

# Вплив цитрату ванадію на гематологічні характеристики щурів із алоксаніндукованим діабетом

Л.І. Понкало, Г.В. Климець, Р.Я. Іскра, О.О. Сушко

Інститут біології НААН, Львів; e-mail: ponkalo-lesia@ukr.net

*Досліджували вплив цитрату ванадію на гематологічні показники щурів із алоксаніндукованим діабетом. Встановлено, що у тварин дослідної групи, які вживали питну воду, вірогідно підвищувалася кількість лейкоцитів на 50,24 %, тромбоцитів на 56,94 % та концентрація гемоглобіну на 11,87 % порівняно з контролем. Крім того, у них зростав середній об'єм еритроцита, що супроводжувалося зниженням середньої концентрації гемоглобіну в одному еритроциті. Виявлено, що застосування цитрату ванадію в дозі 0,125, 0,5, і 2 мкг/мл за умов цукрового діабету призводило до нормалізації показників гематологічного профілю, зокрема знижувалась кількість лейкоцитів на 20,49, 12,36 і 29,14 % ( $P < 0,001$ ) відповідно порівняно з групою щурів, які вживали лише воду. У тварин, яким вводили цитрат ванадію у дозі 0,125 і 0,5 мкг/мл вірогідно знижувалась кількість тромбоцитів на 55,83 і 51,92 %, вміст гематокриту на 23,79 і 14,20 %, тромбокриту на 27,29 і 58,25 % та концентрація гемоглобіну на 24,97 та 13,98 %, при цьому вони сягали майже контрольних значень.*

*Ключові слова: діабет; цитрат ванадію; кров; алоксан; щури.*

## ВСТУП

Цукровий діабет (ЦД) є багатофакторним метаболічним захворюванням із характерною для нього гіперглікемією, яка виникає внаслідок дефіциту інсуліну або через інсулінорезистентність [1]. Згідно з сучасними даними, в патогенезі його ускладнень, окрім гіперглікемії, недостатності функцій  $\beta$ -клітини, інсулінової резистентності, залучені додаткові групи факторів ризику – запалення та структурно-функціональні порушення системи крові [4]. Існують свідчення, що це захворювання може впливати на гематологічний профіль тварин, зокрема знижувати кількість циркулюючих стовбурових клітин (клітин-попередників) і порушувати їхню функцію, що впливає на якісні та кількісні параметри клітин крові [7]. У зв'язку з цим при дослідженні нових антидіабетичних препаратів стає очевидною необхідність враховувати не лише їх гіпоглікемічну дію, але й вплив на функціональний стан клітин крові. Віднедавна все більшу увагу дослідників привертають

препарати сполук ванадію. Так, встановлено, що лікування ванадієм зумовлює зниження вмісту глюкози у крові дослідних щурів із ЦД 1-го та 2-го типу [5]. Щодо механізму дії солей ванадію найпоширенішою гіпотезою є те, що він може взаємодіяти із такими фосфатними групами ферментів, як тирозингідроксилаза, аденозинкіназа, гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа чи рибонуклеаза [9]. Сполуки ванадію також здатні відновлювати активність ферментів, які беруть участь у метаболізмі. Досліджено, що ванадій є конкурентним інгібітором глюкозо-6-фосфатфосфатази — головного ензиму у розвитку інсулінорезистентності при ЦД 2-го типу [6].

Метою наших досліджень було з'ясувати вплив різних кількостей органічної сполуки цитрату ванадію на гематологічний профіль щурів із алоксаніндукованим діабетом.

