



Влияние различных сахарозаменителей на содержание гликогена лейкоцитов крови и состав лейкоцитарной формулы у мышей C57BL/6

А.Г. Кижина^{1,*} , М.С. Машинкас² , Э.В. Панова^{1,2} , В.В. Илюха² 

¹Институт биологии Карельского научного центра, Российская академия наук, Федеральный исследовательский центр «КарНЦ РАН», 185910, Россия, Республика Карелия, г. Петрозаводск, ул. Пушкинская, д. 11;

²Петрозаводский государственный университет, 185910, Россия, Республика Карелия, г. Петрозаводск, пр. Ленина, д. 33

*e-mail: golubewa81@yandex.ru

Изучали влияние экстракта листьев стевии, сахарината и цикламата в различных дозировках на содержание гликогена лейкоцитов крови у мышей C57BL/6, как необходимого субстрата для осуществления фагоцитарных реакций. Установлено увеличение содержания гликогена во всех экспериментальных группах, получавших заменители сахара в дозировке 10 мг/г массы тела. Влияние сахарозаменителей на состав лейкоцитарной формулы было выявлено только для мышей, получавших экстракт листьев стевии в дозировке 10 мг/г массы тела, и заключалось в повышении соотношения нейтрофилов и лимфоцитов (Нф/Лф). Полученные данные расширяют представления о метаболизме заменителей сахара в организме и их влиянии на физиологические системы – в частности, на гемопоэтическую и иммунную.

Ключевые слова: экстракт листьев стевии, сахаринат, цикламат, гликоген, лейкоциты, мыши C57BL/6

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-4-6

Введение

Широкое применение различных сахарозаменителей в последние десятилетия вызвано стремлением сократить потребление рафинированного сахара и снизить связанные с ним риски для здоровья (повреждение зубной эмали, чрезмерная секреция инсулина, развитие ожирения и др.). Однако, несмотря на популярность некоторых заменителей сахара и имеющиеся свидетельства в пользу их безопасности и даже эффективности при лечении метаболических расстройств [1, 2], вопрос о последствиях их воздействия на различные физиологические системы и организм в целом остается открытым. Так, сведения о возможном влиянии употребления сахарозаменителей на свойства иммунокомпетентных клеток и функционирование иммунной системы фрагментарны и нуждаются в дополнении.

На примере фруктозы [3], сахарозы и аспартама [4] показано, что одним из нарушений углеводного обмена при приеме подсластителей является

угнетение синтеза гликогена печени. В лейкоцитах гликоген служит основным запасующим субстратом, необходимым для энергетического обеспечения реакций неспецифического иммунитета. Накопление достаточного количества гликогена лейкоцитами требуется для эффективного осуществления фагоцитарных реакций [5]. Ослабление фагоцитоза в отношении различных возбудителей было показано как у больных сахарным диабетом, так и у моделей генетически запрограммированного сахарного диабета 2-го типа (db/db мыши) [6]. Немаловажным является тот факт, что одним из нарушений при развитии диабета является дефект метаболизма глюкозы и как следствие снижение синтеза гликогена в печени [7].

С учетом этого представляется актуальным изучение содержания гликогена в лейкоцитах при приеме искусственных и натуральных заменителей сахара. Также одним из описанных эффектов влияния потребления сахарозаменителей на иммунологические параметры является изменение

уровня про- и противовоспалительных цитокинов [8], что может оказывать модулирующее действие на пролиферацию и дифференцировку различных типов лейкоцитов.

Целью настоящего исследования являлось сравнительное исследование содержания гликогена в лейкоцитах периферической крови, а также количества различных типов лейкоцитов у мышей C57BL/6 при приеме некоторых сахарозаменителей.

