

ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ЛІМФОЦИТІВ У ЩУРІВ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МОДЕЛЮВАННЯ МЕТАБОЛІЧНОГО СИНДРОМУ

Кузьміна І.Ю., Кузьміна О.О.

Харківський національний медичний університет

e-mail: irina.u.kuzmina@gmail.com

LYMPHOCYTES AGE-RELATED FEATURES IN RATS IN CONDITIONS OF METABOLIC SYNDROME EXPERIMENTAL MODELING

Kuzmina I.Yu., Kuzmina O.O.

Kharkiv National Medical University

Summary/Резюме

Obesity in rodents is considered as an increase in body weight due to fat depots when they are given a high-fat diet, which contributes to an increase in body weight. In this case, it is relevant to determine the total level of leukocytes, which are associated with metabolic disorders and adipose tissue. The purpose of the work is to establish age-related characteristics of lymphocytes as a marker of subclinical inflammation in rats in the conditions of experimental modeling of metabolic syndrome. The study was conducted on 120 white female rats of the WAG/G Sto population. Animals with MS were divided into 3 main groups by age — young (immature), mature (mature) and old (post-reproductive age) with 30 rats in each group. Experimental group with MS modeling for 1 month (group 1); MS modeling for 3 months (group 2); MS modeling for 6 months (group 3). The control group (intact animals), which were not subjected to MS modeling, consisted of 30 healthy rats of the same age, 10 rats each. When studying the immunological status of lymphocytes in rats under experimental MS conditions, it was found that the average number of lymphocytes in 1 ml of rat blood changed with age and significantly differed from control values. The level of lymphocyte populations in peripheral blood in rats indicates a decrease in the number of T-lymphocytes CD3+, CD8+ and CD4+, compared with the control. No significant differences in the average absolute values of T and B-lymphocytes (CD3+ and CD19+), as well as CD4+, were found between rats in the main and control groups. The absolute and relative content of lymphocytes in rats reflects changes occurring in the local link of immunity in metabolic syndrome and was revealed by pronounced leukocyte infiltration, represented mainly by T-lymphocytes and cells of the monocyte-macrophage series. The detected disorders may indicate an inflammatory reaction in the age aspect in MS.

Keywords: *metabolic syndrome, obesity, systemic inflammation, lymphocytes, immune system.*

Ожиріння у гризунів розглядають як збільшення маси тіла за рахунок жирових депо при призначенні їм високожирової дієти, яка сприяє підвищенню внутрішньої маси організму. При цьому актуальним є визначення загального рівня лейкоцитів, які пов'язані з метаболічними порушеннями та жировою тканиною. Мета роботи — встановлення вікових особливостей лімфоцитів як маркера субклінічного запалення у щурів в умовах експериментального моделювання метаболічного синдрому. Дослідження проведено на 120 білих самках-щурах популяції WAG/G Sto. Тварин з МС було поділено на 3 основні групи за віком — молоді (статевонезрілі), зрілі (статевозрілі) та старі (пост репродуктивного віку) по 30 щурів у кожній групі. Експериментальна група із моделю-

ванням МС протягом 1 місяця (1 група); моделювання МС протягом 3-х місяців (2 група); моделювання МС протягом 6 місяців (3 група). Контрольна група (інтактні тварини), яким не проводили моделювання МС, складалась із 30 здорових щурів того ж віку, по 10 щурів кожного. При дослідженні імунологічного статусу лімфоцитів у щурів в умовах експериментального МС з'ясовано, що середні показники кількості лімфоцитів в 1 мл крові щурів змінювались з віком і вірогідно відрізнялися від контрольних значень. Рівень популяцій лімфоцитів у периферичній крові у щурів свідчить про зменшення кількості Т-лімфоцитів CD3+, CD8+ і CD4+, у порівнянні з контролем. Достовірні відмінності за середніми показниками абсолютних значень Т і В-лімфоцитів (CD3+ і CD19+), а також CD4+ між щурами основної та контрольної груп не виявлені. Абсолютний і відносний вміст лімфоцитів у щурів відображає зміни, що відбуваються в локальній ланці імунітету при метаболічному синдромі і виявлялося вираженою лейкоцитарною інфільтрацією, представленою переважно Т-лімфоцитами та клітинами моноцитарно-макрофагального ряду. Виявлені порушення можуть свідчити про запальну реакцію у віковому аспекті при МС.

