

МЕДИЦИНА

УДК 612.084

М. В. КОВАЛЕВА, В. Ю. АФОНИН

ОСОБЕННОСТИ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КРЫС ЛИНИИ SHR В УСЛОВИЯХ ГЕНЕТИЧЕСКИ ОБУСЛОВЛЕННОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ*(Представлено членом-корреспондентом С. А. Усановым)*

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск

Поступило 08.09.2014

Введение. Процесс гипертрофии сердца лежит в основе развития сердечно-сосудистых осложнений и приводит к коронарному синдрому, инфаркту миокарда, сердечной недостаточности и внезапной смерти. Установлено, что в 15–20 % случаев патологическое увеличение массы сердца развивается в условиях генетически обусловленной артериальной гипертензии [1]. Создание экспериментальной модели гипертрофии миокарда на животных является важной задачей для изучения механизма развития патологии сердечно-сосудистой системы.

Спонтанно гипертензивные крысы (линия SHR) являются патологической моделью в условиях высокого артериального давления. В свою очередь, Wistar-Kyoto крысы (линия WKY) представляют собой модель контроля для крыс линии SHR в условиях нормального артериального давления [2].

Согласно литературным данным, у крыс линии SHR увеличивается артериальное давление [3], соотношение массы миокарда к массе тела, наблюдается нарушение окислительного фосфорилирования в митохондриях, гиперактивация ренин-ангиотензин-альдостероновой системы по сравнению с крысами линии WKY [4]. Изменения в органах и тканях могут регистрироваться с использованием морфологических, ферментных, цитогенетических, гематологических показателей [5].

Таким образом, комплексная оценка животных с гипертрофией миокарда в условиях генетически обусловленной артериальной гипертензии является важной и актуальной проблемой.

Цель исследования – провести сравнительную оценку морфологических и биохимических показателей у крыс линий WKY и SHR в условиях генетически обусловленной артериальной гипертензии для создания экспериментальной модели гипертрофии миокарда.

Материалы и методы исследования. Для моделирования генетически обусловленной артериальной гипертензии использовали 16 (22 недели) и 5 (20 недель) белых крыс-самцов линии SHR. Крысы линии WKY в количестве 5 шт (20 недель) были контрольной группой.

Развитие гипертрофии миокарда оценивали путем измерения веса тела, сердца, относительного коэффициента массы сердца.

Проводили контроль ферментных, цитогенетических, гематологических показателей:

измеряли активность ферментов энергетического обмена в сыворотке крови: аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), креатинкиназы (КФК), креатинкиназы сердечной мышцы (КФК-МБ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ), лактатдегидрогеназы сердечной мышцы (ЛДГ-1). Использовали наборы LiquickCor, Cormay и измерения проводили на биохимическом анализаторе (Hitachi 902 ISE Hitachi Science Systems Ltd, Rochediagnostics Gmth);

анализировали количество клеток с ДНК-повреждениями, распределение клеток по фазам клеточного цикла. Анализ ДНК проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США);

оценивали количество лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов, гранулоцитов. Для оценки гематологических показателей кровь добавляли к изотоническому раствору HC-Diluent (Human GmbH, Германия) и оценивали на автоматизированном гематологическом анализаторе (Hema-count, Германия). Декапитацию крыс и забор биологического материала проводили в возрасте 20 и 22 недели.

Статистическую обработку проводили с использованием пакета анализа данных Excel и Statistica 8.0 непараметрическими методами с использованием критериев Краскела–Уоллиса, Манна–Уитни и коэффициента парной корреляции. Результаты представлены как среднее арифметическое значение плюс/минус стандартная ошибка среднего для выборки.

Результаты и их обсуждение. В ходе исследования было установлено, что у крыс линии SHR в возрасте 20 и 22 недель по сравнению с крысами WKY масса почек, сердца, относительный коэффициент массы почек статистически значимо не изменялись ($p = 0,076$, $p = 0,401$, $p = 0,251$ и $p = 0,081$, $p = 0,142$, $p = 0,395$ соответственно). Наблюдалась тенденция к снижению массы тела у крыс линии SHR в возрасте 20 недель, которая достигла статистической значимости для крыс в возрасте 22 недель по сравнению с крысами линии WKY ($p = 0,171$ и $p < 0,001$ соответственно). Достоверно увеличивался относительный коэффициент массы сердца у крыс линии SHR в возрасте 20 и 22 недель по сравнению с крысами WKY ($p = 0,016$ и $p = 0,008$ соответственно). Полученные результаты подтверждают литературные данные о развитии гипертрофии сердца у крыс линии SHR по сравнению с крысами линии WKY [6] путем увеличения показателя относительного коэффициента массы сердца. Результаты оценки морфологических показателей представлены в табл. 1.