Материалы и методы

Работа проводилась на самках лабораторных мышей инбредной линии C57BL/6 в возрасте от 1,5 мес., содержащихся в виварии Петрозаводского государственного университета при стандартных условиях. Экспериментальные животные были разбиты на 7 групп: 1-я – контрольная ($n = 6$), получавшая очищенную питьевую воду, и 6 других, которые взамен питьевой воды потребляли водные растворы различных сахарозаменителей – экстракта листьев стевии (ЭЛС) в дозе 1 мг/г массы тела (2-я группа, $n = 9$), ЭЛС в дозе 10 мг/г массы тела (3-я группа, $n = 10$), сахарината в дозе 1 мг/г массы тела (4-я группа, $n = 8$), сахарината в дозе 10 мг/г массы тела (5-я группа, $n = 10$), цикламата в дозе 1 мг/г массы тела (6-я группа, $n = 7$), цикламата в дозе 10 мг/г массы тела (7-я группа, $n = 9$). Расчет дозировки 1 мг/г производился исходя из рекомендаций производителей, учитывая массу тела экспериментальных животных при коэффициенте безопасности 100, а для усиления эффекта допустимую суточную дозу каждого заменителя сахара увеличили в 10 раз, что составило 10 мг/г. Эксперимент длился 8 нед., на протяжении которых все животные получали экструдированно-гранулированный корм ЛБК-120 (Профгрызун, Россия), а также воду или водные растворы заменителей сахара без ограничения. Поение животных было свободное, при этом количество потребляемых сахарозаменителей во всех группах было постоянным, так как концентрация растворов корректировалась с учетом количества потребляемой жидкости и изменения веса животных. Определяли массу тела мышей, наблюдали за их внешним видом и активностью.

По окончании эксперимента мышей декапировали в утренние часы, полученную кровь использовали для анализа содержания глюкозы глюкозооксидазным методом, а также для приготовления мазков. Для определения содержания глюкозы в крови использовался набор реагентов «КлиниТест-Глюкоза» (Эко-Сервис, Россия). Анализ проводился на многорежимном планшетном считывателе SpectraMax i3x (Molecular Devices, США). Мазки крови окрашивались гематологическими красителями по Паппенгейму для определения соотношения различных типов лейкоцитов и методом ШИК-реакции (реакция с ре-

активом Шиффа – йодной кислотой) для выявления содержания лейкоцитарного гликогена.

Окрашенные мазки исследовали при помощи светового микроскопа Axioscop 40, (Zeiss, Германия). Цифровые микрофотографии гликоген-позитивных лейкоцитов от каждого животного анализировали с использованием программного обеспечения для анализа изображений ВидеоТест 4.0 (ВидеоТест, Россия). Автоматически измеряли морфометрические и оптические характеристики: общую площадь продукта цитохимической реакции в клетках и его оптическую плотность. Содержание гликогена оценивали по интенсивности цитохимического показателя, который представляет собой произведение двух этих параметров.

Полученные данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики с использованием MS Excel и Statgraphics plus 5.0. Для проверки групп на нормальность распределения был использован критерий Колмогорова-Смирнова. Для сравнения групп, в связи с отсутствием нормальности распределения показателей был выбран непараметрический U-критерий Манна-Уитни для малых выборок, с учетом поправки на множественность сравнений FDR (false discovery rate). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Лабораторные исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

Результаты и обсуждение

По результатам цитохимического исследования установлено, что гликоген выявляется преимущественно в нейтрофильных лейкоцитах. Содержание гликогена, которое оценивалось по интегральному цитохимическому показателю, было не одинаковым среди экспериментальных групп. Более высокие его значения установлены у опытных животных, потреблявших концентрированные растворы сахарозаменителей (рис. 1). При этом значительных изменений в содержании глюкозы крови при приеме всех трех сахарозаменителей выявлено не было (табл. 1). Накопленный на сегодняшний день объем данных указывает на существование противоречий относительно метаболизма глюкозы, а также синтеза инсулина и глюкагона при приеме сахарозаменителей. Роберт Такер и Ши-Ен Тан [9] приводят результаты более 10 исследований, которые показывают, что употребление различных заменителей сахара, включая ЭЛС и сахарината, не оказало существенного влияния на уровень глюкозы.

Наш эксперимент показал, что, не смотря на отсутствие различий в уровне глюкозы крови у исследуемых животных, содержание гликогена су-

щественно возросло при приеме сахарозаменителей в дозировке 10 мг/г. Увеличение уровня гликогена в клетках печени было установлено у крыс получавших водный раствор листьев стевии в различных дозировках [10]. Одной из возможных причин увеличения содержания гликогена является усиление секреции инсулина под влиянием сахарозаменителей. Согласно данным ряда исследователей сахаринат, цикламат и стевизид повышают уровень инсулина за счет воздействия на β -клетки поджелудочной железы [11, 12]. В другой работе было показано, что синтетические подсластители увеличивают доступность глюкозы для организма за счет усиления ее абсорбции путем активации транспортных белков SGLT1 и GLUT2 [13].

Установленное увеличение содержания гликогена в нейтрофильных лейкоцитах, может рассматриваться как положительный эффект влияния сахарозаменителей, так как накопление гликогена в достаточном количестве является необходимым условием эффективного фагоцитоза, даже при обилии внеклеточной глюкозы [5]. Иммуномодулирующие свойства сахарозаменителей, на примере ЭЛС были продемонстрированы и в другом исследовании, где при его введении

у мышей значительно увеличилась фагоцитарная активность макрофагов селезенки [14].

