

ГІСТОЛОГІЧНІ ЗМІНИ В СЕЛЕЗІНЦІ ЩУРІВ У РАННІ ТЕРМІНИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУКОВАНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

О.Б. Ханенко, Ю.І. Попович

Івано-Франківський національний медичний університет, м. Івано-Франківськ, Україна

Ключові слова: цукровий діабет, селезінка, морфологічні зміни, біла пульпа, червона пульпа.

Буковинський медичний вісник. 2024. Т. 28, № 3 (111). С. 43-46.

DOI: 10.24061/2413-0737.28.3.111.2024.8

E-mail:
uiporovych@ifnmu.edu.ua
olexandrkh29@gmail.com

Резюме. Діабет є системним захворюванням, яке впливає на різні органи та системи організму. Дослідження особливостей змін селезінки у щурів, які страждають на цукровий діабет, допомагає зрозуміти ці зміни та їх вплив на імунну функцію.

Мета дослідження – встановлення особливостей морфологічних змін структурних компонентів селезінки в ранньому періоді експериментального цукрового діабету.

Результати. Встановлено морфологічні зміни селезінки в ранньому періоді експериментального стрептозоточиного цукрового діабету. ЦД викликали одноразовим внутрішньоочеревинним уведенням стрептозоточину. Гістологічні дослідження селезінки проводили через 14 і 28 днів після індукції ЦД. У здорових щурів селезінка мала нормальну структуру з чітким розмежуванням червоної та білої пульпи. Морфометричні дослідження показали, що лімфатичні вузли мали діаметр $(445,92 \pm 12,6)$ мкм і товщину маргінальної зони $(76,22 \pm 5,12)$ мкм. Через 14 днів експериментального ЦД гістологічні препарати виявляли зменшені лімфоїдні вузлики білої пульпи діаметром $(435,83 \pm 14,28)$ мкм і гермінативними центрами $(139,97 \pm 5,74)$ мкм. Через 28 днів лімфоїдні вузлики ще більше зменшилися - до $(392,37 \pm 10,29)$ мкм, а гермінативні центри – до $(125,93 \pm 5,71)$ мкм. Ширина періартеріальної лімфоїдної муфти зменшилася до $(67,91 \pm 3,62)$ мкм, що свідчить про ранні зміни в Т-клітинних зонах.

Висновок. У ранні терміни експериментального цукрового діабету в селезінці відзначаються значні структурні зміни, а саме відбувається зменшення розмірів лімфоїдних вузликів, гермінативних центрів і ширини різних зон селезінки, а також зниження щільності лімфоцитів. Дані зміни можуть свідчити про серйозну імунологічну дисфункцію у піддослідних щурів.

HISTOLOGICAL CHANGES IN THE RAT SPLEEN IN THE EARLY STAGES OF EXPERIMENTAL STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES MELLITUS

O.B. Khanenko, Y.I. Popovych

Key words: diabetes mellitus, spleen, morphological changes, white pulp, red pulp.

Bukovinian Medical Herald.

2024. V. 28, № 3 (111). P. 43-47.

Resume. Diabetes is a systemic disorder that has a significant impact on a number of different organ systems within the body. Studying changes in the spleen in diabetic rats aids in understanding these changes and their effect on immune function. The objective of the study is to investigate the characteristics of morphological changes in the structural components of the spleen in the early stage of experimental diabetes.

Results. Morphological changes in the spleen during the early stages of streptozotocin-induced experimental diabetes mellitus were observed. Diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of streptozotocin. Histological examination of the spleen was conducted 14 and 28 days after diabetes induction. In healthy rats, the spleen exhibited a normal structure with a clear distinction between red and white pulp. Morphometric analysis showed that lymphoid nodules had a diameter of (445.92 ± 12.6) μm and a marginal zone thickness of (76.22 ± 5.12) μm . After 14 days of experimental diabetes, histological preparations revealed reduced lymphoid nodules of white pulp with a diameter of (435.83 ± 14.28) μm and germinal centers (139.97 ± 5.74) μm . After 28 days, lymphoid nodules further decreased to (392.37 ± 10.29) μm , and germinal centers - to (125.93 ± 5.71) μm . The width of the periarterial lymphoid sheaths decreased to (67.91 ± 3.62) μm , indicating early changes in T-cell zones.

Conclusion. During the initial stages of diabetes mellitus in experimental settings, notable structural modifications occur in the spleen. Specifically, there is a reduction in the size of lymphoid nodules, germinal centers, and various zones of the spleen, as well as a decrease in the density of lymphocytes. These alterations may suggest a severe immunological dysfunction in rats used for experimentation.

