

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА В ТКАНЯХ ПРОГНОЗИРУЕТ ТЯЖЕСТЬ НАРУШЕНИЯ В СИСТЕМЕ КЛЕТОК КРОВИ И КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА У МЫШЕЙ С МОДЕЛЬЮ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-ГО ТИПА

О.И. Степанова^{1,*}, Р.А. Клёсов¹, Х.Х. Семёнов¹, И.Б. Алчинова², А.Б. Черепов²,
А.А. Метёлкин², М.Ю. Карганов², А.О. Никольская³, Н.А. Онищенко³, Ю.Б. Басок³

¹ ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, 1

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»
125315, Российская Федерация, Москва, ул. Балтийская, 8

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии
и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздрава России
123182, Российская Федерация, Москва, ул. Щукинская, 1

При прогрессирующем развитии сахарного диабета 2-го типа (СД2) у мышей db/db выявлено три стадии нарушения метаболизма углеводов и окислительно-восстановительных процессов (ОВП). Установлено, что уже в I стадии у мышей db/db снижалось содержание эритроцитов, гемоглобина и лейкоцитов. Во II и особенно в III стадиях происходило повышение тромбоцитов, %-содержания нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов и снижение лимфоцитов. В костном мозге у мышей db/db уже в I, но особенно в III стадии определялось снижение доли живых и повышение количества повреждённых клеток, преимущественно за счёт апонекротических клеток. Таким образом, по мере прогрессирования СД2 и выраженного снижения эффективности ОВП, особенно на III стадии, в организме тормозятся процессы кроветворения и усиливаются нарушения в соотношении клеточных популяций нейтрофилов/лимфоциты, что свидетельствует о развитии тяжёлой гипоксии, активации системной воспалительной реакции и торможении репаративных процессов, создающих условия для развития опасных осложнений.

Ключевые слова: сахарный диабет, окислительно-восстановительные процессы, клетки крови и костного мозга

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа частично выполнена в рамках государственного задания по теме: «Оценка адаптивных реакций организма на действие физико-химических и экологических факторов среды» (№ FGUF-2022-0010).

Для цитирования: Степанова О.И., Клёсов Р.А., Семёнов Х.Х., Алчинова И.Б., Черепов А.Б., Метёлкин А.А., Карганов М.Ю., Никольская А.О., Онищенко Н.А., Басок Ю.Б. Динамика изменения окислительного метаболизма в тканях прогнозирует тяжесть нарушения в системе клеток крови и клеток костного мозга у мышей с моделью сахарного диабета 2-го типа. *Биомедицина*. 2024;20(3E):107–112. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-107-112>

Поступила 27.03.2024

Принята после доработки 23.08.2024

Опубликована 01.11.2024

CHANGES IN TISSUE OXIDATIVE METABOLISM PREDICT THE SEVERITY OF DISORDERS IN THE SYSTEM OF BLOOD AND BONE MARROW CELLS IN A MOUSE MODEL OF TYPE 2 DIABETES MELLITUS

Olga I. Stepanova^{1,*}, Roman A. Klesov¹, Khyzyr Kh. Semenov¹, Irina B. Alchinova²,
Anton B. Cherepov², Arkady A. Metelkin², Mikhail Yu. Karganov², Alla O. Nikolskaya³,
Nina A. Onishchenko³, Yulia B. Basok³

¹ Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorsk District, Svetlye Gory Village, 1

² Research Institute of General Pathology and Pathophysiology
125315, Russian Federation, Moscow, Baltiyskaya Str., 8

³ Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs
of the Ministry of Health Care of Russia
123182, Russian Federation, Moscow, Shchukinskaya Str., 1

The progressive development of diabetes mellitus (DM2) in db/db mice is associated with three stages of impaired carbohydrate metabolism and redox processes. In db/db mice, the content of erythrocytes, hemoglobin, and leukocytes was found to decrease already in stage I of DM2. In the II and, in particular, III stages, an increase in platelets, percentage of neutrophils, monocytes, and eosinophils was observed, along with a decrease in lymphocytes. In the bone marrow of db/db mice, a decrease in the proportion of living cells and an increase in the number of damaged cells were determined already in stage I, but especially in stage III, mainly due to aponecrotic cells. Therefore, along with the progression of DM2 and a marked decrease in the effectiveness of redox processes, particularly in stage III, hematopoiesis processes are inhibited and disturbances in the ratio of neutrophil/lymphocyte cell populations increase. This indicates the development of severe hypoxia, activation of a systemic inflammatory reaction, and inhibition of reparative processes that create conditions for the development of dangerous complications.

Keywords: diabetes mellitus, redox processes, blood and bone marrow cells

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Funding: the work was partially completed within the framework of the state assignment on the topic: "Assessment of the body's adaptive responses to the action of physicochemical and environmental factors" (No. FGFU-2022-0010).