Таблица 1. Оценка морфологических признаков крыс линий SHR и WKY

Линия крыс	Возраст, нед.	Масса тела, г	Масса сердца, г	ОКМ сердца	Масса почек, г	ОКМ почек
SHR	22	284,0 ± 5,3*	1,19 ± 0,03	4,18 ± 0,08*	2,32 ± 0,11	8,13 ± 0,27
SHR	20	330 ± 5,7	1,34 ± 0,03	4,05 ± 0,06*	2,44 ± 0,11	7,40 ± 0,36
WKY	20	348 ± 12	1,32 ± 0,04	3,74 ± 0,07	2,63 ± 0,08	7,58 ± 0,09

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой крыс WKY, критерий Краскела–Уоллиса и Манна–Уитни.

Набор ферментов энергетического обмена, используемый в нашем исследовании, отражает функциональное состояние миокарда [4]. Результаты определения ферментных показателей в сыворотке крови крыс представлены в табл. 2.

Таблица 2. Оценка ферментных показателей у крыс линий SHR и WKY

Линия крыс	Возраст, нед.	АСТ	АЛТ	АСТ/АЛТ	ЛДГ	ЛДГ-1	КФК	КФК-МБ
SHR	22	288,9 ± 17,3**	86,2 ± 2,9**	3,3 ± 0,10	1897 ± 154*	770,3 ± 54*	6015 ± 651	1958 ± 211*
SHR	20	323,5 ± 17,3*	64,8 ± 2,6	5,04 ± 0,41*	1739 ± 141*	818,9 ± 59*	6624 ± 859	1116 ± 134
WKY	20	226,4 ± 27,3	71,9 ± 4,5	3,11 ± 0,23	749,8 ± 126	412,6 ± 60	4296 ± 100	942 ± 209

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой крыс WKY, критерий Краскела–Уоллиса и Манна–Уитни; ** – $p < 0,05$ по сравнению с группой крыс WKY, коэффициент парной корреляции.

Концентрации ферментов энергетического обмена повышаются в плазме крови при цитолизе кардиомиоцитов [7]. Оценка данных показателей является маркером развития процесса гипертрофии миокарда.

В исследовании группы ферментов АСТ, АЛТ было установлено, что у крыс линии SHR в возрасте 20 недель по сравнению с крысами WKY активность АСТ, отношение АСТ/АЛТ статистически значимо увеличивалось при отсутствии достоверных различий показателя АЛТ ($p = 0,028$, $p = 0,009$, $p = 0,175$ соответственно). Наблюдалась тенденция к увеличению АСТ, АЛТ и отношению АСТ/АЛТ у крыс линии SHR в возрасте 22 недель по сравнению с крысами WKY ($p = 0,11$, $p = 0,053$, $p = 0,395$ соответственно). Была установлена статистически значимая связь между показателями АСТ, АЛТ линий крыс SHR и WKY ($r = -0,4$, $p = 0,043$ и $r = -0,5$, $p = 0,028$).

Уровни ЛДГ, ЛДГ-1 у животных линии SHR в возрасте 20 и 22 недель по сравнению с WKY статистически значимо были выше ($p = 0,009$, $p = 0,009$ и $p < 0,001$, $p = 0,004$ соответственно).

Увеличение концентрации ЛДГ, ЛДГ-1 и АСТ в плазме крови наблюдается при запуске анаэробного метаболического пути в условиях гипоксии и при усилении интенсивности окислительного фосфорилирования соответственно, которые происходят в условиях гипертрофии [7].

Наблюдалась тенденция к увеличению уровней КФК, КФК-МБ у крыс линии SHR в возрасте 20 и 22 недель по сравнению с крысами WKY, которая достигла статистической значимости для показателя КФК-МБ крыс линии SHR в возрасте 22 недель ($p = 0,343$, $p = 0,548$ и $p = 0,327$, $p = 0,025$ соответственно). Данные ферменты отвечают за энергетическое обеспечение клеток сердца и регулируют содержание глюкозы в плазме крови, интенсификацию углеводного обмена. Увеличение КФК и КФК-МБ свидетельствует об увеличении энергетической потребности клеток сердца в условиях генетически обусловленной артериальной гипертензии [7]. Таким образом, у крыс линии SHR увеличиваются уровни АСТ, ЛДГ, ЛДГ1 и КФК, КФК-МБ по сравнению с крысами линии WKY.

