 - 16, 2016, La Paz, Bolivia. – Wilderness and Environmental Medicine. – 2017. - V 28, Issue 1. - P. e3.
 7. Goncharov S. Effect of cholesterol diet and corvutin at cardiohemodynamics and expression of H2S-synthesizing enzymes genes in aorta of spontaneously hypertensive rats / Goncharov S., Goshovska Y., Portnichenko G., Tumanovska L., Dosenko V., Sagach V. // European Journal Of Clinical Investigation. – 2017. – 47. – P. 130.
 8. Portnychenko A. P1593 Hypoxic preconditioning and metabolic rebuilding in heart ventricles of diabetic rats / Portnychenko A., Vasylenko M., Lapikova-Bryhinska T., Kolcheva M., Portnichenko H., Babicheva V., Ponomaryova I., Portnichenko V. // ESC Congress 2017, 26-30 Aug 2017, Barcelona, Spain. European Heart Journal. - 2017. – 38 (suppl 1). – P. ehx502.P1593.
 9. Портніченко А.Г. Молекулярні механізми фенотипової перебудови тканин при гіпоксії та їх вікові особливості / Портніченко А.Г., Василенко М.І., Бабічева В.В., Лапікова-Бригінська Т.Ю., Гур'янова В.Л., Портніченко Г.В., Розова К.В., Портніченко В.І. // Вікові та хронобіологічні аспекти медицини і фармації. Матер. наук.-практ. конф. з міжн. участю, Чернівці, 4-5 жовтня 2018 р. – Чернівці, БДМУ, 2018. - С. 90-91.

АНОТАЦІЯ

Портніченко Г.В. Участь стеролрегуляторних білків (SREBP) у регуляції морфофункціонального стану серцево-судинної системи гіпертензивних щурів за умов високохолестеринової дієти - Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.13 «Фізіологія людини і тварин» - Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця, НАН України, Київ, 2019.

Дисертація присвячена дослідженням сполученого впливу артеріальної гіпертензії та високохолестеринової дієти на функцію та структуру серцево-судинної системи, зокрема серця і великих судин, а також на ліпідний метаболізм та експресію одного з ключових регуляторів синтезу вільних жирних кислот та холестерину в клітині - білків, що здатні зв'язувати

стеролрегуляторні елементи (SREBP). Вперше досліджено вплив високохолестеринової дієти за умов артеріальної гіпертензії порівняно з впливом кожного з цих факторів окремо. Вперше охарактеризовано розвиток початкових стадій атерогенетичних змін в стінці аорти щурів. За допомогою мікрокатетеризації лівого шлуночка серця показано зміни функціонування серцево-судинної системи під впливом гіперхолестеринемії та артеріальної гіпертензії. Визначення рівня ліпопротеїдів крові показало зміни нормального стану ліпідного метаболізму за впливу високохолестеринової дієти, що були, однак, менш вираженими за умов артеріальної гіпертензії. Окремою ланкою було дослідження генетичних механізмів регуляції ліпідного обміну за допомогою ПЛР у реальному часі, яке встановило зміни експресії ключових регуляторів синтезу жирних кислот та холестерину в клітині *SREBF1* і *SREBF2*, а також експресії їх генів-мішеней *Insig1* та *HMGCoAr*. Отримані дані свідчать про порушення нормальної регуляції генезу ліпідів в клітинах за умов поєданого впливу артеріальної гіпертензії та гіперхолестеринемії, як в серцево-судинній системі, так і в клітинах печінки, а також є свідченням розладу між процесами споживання й синтезу ліпідів *de novo*, як однієї з провідних ланок порушень ліпідного метаболізму. Гістологічні та ультраструктурні дослідження тканин серця й судин свідчать про характерні для артеріальної гіпертензії зміни в ультраструктурі тканин стінки аорти, що значно погіршилися внаслідок розладів ліпідного метаболізму, і демонструють картину, характерну для початкових стадій атерогенезу. Таким чином, вперше показано, що спільний вплив високохолестеринової дієти та артеріальної гіпертензії є взаємопов'язаним щодо дії на регуляторні механізми, що створює передумови для більш виражених розладів, характерних для метаболічного синдрому.

Ключові слова: SREBP, ліпідний обмін, артеріальна гіпертензія, високохолестеринова дієта, серцево-судинна система

АННОТАЦІЯ

Портниченко Г.В. Участие стеролрегуляторных белков (SREBP) в регуляции морфофункционального состояния сердечно-сосудистой системы гипертензивных крыс в условиях высокохолестериновой диеты - Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 03.00.13 «Физиология человека и животных» - Институт физиологии им. Богомольца, НАН Украины, Киев, 2019.