Оригінальні дослідження

Вступ. Цукровий діабет є одним із головних викликів для сучасної світової охорони здоров'я, який характеризується розвитком гіперглікемії та призводить до низької якості життя з боку різних органів та систем. Він є багатогранним захворюванням, на розвиток якого впливають генетичні, екологічні фактори та спосіб життя. Глобальна поширеність цукрового діабету зростає, причому ожиріння, старіння населення та збільшення тривалості життя є ключовими факторами, що сприяють цьому. Причому встановлено, що ріст захворюваності є більш вираженим у густонаселених регіонах світу [1].

Такі фактори, як підвищена концентрація глюкози в крові призводять до розвитку неферментативної глікації та хронічного запалення низької інтенсивності в тканинах, які є основними уражаючими факторами тканин при даному захворюванні. Змінений рівень антиоксидантів, таких як глутатіон у хворих на ЦД, спонукає до порушення імунної відповіді, що згодом збільшує ризик розвитку інфекцій та супутніх захворювань [2].

Значна кількість як клінічних, так і експериментальних досліджень вказують на те, що ускладнення цукрового діабету, такі як серцево-судинні, ниркові, пов'язані з ураженням імунної системи. Виникнення їх зумовлене зміненими імунними реакціями та порушенням функції імунних клітин, що, у першу чергу, пов'язано з такими факторами, як оксидативний стрес, зміною цитокінових профілів та розвитком у тканинах хронічного запалення низької інтенсивності [2-5].

У ході як клінічних, так і експериментальних досліджень встановлено, що хронічна гіперглікемія значно впливає на морфологію імунних органів. Так, уражаючі фактори при цукровому діабеті значно впливають на морфологію селезінки та інших імунних органів [6]. Однак у наявній літературі недостатньо відомостей про закономірності морфологічних змін, співвідношення клітинного складу лімфоїдного апарату селезінки в селезінці при експериментальному діабеті.

Мета дослідження - встановлення особливостей морфологічних змін, що відбуваються в структурних компонентах селезінки на ранніх стадіях індукованого цукрового діабету.

Матеріал і методи. Дослідження експериментального цукрового діабету (контрольна група, 14-та, 28-ма доба) були виконані на 15 щурах-самцях масою 180 - 200 г. У нашому медико-біологічному експериментальному дослідженні за участю лабораторних тварин ми дотримувалися рекомендацій, встановлених Європейською комісією.

Першу групу склали тварини, у яких не викликали експериментального цукрового діабету і слугували контролем (5 інтактних тварин). До другої групи (група діабету — 10 тварин), яким моделювали цукровий діабет (СПЦД) шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення стрептозоточину фірми Sigma (США), розведеному в 0,1 М цитратного буферу (рН 4,5) у дозі 6 мг/100 г маси тіла.

Для проведення гістологічного дослідження фрагменти селезінки фіксували в 10% нейтральному розчині формаліну та зневоднювали в послідовності

спиртових розчинів зі зростаючою концентрацією. Готували тонкі зрізи товщиною 3-5 мкм. Зразки забарвлювали за допомогою гематоксилін-єозину. Мікроскопічні дослідження проводили через 14 і 28 днів від початку діабету. Гістологічні препарати вивчали за допомогою мікроскопа Olympus BH-2, оснащеного об'єктивами x10 та x40.

Отримані дані піддавали дисперсійному аналізу, а нормальність розподілу підтверджували за допомогою критерію Стьюдента. У всіх інших випадках використовували U-критерій Манна-Уїтні.

Результати дослідження та їх обговорення. При дослідженні інтактних щурів селезінка розміщена типово, трикутної форми, з гладкою поверхнею. На зрізі відзначено, що червона та біла пульпа нормальної структури з чітким розмежуванням.

При морфометричних дослідженнях встановлено: діаметр лімфатичних вузликів становить $(445,92 \pm 12,6)$ мкм, вони чітко відмежовані від червоної пульпи (табл. 1). Маргінальна зона розміщена між червоною та білою пульпою — має чіткі контури, її товщина складає $(76,22 \pm 5,12)$ мкм. Періартеріальна лімфоїдна муфта шириною $(85,78 \pm 3,07)$ мкм локалізована типово з артерією в центрі. Діаметр просвіту артерії складає $(29,82 \pm 1,02)$ мкм. Всі показники наведені на графіку (на рис. 1 зображений графік зміни морфологічних параметрів білої пульпи щурів).

