

ІМУННИЙ СТАТУС ЩУРІВ ЗА ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ ЗАМІЩУЮЧОЇ КЛІТИННОЇ ТЕРАПІЇ

В. В. Ковпак, кандидат ветеринарних наук, докторант
Ю. О. Харкевич, кандидат ветеринарних наук
Національний університет біоресурсів і
природокористування України

Імунологічні показники крові та функціональні показники фагоцитів за цукрового діабету у тварин вказують на наявність у їх організмі певних патологічних процесів, викликаних інсуліновою недостатністю. Введені на фоні цукрового діабету мезенхімальні стовбурові клітини знижують рівень глюкози у крові тварин-реципієнтів та сприяють відновленню параметрів крові в бік показників вихідного стану.

Ключові слова: цукровий діабет, мезенхімальні стовбурові клітини, глюкоза, лейкоцити, імуноглобуліни.

Загальновідомо, що у домашніх тварин, на рівні з людиною, також може розвинутися цукровий діабет (ЦД) I типу. Досить повно висвітлені і дані клініко-лабораторних досліджень за цукрового діабету (ЦД) у тварин, зокрема, картини крові [4]. Було встановлено, що вміст загальної кількості лейкоцитів у периферійній крові тварин та людей за даної патології корелює з важкістю уражень органів та систем організму [11]. Через зростаючу кількість доказів, що лейкоцити відіграють важливу роль у розвитку і прогресуванні ускладнень при діабеті, значну кількість уваги приділяється саме вивченню даного питання.

Разом з тим, даних досліджень, що стосуються диференційованого визначення вмісту в крові лейкоцитів за цукрового діабету, функціональних показників фагоцитів, а також показників гуморального імунітету практично відсутні. Більше того, дані існуючих досліджень доволі суперечливі.

Розробка методів лікування ЦД – ще одна актуальна область досліджень науковців. Особливо активізувалася вона при розвитку методів клітиннозаміщуючої терапії. На даний час кандидатами для цієї терапії є мезенхімальні стовбурові клітини (МСК), які здатні диференціюватися в практично будь-який тип клітин.

З огляду на вищеперераховане, **метою** даної роботи є дослідити рівень глюкози, загальний та диференційний вміст лейкоцитів у периферійній крові щурів, деякі їх функціональні показники, вміст циркулюючих імунних комплексів, а також імуноглобулінів на фоні змодельованого аллоксанового цукрового діабету за інтраперитонеального введення мезенхімальних стовбурових клітин.

Матеріали і методи досліджень. У досліді використали 12 щурів. Щурі були розділені на 4 групи по 3 тварини в кожній: I – контрольна, II – дослідна, без терапевтичного втручання (відбір крові для аналізу проводили на 20 добу експерименту), III – дослідна, без терапевтичного втручання (відбір крові для аналізу проводили на 34 добу експерименту), IV – дослідна, тваринам якої на 20 добу після формування ЦД вводили МСК у кількості 2 млн. (відбір крові для аналізу проводили на 34 добу експерименту).

ЦД формували шляхом однократного підшкірного введення аллоксану моногідрату в дозі 150 мг/кг у вигляді 5% розчину на цитратному буфері після попередньої 24-годинної голодної дієти при вільному доступі до води.

МСК отримували з кісткового мозку трубчастих кісток щурів віком 12 діб. Культивування клітин здійснювали за стандартною методикою у CO₂-інкубаторі.

Рівень глюкози в сироватці крові визначали за допомогою глюкозооксидазного методу. Аналіз загального та диференційного вмісту лейкоцитів, а також еритроцитів та гемоглобіну у периферійній крові тварин досліджували з допомогою автоматичного гематологічного аналізатора. Відносний вміст субпопуляцій лімфоцитів визначали методом розеткоутворення з еритроцитами барана, циркулюючих імунних комплексів – методом преципітації в поліетиленгліколі, імуноглобулінів – за допомогою імуноферментного методу. Функціональні показники лейкоцитів визначали загальноприйнятим методом з використанням часток латексу.