## МЕТОДИКА

Дослідження проведені на 40 білих лабораторних щурах, які перебували в умовах

віварію Інституту біології тварин НААН, масою тіла від 100 до 120 г. Тварин було розділено на п'ять груп: контрольну (I) і 4 дослідні. Тваринам II групи давали пити чисту воду без добавок, а III, IV і V груп протягом місяця до неї додавали розчин цитрату ванадію в кількостях 0,125, 0,5 і 2,0 мкг/мл води відповідно. У тварин усіх дослідних груп на тлі 24-годинного голодування моделювали ЦД внутрішньоочеревинним введенням 5 %-го розчину моногідрат алоксану ("Синбіас", Україна) у дозі 150 мг/кг. Через 30 хв після введення препарату тваринам було відновлено доступ до їжі та води. Гіперглікемію виявляли вимірюванням вмісту глюкози крові, зібраної з хвостової вени, за допомогою портативного глюкометра ("Gamma-M", Великобританія). Для подальших досліджень залучали тільки тварин з підвищеним її вмістом (>12 ммоль/л). Через 40 діб тварин декапітували під легким ефірним наркозом. Експерименти проводили відповідно до положень "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей" (Страсбург, 1986), "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах", ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Матеріалом для дослідження слугувала кров щурів, яку відбирали одразу після де-

капітації. Комплексний аналіз крові здійснювали на ветеринарному гематологічному аналізаторі ("Orphee Mythic 18 Vet", Швейцарія), використовуючи пробірки, які містили антикоагулянт ЕДТА – К 3. Визначали такі показники: загальну кількість еритроцитів, лейкоцитів, лімофоцитів, моноцитів, гранулоцитів, тромбоцитів, концентрацію гемоглобіну, гематокрит, тромбокрит, середній об'єм еритроцита, середній вміст гемоглобіну в еритроциті, ширину розподілу еритроцитів, середній тромбоцитарний об'єм.

Результати обраховували за допомогою комп'ютерної програми «Statistika». Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерій t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Отримані в експерименті результати свідчать про істотне підвищення вмісту глюкози в крові (2,4 раза) після моделювання ЦД (табл. 1) Це можна пояснити тим, що алоксан виступає токсичним аналогом глюкози, який акумулюється в панкреатичних  $\beta$ -клітинах за допомогою переносника глюкози GLUT 2. За наявності глутатіону він генерує активні форми кисню в циклічній окисно-відновній реакції за участю відновленого продукту – діалурової кислоти [10].

Таблиця 1. Концентрація глюкози у крові щурів із цукровим діабетом (ЦД) за введення цитрату ванадію ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Схема дослідю, групи тварин	Вихідний стан	1-ша доба експерименту	30-та доба експерименту	10-та доба після введення алоксану
Контроль (I група)	6,51 $\pm$ 0,49	6,87 $\pm$ 0,45	6,12 $\pm$ 0,30	6,08 $\pm$ 0,51
ЦД (II група)	6,68 $\pm$ 0,16	6,65 $\pm$ 0,31	6,48 $\pm$ 0,27	15,14 $\pm$ 0,64***
ЦД і введення цитрату ванадію 0,125 мкг/мл (III група)	6,61 $\pm$ 0,3	6,46 $\pm$ 0,61	6,56 $\pm$ 0,56	13,96 $\pm$ 0,66***
0,5 мкг/мл (IV група)	6,23 $\pm$ 0,3	6,2 $\pm$ 0,51	6,15 $\pm$ 1,23	13,26 $\pm$ 0,35***##
2,0 мкг/мл (V група)	5,79 $\pm$ 0,23	6,4 $\pm$ 0,47	6,78 $\pm$ 0,62	14,38 $\pm$ 0,54***

Примітка: У цій і наступних таблицях різниці статистично вірогідні: \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$  порівняно з контролем; #  $P < 0,05$ ; ##  $P < 0,01$ ; ###  $P < 0,001$  порівняно з II дослідною групою.

За умов додавання до раціону щурів цитрату ванадію у тварин III, IV, V дослідних груп знижувався вміст глюкози, проте ці значення виявилися вірогідними лише у тварин IV групи порівняно з II, що вказує на нормалізуючий вплив цитрату ванадію. Доведено, що метаболічні форми ванадію у живому організмі мають здатність зв'язувати транспортні білки і тому він може бути неконкурентним інгібітором  $K^+$ -АТФази. Як наслідок — інгібування  $Na^+$ ,  $K^+$ -АТФази може підвищити швидкість транспорту і окиснення глюкози [5, 9].