В условиях артериальной гипертензии происходит активация ангиотензина II и генерирование активных форм кислорода, которые вызывают повреждения клеток и ДНК. При цито-, ДНК-повреждении активация процессов клеточного деления вызывает развитие пролиферативных процессов и фиброза или клеточной гибели. Происходит снижение количества клеток в G0/G1 фазе и увеличивается количество клеток в S+G2/M фазе клеточного цикла [8], нарастает уровень ДНК-повреждений в клетках почек с их дальнейшей реализацией в микроядра [9]. В данных условиях можно предположить развитие дефицита субпопуляций стволовых и слабо дифференцированных клеток при клеточной репарации не только в сердечно-сосудистой системе, но и других органах и тканях, что приводит к ускорению процессов старения и гибели.

Результаты исследования цитогенетических показателей крыс линий SHR и WKY представлены в табл. 3.

Таблица 3. Оценка цитогенетических показателей крыс линий SHR и WKY

Линия крыс	Возраст, нед.	ДНК повреждения, %	G0/G1, %	S, %	S+G2/M, %
SHR	22	14,27 ± 1,27*	94,1 ± 0,6*	4,7 ± 0,8*	5,1 ± 0,78*
SHR	20	4,65 ± 0,66	98,4 ± 0,23	1,04 ± 0,28	1,63 ± 0,23
WKY	20	4,18 ± 0,87	97,2 ± 0,7	0,67 ± 0,19	2,83 ± 0,70

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с группой крыс WKY, критерий Краскела–Уоллиса и Манна–Уитни.

В периферической крови у крыс линии SHR в возрасте 20 недель по сравнению с крысами WKY отсутствуют статистически значимые изменения цитогенетических показателей.

Наблюдается тенденция к увеличению клеток с ДНК-повреждениями, накоплению клеток в фазах G0/G1 (фаза начального роста) и S клеточного цикла и снижению количества клеток в фазе S+G2/M клеточного цикла, которая не достигает статистической значимости у крыс линии SHR в возрасте 20 недель по сравнению с крысами WKY ($p = 0,465$, $p = 0,175$, $p = 0,465$, $p = 0,175$ соответственно). Было установлено достоверное увеличение клеток с ДНК-повреждениями, накопление клеток в фазах S и S+G2/M клеточного цикла и снижение количества клеток в фазе G0/G1 клеточного цикла у крыс линии SHR в возрасте 22 недель по сравнению с крысами WKY ($p = 0,001$, $p = 0,003$, $p = 0,011$, $p = 0,000$ соответственно). Накопление клеток в S+G2/M-фазе клеточного цикла является показателем подготовки к делению клеток [10], а также возможного их ареста в случае повреждений ДНК. Таким образом, у крыс линии SHR увеличивается количество клеток в S, S+G2/M-фазе клеточного цикла, накопление клеток с ДНК-повреждениями по сравнению с крысами линии WKY.

Результаты исследования гематологических показателей периферической крови крыс линий SHR и WKY представлены в табл. 4.

Таблица 4. Оценка гематологических показателей у крыс линий SHR и WKY

Линия крыс	Возраст, нед.	Количество лейкоцитов, 10 ⁹ /л	Количество лимфоцитов, %	Количество лимфоцитов, 10 ⁹ /л	Количество моноцитов, %	Количество моноцитов, 10 ⁹ /л	Количество гранулоцитов, %	Количество гранулоцитов, 10 ⁹ /л
SHR	22	10,7 ± 0,7***	65,3 ± 2,2	6,9 ± 0,5***	5,7 ± 0,7	0,58 ± 0,06	29,0 ± 2,5	3,2 ± 0,4
SHR	20	14,6 ± 1,1	67,3 ± 4,1	9,93 ± 1,1	5,94 ± 1,82	0,79 ± 0,18	26,8 ± 3,5	3,96 ± 0,69
WKY	20	14,0 ± 0,5	70,1 ± 1,9	5,96 ± 1,98	9,8 ± 0,5	0,84 ± 0,28	23,9 ± 1,1	3,35 ± 0,18

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с группой крыс WKY, критерий Краскела–Уоллиса и Манна–Уитни; ** – $p < 0,05$ по сравнению с группой крыс SHR в возрасте 20 недель, критерий Краскела–Уоллиса и Манна–Уитни.