For citation: Stepanova O.I., Klesov R.A., Semenov Kh.Kh., Alchinova I.B., Cherepov A.B., Metelkin A.A., Karganov M.Yu., Nikolskaya A.O., Onishchenko N.A., Basok Yu.B. Changes in Tissue Oxidative Metabolism Predict the Severity of Disorders in the System of Blood and Bone Marrow Cells in a Mouse Model of Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal Biomed.* 2024;20(3E):107–112. <https://doi.org/10.33647/2713-0428-20-3E-107-112>

Submitted 27.03.2024

Revised 23.08.2024

Published 01.11.2024

Введение

Сахарный диабет 2-го типа (СД2) представляет собой хроническое мультифакторное заболевание, ранним клиническим проявлением которого является постепенно прогрессирующая гипергликемия. Проблема взаимовлияния при СД2 гипер-

гликемии, окислительного метаболизма в тканях и состояния клеток крови и костного мозга (КМ) остаётся недостаточно изученной.

Цель работы — изучить влияние прогрессирующих нарушений углеводного

и окислительного метаболизма в тканях на динамику изменения состояния клеток крови и КМ у мышей с СД2.

Материалы и методы

Динамику нарушений метаболизма в тканях организма и состояния клеток крови и КМ при СД2 изучали на гомозиготных мышах C57BL/KsJYLepr^{db/+} (B/Ks-Lepr^{db/+}) – (db/db) (n=40). Контролем служили фенотипически здоровые гетерозиготные мыши той же линии (B/Ks-Lepr^{db/+}) – (db/+m) (n=16). В динамике измеряли содержание глюкозы в крови, гликозилированного гемоглобина (HbA1c%) в эритроцитах и массу тела, а также проводилась оценка состояния окислительно-восстановительных процессов (ОВП) в тканях организма, неинвазивно с помощью аппарата ЛАЗМА-СТ (Россия), который измеряет микроциркуляцию крови и лимфы в тканях хвоста, определяли уровень активности митохондриальных коферментов — НАДН, ФАД и показатель окислительного метаболизма (ПОМ) [1]. Для исследования клеток крови забирали её в пробирки с K₃ЭДТА, а оценку гематологических показателей проводили на автоматическом гематологическом анализаторе DYMIND VET DF50 (Китай). Данные представляли как средний результат из трёх промеров.

Клетки костного мозга (ККМ) выделяли у мышей с использованием стандартного протокола [2]. Для оценки выраженности апоптоза ККМ использовали детекцию фосфатидилсерина на внешней мембране клеток с помощью меченого аннексина V. Количество аннексин-положительных клеток оценивали по стандартному протоколу с последующей проточной цитометрией [3]. Для определения целостности клеточной мембраны использовали йодистый пропидий. Образцы анализировали на проточном цитометре BD FACSCalibur («Becton Dickson», США), для каждого образца накапливалось от 15 000 до 25 000 событий.

Анализ результатов проводили с учётом рекомендаций, изложенных в работе [3], но не без установки таргетного гейта.

Результаты и их обсуждение

Измерение показателей — глюкозы и HbA1c — выявило, что нарушение углеводного обмена прогрессирует и отличается от показателей контрольной группы (db/+m). Сравнение возрастных изменений выявило, что у мышей db/db быстро развивалось ожирение, типичное при СД2. Однако начиная с 5–6 до 8 мес. у мышей db/db развивалась быстрая потеря веса, при этом уровень глюкозы и HbA1c в крови продолжал увеличиваться. У мышей db/db наблюдались клинические признаки, такие как полидипсия, полифагия и полиурия, которые были выраженными со 2-го мес. после рождения. При динамическом измерении микроциркуляторно-тканевых показателей, характеризующих состояние ОВП, у мышей db/db и мышей db/+m было установлено, что на сроке жизни 1,5 мес. амплитуды концентрации коферментов НАДН, ФАД и ПОМ выявленные различия показателей состояния ОВП при сравнении с контролями были недостоверны. Эта I стадия развития СД2 была названа периодом адаптации.

