

УДК 616.12-008.331.1:616-008.81-008.852]-092.4-092.9

ТРОМБОЦИТЫ У КРЫС ЛИНИИ SHR В РАЗЛИЧНЫЕ ПЕРИОДЫ ФОРМИРОВАНИЯ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

Сидехменова А.В., Алиев О.И., Анищенко А.М., Шаманаев А.Ю., Федорова Е.П.

*Лаборатория фармакологии кровообращения ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга», Томск,
e-mail: sidehmenova@yandex.ru*

Подъем артериального давления у крыс линии SHR в период с 5-й по 12-ю недели жизни происходил в два этапа: в период с 5-й по 6-ю недели и в период с 8-й по 9-ю недели. По количеству тромбоцитов и уровню тромбоцита между крысами SHR и WKY в данном возрастном периоде достоверных различий выявлено не было. На первом этапе подъема артериального давления у крыс линии SHR статистически значимо повышался показатель анизоцитоза тромбоцитов по сравнению с крысами линии WKY. Начиная со второго периода повышения артериального давления наряду с высоким уровнем анизоцитоза тромбоцитов у крыс линии SHR также наблюдалось увеличение среднего объема тромбоцитов по сравнению с данным показателем у крыс линии WKY. Полученные результаты показывают, что изменение морфологических параметров, отражающих функциональную активность тромбоцитов связано с этапами повышения артериального давления.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, крысы SHR, крысы WKY, артериальное давление, тромбоциты

PLATELETS IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS IN DIFFERENT PERIODS OF ARTERIAL HYPERTENSION FORMING

Sidekhmenova A.V., Aliev O.I., Anishhenko A.M., Shamanaev A.Y., Fedorova E.P.

Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine named after E.D. Goldberg», Tomsk, e-mail: sidehmenova@yandex.ru

The increase of blood pressure in SHR during the period from the 5th to the 12th week of life took place in two stages: in the periods from 5th to 6th week and from 8th to 9th week. By the number of platelets and level thrombocrit between SHR and WKY strain in this age period no significant differences were found. In the first stage of blood pressure rise in SHR significantly increased platelet anisocytosis index compared to rats WKY was identified. In the second stage of blood pressure rise mean platelet volume appeared in addition to platelet anisocytosis in SHR. The results show that the change in morphological parameters reflecting the functional activity of the platelets is associated with stages of blood pressure elevation.

Keywords: hypertension, rats SHR, rats WKY, blood pressure, platelets

По данным ВОЗ, осложнения артериальной гипертензии вызывают 9,4 млн смертельных случаев в мире ежегодно [2]. При этом нарушения функции тромбоцитов служит причиной тромботических осложнений, связанных с гипертензией [3, 6].

Крысы линии SHR являются адекватной экспериментальной моделью для изучения механизмов формирования артериальной гипертензии и поиска новых лекарственных средств ее коррекции [1, 5]. Анализ литературы показал, что в настоящее время отсутствуют исследования, в которых изучена последовательная динамика изменения количественных показателей тромбоцитов у крыс с артериальной гипертензией по сравнению с нормотензивными животными от начала возрастания артериального давления до развития стойкой артериальной гипертензии.

В связи с этим целью нашего исследования являлось изучение количественных показателей и морфологических параметров тромбоцитов у линии SHR последовательно в процессе формирования артериальной гипертензии.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проведены на 40 крысах-самцах линии SHR (spontaneously hypertensive rats) и 40 крысах-самцах линии Wistar-Kyoto (WKY) категории SPF, полученных из вивария ИБХ РАН, г. Пушкино (Сертификат здоровья животных от 04.09.2014). В виварии НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга животные содержались в неполной барьерной системе при следующих параметрах окружающей среды: температура — $+22 \pm 2^\circ\text{C}$, относительная влажность — $50 \pm 20\%$, воздухообмен 12–15 объемов помещения в час, световой режим — 12:12 ч. Содержание животных и уход за ними осуществлялись в соответствии с правилами, изложенными в Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986). Протокол исследования утвержден комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга (протокол № 72052014). Животные каждой линии были разделены по возрасту на 8 возрастных групп, соответствующих 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 неделям жизни, по 5 крыс в каждой группе.

Артериальное давление (АД) у крыс регистрировали неинвазивным методом на хвосте с помощью системы измерения артериального давления у мелких животных NIBP200A («Biorac Systems, Inc.», США). Данная система предназначена для измерения АД в реальном времени у бодрствующих животных. Запись и обработ-

ка данных производилась на компьютере с помощью программы «AcqKnowledge 4.2 for MP150».