Результати досліджень. Як свідчать дані таблиці 1, через 20 діб після введення дослідним тваринам аллоксану рівень глюкози у їх крові суттєво зріс та був у 2,9 рази достовірно вищим у порівнянні з вихідним станом. Підвищення рівня глюкози є наслідком пошкоджуючого впливу мезоксалилсечовини на інсулін-продукуючий апарат підшлункової залози.

Дослідження вмісту лейкоцитів у крові тварин за ЦД вказує на те, що характерним є підвищення загального вмісту лейкоцитів, а зміни відносного вмісту окремих їх субпопуляцій не є специфічними (табл. 1). Так, через 20 днів після моделювання ЦД загальний вміст лейкоцитів у крові дослідних тварин становив $10,5 \pm 0,67 \times 10^3/\text{мкл}$, що на 64% більше порівняно з вихідним станом.

Механізм, відповідальний за лейкоцитоз на перших етапах розвитку ЦД, в значній мірі невідомий та є предметом дискусій. Разом з тим, встановлено, що на рівень вмісту лейкоцитів у крові за ЦД впливає поява ендогенних антигенів та підвищений вміст глюкози в крові [0, 3]. Як відомо, недостатність підшлункової залози проявляється не лише у підвищеному вмісті глюкози у крові тварин, а й у розвитку нефро-, міокардіопатії. Клітини цих органів адсорбують глюкозу з крові без використання інсуліну. Підвищення рівня глюкози всередині клітини перешкоджає виробленню нею ключових ферментів, самовідновленню, транспорту через мембрану необхідних поживних речовин, що призводить до пошкодження клітини та потрапляння у кров продуктів її руйнації [0].

Дані, наведені в таблиці 1, також свідчать, що єдиною субпопуляцією лімфоцитів, відносний рівень якої підвищився, є В-лімфоцити. Порівнюючи відносний рівень В-лімфоцитів через 20 днів після моделювання ЦД з рівнем вмісту імуноглобулінів через такий же період (табл. 2), можна зробити висновок, що між цими показниками існує кореляція, оскільки вміст IgG, IgM, IgA також підвищився порівняно з вихідним станом (на 38, 36 і 50% відповідно).

Таблиця 1

Рівень глюкози, деякі імунологічні показники крові щурів та функціональні показники фагоцитів за цукрового діабету, n=3 (M±m)

Показники	Вихідний стан	Через 20 днів після моделювання ЦД	Через 34 доби після моделювання ЦД (на фоні застосування МСК)	Через 34 доби після моделювання ЦД (без застосування МСК)
1	2	3	4	5
Глюкоза, мМоль/л	4,7±0,4	13,96±1,4**	8,9±0,5**	12,8±1
Лейкоцити, $10^3/\text{мкл}$	6,4±0,64	10,5±0,67*	9,3±0,72*	3,3±0,54**
Лімфоцити, %	59,3±3,3	62,6±1,9	57±5,8	66,3±2,5

Т лімфоцити,%	61,6±1,4	56,3±1,9	62,6±3,67	60±2,3
Т хелпери,%	37,6±0,9	33,3±2,5	42,3±2,7	39,6±1,6
Т супресори,%	23,6±1,5	22±1,16	20,3±1,35	20,3±1
Природнікілери,%	18±1,16	17,6±0,96	17,6±1,35	16,3±0,96
В лімфоцити,%	17,6±1,5	22,7±0,9*	21±1,74	21±0,6

Продовження таблиці 1

1	2	3	4	5
Імунорегуляторний індекс	1,6±0,14	1,53±0,2	2,09±0,16	1,95±0,02
Паличкаоядерні,%	4±1,16	5±1,74	1,66±0,38	3±1,2
Сегментоядерні,%	31,3±5	20±3	34,6±4,84	23,6±3,8
Еозинофіли,%	4±1,16	6±0,58	4,33±1,54	2,7±0,9
Базофіли,%	0,66±0,4	1±0,58	0,33±0,38	0
Моноцити,%	3,33±0,4	4,33±0,38	2±0,58	3±0,6
Фагоцитарне число, ум. од.	7,9±0,1	7,9±0,1	7,9±0,23	7,3±0,4
Фагоцитарний індекс,%	49±0,5	49±0,6	49,3±3,67	49,6±1,5
Гемоглобін, г/л	129,6±3	130±3,48	136±8,1	126,2
Еритроцити, 10 ⁶ /мкл	6,62±0,05	6,4±0,28	7,9±0,58	6,53±0,1

Примітка. * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$ порівняно з контролем (контролем для показників через 20 діб після моделювання ЦД були показники вихідного стану, а показників через 34 доби після моделювання ЦД – показники через 20 діб після моделювання ЦД).