Формирование у мышей db/db первых клинических признаков дезадаптации обнаруживается в возрасте 2,0–2,5 мес., когда констатируется значительное повышение веса, уровня гликемии (до $18,70 \pm 3,83$ ммоль/л) и появление полиурии. На этом сроке показатели микроциркуляции снижаются, а амплитуды коферментов достоверно повышаются (НАДН= $1,16 \pm 0,47$; ФАД= $1,51 \pm 0,44$) и достоверно понижается ПОМ ($6,26 \pm 2,36$), что указывает на снижение ОВП в организме и развитие тканевой гипоксии. С возрастом у животных до 4,5 мес. продолжает повышаться уровень глюкозы в крови и HbA1c (глюкозотоксичность), нарастают полиурия и полифагия, прогрессирует тяжесть нару-

шения физиологических функций и ОВП в организме, но ещё не проявляются осложнения. Эта II стадия была названа стадией прогрессирующей дезадаптации. В возрасте 5,0–6,5–8 мес. у мышей db/db гипергликемия достигает $27,40 \pm 2,09$ ммоль/л (норма — $5,70 \pm 0,65$ ммоль/л; $p < 0,05$), HbA1c — $8,9 \pm 1,25\%$ (норма — $3,9 \pm 0,57\%$; $p < 0,05$); отмечаются высокие уровни коферментов: НАДН = $1,42 \pm 0,75$ (норма — $0,65 \pm 0,01$; $p < 0,05$), ФАД = $1,51 \pm 0,33$ (норма — $0,97 \pm 0,02$; $p < 0,05$) и крайне низкий уровень ПОМ = $3,97 \pm 1,39$ (норма — $10,91 \pm 2,04$; $p < 0,05$). На этом же сроке у 30% животных в состоянии крайней степени тяжести возникала мацерация кожи (в области холки), которая становилась обширной незаживающей раной и оставалась у животного вплоть до его гибели. На этом сроке аппаратом ЛАЗМА-СТ было выявлено появление пиков пигмента липофусцина у 40% животных и пиков пигмента порфирина у 5% животных, которые являются маркерами развивающейся в организме декомпенсации, что позволило нам признать описанное состояние на сроке с 5,0–6,5 до 8 мес. III стадией развития СД2 — стадией декомпенсации.

Выявив три стадии метаболических нарушений при СД2, приступили к изучению состояния клеток крови и КМ в эти периоды. Получены результаты исследования состояния эритроцитов и тромбоцитов у мышей db/+m (контроль) и у мышей db/db на разных стадиях прогрессирования СД2. На ранних сроках жизни мышей db/db (1,5–2,0 мес. — стадия адаптации) в их крови отмечается низкое содержание эритроцитов и сниженное содержание в эритроцитах гемоглобина по сравнению с контролем db/+m. Повышение эритроцитов на стадии декомпенсации является следствием сгущения крови на фоне развившейся полиурии. На раннем сроке жизни мышей db/db наметилась тенденция к повышению среднего объёма эритроцита, ширины распределе-

ния эритроцитов (стандартное отклонение) и тромбоцитов, а также к снижению средней концентрации гемоглобина в эритроците. Эта тенденция сохранялась на этапах дезадаптации и декомпенсации, которые свидетельствуют о развивающихся структурных изменениях эритроцитов.

При исследовании тромбоцитов выявлено резкое увеличение количества этих клеток в крови на этапе декомпенсации ОВП и метаболизма у мышей db/db. При исследовании содержания лейкоцитов в крови было выявлено более низкое содержание общего количества лейкоцитов на ранних сроках жизни мышей db/db (1,5–2,0 мес.) по сравнению с контролем — $5,22 \times 10^9$ /л против $9,92 \times 10^9$ /л. С возрастом мышей db/db снижение содержания клеток белой крови прогрессировало, на фоне происходящего повышения процентного содержания нейтрофилов, моноцитов и эозинофилов, а также снижения лимфоцитов. Эти изменения усиливались при декомпенсации. Повышение содержания тромбоцитов, нейтрофилов, моноцитов и эозинофилов на фоне прогрессирующего снижения содержания лимфоцитов, и повышение отношения процентного содержания нейтрофилов к лимфоцитам свидетельствуют об усиливающейся активации при СД2 системной воспалительной реакции и торможении репаративных процессов, создающих условия для развития микро- и макрососудистых осложнений.

Выявленные изменения в крови побудили нас изучить у мышей db/db состояние КМ, осуществляющего процессы кроветворения в организме. Цитометрическое исследование состояния ККМ показало картину распределения: живых ~66,1% и гибнущих ККМ ~33,85% мышей на I стадии СД2, которая не отличается от контрольных мышей db/+m. На II стадии развития СД2 у мышей db/db происходит заметное увеличение доли клеток меченных аннексином V AF488 ~20,3%, т. е. начинает преобладать апопто-

тический путь гибели ККМ. Массированная гибель ККМ у мышей db/db с СД2 наблюдается в III стадии: клеточная гибель скорее идёт по апонекротическому пути, т. к. пул клеток, окрашенных аннексином V AF488 и иодидом пропидия, составляет ~44,4% от общего количества. При этом пул неповреждённых клеток составляет менее ~30,6%, и пул клеток, которые составляют объёмную некротическую популяцию, детектируемую цитометром, — ~17,2%. При прогрессировании метаболических нарушений и снижении эффективности ОВП в костном мозге также неуклонно нарастает угнетение процессов кроветворения, постепенно формирующих в организме различные осложнения и состояние необратимости.