Гематологічні дослідження (табл. 2) свідчать про те, що у крові щурів II групи зросло число еритроцитів на 7,20 %, концентрація гемоглобіну та гематокрит на 11,87 (P<0,01) та 14,48 % (P<0,001) відповідно, проте знижувалася середня концентрація гемоглобіну 10,7 % (P<0,001) та збільшувався середній об'єм еритроцита на 7,22 % (P<0,01). Така невідповідність між масою і концентрацією гемоглобіну в одному еритроциті зумовлена тим, що в крові дослідних тварин наявні молоді еритроцити, що мають великий об'єм,

а тому і більшу масу гемоглобіну порівняно з старими еритроцитами. За умов ЦД такі зміни гематологічних показників відбуваються як компенсаторна реакція організму, спрямована на збільшення кисневої ємності крові у відповідь на тканинну гіпоксію, яка виникає внаслідок збільшення в еритроцитах глікозильованого гемоглобіну з підвищеною спорідненістю до кисню [4].

Результати досліджень (див. табл. 2) вказують на відсутність значимих змін у кількості еритроцитів у III, IV, V групах порівняно з контрольною, при цьому знижувалася концентрація гемоглобіну та гематокрит (P<0,05-0,01) у тварин III групи, зростав середній об'єм еритроцита (P<0,05-0,001) у тварин IV і V груп та вірогідно знижувалася середня концентрація гемоглобіну в еритроциті на 3,0, 4,19 та 5,54 % у III, IV і V дослідних групах відповідно. Відомо, що ванадій регулює процеси кровотворення, оскільки він може засвоюватися за допомогою молекул-переносників, зокрема утворювати комплекси з трансферином, феритином, посилювати зв'язування кисню з гемоглобіном та мет-

**Таблиця 2.** Кількість еритроцитів та їх функціональні властивості у периферичній крові щурів із цукровим діабетом (ЦД) за введення цитрату ванадію ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Групи тварин	Еритроцити, $1 \times 10^{12}/л$	Концентрація гемоглобіну, г/л	Гематокрит, %	Середній об'єм еритроцита, $мкм^3$	Середній вміст гемоглобіну, пг	Середня концентрація гемоглобіну в еритроциті, $мг^*моль/л$
Контроль (I група)	7,36±0,24	141,725±3,497	37,30±1,014	50,60±0,722	19,61±0,192	380,25±0,930
ЦД (II група)	7,899±0,23	157,75±1,989**	42,70±0,424**	54,26±0,438**	19,98±0,119	368,85±1,146***
ЦД і введення цитрату ванадію						
0,125 мкг/мл (III група)	6,38±0,401#	118,35±5,844**###	32,54±1,683###	51,87±0,407##	18,94±0,449	368,54±4,79*
0,5 мкг/мл (IV група)	7,04±0,249#	135,70±6,458#	36,64±1,032###	52,73±0,285**	19,24±0,075	368,40±2,035***
2,0 мкг/мл (V група)	7,21±0,222	142,50±8,32	39,17±1,27	54,25±0,242***	19,73±0,041	359,18±2,424***##

гемоглобіном [5]. Таким чином, концентрація ванадію змінюється зі споживанням заліза, а тому впливає на вміст гемоглобіну в крові. Крім цього, ванадій також стимулює процеси еритропоезу, пришвидшує регенерацію червоних кров'яних клітин тощо [5]. Також вважається, що при гіпоксії його сполуки можуть покращувати функції кардіоміоцитів. Подібний вплив ванадію на зміну кількості еритроцитів, концентрацію гемоглобіну та гематокриту є також у працях інших авторів [8].

У разі впливу цитрату ванадію в крові щурів із діабетом у III та IV дослідних групах вірогідно знижувалася кількість еритроцитів, концентрація гемоглобіну та вміст гематокриту порівняно з тваринами II групи. Також знижувався середній об'єм еритроцита на 4,40 та 2,81 % ( $P<0,05-0,01$ ) відповідно, водночас середня концентрація гемоглобіну в еритроциті наближалася до значень II групи, що свідчить про нормалізацію кисеньтранспортної функції. За даними Iskra і співавт. [1] сполуки ванадію підвищують інтенсивність перетворення вуглеводів гліколітичним шляхом. Однією з ланок механізму регуляції ванадієм метаболізму в еритроцитах, імовірно, є його стимулювальний вплив на утворення дифосфогліцерофосфату (2, 3- DPG) і, відповідно, на кисеньтранспортну функцію гемоглобіну.