Общее количество тромбоцитов (PLT, $10^9/\text{л}$ крови), средний объем тромбоцитов (MPV, fl) показатель анизоцитоза тромбоцитов (PDW) и тромбоцит (PCT) определяли с помощью автоматического гематологического анализатора «Mythic vet 18» (PZ CORMAY S.A.). Кровь забирали из насечек на хвосте в капиллярные пробирки «Microvette Sarstedt» (Германия) с K_2EDTA .

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета статистических программ «Statistica 8.0». Данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m – стандартная ошибка среднего значения. Для оценки достоверности межгрупповых различий использовали непараметрические критерии Краскела-Уоллиса и Манна-Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение

АД у крыс линии WKY в период с 5-й по 12-ю недели жизни оставалось стабильным: средние значения систолического артериального давления (САД) в эти сроки составляло 126 ± 2 мм рт. ст., диастолического артериального давления (ДАД) – 95 ± 2 мм рт. ст. Наблюдаемые в течение данного временного периода колебания АД не являлись значимыми, что подтверждается результатами статистического анализа ($p = 0,08$) (рисунок).

У крыс линии SHR была выявлена этапность формирования артериальной гипертензии. У 5-недельных крыс линии SHR АД не отличалось от показателей крыс WKY того же возраста. Начиная с 6-й недели жизни, наблюдалось увеличение АД у крыс линии SHR по сравнению с нормотензивными животными. Вместе с тем между 6 и 8 неделями жизни у крыс SHR, несмотря на повышенные величины АД, оно оставалось стабильным, что подтверждается отсутствием достоверных различий в этот период ($p = 0,25$). Среднее значение САД составляло 162 ± 3 мм рт. ст., ДАД – 133 ± 2 мм рт. ст. Начиная с 9-й недели жизни у крыс SHR наблюдалось прогрессивное повышение АД. К 12-й неделе жизни величина САД составляла 211 ± 7 мм рт. ст., ДАД – 171 ± 6 мм рт. ст.

Таким образом, подъем артериального давления у крыс линии SHR наблюдался с 6-й недели жизни и до конца исследования и происходил не монотонно, а ступенчато. Мониторинг артериального давления с 5-й по 12-ю неделю жизни у животных линии SHR позволил выделить два этапа повышения артериального давления: с 5-й по 6-ю неделю и с 9-й по 10-ю неделю.

В течение всего периода наблюдения общее количество тромбоцитов крови у крыс линии SHR статистически значимо не отличалось от значений у крыс линии WKY за исключением 9 недели (таблица). Тромбоцит у животных линии SHR достоверно не от-

личался от значений у крыс WKY в течение всего периода исследования. На 5-ю неделю жизни показатель анизоцитоза тромбоцитов у животных линии SHR и крыс линии WKY достоверно не отличался. Начиная с 6-й недели и до конца всего периода исследования наблюдалось статистически значимое увеличение PDW на 21–67% у животных линии SHR по сравнению со значениями у крыс WKY. Повышение показателя анизоцитоза тромбоцитов у животных линии SHR совпадает с первым этапом возрастания артериального давления. Средний объем тромбоцитов у крыс линии SHR в период с 5-й по 8-ю недели жизни достоверно не отличался от значений у нормотензивных животных. С 9-й по 12-ю недели жизни было выявлено статистически значимое увеличение MPV у крыс линии SHR на 12–17% по сравнению с крысами линии WKY. Достоверное увеличение среднего объема тромбоцитов у спонтанно гипертензивных животных относительно нормотензивных крыс линии WKY совпадало со вторым этапом повышения артериального давления и сохранялось до конца исследования (9–12 недели).

Измерение среднего объема тромбоцитов и показателя анизоцитоза является простым и легким способом оценки функции тромбоцитов [4, 7, 8]. Повышение MCV свидетельствует о наличии в кровотоке крупных тромбоцитов. По сравнению с более мелкими клетками, крупные тромбоциты содержат больше гранул, активнее агрегируют [4, 7, 8]. Повышение показателя анизоцитоза тромбоцитов также связано с увеличением функциональной активности тромбоцитов. E. Vagdatli и соавторы [8] связывают увеличение PDW у пациентов, имеющих достоверно высокую агрегацию тромбоцитов, с образованием у активированных клеток псевдоподий и изменением их размеров.