Выводы

1. Прогрессирующее развитие СД2 проследится на фоне усиливающейся гликемии, увеличения содержания гликозилированного гемоглобина в эритроцитах, повышения массы тела на I и II стадии и снижения массы тела на III стадии. Эти изменения кли-

нических показателей происходят на фоне постепенного снижения эффективности показателей ОВП (повышение амплитуд коферментов НАДН, ФАД и снижение ПОМ), особенно выраженном на III стадии.

2. При пилотном исследовании состояния клеток крови у мышей с СД2 уже на I стадии отмечается снижение содержания эритроцитов, гемоглобина и лейкоцитов, которое сохраняется на II и III стадии. На II и особенно на III стадии наступает резкое повышение количества тромбоцитов и процентного содержания нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов, снижение лимфоцитов, а также повышение отношения нейтрофилы/лимфоциты, которое свидетельствуют о развитии системной воспалительной реакции.

3. В образцах костного мозга мышей db/db на I и II стадии сохраняется тенденция к поддержанию исходных значений живых и повреждённых клеток; на III стадии — отмечается снижение живых клеток до 30,6% и повышение повреждённых до 69,39%, преимущественно за счёт клеток в состоянии апонекроза (44,4%) и некроза (17,2%).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Степанова О.И., Клёсов Р.А., Семёнов Х.Х., Помыткин И.А., Онищенко Н.А., Каркищенко В.Н. Способ неинвазивного изучения тканевых нарушений при сахарном диабете 2 типа у мышей db/db с помощью лазерной доплеровской флоуметрии. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. 2023;67(2):118–129. [Stepanova O.I., Klesov R.A., Semenov Kh.Kh., Pomytkin I.A., Onishchenko N.A., Karkischenko V.N. Spособ neinvazivnogo izucheniya tkanevykh narusheniy pri sakharom diabete 2 tipa u myshey db/db s pomoshch'yu lazernoy dopplerovskoy fluometrii [A method for noninvasive studying tissue disorders in type 2 diabetes mellitus in db/db mice using laser Doppler flowmetry]. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya* [Pathological Physiology and Experimental Therapy]. 2023;67(2):118–129. (In Russian)]. DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.118-129
2. Amend S.R., Valkenburg K.C., Pienta K.J. Murine hind limb long bone dissection and bone marrow isolation. *J. Vis. Exp.* 2016;110:53936. DOI: 10.3791/53936
3. Crowley L.C., Marfell B.J., Scott A.P., Waterhouse N.J. Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016;2016(11). DOI: 10.1101/pdb.prot087288

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Степанова Ольга Ивановна*, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: olgsima50@mail.ru

Olga I. Stepanova*, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: olgsima50@mail.ru

Клѣсов Роман Алексеевич, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: klesrom@mail.ru

Roman A. Klesov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: klesrom@mail.ru

Семѣнов Хызыр Хыйсаевич, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: info@scbmt.ru

Khyzyr Kh. Semenov, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: info@scbmt.ru

Алчинова Ирина Борисовна, к.б.н., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»;
e-mail: alchinovairina@yandex.ru

Irina B. Alchinova, Cand. Sci. (Biol.), Research Institute of General Pathology and Pathophysiology;
e-mail: alchinovairina@yandex.ru

Черепов Антон Борисович, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»;
e-mail: antoncherepov2016@gmail.com

Anton B. Cherepov, Research Institute of General Pathology and Pathophysiology;
e-mail: antoncherepov2016@gmail.com

Метѣлкин Аркадий Андреевич, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»;
e-mail: armetelkin@gmail.com

Arkady A. Metelkin, Research Institute of General Pathology and Pathophysiology;
e-mail: armetelkin@gmail.com

Карганов Михаил Юрьевич, д.б.н., проф., ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»;
e-mail: mkarganov@mail.ru

Mikhail Yu. Karganov, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Research Institute of General Pathology and Pathophysiology;
e-mail: mkarganov@mail.ru

Никольская Алла Олеговна, к.б.н., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздрава России;
e-mail: allanik64@yandex.ru

Alla O. Nikolskaya, Cand. Sci. (Biol.), Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: allanik64@yandex.ru

Онищенко Нина Андреевна, д.м.н., проф., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздрава России;
e-mail: allanik64@yandex.ru

Nina A. Onishchenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: allanik64@yandex.ru

Басок Юлия Борисовна, д.м.н., ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздрава России;
e-mail: bjb2005@mail.ru

Yulia B. Basok, Dr. Sci. (Med.), Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Health Care of Russia;
e-mail: bjb2005@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author