Лейкоцитарний профіль крові відображає загальну реактивність організму. Слід відмітити зростання кількості лейкоцитів на

50,24 % ( $P<0,01$ ) у тварин II групи порівняно з контрольною, що може бути спричинене адаптаційною реакцією організму на виникнення патофізіологічних змін (табл. 3). ЦД супроводжується інфекційно-запальними процесами, з яких найчастішими є бактерійні інфекції, котрі зумовлюють виникнення рецидивів і важко піддаються лікуванню. Зниження кількості лейкоцитів у тварин III, IV та V груп на 20,49 ( $P<0,05$ ), 12,36 та 29,14 % ( $P<0,001$ ) відповідно щодо значень II групи свідчить про нормалізацію лейкопоезу за дії цитрату ванадію у досліджуваних дозах.

При дослідженні окремих форм лейкоцитів (див. табл. 3) встановлено, що у крові щурів II групи зростала кількість лімфоцитів, моноцитів та гранулоцитів ( $P<0,05-0,001$ ) порівняно з контрольною групою. Зміни окремих форм лейкоцитів та порушення їхніх функціональних властивостей є ймовірними причинами схильності хворих на ЦД до інфекційних процесів і порушення імунологічного статусу [4].

Зважаючи на те, що клітинно-опосередкована імунна відповідь — один з найважливіших чинників, що визначають активність імунної системи організму, нами було проаналізовано зміни показників окремих форм лейкоцитів крові щурів із ЦД за впливу цитрату ванадію. Встановлено, що його застосування при діабеті призводить до нормалізації показників лейкоцитарного профілю, зокрема до зменшення кількості лімфоцитів у III, IV

**Таблиця 3. Загальна кількість лейкоцитів та їх окремих підгруп у периферичній крові щурів із цукровим діабетом (ЦД) за введення цитрату ванадію ( $M\pm m$ ,  $n=5$ )**

Групи тварин	Лейкоцити, $1\times 10^9/\text{л}$	Лімфоцити, $1\times 10^9/\text{л}$	Моноцити, $1\times 10^9/\text{л}$	Гранулоцити, $1\times 10^9/\text{л}$
Контроль (I група)	12,54 $\pm$ 0,93	9,32 $\pm$ 0,79	0,47 $\pm$ 0,07	2,75 $\pm$ 0,09
ЦД (II група)	18,84 $\pm$ 1,17**	12,26 $\pm$ 0,60*	2,23 $\pm$ 0,33***	4,32 $\pm$ 0,26***
ЦД і введення цитрату ванадію	14,98 $\pm$ 0,19*#	11,18 $\pm$ 0,28	0,96 $\pm$ 0,10**##	2,85 $\pm$ 0,02###
0,125 мкг/мл (III група)	16,51 $\pm$ 0,94*	11,82 $\pm$ 0,64*	1,33 $\pm$ 0,13***#	3,35 $\pm$ 0,22**
0,5 мкг/мл (IV група)	13,35 $\pm$ 0,17###	9,81 $\pm$ 0,23##	0,71 $\pm$ 0,13##	2,83 $\pm$ 0,11###
2,0 мкг/мл (V група)				

Таблиця 4. Вміст тромбоцитів і тромбоцитарні індекси щурів периферичної крові із цукровим діабетом (ЦД) за введення цитрату ванадію ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Групи тварин	Тромбоцити, $1 \times 10^9/\text{л}$	Тромбокрит, %	Середній об'єм тромбо- цита, фл	Відносна ширина розподілу тромбо- цитів за об'ємом, %
Контроль (I група)	457,56±66,552	0,271±0,037	6,32±0,102	22,21±1,891
ЦД (II група)	718,10±58,43*	0,436±0,022**	6,14±0,157	16,76±0,529*
ЦД і введення цитрату ванадію				
0,125 мкг/мл (III група)	371,15±57,624###	0,317±0,075	6,27±1,427	21,84±1,873##
0,5 мкг/мл (IV група)	345,25±25,102###	0,182±0,027##	6,56±0,193	23,59±2,383#
2,0 мкг/мл (V група)	614,00±29,052	0,545±0,115	6,18±0,985	15,09±0,176**