Результаты нашего эксперимента показали, что потребление сахарозаменителей не влияет на относительное содержание различных типов лейкоцитов периферической крови (рис. 2), но при этом установлено возрастание нейтрофильно-лимфоцитарного соотношения (Нф/Лф) при приеме ЭЛС в дозировке 10 мг/г (рис. 3). Мыши, как и большинство грызунов, имеют эволюционно сложившийся лимфоцитарный профиль крови, и количество нейтрофильных лейкоцитов у них невелико. Повышение нейтрофилов по отношению к лимфоцитам крови в большинстве случаев рассматривается как неблагоприятный признак, который может указывать на наличие системного воспаления или хронического стресса у животных, в том числе человека [15, 16]. Найденное увеличение Нф/Лф может быть связано с перераспределением про- и противовоспалительных цитокинов при приеме ЭЛС в высокой дозировке [17]. Надо отметить, что в нашем эксперименте животные, получавшие ЭЛС в высокой концентрации – единственная группа, у которой отмечалась отрицательная динамика массы тела (табл. 1).

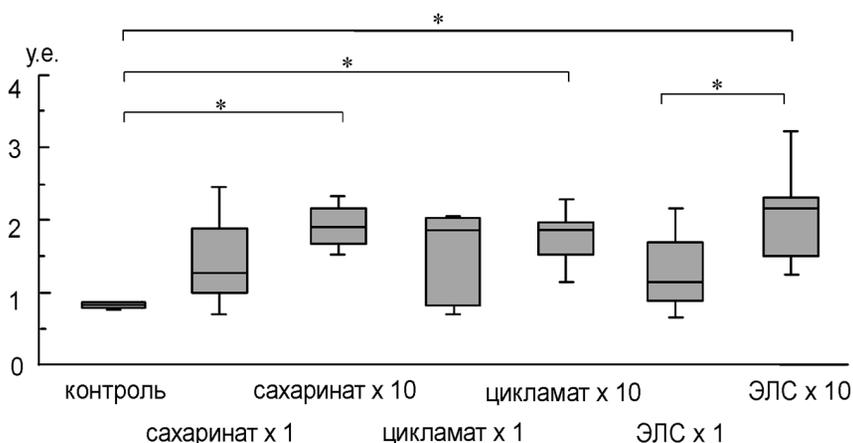


Рис. 1. Содержание гликогена в нейтрофильных лейкоцитах у мышей C57BL/6, получавших различные сахарозаменители. Здесь и на рис. 3 представлены значения медиан (горизонтальная черта), границ квартилей, а также максимальные и минимальные значения (вертикальная черта) в анализируемых выборках. * – различия значимы, $p < 0,05$.

Таблица 1

Влияние различных сахарозаменителей на содержание глюкозы в плазме крови и прирост массы тела у мышей C57BL/6

Параметры	Экспериментальные группы						
	1	2	3	4	5	6	7
Содержание глюкозы, ммоль/л	7,1±0,8	6,0±0,9	7,0±1,8	6,5±0,4	5,2±0,8	7,0±1,3	5,6±2,0
Прирост массы тела, г	0,6±1,4	0,5±1,0	-0,3±1,5 [^] *	2,4±2,6 [*]	0,4±0,6 [^]	0,7±1,8	0,5±1,5

Экспериментальные группы: 1 – контроль, 2 – ЭЛС (1 мг/г), 3 – ЭЛС (10 мг/г), 4 – сахаринат (1 мг/г), 5 – сахаринат (10 мг/г), 6 – цикламат (1 мг/г), 7 – цикламат (10 мг/г)

Данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха, * – различия значимы по сравнению с контрольной группой, $p < 0,05$; ^ – по сравнению с группой, потреблявшей тот же сахарозаменитель в дозировке 1 мг/г веса мыши, $p < 0,05$.