Ключові слова: метаболічний синдром, ожиріння, системне запалення, лімфоцити, імунна система.

Сьогодні ожиріння розглядається як багатофакторна патологія, яка асоціюється з метаболічними порушеннями, цукровим діабетом, серцево-судинними захворюваннями, злоякісними новоутвореннями, тощо. Невпинне зростання ожиріння як серед дорослих, так і серед дитячого населення, стає все більш серйозною проблемою світової охорони здоров'я, що призводить до підвищення захворюваності і смертності.

Запалення є одним з важливіших механізмів в патогенезі ожиріння. Жирова тканина вважається як ініціатором, так і основним фактором системного запалення та вирішальним чином позначається на метаболічній та секреторній функції жирової тканини та відіграє провідну роль у розвитку патологічних процесів, що супроводжують ожиріння. Морфологічною основою запалення жирової тканини при ожирінні є інфільтрація останньої імунокомпетентними клітинами, що дозволяє розглядати її не лише як ендокринний орган, а й як орган імунної системи [1]. Саме запальні процеси в жировій тканині призводять до імунної відповіді та подальшого залучення різних типів лімфоцитів.

Дані як експериментальних, так і клінічних досліджень свідчать, про те, що підвищений загальний рівень лейкоцитів пов'язані з метаболічними порушеннями

та ожирінням [2].

Рівень лімфоцитів є легко вимірюваним, відтворюваним і доступним показником, який вказує на послаблений клітинний імунітет, що пов'язаний з системним запаленням і є незалежним маркером ризику розвитку діабету, інсулінорезистентності, метаболічного синдрому (МС). Між тим, кількість лейкоцитів може змінюватися не тільки в залежності від різних факторів, що пов'язані з ожирінням, а також в залежності від генетичних, екологічних та соціальних факторів, зокрема віку, статі, паління, фізичного навантаження, тощо

Метою роботи було встановлення вікових особливостей лімфоцитів як маркера субклінічного запалення у щурів в умовах експериментального моделювання метаболічного синдрому.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проведено на 120 білих самках-щурах популяції WAG/G Sto. Тварин з МС було поділено на 3 основні групи за віком — молоді (статевонезрілі), зрілі (статевозрілі) та старі (пост репродуктивного віку) по 30 щурів у кожній групі. Експериментальна група із моделюванням МС протягом 1 місяця (1 група); моделювання МС протягом 3-х місяців (2 група); моделювання МС протягом 6 місяців (3 група). Контрольна група (інтактні тварини), яким не проводили моделювання МС,

складалась із 30 здорових щурів того ж віку, по 10 щурів кожного.

Експерименти проведені відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схваленими І Національним конгресом з біоетики (20.09.2001 р., Київ, Україна) і узгодженими з положеннями «Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей».

Для моделювання МС щурам основної групи один раз на тиждень робили підшкірні ін'єкції бетаспану (20 мкг/кг маси), розчиненого в 0,2 мл очищеної і стерилізованої оливкової олії протягом 4 тижнів. Використовували для щурів висококалорійну дієту протягом усього експерименту, яка призводить до збільшення маси тіла тварин, збільшення площі адипоцитів і поступового розвитку гіперглікемії, інсулінорезистентності та розвитку МС [3].

Антропометричні показники визначали методами що сприяли питомому приросту маси тіла та розвитку ожиріння у тварин. Загальний аналіз крові був виконаний на гематологічному аналізаторі методом проточної цитофлуориметрії с розраховуванням кількості лімфоцитів.

Статистична обробка отриманих даних проводилася із застосуванням пакета програм Statistica 10.0 (StatSoft Inc., США). Оцінка вірогідності різниць середніх величин у групах (p) проводилася за допомогою критерію Стюдента (t). Відмінності вважалися статистично значущими при $p < 0.05$.