Відносний вміст у крові щурів інших субпопуляцій лімфоцитів через 20 діб після моделювання ЦД був нижчим порівняно з вихідним станом, що може вказувати на їх перерозподіл у кров'яному руслі, пов'язаний з міграцією у ділянки зосередження ендотангенів.

Відносний вміст природних кілерів після моделювання ЦД не змінився (табл. 1).

Стосовно субпопуляцій гранулоцитів та моноцитів, то їх відносний вміст у крові щурів через 20 діб після моделювання ЦД фактично не змінився, за виключенням паличкаоядерних нейтрофілів, рівень яких знизився порівняно з вихідним станом, що також може вказувати на наявність у їх організмі певних патологічних процесів (табл. 1).

Імунорегуляторний індекс через 20 діб після моделювання ЦД знизився порівняно з вихідним станом, що свідчить про переважання за ЦД лімфоцитів із супресивними фенотипом.

Вміст еритроцитів і гемоглобіну при розвитку ЦД не змінився (табл. 1).

Щодо функціональних показників фагоцитів (нейтрофілів), варто відзначити, що вони при моделюванні ЦД

також не змінилися (табл. 1). Разом з тим, дані багатьох досліджень підтверджують, що фагоцити за цієї патології володіють зниженою здатністю до хемотаксису та фагоцитозу, що прямопропорційно залежить від важкості перебігу самого захворювання [2].

Вміст циркулюючих імунних комплексів у крові тварин через 20 діб після моделювання ЦД підвищився на 10% та становив $97 \pm 2,5$ од., що, очевидно, є результатом появи в організмі антигенів ендogenous походження при розвитку патологій окремих органів і систем.

Як свідчать дані таблиці 1, за ЦД на фоні застосування МСК загальна кількість лейкоцитів у крові дослідних тварин зменшилась та становила $9,3 \times 10^3$ клітин/мкл. Варто відзначити, що вміст лейкоцитів у крові щурів, яким не застосували МСК, був у 3,2 рази ($3,3 \times 10^3$ клітин/мкл) достовірно нижчим порівняно з 20 добою, та у 1,9 разів нижчим порівняно з вихідним станом. Таке критичне зниження загальної кількості лейкоцитів у крові тварин, яким не застосовували МСК, співпадає з високим рівнем у їх крові глюкози, який знизився порівняно 20 добою після формування ЦД лише на 8,4% (до $12,8 \pm 1$ мМоль/л), тоді як при застосуванні МСК – на 36,3% (до $8,9 \pm 0,5$ мМоль/л). Як відомо, глюкоза – моноцукрид, який вкрай необхідний для усіх біосинтетичних процесів, у тому числі ділення клітин. За нестачі інсуліну глюкоза не здатна утилізуватися імунокомпетентними клітинами, що призводить до інгібіції синтезу ДНК, як наслідок – пригнічення клітинного поділу та апоптозу [2]. Таким чином, можна зробити висновок, що введені на фоні ЦД I типу МСК знижують рівень глюкози у крові тварин-реципієнтів.

МСК – популяція клітин, яким властива регенеративна дія на підшлункову залозу *in vivo* [5, 6]. Дослідження підтверджують, що МСК, які містяться у багатьох органах тварин, здатні диференціюватися у інсулін-продукуючі клітини та сприяти вирішенню ЦД [8]. Введені тварині-реципієнту МСК здатні мігрувати у підшлункову залозу та сприяти збільшенню кількості власних панкреатичних острівців та бета-клітин, що проявляється у підвищенні синтезу ними аутологічного інсуліну та зменшенні рівня глюкози в крові [7, 9].

Стосовно імуноглобулінів (табл. 2), то їх вміст у сироватці крові дослідних тварин також зменшився. У щурів, яким застосували МСК, через 34 доби після моделювання ЦД, вміст

IgG становив $5,08 \pm 0,45$ г/л, що на 14% менше порівняно з 20 добою після моделювання ЦД. При цьому рівень IgM достовірно знизився на 51%, а IgA – на 50%.