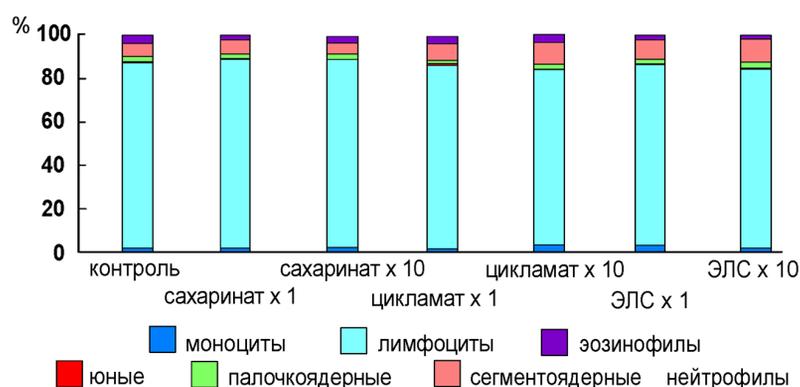


Рис. 2. Состав лейкоцитарной формулы у мышей C57BL/6, получавших различные сахарозаменители.

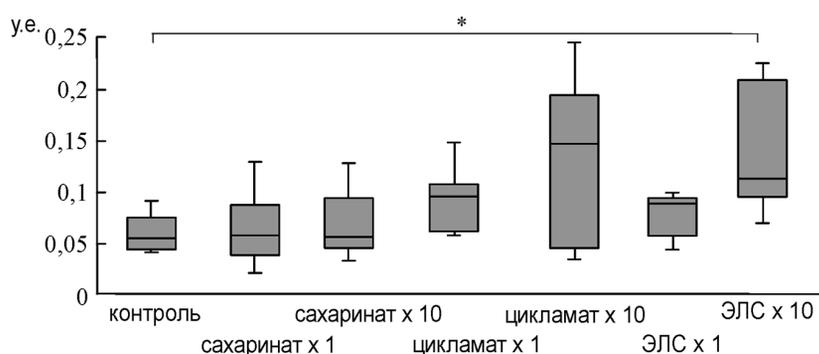


Рис. 3. Соотношение нейтрофилов и лимфоцитов у мышей C57BL/6, получавших различные сахарозаменители.

Таким образом, впервые были получены сведения об изменении содержания гликогена в лейкоцитах крови под влиянием различных сахарозаменителей. Установлено, что только высокие концентрации вызывают значимое увеличение содержания этого полисахарида; а для ЭЛС в дозе 10 мг/г также показано влияние на Нф/Лф. Новые данные расширяют представления о метаболизме заменителей сахара в организме и их влиянии на физиологические системы – в частности, на гемопоэтическую и иммунную.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ramesh B., Pugalendi K.V. Anti-hyperglycemic effect of umbelliferone in streptozotocin diabetic rats. *J. Med. Food.* 2006;9(4):562–566.
2. Jan S.A., Habib N., Shinwari Z.K., Ali M., Ali N. The anti-diabetic activities of natural sweetener plant Stevia: an updated review. *SN Appl. Sci.* 2021;3:517.
3. Vrána A., Fábry P., Kazdová L., Zvolanková K. Effect of the type and proportion of dietary carbohydrate on serum glucose levels and liver and muscle glycogen synthesis in the rat. *Nutr. Metab.* 1978;2(5):313–320.
4. El-Shinnawy N.A., Abd Elmageid S.A. Comparative studies on the effect of aspartame (artificial sweetener) and stevia (natural sweetener) on liver of male albino rat. *J. Sci. Res. Sci.* 2017;34(1):33–58.
5. Weisdorf D.J., Craddock P.R., Jacob H.S. Glycogenolysis versus glucose transport in human granulocytes: differential activation in phagocytosis and chemotaxis. *Blood.* 1982;60(4):888–893.

Работа выполнена за счет средств федерального бюджета на выполнение государственного задания КарНЦ РАН (FMEN-2022-0003). Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными и одобрены Комиссией по биоэтике Института биологии КарНЦ РАН (протокол №4 от 04.10.2021). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Авторы выражают благодарность за участие в осуществлении эксперимента сотрудника Петрозаводского государственного университета к.б.н. Зыкину Н.С.

6. Dowe R., Iqbal A., Heller S.R., Sabroe I., Prince L.R. A bittersweet response to infection in diabetes; targeting neutrophils to modify inflammation and improve host immunity. *Front. Immunol.* 2021;12:678771.
7. Krssak M., Brehm A., Bernroider E., Anderwald C., Nowotny P., Man C.D., Cobelli C., Cline G.W., Shulman G.I., Waldhäusl W., Roden M. Alterations in postprandial hepatic glycogen metabolism in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2004;53(12):3048–3056.
8. Rahiman F., Pool E.J. The *in vitro* effects of artificial and natural sweeteners on the immune system using whole blood culture assays. *J. Immunoassay Immunochem.* 2014;35(1):26–36.
9. Tucker R.M., Tan S.Y. Do non-nutritive sweeteners influence acute glucose homeostasis in humans? A systematic review. *Physiol. Behav.* 2017;182:17–26.
10. Ahmad U., Ahmad R.S. Anti diabetic property of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves in

Streptozotocin-induced diabetes in albino rats. *BMC Complement. Altern. Med.* 2018;18(1):179.