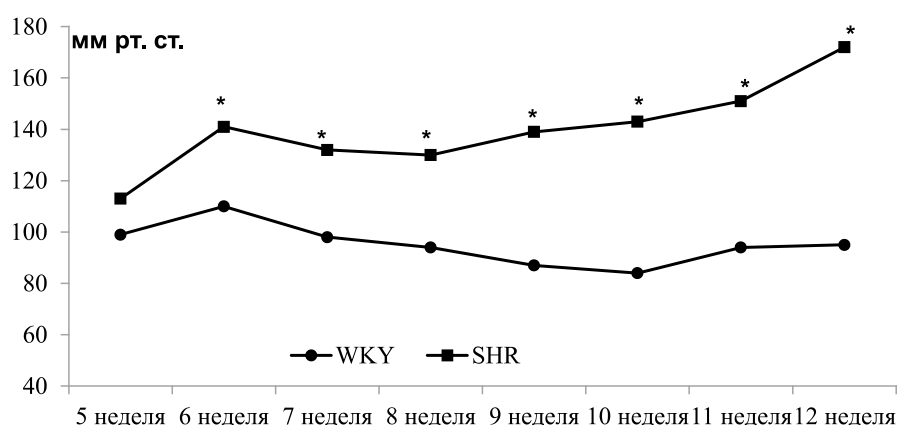
Таким образом, у крыс линии SHR выявлено, что изменение морфологических параметров, отражающих функциональную активность тромбоцитов связано с этапами повышения артериального давления. На первом этапе повышения артериального давления у крыс линии SHR наблюдалось увеличение показателя анизоцитоза тромбоцитов по сравнению с крысами WKY, что может свидетельствовать о появлении некоторого количества активированных тромбоцитов. Начиная со второго периода повышения артериального давления наряду с высоким уровнем анизоцитоза тромбоцитов у крыс линии SHR также происходило увеличение среднего объема тромбоцитов по сравнению с данным показателем у крыс линии WKY.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (соглашение № 14-25-00017).

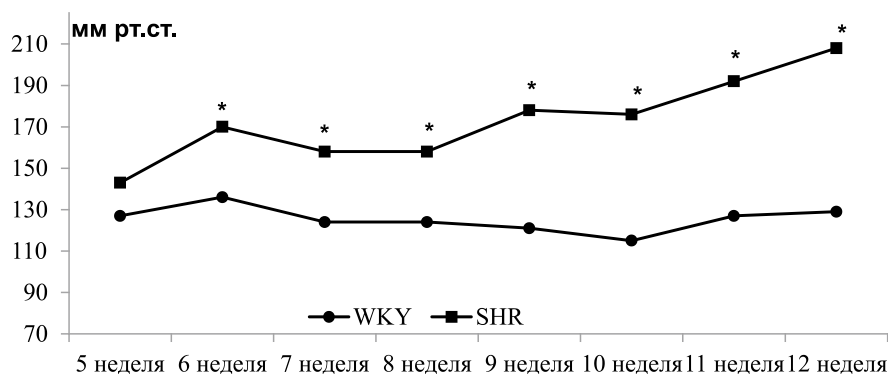
Динамика общего количества тромбоцитов (PLT, $10^9/\text{л}$ крови), тромбокрита (PCT), среднего объема тромбоцитов (MPV, fl) и показателя анизоцитоза тромбоцитов (PDW) у нормотензивных крыс линии WKY и спонтанно гипертензивных крыс линии SHR

Возраст	Группа	PLT, $10^9/\text{л}$ крови	PCT	MPV, fl	PDW
5-я неделя	WKY	$879,0 \pm 86,9$	$0,55 \pm 0,10$	$6,14 \pm 0,49$	$21,36 \pm 1,55$
	SHR	$765,6 \pm 81,6$	$0,50 \pm 0,08$	$6,80 \pm 0,29$	$26,50 \pm 2,23$
6-я неделя	WKY	$934,1 \pm 57,6$	$0,52 \pm 0,04$	$5,60 \pm 0,29$	$20,33 \pm 0,91$
	SHR	$960,7 \pm 37,7$	$0,54 \pm 0,02$	$5,64 \pm 0,07$	$24,56 \pm 0,90^*$
7-я неделя	WKY	$1058,8 \pm 70,8$	$0,57 \pm 0,04$	$6,99 \pm 0,36$	$16,85 \pm 1,00$
	SHR	$894,8 \pm 73,5$	$0,56 \pm 0,03$	$5,85 \pm 0,07$	$28,22 \pm 2,14^*$
8-я неделя	WKY	$885,2 \pm 33,9$	$0,54 \pm 0,04$	$6,01 \pm 0,24$	$19,01 \pm 1,02$
	SHR	$823,9 \pm 39,9$	$0,46 \pm 0,02$	$5,67 \pm 0,15$	$26,59 \pm 1,41^*$
9-я неделя	WKY	$815,5 \pm 24,26$	$0,44 \pm 0,01$	$5,38 \pm 0,10$	$23,38 \pm 0,58$
	SHR	$645,3 \pm 30,93^*$	$0,38 \pm 0,02$	$6,02 \pm 0,08^*$	$36,39 \pm 2,10^*$
10-я неделя	WKY	$844,1 \pm 65,6$	$0,43 \pm 0,03$	$5,09 \pm 0,05$	$25,92 \pm 1,14$
	SHR	$726,0 \pm 54,1$	$0,38 \pm 0,05$	$5,81 \pm 0,17^*$	$36,16 \pm 2,00^*$
11-я неделя	WKY	$861,7 \pm 62,1$	$0,43 \pm 0,03$	$4,98 \pm 0,03$	$25,35 \pm 0,86$
	SHR	$757,2 \pm 54,4$	$0,42 \pm 0,03$	$5,63 \pm 0,07^*$	$36,72 \pm 1,68^*$
12-я неделя	WKY	$763,5 \pm 42,8$	$0,41 \pm 0,02$	$5,25 \pm 0,11$	$25,89 \pm 2,11$
	SHR	$618,8 \pm 83,7$	$0,38 \pm 0,05$	$6,12 \pm 0,19^*$	$36,96 \pm 2,84^*$