Таблиця 2

Вміст у крові щурів окремих класів імуноглобулінів і циркулюючих імунних комплексів за цукрового діабету, n=3 (M±m)

Показники	Вихідний стан	Через 20 днів після моделювання ЦД	Через 34 доби після моделювання ЦД (на фоні застос. МСК)	Через 34 доби після моделювання ЦД (беззастос. МСК)
Імуноглобулін G, г/л	$4,29 \pm 0,15$	$5,9 \pm 0,22^*$	$5,08 \pm 0,45$	$3,59 \pm 0,1^{***}$
Імуноглобулін M, г/л	$0,66 \pm 0,06$	$0,9 \pm 0,05^*$	$0,44 \pm 0,04^*$	$0,55 \pm 0,02^{**}$
Імуноглобулін A, г/л	$0,08 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0^{**}$
ЦІК, од.	$88 \pm 5,2$	$97 \pm 2,5$	$84 \pm 4,84$	$86 \pm 5,8$

Примітка. * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$; *** - $P < 0,001$ порівняно з контролем (контролем для показників через 20 днів після моделювання ЦД були показники вихідного стану, а показників через 34 доби після моделювання ЦД – показники через 20 днів після моделювання ЦД).

Вміст ЦІК знизився після застосування МСК на 13% порівняно з 20 добою після моделювання ЦД.

При цьому, у групі тварин, яким не застосовували МСК, вміст IgG становив $3,59 \pm 0,1$ г/л та був на 39,2% достовірно нижчим порівняно з 20 добою після моделювання ЦД та на 16,4% нижчим порівняно з вихідним станом. При цьому, спостерігалось достовірне зниження в крові дослідних тварин і рівня інших класів імуноглобулінів та ЦІК.

Зниження вмісту імуноглобулінів і ЦІК, очевидно, є результатом відновлення ендокринної функції підшлункової залози, внаслідок чого знижується вміст у крові тварин і ендогенних антигенів.

Отже, досліджені параметри крові тварин із змодельованим ЦД свідчать, що за введення МСК вони були більш наближені до показників вихідного стану, порівняно з

тваринами, яким дані клітини не вводили, що вказує на позитивний вплив МСК на перебіг ЦД. Варто зазначити, що окрім терапевтичного потенціалу, МСК володіють і імуномодулюючими властивостями, зокрема, імуносупресивною дією [10].

Висновки. 1. Ведення дослідним тваринам аллоксану викликає розвиток у них цукрового діабету, що супроводжується підвищенням рівня глюкози у крові.

2. Імунологічні показники крові та функціональні показники фагоцитів за цукрового діабету у тварин вказують на наявність у їх організмі певних патологічних процесів, викликаних інсуліновою недостатністю.

3. Введені на фоні цукрового діабету мезенхімальні стовбурові клітини знижують рівень глюкози у крові тварин-реципієнтів та сприяють відновленню параметрів крові в бік показників вихідного стану.

Список використаних джерел:

1. Джерело доступу: <http://www.diabetesnet.com/about-diabetes/diabetes-complications/why-are-only-certain-organs-damaged>.
2. Alba-Loureiro T. C. Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus / T. C. Alba-Loureiro, C. D. Munhoz, J. O. Martin et al. // Brazilian Journal of Medical and Biological Research. – 2007. – Vol. 40. – P. 1037–104.
3. Booth G. Elevated ambient glucose induces acute inflammatory events in the microvasculature: effects of insulin / G. Booth, T. J. Stalker, A. M. Lefer et al. // American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. – 2001. – Vol. 280, No. 6. – P. 848–856.
4. Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. 3 edition / Edward C. Feldman, Richard W. Nelson // Saunders, 2003 – 1104 p.
5. Lin G. Treatment of type 1 diabetes with adipose tissue-derived stem cells expressing pancreatic duodenal homeobox 1 / G. Lin, G. Wang, G. Liu et al. // Stem Cells Dev. – 2009. – Vol. 18, No. 10. – P. 1399– 406
6. Phadnis S. M. Human bone marrow-derived mesenchymal cells differentiate and mature into endocrine pancreatic lineage in vivo / S. M. Phadnis, M. V. Joglekar, M. P. Dalvi // Cytotherapy. – 2011. – Vol. 13, No. 3. – P. 279–293.
7. Ryang H. L. Multipotent stromal cells from human marrow homeo and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NODscid mice / H. L. Ryang, J. S. Min, L. R. Roxanne et al. // PNAS. – 2006. – Vol. 103, No. 46. – P. 17438–17443.
8. Sun Y. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from diabetic patients into insulin-producing cells in vitro / Y. Sun, L. Chen, X. G. Hou et al. // Chin. Med. J. (Engl). – 2007. – Vol. 120, No. 9. – P. 771–776

