

СОСТОЯНИЕ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГЛИКЕМИИ И ДЕЙСТВИЯ ИММУНОМОДУЛЯТОРА

Гетте И.Ф., Данилова И.Г.

ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук,
г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Количество лимфоцитов, их функциональная активность, в частности спектр выделяемых цитокинов, определяют выраженность аутоиммунного процесса при сахарном диабете (СД) в отношении как островковых β -клеток, так и других клеток организма. Поскольку продукция цитокинов координируется макрофагами, а также может зависеть от состояния нуклеиновых кислот в лимфоцитах, целью работы стало исследование содержания нуклеиновых кислот в лимфоцитах крови и продукции цитокинов у крыс с аллоксановым диабетом и при действии иммуномодулятора 3-аминофталгидразида (3-АФГ).

На крысах-самцах W1STAR моделировали СД 1 типа внутривентриальным введением аллоксана дозой 300 мг/кг. Доза 3-АФГ составляла 2 мг/кг, всего 20 внутримышечных инъекций.

Установлено, что моделирование СД сопровождается увеличением количества лимфоцитов в крови, их предшественников в костном мозге и содержания ДНК в лимфоцитах крови и сопряжено с повышенной продукцией цитокинов IL-6 и TNF α . Введение 3-АФГ диабетическим крысам способствует уменьшению количества лимфоцитов и содержания в них ДНК, что, вероятно, является причиной снижения уровня провоспалительного цитокина IL-6 в плазме крови и вносит вклад в коррекцию гипергликемии.

Ключевые слова: лимфоциты, аллоксановый диабет, иммуномодулятор, цитокины, нуклеиновые кислоты

STATE OF HYPERGLYCEMIC AND IMMUNOMODULATOR- TREATED PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES

Gette I.F., Danilova I.G.

Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. A level of peripheral blood lymphocytes, their functional activity and particularly produced range of secreted cytokines underlie severity of autoimmune process in diabetes mellitus (DM) against islet β -cells

Адрес для переписки:

Гетте Ирина Федоровна
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения Российской академии наук
620049, Россия, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.
Тел.: 8 (909) 019-53-22.
E-mail: i.goette@yandex.ru

Address for correspondence:

Gette Irina F.
Institute of immunology and Physiology, Ural Branch,
Russian Academy of Sciences
620049, Russian Federation, Yekaterinburg,
Pervomayskaya str., 106.
Phone: 7 (909) 019-53-22.
E-mail: i.goette@yandex.ru

Образец цитирования:

И.Ф. Гетте, И.Г. Данилова «Состояние лимфоцитов периферической крови в условиях гипергликемии и действия иммуномодулятора» // Российский иммунологический журнал, 2020. Т. 23, № 3. С. 329-334.
doi: 10.46235/1028-7221-269-SOH
© Гетте И.Ф., Данилова И.Г., 2020

For citation:

I.F. Gette, I.G. Danilova "State of hyperglycemic and immunomodulator-treated peripheral blood lymphocytes", Russian Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2020, Vol. 23, no. 3, pp. 329-334.
doi: 10.46235/1028-7221-269-SOH
DOI: 10.46235/1028-7221-269-SOH

and other body cells. Because cytokine production is coordinated by macrophages and may also depend on accessibility lymphocyte nucleic acids, we aimed at examining level of nucleic acids in blood lymphocytes as well as cytokine production in rats with alloxan-induced diabetes treated with immunomodulator 3-aminophthalhydrazide (3-APH).

Type 1 DM was modeled in male Wistar rats by intraperitoneally administered alloxan at a dose of 300 mg/kg followed by inoculating 3-APH (2 mg/kg, in total 20 intramuscular injections). It was found that modeled diabetes was accompanied by increased number of peripheral blood lymphocytes and their bone marrow precursors, coupled to higher DNA amount in blood lymphocytes and associated with increased IL-6 and TNF α production. Administration of 3-APH to diabetic rats contributed to decreased number of peripheral blood lymphocytes and related DNA level likely resulting in decreased level of pro-inflammatory cytokine IL-6 in the blood serum and contributing to corrected hyperglycemia.