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению со значениями у крыс линии WKY того же возраста.



А)



Б)

Систолическое (А) и диастолическое (Б) артериальное давление у нормотензивных крыс линии WKY и спонтанно гипертензивных крыс линии SHR в период с 5-й по 12-ю неделю.

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению со значениями у крыс линии WKY того же возраста

Список литературы

1. Мурашев А.Н. Оценка адекватности модели артериальной гипертензии на крысах для изучения гипотензивных лекарственных средств // Токс. вестн. – 2010. – № 5. – С. 36–41.

2. A global brief on Hypertension / WHO, 2013. – 40 p.

3. Alexandru N., Popov D., Georgescu A. Platelet dysfunction in vascular pathologies and how can it be treated // Thromb. Res. – 2012. – Vol. 129. – P. 116–126.

4. Briggs C. Quality counts: new parameters in blood cell counting // Jnl. Lab. Hem. – 2009. – Vol. 31. – P. 277–297

5. Bruschi G., Minari M., Bruschi M.E., Tacinelli L., Milani B., Cavatorta A., Borghetti A. Similarities of essential and spontaneous hypertension: volume and number of blood cells // Hypertens. – 1986. – Vol. 8. – P. 983–989.

6. El Haouari M., Rosado J.A. Platelet function in hypertension // Blood Cells Mol Dis. – 2009. – Vol. 42. – P. 38–43.

7. Park Y., Schoene N., Harris W. Mean platelet volume as an indicator of platelet activation: methodological issues // Platelets. – 2002. – Vol. 13. – P. 301–306.

8. Vagdatli E., Gounari E., Lazaridou E., Katsibourlia E., Tsikopoulou F., Labrianou I. Platelet distribution width: a simple, practical and specific marker of activation of coagulation // Hippokratia. – 2010. – Vol. 14, № 1. – P. 28–32.

References

1. Murashev A.N. Otsenka adekvatnosti modeli arterialnoy gipertonii na kryсах dlya izucheniya gipotenzivnykh lekarstvennykh sredstv // Toks. vestn. 2010. no. 5. pp. 36–41.

2. A global brief on Hypertension / WHO, 2013. 40 p.

3. Alexandru N., Popov D., Georgescu A. Platelet dysfunction in vascular pathologies and how can it be treated // Thromb. Res. 2012. Vol. 129. pp. 116–126.

4. Briggs C. Quality counts: new parameters in blood cell counting // Jnl. Lab. Hem. 2009. Vol. 31. pp. 277–297

5. Bruschi G., Minari M., Bruschi M.E., Tacinelli L., Milani B., Cavatorta A., Borghetti A. Similarities of essential and spontaneous hypertension: volume and number of blood cells // Hypertens. 1986. Vol. 8. pp. 983–989.

6. El Haouari M., Rosado J.A. Platelet function in hypertension // Blood Cells Mol Dis. 2009. Vol. 42. pp. 38–43.

7. Park Y., Schoene N., Harris W. Mean platelet volume as an indicator of platelet activation: methodological issues // Platelets. 2002. Vol. 13. pp. 301–306.

8. Vagdatli E., Gounari E., Lazaridou E., Katsibourlia E., Tsikopoulou F., Labrianou I. Platelet distribution width: a simple, practical and specific marker of activation of coagulation // Hippokratia. 2010. Vol. 14. no. 1. pp. 28–32.

Рецензенты:

Суслов Н.И., д.м.н., профессор, заведующий лабораторией фитофармакологии и специального питания, НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга, г. Томск;

Плотникова Т.М., д.б.н., профессор, профессор кафедры фармакологии, ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, г. Томск.