та V групах на 8,81, 3,59 та 9,98 % ( $P < 0,01$ ), зниження кількості моноцитів та гранулоцитів ( $P < 0,05-0,001$ ) порівняно з тваринами II групи. При цьому нами відмічено, що вказані показники у III та V групах практично зменшувалися до контрольних значень.

У патогенезі ангіопатій виключне значення надається тромбоцитам, які ініціюють процес тромбоутворення та розвиток основних форм ускладнення. У тварин з ЦД (табл. 4) зростала кількість тромбоцитів на 56,94 ( $P < 0,05$ ) та тромбокрит на 60,89 % ( $P < 0,01$ ). Стан тривалої гіперглікемії призводить до порушення регуляції низки сигнальних шляхів у тромбоцитах, що зумовлює підвищення їх утворення. Результатом усіх цих змін є посилення гемокоагуляції та розвиток судинної дисфункції, що може відігравати ключову роль у розвитку діабетичних ангіопатій [3]. Слід відзначити (див. табл. 4) зниження кількості тромбоцитів у III та IV групах на 18,91 та 24,60 % відповідно порівняно з контролем, проте ці результати не є вірогідними. Крім цього, знижувалася кількість тромбоцитів у III і IV групах на 55,83 і 51,92 % ( $P < 0,001$ ) відповідно щодо значень II групи, а також зменшувався тромбокрит у тварин IV дослідної групи на 58,25 % ( $P < 0,01$ ). Результати досліджень *in vitro* свідчать, що сполуки ванадію індукують активацію тромбоцитів і збільшення їх агрегації, як наслідок відбувається інгібування білків тирозинфосфатаз, а це підвищує

вміст фосфорильованих білків, які залучені до активації тромбоцитів [7].

При дослідженні середнього об'єму тромбоцитів вагомих змін не спостерігали у жодній дослідній групі. Показник гетерогенності тромбоцитів вірогідно знизився у тварин II та V груп порівняно з контролем, що може вказувати на порушення розмірів популяції тромбоцитів. Проте застосування цитрату ванадію щурам III та IV груп сприяло вірогідному зростанню цього показника та сягало контрольних значень. Загалом отримані результати проведених досліджень свідчать про нормалізацію гематологічного профілю крові щурів із алоксаниндукованим діабетом за впливу цитрату ванадію.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.*

**Л.І. Понкало, Г. В. Клымец, Р.Я. Искра, О.О. Сушко**

#### **ВЛИЯНИЕ ЦИТРАТА ВАНАДИЯ НА ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КРЫС С АЛЛОКСАНИНДУЦИРОВАННЫМ ДИАБЕТОМ**

Исследовали влияние цитрата ванадия на гематологические показатели крыс с аллоксаниндуцированным диабе-

том. Установлено, що в умовах експериментально викликаного діабета у тварин, які вживали чисту воду, достовірно підвищалося кількість лейкоцитів на 50,24%, тромбоцитів на 56,94% і концентрація гемоглобіна на 11,87% по порівнянню з контролем. Крім того, у них збільшилася середня об'ємна еритроцита, що супроводжалося зниженням середньої концентрації гемоглобіна в одному еритроциті. Установлено, що застосування цитрату ванадію в дозах 0,125, 0,5 і 2 мкг/мл при аллоксаниндукованому діабеті приводило до нормалізації показників гематологічного профілю щурів, зокрема кількість лейкоцитів зменшилася на 20,49 ( $P < 0,005$ ), 12,36 і 29,14% ( $P < 0,001$ ) відповідно порівнянню з тваринами, які пили тільки воду. У тварин, які вживали цитрат ванадію в дозах 0,125 і 0,5 мкг/мл, достовірно зменшилася кількість тромбоцитів на 55,83 і 51,92%, вміст гематокриту – на 23,79 і 14,20%, тромбоцитів – на 27,29 і 58,25% і концентрація гемоглобіна – на 24,97 і 13,98%, при цьому ці показники досягали майже контрольних значень. Ключові слова: діабет, цитрат ванадію, кров, аллоксан, щур.