Результати дослідження та їх обговорення

При дослідженні імунологічного статусу лімфоцитів у щурів в умовах експериментального МС з'ясовано, що середні показники кількості лімфоцитів в 1 мл крові щурів змінювались з віком і вірогідно відрізнялися від контрольних значень (табл. 1).

Аналіз відносного вмісту різних популяцій лімфоцитів у периферичній крові у щурів свідчить про деяке зменшення середніх значень кількості Т-лімфоцитів (CD3+), Т-супресорів (CD8+) і достовірному зниженні Т-хелперів (CD4+), у порівнянні з контролем (табл. 1). Відзначена також тенденція до збільшення середніх показників відносно вмісту ЕК-кліток (CD16+).

Достовірні відмінності за середніми показниками абсолютних значень Т і В-лімфоцитів (CD3+ і CD19+), а також Т-хелперів (CD4+) між щурами основної та контрольної груп не виявлені (табл. 2). При МС встановлено достовірне зниження субпопуляції Т-супресорних лімфоцитів (CD8+) і підвищення ЕК-кліток (CD16+) у порівнянні з груповим контролем.

Достовірні відмінності за середніми показниками абсолютних значень Т і В-лімфоцитів (CD3+ і CD19+), а також Т-хелперів (CD4+) між щурами основної та контрольної груп не виявлені (табл. 2). При МС встановлено достовірне зниження субпопуляції Т-супресорних лімфоцитів (CD8+) і підвищення ЕК-кліток (CD16+) у порівнянні з груповим контролем.

Таблиця 1

Відносний вміст популяцій лімфоцитів у периферичній крові щурів при МС в залежності від віку

Показники	Група контролю ($n = 10$)	Молоді (статевонезрілі) 1 група ($n = 30$)	Зрілі (статевозрілі) 2 група ($n = 30$)	Старі (пост репродуктивного віку) 3 група ($n = 30$)
CD3 ⁺	65,0 ± 2,0	60,4 ± 2,3*	61,2 ± 4,0*	59,9 ± 2,9*
CD4 ⁺	40,5 ± 1,0	35,9 ± 1,56*	34,6 ± 3,18*	36,6 ± 1,78*
CD8 ⁺	23,3 ± 1,1	21,0 ± 1,5*	20,1 ± 2,7*	21,5 ± 1,9*
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,77 ± 0,11	1,96 ± 0,2*	2,2 ± 0,6*	1,9 ± 0,14*
CD16 ⁺	14,1 ± 1,8	17,1 ± 1,7*	16,5 ± 2,1*	18,4 ± 3,1*
CD19 ⁺	10,9 ± 0,8	8,6 ± 0,8*	9,7 ± 1,7	8,1 ± 1,0*

Примітка: - достовірні відмінності з груповим контролем ($P < 0,05$)

Враховуючи відсутність достовірних відмінностей за середніми показниками клітинної ланки імунітету, було проведено аналіз частоти виявлення змін цих параметрів у щурів із МС (табл. 3).

Таблиця 2

Показники абсолютного вмісту різних популяцій лімфоцитів у периферичній крові щурів при МС в залежності від віку

Показники	Група контролю (n = 10)	Молоді (статевонезрілі) 1 група (n = 30)	Зрілі (статевозрілі) 2 група (n = 30)	Старі (пост репродуктивного віку) 3 група (n = 30)
Загальна кількість лімфоцитів у плазмі крові	1,9 ± 0,2	1,95 ± 0,18	1,97 ± 0,6	1,95 ± 0,15
CD3 ⁺	1,2±0,1	1,12±0,09	1,05 ± 0,25	1,15 ± 0,07
CD4 ⁺	0,8±0,01	0,73 ± 0,09	0,77±0,4	0,71 ± 0,06
CD8 ⁺	0,5 ± 0,03	0,40 ± 0,04*	0,41±0,17	0,39±0,03*
CD16 ⁺	0,2±0,06	0,37±0,06*	0,35 ± 0,08	0,42±0,07*
CD19 ⁺	0,2 ± 0,05	0,18 ± 0,03	0,16±0,07	0,18 ± 0,04

Примітка: - достовірні відмінності з груповим контролем (P < 0,05)

Таблиця 3

Частота змін основних показників популяційного складу лімфоцитів периферичної крові щурів при МС у порівнянні з нормативними значеннями

Показники	Відносний зміст	Абсолютний зміст
CD3 ⁺	15 (35,7 %)	16 (38,1 %)
CD4 ⁺	22 (50 %)	19 (45,2 %)
CD8 ⁺	16 (38,1 %)	13 (30,9 %)
CD16 ⁺	16 (38,1 %)	16 (38,1 %)
CD19 ⁺	13 (30,9 %)	15 (35,7 %)

Примітка: - достовірна різниця з групою контролю (P < 0,05).