Keywords: lymphocytes, alloxan diabetes, immunomodulator, cytokines, nucleic acids

Работа выполнена в рамках гос. задания ИИФ УрО РАН, тема № АААА-А18-118020 590 1070.

Введение

Лимфоциты периферической крови принимают участие как в развитии сахарного диабета, так и в последующем поддержании аутоиммунных процессов, направленных на деструкцию не только островковых инсулинпродуцирующих клеток, но также других клеток организма [5, 6]. Количество лимфоцитов и их функциональная активность, в частности продукция цитокинов, определяют выраженность аутоиммунных реакций и иммунорезистентность у больных сахарным диабетом [7]. Патологические процессы при сахарном диабете (СД) 1 и 2 типа, прежде всего гипергликемия, оксидативный стресс и недостаточность антиоксидантной защиты, способствуют повреждению ядерной и митохондриальной ДНК лимфоцитов [2]. Нарушение структуры ДНК в лимфоцитах периферической крови часто исследуют в качестве модели повреждения других соматических клеток организма [4]. К наиболее часто выявляемым проявлениям генотоксичности при СД относятся фрагментация одной или двух нитей ДНК, мутации, снижение скорости репарации ДНК, изменения экспрессии генов, связанные с модификациями гистоновых белков; следствием увеличения разрывов ДНК является апоптоз клеток [4].

Деструкция ДНК при сахарном диабете, предположительно, должна сопровождаться уменьшением количества ДНК в лимфоцитах, а также снижением количества РНК, поскольку экспрессия генов при поврежденной ДНК также должна быть нарушена. Однако существуют единичные работы, оценивающие содержание нуклеиновых кислот в лимфоцитах [3].

Продукция цитокинов осуществляется преимущественно лимфоцитами, и этот процесс координируют макрофаги, способные также вырабатывать провоспалительные цитокины, противовоспалительные цитокины и факторы роста [7]. Действие иммуномодулятора макрофагов 3-аминофталгидразида (3-АФГ), как было показано ранее, снижает уровень гипергликемии при экспериментальном сахарном диабете, устраняя основную патогенетический фактор, вызывающий повреждение ДНК [5], но не нормализует количество гистоновых белков фракции H_{2A}, H₃, H₄, регулирующих экспрессию провоспалительных факторов в лимфоцитах [1]. В то же время остается недостаточно исследованным вопрос о влиянии состояния лимфоцитов (количества клеток, содержания в них нуклеиновых кислот, продукции цитокинов) на выраженность гипергликемии в условиях аллоксанового диабета и действия иммуномодулятора макрофагов 3-АФГ.

Цель работы – исследовать содержание нуклеиновых кислот в лимфоцитах крови и продукцию цитокинов у крыс с аллоксановым диабетом и при действии иммуномодулятора 3-аминофталгидразида.

Материалы и методы

Эксперимент выполнен на 30 крысах-самцах Wistar массой 220-250 г. Содержание животных и все манипуляции соответствовали рекомендациям международного этического комитета (Директива Совета ЕС 2010/63/EU). Были выделены 3 группы по 10 крыс: 1 – интактная; 2 – СД; 3 – СД + 3-АФГ. Сахарный диабет 1 типа в группах 2 и 3 моделировали внутрибрюшинным введением аллоксана дозой 300 мг/кг по авторской методике [5]. Крысам группы 3 после 30 суток развития СД осуществляли внутримышеч-