**L. Ponkalo, H. Klymets, R. Iskra, O. Sushko**

#### **THE EFFECT OF VANADIUM CITRATE ON HAEMATOLOGICAL CHARACTERISTICS OF RATS UNDER ALLOXAN-INDUCED DIABETES**

The effect of vanadium citrate on the haematological indexes of the alloxan-induced diabetic rats was studied. It was established that in animals of the II group which consumed pure water, the number of leukocytes apparently increased by 50.24%, platelets – by 56.94%, and the hemoglobin concentration - by 11.87% as compared to the control. In addition, in animals of this group, the mean cell volume increased, which was accompanied by a decrease in the mean corpuscular hemoglobin concentration. It was found that the consumption of vanadium citrate at doses of 0,125, 0,5, і 2  $\mu\text{g/ml}$  under alloxan-induced diabetes resulted in the normalization of rats' haematological profile indexes, particularly the number of leukocytes decreased by 20.49, 12.36 and 29.14% respectively, as compared to the control group II. In animals treated with vanadium citrate at doses of 0,125 and 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , it was

shown an apparent decrease in the number of platelets by 55.83 and 51.92%, the magnitude of hematocrit by 23.79 and 14.20%, thrombocrit by 27.29 and 58.25% and hemoglobin concentration by 24.97 and 13.98%, while these parameters reached almost control values.

Key words: diabetes; vanadium citrate; blood; alloxan; rats.

*Institute of Animal Biology of NAAS, Lviv.*

#### **REFERENCES**

1. Iskra R, Sushko O, Klymets H, Ponkalo L. Impact of vanadium citrate on glutathione blood system in rats with experimentally induced diabetes. *Visn. Lviv University. Biology series.* 2016; 73:144-7. [Ukrainian].
2. Belayeva N, Gorodetskii V, Tochilkin A, Golubev M. Vanadium compounds as a new class of therapeutical agents for treatment of diabetes mellitus. *Biomed Chem.* 2000; 46(4): 344-60. [Russian].
3. Naumenko V. Pathogenetic therapy of diabetes complications. *Int J Endocrinol.* 2006; 1(3): 55-60. [Ukrainian].
4. Khokhla M, Kleveta G, Chajka Ya, Skybitska M, Sybirna N. The influence of Galega officinalis under on rats leukocytes apoptosis the experimental diabetes mellitus type I. *Visn Lviv University. Biology series.* 2012; 60:117-25. [Ukrainian].
5. Chekman IS, Kaplunenko VG, Haiduk KS. Vanadium: clinic, pharmacological and toxicological properties. *Ukr Medl J.* 2016; 1(111): 28-32. [Ukrainian].
6. Bose S, Farah M, Jung H et al. Molecular mechanism of bis(maltolato)oxovanadium(IV)-induced insulin signaling in 3T3-L1 and IM9 cells: impact of dexamethasone. *J Mol Endocrinol.* 2007; 38(6):627-49.
7. Pumiglia K, Lau L, Huang Ch et. al. Activation of signal transduction in platelets by the tyrosine phosphatase inhibitor pervanadate (vanadyl hydroperoxide). *Biochem J.* 1992; 286:441-9.
8. Sánchez-González C, Rivas-García L, López-Chaves C. Exposure to bis(maltolato)oxovanadium(IV) increases levels of hepcidin mRNA and impairs the homeostasis of iron but not that of manganese. *Food Chem Toxicol.* 2014; 73:451-9.
9. Thompson K, Orvig C. Vanadium in diabetes: 100 years from Phase to Phase. *I J Inorg Biochem.* 2006; 100(12):1925-35.
10. Rohilla A, Ali S. Alloxan Induced Diabetes: Mechanisms and Effects. *Int J Res Pharma Biomedical Sci.* 2012; 3:819-23.

*Матеріал надійшов до редакції 24.02.2017*