З представлених даних видно, що у 30,9-50 % випадків у щурів при МС відзначалося зниження основних популяцій лімфоцитів периферичної крові, а також збільшення вмісту ЕК-клітин (CD16⁺). Істотної різниці між щурами з МС не виявлено.

Вивчення гуморальної ланки імунітету, результати якої представлені в таблиці 4, дозволило виявити достовірне збільшення імуноглобулінів класу G у загальних групах щурів із МС порівняно з контрольною групою тварин. Істотних відмінностей у середніх рівнях IgM та IgA між обстеженими групами не встановлено. Виявлено суттєві відмінності у середніх рівнях IgG, IgM та IgA у віковому аспекті між обстеженими групами щурів.

Таким чином, дослідження імунних показників на системному рівні дозволило виявити тенденцію до зменшення вмісту Т-лімфоцитів (CD3⁺), зниження кількості Т-хелперів (CD4⁺) та Т-супресорів (CD8⁺), а також підвищення вмісту ЕК-клітин (CD 16⁺) та імуноглобулінів G у щурів при МС [4].

Отримані результати вказують, що при МС у 38,1 % тварин у віці до 6 місяців мають порушення Т-клітинної ланки системного імунітету, які свідчать про наявність імунодефіцитного стану [5].

Згідно з отриманих даних, у щурів при МС у віковому аспекті показник загальної кількості лейкоцитів був майже в 2 рази вищим, ніж у групі контролю (p < 0,05). Відсотковий вміст лімфоцитів серед загальної популяції лейкоцитів при МС в залежності від

віку щурів становив приблизно 65 %, що суттєво відрізнялося від групи контролю (табл. 5).

При порівнянні загальної кількості лімфоцитів у щурів при МС відзначалося майже дворазове підвищення їх вмісту у порівнянні з контролем. При МС відмічено також зміну співвідношення регуляторних субпопуляцій Т-лімфоцитів, що пов'язане із суттєвим підвищенням абсолютного вмісту Т-хелперів (CD4⁺). Найбільше їхнє збільшення було встановлено при МС, незважаючи на більш високе середнє значення CD4⁺ клітин [6].

Висновки

Проведене дослідження свідчать про те, що абсолютний і відносний вміст імунокомпетентних клітин у периферичній крові відображає зміни, що відбуваються в локальній ланці імунітету у щурів при метаболічному синдромі.

Згідно з отриманими даними, однотипні зміни імунітету характерні для щурів з МС, що виявлялося вираженою лейкоцитарною інфільтрацією, представленою переважно Т-лімфоцитами та клітинами

моноцитарно-макрофагального ряду, з підвищеною експресією молекул адгезії та деякого збільшення вмісту ЕК-клітин [7].

Виявлені порушення можуть свідчити про запальну реакцію у віковому аспекті при МС. Розвиток ожиріння супроводжується підвищенням лімфоцитів з оцінкою його клінічної значущості як маркера субклінічного запалення.

Таблиця 4.

Вміст імуноглобулінів у периферичній крові щурів при МС залежно від віку ($M \pm m$)

Показники	Група контролю (n = 10)	Молоді (статевонезрілі) 1 група (n = 30)	Зрілі (статевозрілі) 2 група (n = 30)	Старі (пост репродуктивного віку) 3 група (n = 30)
IgG	1225,0 ± 66,8	1495,1 ± 113,0*	1149,7 ± 97,6*	1657,1 ± 142,6***
IgM	183,0 ± 13,3	180,8 ± 15,8	148,3 ± 19,3*	197,0 ± 20,7*
IgA	222,5 ± 25,6	218,8 ± 14,5*	233,3 ± 23,0*	211,5 ± 18,7*

Примітка: - достовірна різниця з групою контролю ($P < 0,05$).