ные инъекции 3-АФГ из расчета 2 мг/кг, всего 20 инъекций. Через 60 суток животных выводили из эксперимента передозировкой эфира. Содержание глюкозы определяли набором реактивов («Витал-диагностикс», Санкт-Петербург), гликированного гемоглобина (HbA1c) – набором «ГЛИКОГЕМОТЕСТ» (ЭЛТА, Москва). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре DU-800 (Beckman, США). Методом ИФА в плазме крови определяли содержание инсулина набором Rat/Mouse Insuline (Millipore, США), цитокинов IL-6, TNF α и фактора роста IGF-1 наборами Thermo Scientific (США) на анализаторе “Lazurit Automated ELISA System” (США). Анализ периферической крови проводили на гематологическом анализаторе “Celly 70 Biocode Hysel”. Подсчет клеток костного мозга производили на микроскопе Leica DM 2500. В лимфоцитах, выделенных из крови центрифугированием в смеси фиколл-верографин, определяли содержание свободных нуклеотидов, ДНК и РНК методом Маркушевой Л.И. и соавт. [3], основанном на гидролизе нуклеиновых кислот при различных значениях рН и дифференциальном центрифугировании выделяемых веществ, и выражали в мкг/млн лимфоцитов.

гировании выделяемых веществ, и выражали в мкг/млн лимфоцитов.

Статистический анализ материала проводили с помощью программ Statistica 6.0 (Stat.Soft.Inc.), программы Microsoft Excel 2003 и непараметрического критерия Манна–Уитни. Данные представлены в виде среднего значения \pm ошибка среднего. При проверке статистических гипотез использовался уровень значимости 5% ($p < 0,05$).

Результаты

Через 60 суток после моделирования аллоксанового диабета в крови крыс группы 2 отмечается достоверное увеличение содержания глюкозы, гликированного гемоглобина, цитокинов IL-6, TNF α и снижение уровня инсулина и IGF-1 по сравнению с соответствующими показателями интактных животных (табл. 1). На 60-е сутки, после 20 инъекций 3-АФГ, у крыс группы 3 концентрация глюкозы уменьшилась, нормализовалось содержание гликированного гемоглобина, инсулина, IGF-1 и IL-6, но количество TNF α осталось на прежнем уровне.

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ САХАРНОГО ДИАБЕТА И ЦИТОКИНЫ В КРОВИ КРЫС

TABLE 1. INDICATORS OF DIABETES MELLITUS AND CYTOKINES IN THE BLOOD OF RATS

Показатели Indicators	1 Интактные Intact	2 СД DM	3 СД + 3-АФГ DM + 3-APH
Глюкоза, ммоль/л Glucose, mmol/l	5,92 \pm 0,31	27,50 \pm 3,02*	16,90 \pm 2,98* **
HbA1c, %	4,50 \pm 0,22	9,17 \pm 0,29*	4,12 \pm 0,88**
Инсулин, мкг/мл Insulin, mcg/ml	1,25 \pm 0,20	0,53 \pm 0,07*	2,50 \pm 0,63**
IGF-1, нг/мл IGF-1, ng/ml	981 \pm 173	327 \pm 66*	699 \pm 111**
IL-6, пг/мл IL-6, pg/ml	43,8 \pm 1,1	51,0 \pm 2,5*	33,6 \pm 3,8* **
TNF α , пг/мл TNF α , pg/ml	51,1 \pm 1,5	240,0 \pm 5,7*	260,0 \pm 4,0*

Примечание. * – различия с группой интактных животных достоверны при $p < 0,05$; ** – различия с группой 2 достоверны при $p < 0,05$.

Note. *, differences with the group of intact animals are significant at $p < 0.05$; **, differences with group 2 are significant at $p < 0.05$.

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ СВОБОДНЫХ НУКЛЕОТИДОВ, ДНК И РНК В ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ, КОЛИЧЕСТВО ЛИМФОЦИТОВ В КРОВИ И ИХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В КОСТНОМ МОЗГЕ

TABLE 2. CONTENT OF FREE NUCLEOTIDES, DNA AND RNA IN BLOOD LYMPHOCYTES, THE NUMBER OF LYMPHOCYTES IN THE BLOOD AND THEIR PRECURSORS IN THE BONE MARROW

Показатели Indicators	1 Интактные Intact	2 СД DM	3 СД + 3-АФГ DM + 3-APH
Нуклеотиды, мкг/млн Nucleotides, mkg/million	0,468±0,056	1,230±0,092*	0,508±0,055**
РНК, мкг/млн RNA, mkg/million	0,156±0,014	0,184±0,020	0,185±0,037
ДНК, мкг/млн DNA, mkg/million	0,126±0,008	0,284±0,032*	0,157±0,005***
РНК/ДНК RNA/DNA	1,23±0,09	0,72±0,06*	1,24±0,20**
Лимфоциты в крови, тыс/мкл Blood lymphocytes, thousand/mkl	10,69±0,07	18,40±1,99*	7,32±0,48***
Лимфоциты в костном мозге, млн/100 г массы тела Bone marrow lymphocytes million/100 g of body weight	4,91±1,05	8,06±1,30*	3,13±0,29**

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

Установлено увеличение количества свободных нуклеотидов в лимфоцитах диабетических крыс группы 2 и нормализация показателя после действия иммуномодулятора в группе 3 (табл. 2). Содержание ДНК в лимфоцитах крови крыс группы 2 также достоверно возросло, а затем уменьшалось после инъекций 3-АФГ, оставаясь выше уровня показателя интактных крыс, но меньше, чем у крыс группы 2. Содержание РНК в лимфоцитах не имело достоверных отличий во всех исследованных группах. Изменение соотношения РНК/ДНК соответствовало обнаруженным изменениям количества ДНК: снижение показателя после моделирования СД и нормализация после действия 3-АФГ.

У диабетических крыс обнаружено увеличение количества лимфоцитов в периферической крови и предшественников лимфоцитов в костном мозге относительно показателей интактной группы (табл. 2). Инъекции иммуномодулятора

крысам группы 3 сопровождалось снижением лимфоцитарной фракции в крови и костном мозге.

Обсуждение

Обнаруженные изменения уровня глюкозы, HbA1c, инсулина и провоспалительных цитокинов в крови крыс группы 2 являются характерными для сахарного диабета 1 типа [5, 8], а снижение гипергликемии и улучшение баланса цитокинов в группе 3 подтверждают установленные ранее эффекты 3-АФГ [5, 7]. Увеличение содержания ДНК в лимфоцитах периферической крови диабетических крыс (почти в 2 раза относительно нормы) может быть следствием репликации с остановкой цитокинеза, что является компенсаторной реакцией, необходимой для увеличения количества функционирующих генов. Это предположение подтверждается увеличением концентрации IL-6 и TNFα в плазме крови и

обнаруженным ранее уменьшением количества гистоновых белков фракции H_{2A}, H_{3}, H_{4} [1]. Повышенное количество свободных нуклеотидов в лимфоцитах диабетических крыс, вероятно, необходимо для синтеза ДНК, поскольку содержание РНК остается на прежнем уровне. Возможно, компенсаторное увеличение количества ДНК в лимфоцитах является универсальной реакцией на действие патогена, так как образование полиплоидных, преимущественно тетраплоидных, лимфоцитов было обнаружено при вирусных инфекциях и действии различных токсикантов [4]. Повышение концентрации IL-6 и TNF α в плазме крови крыс группы 2 может происходить как за счет усиленной экспрессии цитокинов удвоенным количеством генов, так и за счет возросшего количества лимфоцитов. Действие иммуномодулятора макрофагов 3-АФГ сопровождается, с одной стороны, снижением количества лимфоцитов, с другой стороны – уменьшением содержания ДНК в лимфоцитах и увеличением концентрации фактора роста IGF-1 в плазме крови,

что, вероятно, связано с изменением фенотипа макрофагов с провоспалительного на противовоспалительный [7]. Нормализация количества лимфоцитов и снижение уровня провоспалительного цитокина IL-6 при действии 3-АФГ способствуют снижению гипергликемии у диабетических животных и повышению продукции инсулина за счет, как было показано ранее, сохранения жизнеспособности β -клеток [5].

Выводы

1. Повышенная продукция провоспалительных цитокинов при аллоксановом диабете происходит за счет увеличения количества лимфоцитов и содержания в них ДНК.

2. Действие иммуномодулятора макрофагов 3-АФГ способствует нормализации количества лимфоцитов и уменьшению содержания ДНК в лимфоцитах, что сопровождается уменьшением уровня IL-6 в плазме крови и снижением гипергликемии.