9. Urban V. S. Mesenchymal Stem Cells Cooperate with Bone Marrow Cells in Therapy of Diabetes / V. S. Urban, J. Kiss, J. Kovacs et al. // Stem cells. – 2008. – Vol. 26. – P. 244–253.

10. Wang Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications / Ying Wang, Xiaodong Chen, Wei Cao // Nature Immunology. – 2014. – Vol. 15. – P. 1009–1016.

11. Xu Wei. Correlation between Peripheral White Blood Cell Counts and Hyperglycemic Emergencies / Wei Xu, Hai-feng Wu, Shao-gang Ma et al. // International Journal of Medical Sciences. – 2013. – Vol. 10(6). – P. 758–765.

В. В. Ковпак, Ю. А. Харкевич. Иммунный статус крыс при сахарном диабете при применении замещающей клеточной терапии.

Иммунологические показатели крови и функциональные показатели фагоцитов при сахарном диабете у животных указывают на наличие в их организме определенных патологических процессов, вызванных инсулиновой недостаточностью. Введенные на фоне сахарного диабета мезенхимальные стволовые клетки снижают уровень глюкозы в крови животных-реципиентов и способствуют восстановлению параметров крови в сторону показателей исходного состояния.

Ключевые слова: сахарный диабет, мезенхимальные стволовые клетки, глюкоза, лейкоциты, иммуноглобулины.

V. Kovpak, Yu. Kharkevich. Immune status of diabetic rats treated with replacement cell therapy.

Just as in humans, the pancreas of diabetic animals is unable to produce enough insulin due to damaged beta-islets. It was found that the total content of leukocytes in peripheral blood of diabetic animals and people correlates with the severity of impaired organs and systems of the body. Due to a growing number of evidence that leukocytes play an important role in the development of diabetic complications, greater attention is being given to the study of the subject.

The aim of this work is to investigate the level of glucose, total and differential leukocyte content in the peripheral blood of rats, some of their functional indexes, the content of circulating immune complexes and immunoglobulins against the background of the simulated alloxan diabetes by intraperitoneal administration of mesenchymal stem cells of allogeneic origin.

Materials and methods of research. We used 12 rats in the experiment. Rats were divided into 4 groups consisting of 3 rats each: I – control group, II – experimental group without therapeutic intervention (blood sampling for analysis was performed on the 20th day of the experiment), III – experimental group without therapeutic intervention (blood sampling for analysis was performed on the 34th day of the experiment), IV – experimental group, where MSCs in an amount of 2 million were injected to animals on the 20th day after

the formation of diabetes (blood sampling for analysis was performed on the 34th day of the experiment).

Alloxan diabetes was formed by a single subcutaneous injection of alloxan monohydrate in a dose of 150 mg/kg in the form of 5% solution on citrate buffer (pH 4.5) after a previous 24-hour starvation diet with free access to water.

MSCs were obtained from bone marrow of long bones of rats aged 7-10 days. Cell culture was performed by the standard method in the CO₂ incubator.

Experimental findings. The administration of alloxan to experimental animals causes the development of diabetes, accompanied by increased levels of glucose in the blood. The immunological blood parameters and functional parameters of phagocytes in diabetic animals indicate the presence of certain pathological processes caused by insulin deficiency in their body. Mesenchymal stem cells administered against the background of diabetes reduce the level of glucose in the blood of animals-recipients and help restore blood parameters toward the original indicators.

Key words: *diabetes, mesenchymal stem cells, glucose, leukocytes, immunoglobulins.*