Таблиця 5.

Кількість лейкоцитів та лімфоцитів у периферичній крові щурів у нормі при МС залежно від віку, ($M \pm m$).

Показники	Контрольна група	Молоді (статевонезрілі) 1 група (n = 30)	Зрілі (статевозрілі) 2 група (n = 30)	Старі (пост репродуктивного віку) 3 група (n = 30)
Кількість лейкоцитів $10^6/\text{гтк}$	1,22 ± 0,18	2,32 ± 0,31*	1,99 ± 0,35*	2,59 ± 0,48*
% лімфоцитів	63,0 ± 4,62	65,0 ± 1,48	65,7 ± 2,61	64,4 ± 1,66
Кількість лімфоцитів $10^6/\text{гтк}$	0,74 ± 0,11	1,39 ± 0,13*	1,28 ± 0,22*	1,48 ± 0,17*

Примітка: - достовірна різниця з групою контролю ($P < 0,05$).

References/Література

- Longo M., Zatterale F., Naderi J., Parrillo L., Formisano P., Raciti G. A et. al. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. International Journal of Molecular Sciences. 2019. № 20 (9). 2358 p. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20092358>
- Sulaeva O.N., Belemets N.I. Sexual features of adipose tissue regulation // Clinical endocrinology and endocrine surgery. - 2017. - No. 4 (60). - P. 11-20.
Сулаева О.Н., Белемец Н.И. Половые особенности регуляции жировой ткани // Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія. — 2017. — № 4 (60). — С. 11-20.
- Kotero AN., Ushenkova L.N., Zubenkova E.S., Vainson A.A., Biryukov A.P., Samoilov A.S. Dependence of body weight on age for outbred white and eight lines of laboratory rats: synthetic studies of data from experimental works and nurseries in the aspect of connection with radiosensitivity. Some characteristics of the species "rat" // Medical Radiology and Radiation Safety. - 2018. - Vol. 63. - No. 2. - P. 1-41
Котеров А.Н., Ушенкова Л.Н., Зубенкова Э.С., Вайнсон А.А., Бирюков А.П., Самойлов А.С. Зависимость массы тела от возраста для беспородных белых и восьми линий лабораторных крыс: синтетические исследования данных из экспериментальных работ и питомников в аспекте связи с радиочувствительностью. Некоторые характеристики вида «крыса» // Медицинская радиология и радиационная безопасность. — 2018. — Том. 63. — № 2. — С. 1-41.
- Kuzmina I.Yu., Shutova N.A., Nikolayeva Q.V. The method of modeling the metabolic syndrome in the experiment: pat. No. 118945 Ukraine, IPC G09B 23/28; published 25.03.19. Bul. 6.
Кузьміна І.Ю., Шутова Н.А., Ніколаєва О.В. Спосіб моделювання метаболічного синдрому в експерименті: пат. № 118945 Україна, МПК G09B 23/28; опубл. 25.03.19. Бюл. 6.
- Arner E., Westermark P. O., Spalding K. L., Britton T., Ryden M., Frisen J. et al. Adipocyte turnover: Relevance to human adipose tissue morphology. Diabetes. 2022. № 59. P. 105–109. DOI: <http://dx.doi.org/10.2337/db09-0942>
- Sulaeva O.N., Belemets N.Y. Sexual features of regulation of fat tissue // Clinical endocrinology and endocrine surgery. — 2017. — No. 4 (60). — S. 11-20.
Сулаева О.Н., Белемец Н.И. Половые особенности регуляции жировой ткани // Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія. — 2017. — № 4 (60). — С. 11-20.
- Faloia E., Michetti M., Robertis D. Inflammation as a Link between Obesity and Metabolic Syndrome. Journal of Nutrition and Metabolism. 2012. P. 2–7. DOI: <https://doi.org/10.1155/2012/476380>

Вперше надійшла до редакції 21.02.2025 р.
Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування