

О.Б. Ханенко
Ю.І. Попович

Івано-Франківський національ-
ний медичний університет
Івано-Франківськ, Україна

Надійшла: 14.10.2024
Прийнята: 15.12.2024

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.95-100>

УДК 616.379-008.64:611.44:616-092:612.82-092

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ В СЕЛЕЗІН- ЦІ ЩУРІВ У ПІЗНІ ТЕРМІНИ ЕКСПЕ- РИМЕНТАЛЬНОГО СТРЕПТОЗОТО- ЦИН-ІНДУКОВАНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

Khanenko O.B.  , Popovych Y.I.   Morphological alterations in the spleen of rats during late stages of experimental streptozotocin-induced diabetes mellitus.

Ivano-Frankivsk National Medical University, Ivano-Frankivsk, Ukraine.

ABSTRACT. Background. Diabetes is a systemic disease that affects various organs and systems of the body. One of the known complications is damage to the immune system. However, changes in the spleen, as the central organ of the immune system in diabetes, have not been studied sufficiently. **Objective.** To study the features of morphological changes in the spleen in the late stages of experimental diabetes mellitus. **Methods.** The article presents the results of an experimental study of changes in the spleen parenchyma of rats with streptozotocin diabetes. The study was conducted on 11 adult white male rats, which were divided into two groups: control and experimental. Diabetes mellitus was induced by a single intraperitoneal injection of streptozotocin. Spleens were harvested 42 days and 56 days after induction of diabetes mellitus. **Results.** In diabetic rats, a sharp decrease in the mean diameter of lymphoid nodules was observed: $(360.9 \pm 10.5) \mu\text{m}$ after 42 days and $(314.64 \pm 11.98) \mu\text{m}$ after 56 days, compared with $(448.06 \pm 9.68) \mu\text{m}$ in the control group ($p < 0.05$). The diameters of periarteriolar lymphoid sheaths also differed significantly in different groups: the average diameter was 31.41% smaller in diabetic rats ($p < 0.01$). The narrowing of the central artery lumen probably led to pathological changes in the lymphoid structures of the spleen in diabetes. **Conclusion.** Significant morphological changes were observed in the red and white pulp of the rat spleen in the late stages of experimental streptozotocin-induced diabetes mellitus. The obtained results demonstrate a substantial impact of experimental diabetes on the structural elements of the rat spleen, with progressive changes manifesting at both time points, more prominently at 56 days of streptozotocin-induced diabetes mellitus.

Key words: diabetes mellitus, spleen, morphological changes, immune system.

Citation:

Khanenko OB, Popovych YI. [Morphological alterations in the spleen of rats during late stages of experimental streptozotocin-induced diabetes mellitus]. Morphologia. 2024;18(4):95-100. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2024.4.95-100>

 Khanenko O.B. 0000-0001-5719-7121

 Popovych Yu.I. 0000-0002-2401-4699

 olexandrkh29@gmail.com; yupopovych@ifnmu.edu.ua

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Цукровий діабет – одне з найбільш поширених неінфекційних захворювань у світі. В даний час кількість людей які хворіють на дану патологію складає більше ніж 500 млн., а в 2045 році прогнозується збільшення кількості до 700 млн. хворих. Захворювання спричинене абсолютним або відносним дефіцитом інсуліну, що призводить до підвищення рівня глюкози в крові та численних ускладнень. До них належать ураження таких систем та органів, як нервова система з розвитком нейропатій, судинна система з розвитком мікро- та макроангіопатій, а також ураження

нирок [1].

У ряді досліджень показано, що імунна система є дуже вразливою до тривалого підвищення глюкози в крові, яке супроводжується зниженням опірності організму до різноманітних інфекційних захворювань внаслідок ураження імунних органів [2, 3].

Селезінка, як найбільший вторинний лімфатичний орган, відіграє значну в імунній системі — беручи участь в реакціях як вродженого, так і адаптивного імунітету. Крім того, вона бере значну участь у патогенезі самого цукрового діабету

бету 1 типу. Сюди відносяться процеси диференціації субпопуляції Т-клітин, мобілізації макрофагів та сигнальні Т-клітини хелперів, з останніми пов'язане утворення антитіл до β -клітин підшлункової залози [4, 5].

Однак, незважаючи на велику кількість досліджень, безпосередній вплив діабету на саму селезінку залишається недостатньо вивченим. Необхідні подальші дослідження для з'ясування специфічних клітинних змін, які відбуваються в селезінці у відповідь на діабет. Крім того, вивчення потенційної ролі селезінки в імунній дисрегуляції та судинній патології, пов'язаній з діабетом, може забезпечити нові терапевтичні мішені для лікування системних ускладнень захворювання.

Мета дослідження: дослідити особливості морфологічних змін у селезінці на пізніх стадіях експериментального цукрового діабету.

Матеріали та методи

Дослідження проводилося на лабораторних тваринах, які були розділені на дві групи: контрольну та експериментальну з моделюванням цукровим діабетом. Контрольна група включала п'ять інтактних дорослих щурів-самців вагою 180-200 г з нормальним рівнем глюкози без моделюваного цукрового діабету. Експериментальна група складалася з шести щурів, яким вводили одноразову інтраперитонеальну ін'єкцію стрептозотоцину (Sigma, США) в 0,1 М цитратному буферному розчині (pH 4,5) у дозі 6 мг на 100 г маси тіла [6]. Селезінку забирали через 42 та 56 діб після початку експерименту. Проводили зафарбовування зрізів гематоксиліном та еозинном згідно з протоколом [7]. Експериментальна група складалася з шести щурів, яким вводили одноразову інтраперитонеальну ін'єкцію стрептозотоцину (Sigma, США) в 0,1 М цитратному буферному розчині (pH 4,5) у дозі 6 мг на 100 г маси тіла.

З допомогою програмного забезпечення для аналізу зображень ImageJ проводили вимірювання морфометричних показників: діаметр лімфоїдних вузлів та їх гермінативних центрів, ширина мантийної, маргінальної та периартеріальної лімфоїдної муфти, діаметр просвіту центральної артерії. Експеримент здійснювався з дотриманням рекомендацій Європейської комісії щодо біомедичних досліджень за участю тварин.

Для виконання статистичного аналізу використовувався пакет програмного забезпечення Python версія 3.12. Рівень значущості був встановлений на рівні $p < 0,05$ [8].

Результати дослідження

При розтині поверхня селезінки інтактних щурів гладка і злегка блискуча. На зрізі чітко диференціюються структури селезінки, виділяються дві основні частини: червона і біла пульпи. Біла пульпа представлена лімфоїдними фолікулами. Червона пульпа займає більшу частину селезінки та містить численні судини.

При морфометричному дослідженні у щурів контрольної групи середній діаметр лімфоїдних вузликів становив $(448,06 \pm 9,68)$ мкм (Рис. 1). У тварин з СЦД спостерігалось виражене зменшення цього показника: до $(360,9 \pm 10,5)$ мкм ($p < 0,05$) через 42 доби та до $(314,64 \pm 11,98)$ мкм ($p < 0,01$) через 56 діб, що на 29,77 % менше у порівнянні з показником у інтактних щурів.

Периартеріальні лімфоїдні муфти (ПАЛМ) рідко мали правильну округлу форму, частіше були овально-витягнутими. Діаметр ПАЛМ відрізнявся у тварин різних груп. Середній діаметр ПАЛМ у щурів із ЦД становив $(56,35 \pm 1,86)$ мкм, тоді як у тварин контрольної групи цей показник складав $(82,15 \pm 3,08)$ мкм (зменшення на 31,41%, $p < 0,05$) через 56 діб після моделювання ЦД.

Центральна артерія лімфатичних вузликів частіше розташовувалась ексцентрично, нерідко на периферії лімфатичного вузлика. Відмічалось суттєве зниження просвітів артерій, що ймовірно веде до патологічних змін в лімфоїдних структурах селезінки при цукровому діабеті.

У ході експерименту були проведені морфометричні дослідження лімфоїдних структур білої пульпи селезінки щурів з цукровим діабетом (ЦД) та контрольної групи. У селезінці при ЦД виявлено атрофічні зміни лімфоїдного апарату селезінки зменшенні діаметру фолікулів, а також змінах у структурі периартеріальних зон (усі данні зображено на Мал. 1).

Обговорення

Цукровий діабет викликає значні зміни в селезінці як на макроскопічному, так і на мікроскопічному рівнях, що зумовлено впливом гіперглікемії на цей орган. Так нами виявлено, що у пізні терміни СЦД особливо через 56 днів істотно зменшилися ширина мантийної та маргінальної зон, діаметри лімфоїдних вузликів та їх гермінативних центрів. Отримані результати можуть свідчити про атрофічні зміни в селезінці, що корелює з даними інших авторів. Зазначені перебудови можуть бути зумовлені окислювальним стресом та апоптозом [9]. В окремих дослідженнях було показано, що хронічна гіперглікемія призводить до змін у складі імунної системи, впливаючи на прогресування захворювання і є ключовим фактором метаболічної ендотоксемії та хронічного запалення в тканинах [10].

Хронічне запалення при цукровому діабеті – це складний процес, який виникає внаслідок гіперглікемії та призводить до чисельних ускладнень. Підвищений рівень глюкози в крові активує молекулярні механізми, які сприяють запальній реакції. Одним з таких механізмів є посилення оксидативного стресу, що призводить до посиленого утворення активних форм кисню (АФК), які завдають шкоди білкам, ліпідам і (ДНК), тим самим запускаючи запальні процеси. Одночасно відбувається зниження активності

антиоксидантних ферментів, таких як супероксиддисмутаза, каталаза та глутатіонпероксидаза,

що посилює окислювальний стрес [11-14].

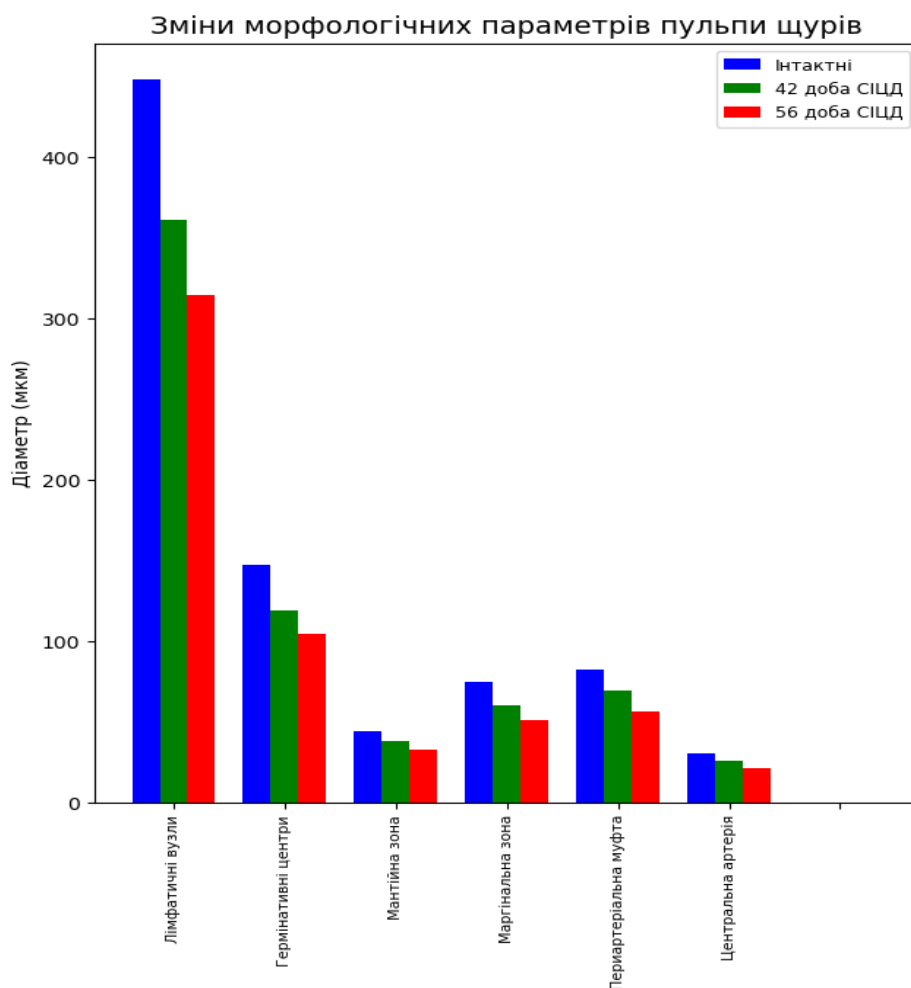


Рис. 1. Морфологічні показники пульпи селезінки у інтактних щурів та у пізні терміни стрептозоточиніндукованого цукрового діабету.

Дисрегуляція імунної системи також відіграє важливу роль, оскільки гіперглікемія погіршує функцію нейтрофілів, Т-лімфоцитів і моноцитів/макрофагів. Зниження фагоцитарної активності нейтрофілів, порушення проліферативної відповіді Т-лімфоцитів та збільшення продукції прозапальних цитокінів моноцитами/макрофагами сприяють розвитку хронічного запалення [11, 12, 13]. Утворюється "вadne коло" запалення, де хронічне запалення посилює інсуліно-резистентність, що призводить до подальшої гіперглікемії та посилення запальних реакцій [13, 14]. Крім того, запалення сприяє дисфункції ендотелію, що характеризується зниженням продукції оксиду азоту та підвищеною експресією молекул адгезії, що полегшує міграцію запальних клітин у тканини [15]. Підвищене вироблення цитокінів, включаючи ФНП- α , ІЛ-6 та ІЛ-1 β , створює запальне середовище, яке сприяє розвитку хронічного запалення [13, 14, 15, 16]. Розу-

міння цих патогенетичних механізмів має вирішальне значення для розробки інноваційних терапевтичних стратегій, спрямованих на зменшення запалення та покращення результатів лікування людей, які страждають на цукровий діабет.

Структурні та функціональні зміни в селезінці, що спостерігаються у пізній термін експериментального цукрового діабету відображають загальний вплив гіперглікемії на організм. Що підтверджується дослідженнями інших авторів [9, 17, 18, 19].

На мікроскопічному рівні в селезінці у пізні етапи цукрового діабету спостерігалася значна дистрофія лімфоїдних структур. Діаметр лімфоїдних вузликів та їх гермінативних центрів, які є основними компонентами імунної відповіді, зменшувався. Це може бути пов'язане зі зниженням реплікації та активації лімфоцитів, що змінює імунну відповідь організму та підвищує вразливість до інфекційних агентів [17, 18, 19].

Периартеріальні лімфоїдні муфти (ПАЛМ), які оточують артеріальні судини селезінки зменшуються в розмірах та втрачають свою структурну компактність, що може впливати на ефективність імунного моніторингу та реакції на антигени. Ці спостереження вказують на глибокі порушення імунної функції селезінки, що має значення для загального стану імунітету і підтверджується в інших дослідженнях [15, 18, 19].

У маргінальній зоні селезінки, яка є перехідною між червоною пульпою та лімфоїдною тканиною, також відмічаються деструктивні зміни, що проявляється розширенням та неправильністю границях. Дані патологічні зміни спостерігалися і в інших дослідженнях [18, 19].

Відомо, що цукровий діабет, хронічне порушення обміну речовин, викликає судинні ускладнення, які вражають як великі, так і дрібні кровоносні судини [17, 18]. Цукровий діабет має значний вплив на судинну систему, включаючи селезінкові артерії, що може призвести до ускладнень, імунологічних порушень та змін з боку інших органів та систем [21, 22, 23].

Ендотеліальна дисфункція (ЕД) є одним з критичних факторів у патогенезі ураження судин при діабеті, причому залучення імунної системи відіграє значну роль у цьому процесі [21]. Крім того, продукція оксиду азоту (NO) ендотеліальними клітинами судин має важливе значення для їх стану, а його порушення через такі фактори, як гіперглікемія та оксидативний стрес, є характер-

ною для діабету [25]. Отже, ендотеліальна дисфункція (ЕД) є ключовим елементом у прогресуванні судинних ускладнень, пов'язаних з цукровим діабетом, тоді як імунна система робить значний внесок у поглиблення цих патологічних станів. Взаємодія між ендотеліальною дисфункцією, запаленням та активацією імунної системи являється потенційною мішенню для терапевтичного втручання з метою усунення судинних ускладнень у хворих на цукровий діабет [24, 25, 26, 27, 28].

Усі ці процеси в сукупності призводять до прогресуючого ушкодження судин, порушення їх функції та структури, що є основою розвитку мікро- та макросудинних ускладнень цукрового діабету.

Підсумок

Морфологічні дослідження лімфоїдних структур білої пульпи селезінки виявили значні зміни у шурів із ЦД, у вигляді зменшення діаметра ПАЛМ, лімфоїдних вузликів, мантийної та маргінальної зон, а також зменшення щільності лімфоцитів у пульпі, що вказує на атрофічні процеси утворень білої пульпи селезінки.

Перспективи подальших досліджень

Необхідні подальші дослідження для з'ясування специфічних клітинних і молекулярних змін, які відбуваються в селезінці у відповідь на цукровий діабет. Вивчення імунної дисрегуляції та судинної патології, пов'язаної з діабетом, може забезпечити нові терапевтичні мішені для лікування системних ускладнень захворювання.

Літературні джерела References

1. International Diabetes Federation: IDF Diabetes Atlas. 10th. Brussels (Belgium): International Diabetes Federation; 2021.
2. Ferlita S, Yegiazaryan A, Noori N, Lal G, Nguyen T, To K, et al. Type 2 Diabetes Mellitus and Altered Immune System Leading to Susceptibility to Pathogens, Especially Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Medicine*. 2019;8(12):2219. DOI: 10.3390/jcm8122219
3. Tang L, Wang H, Cao K, Xu C, Ma A, Zheng M, et al. Dysfunction of circulating CD3+CD56+ NKT-like cells in type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Medical Sciences*. 2023;20(5):652–662. DOI: 10.7150/ijms.83317
4. Aliyu M, Zohora F, Saboor-Yaraghi AA. Spleen in innate and adaptive immunity regulation. 2021;5(1):1–17. DOI: 10.3934/ALLERGY.2021001
5. Kolling J, De Franceschi ID, Nishihira VSK, Baldissera MD, Pinto CG, et al. Resveratrol and resveratrol-hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex recovered the changes of creatine kinase and Na⁺, K⁺-ATPase activities found in the spleen from streptozotocin-induced diabetic rats. *Anais Da Academia Brasileira De Ciências*. 2019;91(3):e20181330. DOI: 10.1590/0001-3765201920181330
6. Levytskyi VA, Zhurakivska OYa, Miskiv VA, Zaiats LM, Petriv RB, Yakymiv YuM, Kishchuk BM, Gnatyuk RZ, inventors; Sposib modeliuvannia tsukrovoho diabetu 1-ho typu u tvaryn riznoho viku. Method of modeling type 1 diabetes in animals of different ages. *Ukrainian patent UA 62966 U*. 2011 Feb 11. Int. Cl. A61B10/00. IPC G09B23/28 №u201101566. Filed 2011. Published Sep
7. Michael X Henderson. Hematoxylin and Eosin Stain - FOR PARAFFIN-EMBEDDED TISSUE SECTIONS 2023;1:86. doi: 10.17504/protocols.io.kxygx3q9zg8j/v1
8. Kunzmann P, Hamacher K. Biotite: a unifying open source computational biology framework in Python. *BMC Bioinformatics*. 2018;19(1):346. DOI: 10.1186/s12859-018-2367-z
9. Hossam Ebaid, Jameel Al-Tamimi, Ali Metwalli, Ahmed A, Allam, Kairy Zohir, Jamaan S, Ajarem, Ahmed Rady, Ibrahim M, Alhazza, Khalid

- E, Ibrahim. Effect of STZ-Induced Diabetes on Spleen of Rats: Improvement by Camel Whey Proteins. *Pakistan Journal of Zoology*. 2015;Vols.47-4:1109–1116.
10. Bhatwa A, Anhê G, Anhê F, Schertzer J. Does Obesity or Hyperglycemia Alter Metabolic Endotoxemia? *Physiology*. 2023;38(1):5729581. DOI: 10.1152/physiol.2023.38.s1.5729581
11. Rodrigues Mantuano N, Stanczak MA, Oliveira I de A, Kirchhammer N, Filardy AA, Monaco G, et al. Data from Hyperglycemia Enhances Cancer Immune Evasion by Inducing Alternative Macrophage Polarization through Increased O-GlcNAcylation. *American Association for Cancer Research*. 2020;8(10):1262–1272. DOI: 10.1158/2326-6066.c.6549885.v1
12. Wang Y, Yi B, Wang S, Chen X, Wen Z. Effect of hyperglycemia on the immune function of COVID-19 patients with type 2 diabetes mellitus: a retrospective study. *PeerJ*. 2022;10:e14570. DOI: 10.7717/peerj.14570
13. Chen B, Zhang H, Liu Y. The Correlation Study of Hyperglycemia on the Expression of White Blood cells and Inflammatory Genes in Patients with Type 2 Diabetes. *International Journal of Frontiers in Medicine*. 2021;3(3):5-10. DOI: 10.25236/ijfm.2021.030302
14. Szukiewicz D. Molecular Mechanisms for the Vicious Cycle between Insulin Resistance and the Inflammatory Response in Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(12):9818-9818. doi: 10.3390/ijms24129818
15. Dri E, Lampas E, Lazarou G, Lazarou E, Theofilis P, Tsioufis C, et al. Inflammatory Mediators of Endothelial Dysfunction. *Life*. 2023;13(6):1420. DOI: 10.3390/life13061420
16. Li T, Wang P, Wang X, Liu Z, Zhang Z, Zhang Y, et al. Inflammation and Insulin Resistance in Diabetic Chronic Coronary Syndrome Patients. *Nutrients*. 2023;15(12):2808. DOI: 10.3390/nu15122808
17. Zhang J, Deng Z, Jin L, Yang C, Liu J, Song H, et al. Spleen-Derived Anti-Inflammatory Cytokine IL-10 Stimulated by Adipose Tissue-Derived Stem Cells Protects Against Type 2 Diabetes. *Stem Cells and Development*. 2017;26(24):1749–1758. DOI: 10.1089/scd.2017.0119
18. Özerkan D, Özsoy N, Cebesoy S, Özer Ç. Distribution of spleen connective tissue fibers in diabetic and vitamin C treated diabetic rats. *Biotechnic & Histochemistry*. 2020;96(5):347–353. DOI: 10.1080/10520295.2020.1795718
19. Hashish H, Kamal R. Effect of curcumin on the expression of Caspase-3 and Bcl-2 in the spleen of diabetic rats. *Journal of Experimental and Clinical Anatomy*. 2015;14(1):18-23. DOI: 10.4103/1596-2393.158923
20. Unissa N, Mahveen M, Kumar S, Katla Swapna. An observation cross sectional study to assess the prevalence of microvascular complications in diabetes. *International Journal of Hospital Pharmacy*. 2019;4:31.
21. Ravshanovna NSD. Morphological Appearance of Blood Vessels of Organs in Diabetes Mellitus. *Deleted Journal*. 2023;25:1–3. DOI: 10.62480/tjms.2023.vol25.pp1-3
22. Liu R, Li L, Shao C, Cai H, Wang Z. The Impact of Diabetes on Vascular Disease: Progress from the Perspective of Epidemics and Treatments. *Journal of Diabetes Research [Internet]*. 2022;2022:1–17. DOI: 10.1155/2022/1531289
23. Konda KK. High Blood Sugar Levels Over a Prolonged Period: Diabetes. *Journal of Glycobiology*. 2021;10(3):1-2.
24. Li Z, Wu N, Wang J, Zhang Q. Roles of Endovascular Calyx Related Enzymes in Endothelial Dysfunction and Diabetic Vascular Complications. *Frontiers in Pharmacology*. 2020;11:590614. DOI: 10.3389/fphar.2020.590614
25. Torimoto K, Okada Y, Tanaka Y. Type 2 Diabetes and Vascular Endothelial Dysfunction. *Journal of UOEH*. 2018;40(1):65–75. DOI: 10.7888/juoeh.40.65
26. Xue C, Chen K, Gao Z, Bao T, Dong L, Zhao L, et al. Common mechanisms underlying diabetic vascular complications: focus on the interaction of metabolic disorders, immuno-inflammation, and endothelial dysfunction. *Cell Communication and Signaling*. 2023;21(1):298. DOI: 10.1186/s12964-022-01016-w
27. Gora IM, Ciechanowska A, Ladyzynski P. NLRP3 Inflammasome at the Interface of Inflammation, Endothelial Dysfunction, and Type 2 Diabetes. *Cells*. 2021;10(2):314. DOI: 10.3390/cells10020314
28. Van Den OM, Raterman HG, Nurmohamed MT, Simsek S. Endothelial Dysfunction, Inflammation, and Apoptosis in Diabetes Mellitus. *Mediators of Inflammation*. 2010;2010:1–15. DOI: 10.1155/2010/792393

Ханенко О.Б., Попович Ю.І. Морфологічні зміни в селезінці щурів у пізні терміни експериментального стрептозотонин-індукованого цукрового діабету.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Діабет є системним захворюванням, яке впливає на різні органи та системи організму. Одним з відомих ускладнень є ураження імунної системи. Втім зміни з боку селезінки, як центрального органу імунної системи при діабеті вивчені недостатньо. **Мета.** Дослідити особливості морфологічних змін у селезінці на пізніх стадіях експериментального цукрового діабету. **Методи.** У статті

представлено результати експериментального дослідження змін у паренхімі селезінки щурів зі стрептозоточиновим діабетом. Дослідження було проведено на 11 дорослих білих щурах-самцях, яких було розділено на дві групи: контрольну та експериментальну. Цукровий діабет викликали одноразовою внутрішньоочеревинною ін'єкцією стрептозоточину. Селезінку забирали через 42 дні та 56 днів після індукції цукрового діабету. **Результати.** У щурів з цукровим діабетом спостерігалось різке зменшення середнього діаметра лімфоїдних вузликів: (360.9 ± 10.5) мкм через 42 діб та (314.64 ± 11.98) мкм через 56 діб, порівняно з (448.06 ± 9.68) мкм у контрольній групі ($p < 0.05$). Діаметри періартеріальних лімфоїдних муфт також значно відрізнялися у різних групах: так середній діаметр на 31,41% менший у щурів з цукровим діабетом ($p < 0.01$). Звуження просвіту центральної артерії, ймовірно, призводило до патологічних змін у лімфоїдних структурах селезінки при діабеті. **Підсумок.** У червоній та білій пульпі селезінки щурів у пізні терміни експериментального стрептозоточин-індукованого цукрового діабету виявлено значні морфологічні зміни. Отримані результати демонструють значний вплив експериментального діабету на структурні елементи селезінки щурів, причому прогресуючі зміни проявлялися в обидва терміни, більше в пізні терміни стрептозоточиніндукованого цукрового діабету.

Ключові слова: цукровий діабет, селезінка, морфологічні зміни, імунна система.