Диссертация посвящена исследованию сопряженного воздействия гипертензии и высокохолестериновой диеты на функцию и структуру сердечно-сосудистой системы, в частности сердца и крупных сосудов, а также на липидный метаболизм и экспрессию одного из ключевых регуляторов синтеза свободных жирных кислот и холестерина в клетке - белков, способных связывать стеролрегуляторные элементы (SREBP). Впервые исследовано влияние высокохолестериновой диеты в условиях гипертензии по сравнению с действием каждого из этих факторов по отдельности. Впервые охарактеризовано развитие начальных стадий атерогенетических изменений в стенке аорты крыс. С помощью микрокатетеризации левого желудочка сердца показаны изменения функционирования сердечно-сосудистой системы под влиянием гиперхолестеринемии и артериальной гипертензии. Определение уровня липопротеидов крови показало изменения нормального состояния липидного метаболизма при воздействии высокохолестериновой диеты, которые были, однако, менее выраженными в условиях гипертензии. Отдельным звеном было исследование генетических механизмов регуляции липидного обмена с помощью ПЦР в реальном времени, которое установило изменения экспрессии ключевых регуляторов синтеза жирных кислот и холестерина в клетке *SREBF1* и *SREBF2*, а также экспрессии их генов-мишеней *Insig1* и *HMGcoAr*. Полученные данные свидетельствуют о нарушении нормальной регуляции геноза липидов в клетках в условиях совместного воздействия гипертензии и гиперхолестеринемии, как в сердечно-сосудистой системе, так и в клетках печени, а также является свидетельством дисбаланса между процессами потребления и синтеза липидов *de novo*, как одного из ведущих звеньев нарушений липидного метаболизма. Гистологические и ультраструктурные исследования тканей сердца и сосудов свидетельствуют о характерных для гипертензии изменениях в ультраструктуре тканей стенки аорты, которые значительно ухудшились вследствие нарушений липидного метаболизма, и демонстрируют картину, характерную для начальных стадий атерогенеза. Таким образом, впервые показано, что совместное воздействие высокохолестериновой диеты и артериальной гипертензии является взаимосвязанным по действию на регуляторные механизмы, что создает предпосылки для более выраженных расстройств, характерных для метаболического синдрома.

Ключевые слова: SREBP, липидный обмен, артериальная гипертензия, высокохолестериновая диета, сердечно-сосудистая система

SUMMARY

Portnichenko G.V. The participation of sterol-regulatory proteins (SREBP) in regulation of morphofunctional state of cardiovascular system in hypertensive rats under high cholesterol diet. - The dissertation for the degree of a Candidate of Biological Sciences (PhD) in the specialty 03.00.13 "Human and animal physiology" – Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv, 2019.

The dissertation is aimed to the study of the combined effect of hypertension and high cholesterol diet on the function and structure of the cardiovascular system, in particular of the heart and large vessels, as well as lipid metabolism and expression of the sterol regulatory elements (SREBP) - one of the key regulators of free fatty acids and cholesterol synthesis in the cell. For the first time, the effect of a high cholesterol diet under hypertension was investigated in comparison with the influence of each of these factors separately. The development of the initial stages of atherogenic changes in the wall of the aorta of rats is described for the first time. The microcatheterization of the left ventricle of the heart showed changes in the functioning of the cardiovascular system under the influence of hypercholesterolemia and arterial hypertension. Determination of blood lipoprotein levels showed changes in the normal state of lipid metabolism due to the effect of a high cholesterol diet that was, however, less pronounced under hypertension. Another part of the work was the study of genetic mechanisms of lipid metabolism regulation using real-time PCR, which established changes in the expression of key regulators of the synthesis of fatty acids and cholesterol in the cell *SREBF1* and *SREBF2*, as well as the expression of their target genes *Insig1* and *HMGCoAr*. The obtained data indicate a violation of the lipids genesis normal regulation in cells under the combined effect of hypertension and hypercholesterolemia conditions, both in the cardiovascular system and in liver cells, and also testifies to the disorder between the processes of consumption and synthesis of lipids *de novo*, as one of the leading links of lipid metabolism disorders. Histological and ultrastructural studies of the tissues of the heart and blood vessels showed hypertensive-induced changes in the ultrastructure of the aortic walls, which have significantly deteriorated due to disorders of the lipid metabolism, and show a pattern typical of the atherogenesis initial stages. Thus, it has been shown for the first time that the combined effect of a high cholesterol diet and arterial hypertension is interrelated due to action on regulatory mechanisms, which creates the preconditions for more severe disorders specific for metabolic syndrome.

Key words: SREBP, lipid metabolism, arterial hypertension, high cholesterol diet, cardiovascular system

СПИСОК СКОРОЧЕНЬ

HMGCoAr (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase) - 3-гідрокси-3-метилглутарил-коензим А-редуктаза

Insig – інсулін-індукований ген

SHR – спонтанно-гіпертензивні щури

SREBF – ген, що кодує білок SREBP

SREBP (sterol regulatory element-binding protein) – білок, що зв'язується зі стеролрегуляторним елементом

ЛПВЩ – ліпопротеїди високої щільності

ЛПНЩ – ліпопротеїди низької щільності

ХОК – хвилинний об'єм крові