В ходе исследования у крыс линии SHR в возрасте 20 недель по сравнению с крысами WKY отсутствуют статистически значимые изменения лейкоцитарных показателей.

Наблюдается тенденция к увеличению абсолютного числа лимфоцитов, относительного и абсолютного числа гранулоцитов, и снижению относительного и абсолютного числа моноцитов, которая не достигает статистической значимости у крыс линии SHR в возрасте 20 недель по сравнению с крысами WKY ($p = 0,602$, $p = 0,754$, $p = 0,602$, $p = 0,675$, $p = 0,602$ соответственно).

Было установлено достоверное снижение числа лейкоцитов и увеличение абсолютного числа лимфоцитов у крыс линии SHR в возрасте 22 недель по сравнению с крысами линии SHR в возрасте 20 недель и WKY ($p = 0,020$, $p = 0,020$ и $p = 0,020$, $p = 0,005$ соответственно). Установлено влияние клеток иммунной системы на развитие и поддержание артериальной гипертензии у крыс линии SHR [11]. В исследованиях наблюдается снижение пролиферации лейкоцитов и лимфоцитов у крыс SHR с возрастом в результате гиперактивации симпатической нервной системы в условиях развития артериальной гипертензии [12]. Кроме того, в результате нарушения окислительного баланса происходит усиление апоптоза лимфоцитов [13]. С другой стороны, окислительный стресс вызывает активацию регенерации гематопозитических клеток со сдвигом в сторону увеличения числа гранулоцитов, лимфоцитов [14].

Заключение. Таким образом, при сравнении морфологических, биохимических показателей у крыс линии SHR и WKY установлено, что крысы линии SHR в возрасте 20–22 недель могут быть использованы в качестве модели гипертрофии миокарда в условиях генетически обусловленной артериальной гипертензии. Наблюдалось увеличение относительного коэффициента массы сердца, активности ферментов окислительного фосфорилирования, пролиферации и гибели клеток, изменению соотношения гематологических клеток.

Литература

1. Soesanto W. // J. Hypertension. 2009. Vol. 54, N 6. P. 1321–1327.
2. Tran E. D. // J. Vasc Res. 2010. N 47. P. 423–431.
3. Conde M. V. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2011. Vol. 3, N 301. P. H1153–H1165.
4. Peng H. // J. Circulation. 2005. N 112. P. 2436–2445.
5. Kolwicz St. C. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2009. N 297. P. H1361–H1368.
6. Послый И. М. Принципы анализа ферментемии. М., 2003. С. 75.
7. Ashwell S. // J. Clin. Cancer Res. 2008. N 14. P. 4032–4037.
8. Chen R. // J. of Southern Medical University 2007. Vol. 27, N 2. P. 1806–1809.
9. Аникин В. В. // Российский кардиол. журн. 2001. № 6. С. 11–16.
10. Schmid U. // J. Cancer Res. 2008. N 68. P. 9239–9246.
11. Fannon L. D. // J. Hypertens. 1992. Vol. 10, N 7. P. 629–634.
12. Pursell E. S. // J. The Anatomical record. 1993. N 273. P. 236–242.
13. Kobayashi N. // J. Free radical biology and medicine. 2006. N 41. P. 484–492.
14. Schmid-Schonbein G. W. // J. Hypertension. 1991. Vol. 17, N 3. P. 323–330.

M. V. KAVALEVA, V. Yu. AFONIN

vengeria@tut.by

SPECIFIC FEATURES OF PHYSIOLOGICAL-BIOLOGICAL PROPERTIES OF SHR RATS IN GENETICALLY DETERMINATE ARTERIAL HYPERTENSION

Summary

Morphological, biochemical indices of the 20–22 weeks-old WKY and SHR rats were studied to get the model of heart hypertrophy in genetically determinate arterial hypertension. In the research we got the model of heart hypertrophy in genetically determinate arterial hypertension. It was found that heart mass index, oxidative phosphorylation enzymes, DNA injury increased and hematological changes were found in SHR rats as compared with WKY rats.