11. Mora M.R., Dando R. The sensory properties and metabolic impact of natural and synthetic sweeteners. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2021;20(2):1554–1583.

12. Jeppesen P.B., Gregersen S., Poulsen C.R., Hermansen K. Stevioside acts directly on pancreatic beta cells to secrete insulin: actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate-sensitive K⁺-channel activity. *Metabolism.* 2000;49(2):208–214.

13. Moriconi E., Feraco A., Marzolla V., Infante M., Lombardo M., Fabbri A., Caprio, M. Neuroendocrine and metabolic effects of low-calorie and non-calorie sweeteners. *Front. Endocrinol.* 2020;11:444.

14. Sehar I., Kaul A., Bani S., Pal H.C., Saxena A.K. Immune up regulatory response of a non-caloric natural sweetener, stevioside. *Chem. Biol. Interact.* 2008;173(2):115–121.

15. Gwak M, Choi S, Kim J, Kim T, Lee S, Park J., Kim H.M. Effects of gender on white blood cell populations and neutrophil–lymphocyte ratio following gastrectomy in patients with stomach cancer. *J. Korean. Med. Sci.* 2007;22(Suppl):S104–S108.

16. Stull C.L., Rodiek A.V. Physiological responses of horses to 24 hours of transportation using a commercial van during summer conditions. *J. Anim. Sci.* 2000;78(6):1458–1466.

17. Farid A., Hesham M., El-Dewak M., Amin A. The hidden hazardous effects of stevia and sucralose consumption in male and female albino mice in comparison to sucrose. *Saudi Pharm. J.* 2020;28(10):1290–1300.

Поступила в редакцию 08.08.2023

После доработки 18.01.2024

Принята в печать 22.01.2024

SHORT COMMUNICATION

Effect of different sweeteners on glycogen content of blood leukocytes and differential leukocyte counts in C57BL/6 mice

A.G. Kizhina^{1,*} , M.S. Mashinskas² , E.V. Panova^{1,2} , V.V. Ilyukha² 

¹*Institute of Biology of the Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Pushkinskaya str. 11, Petrozavodsk, 185910, Russia;*

²*Petrozavodsk State University, Lenina str. 33, Petrozavodsk, 185910, Russia*

*e-mail: golubewa81@yandex.ru

We studied the effect of stevia leaf extract, saccharinate and cyclamate in various dosages on the glycogen content of blood leukocytes in mice, as a necessary substrate for the realization of phagocytosis. An increase of glycogen content was found in all experimental groups which obtained sweeteners at a dosage of 10 mg/g of body weight. The effect of sweeteners on the differential leukocyte counts was found only for mice treated with stevia leaf extract at a dosage of 10 mg/g of body weight. They demonstrated increase of neutrophil-to-lymphocyte ratio. New data expand our understanding of the metabolism of sugar substitutes in the organism and their effect on physiological systems, in particular the hematopoietic and immune systems.

Keywords: *stevia leaf extract, saccharinate, cyclamate, glycogen, leukocytes, C57BL/6 mice*

Funding: The work was supported by state order [FMEN-2022-0003] of Karelian Research Centre RAS (Institute of Biology).

Сведения об авторах

Кижина Александра Геннадьевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории экологической физиологии животных Карельского научного центра РАН. Тел.: 8-8142-57-31-07, e-mail: golubewa81@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3042-8617>

Мащинкас Максим Сергеевич – магистрант Института биологии, экологии и агротехнологий Петрозаводского государственного университета. Тел.: 8-8142-57-31-07, e-mail: lobovich17@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-9986-5647>

Панова Элина Валерьевна – ведущий биолог Института биологии Карельского научного центра РАН, магистрант Института биологии, экологии и агротехнологий Петрозаводского государственного университета. Тел.: 8-8142-57-31-07, e-mail: panova550@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-1124-3489>

Илюха Владимир Викторович – канд. биол. наук, ст. преподаватель кафедры биомедицинской химии, иммунологии и лабораторной диагностики Медицинского института им. профес. А.П. Зильбера Петрозаводского государственного университета. Тел.: 8-8142-79-53-22, e-mail: karax911@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2371-1740>