Список литературы / References

1. Гетте И.Ф. Содержание гистоновых белков в лимфоцитах крыс с аллоксановым диабетом в условиях модулирования активности макрофагов // Вестник уральской медицинской академической науки, 2014, № 3 (49). С. 18-19. [Gette I.F. Content of histone proteins in lymphocytes of rats with alloxan diabetes in terms of macrophage activity modulating. *Vestnik uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Bulletin of the Ural Medical Academic Science*, 2014, no. 3 (49), pp. 18-19. (In Russ.)]
2. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Коновалова Г.Г., Одинокова О.А., Дорощук Н.А., Чазова И.Е. Оксидативный и карбонильный стресс как факторы модификации белков и деструкции ДНК при сахарном диабете // Терапевтический архив, 2018, № 10. С. 46-50. [Lankin V.Z., Tikhaze A.K., Konovalova G.G., Odinokova O.A., Doroshchuk N.A., Chazova I.E. Oxidative and carbonyl stress as a factors of the modification of proteins and DNA destruction in diabetes. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2018, Vol. 90, no. 10, pp. 46-50. (In Russ.)]
3. Маркушева Л.И., Савина М.И., Решина В.М., Тогузов Р.Т. Ядерные белки хроматина в оценке эффективности лечения больных псориазом // Клиническая лабораторная диагностика, 2000. № 7. С. 18-20. [Markusheva L.I., Savina M.I., Reshina V.M., Toguzov R.T. Chromatin nuclear proteins in evaluation of the effectiveness of treatment of patients with psoriasis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2000, no. 7, pp. 18-20. (In Russ.)]
4. Сычева Л.П. Биологическое значение, критерии определения и пределы варьирования полного спектра кариологических показателей при оценке цитогенетического статуса человека // Медицинская генетика, 2007. № 11. С. 3-11. [Sycheva L.P. Biological value, scoring criteria and limits of a variation of a full spectrum karyological indexes of exfoliated cells for estimation of human cytogenetic status. *Meditsinskaya genetika = Scientific and Practical Journal Medical Genetics*, 2007, no. 11, pp. 3-11. (In Russ.)]
5. Danilova I.G., Bulavintceva T.S., Gette I.F., Medvedeva S.Y., Emelyanov V.V., Abidov M.T. Partial recovery from alloxan-induced diabetes by sodium phthalhydrazide in rats. *Biomed. Pharmacother.*, 2017, Vol. 95, pp. 103-110.
6. Ferreira R.C., Simons H.Z., Thompson W.S., Cutler A.J., Dopico X.C., Smyth D.J., Mashar M., Schuilenburg H., Walker N.M., Dunger D.B., Wallace C., Todd J.A., Wicker L.S., Pekalski M.L. IL-21 production by CD4⁺ effector T cells and frequency of circulating follicular helper T cells are increased in type 1 diabetes patients. *Diabetologia*, 2015, Vol. 58, no. 4, pp. 781-790.

7. Jukić T., Abidov M., Ihan A. A tetrahydrophthalazine derivative ‘sodium nucleinate’ exerts a potent suppressive effect upon LPS-stimulated mononuclear cells *in vitro* and *in vivo*. *Collegium Antropologicum*, 2011, Vol. 35, no. 4, pp. 1219-1223.

8. Zargari Samani O., Mahmoodnia L., Izad M., Shirzad H., Jamshidian A., Ghatrehsamani M., Kheiri S., Sadeghian L., Soltani A., Sarmadi A., Kaohsiung J. Alteration in CD8(+) T cell subsets in enterovirus-infected patients: An alarming factor for type 1 diabetes mellitus. *Med. Sci.*, 2018, Vol. 34, no. 5, pp. 274-280.

Авторы:

Гетте И.Ф. – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории морфологии и биохимии ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Данилова И.Г. – д.б.н., доцент, заместитель директора ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Gette I.F., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Morphology and Biochemistry, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Danilova I.G., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Deputy Director, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Поступила 03.06.2020
Принята к печати 01.07.2020

Received 03.06.2020
Accepted 01.07.2020