Через 14 діб експериментального цукрового діабету на гістологічних препаратах селезінки помітні зменшені в розмірах лімфоїдні вузлики білої пульпи. Діаметр лімфоїдних вузликів складає $(435,83 \pm 14,28)$ мкм, а їх гермінативних центрів — $(139,97 \pm 5,74)$ мкм, що відповідно на 2,26 та 4,95 % менше від показників у інтактних тварин ($p < 0,01$). Ширина періартеріальної лімфоїдної муфти складає $(79,66 \pm 2,55)$ мкм. Виявляється повнокров'я червоної пульпи, зниження щільності локалізації клітин маргінальної зони лімфоїдних фолікулів. Зменшується до $(28,71 \pm 1,32)$ мкм також діаметр просвіту центральної артерії, проти $(29,82 \pm 1,02)$ мкм, ($p < 0,05$) у контролі, а діаметр капілярів незначуще зростає до $(8,59 \pm 0,37)$ мкм.

Через 28 діб експериментального цукрового діабету на гістологічних препаратах селезінки відзначається зменшення в розмірах лімфоїдних вузликів білої пульпи на 6,7% до $(392,37 \pm 10,29)$ мкм, а гермінативних центрів на 14,3% до $(125,93 \pm 5,71)$ мкм порівняно з інтактними щурами відповідно $(445,92 \pm 12,60)$ мкм, $P < 0,01$ та $(147,26 \pm 5,5)$ мкм. Ширина мантійної та маргінальної зон у даний термін СПЦД менша за таку ж у інтактних тварин, однак зменшення носить неістотний характер ($P > 0,05$). Всі показники зображені на порівняльній діаграмі (рис.2).

Ширина періартеріальної лімфоїдної муфти зменшується до $(67,91 \pm 3,62)$ мкм, що на 8,4% менше ніж у контролі ($p < 0,01$). Це вказує на ранні зміни в Т-клітинних зонах селезінки.

Діаметр просвіту центральної артерії значно зменшується на 14-й $(28,71 \pm 1,32)$ мкм ($p < 0,05$) і 28-й $(24,49 \pm 1,03)$ мкм ($p < 0,01$) день, що може впливати на кровопостачання лімфатичних структур селезінки.

Результати дослідження та їх обговорення. В експериментальних дослідженнях нами встановлено,

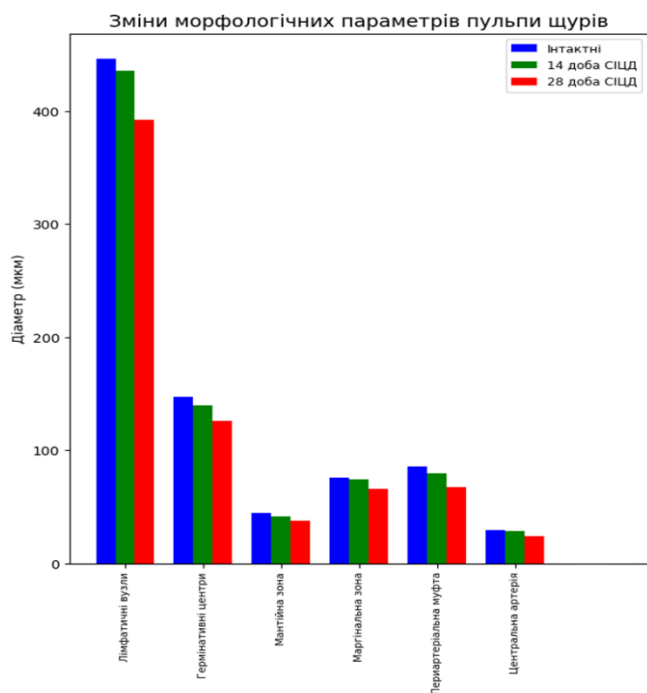


Рис.1. Зміни морфологічних параметрів білої пульпи щурів

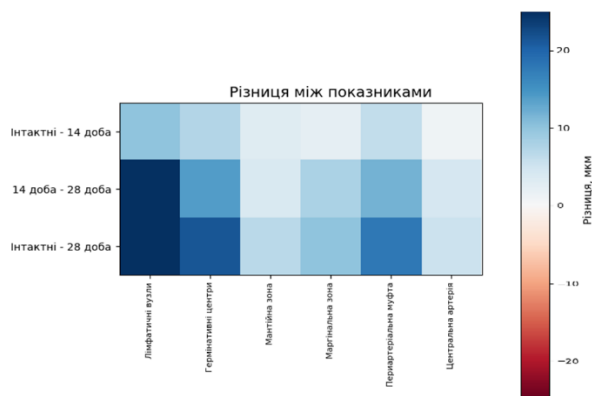


Рис.2. Порівняння змін морфологічних параметрів білої пульпи щурів у різні терміни діабету

що в ранні терміни (14-та, 28-ма доби) СЦД спостерігається зменшення розмірів лімфоїдних вузликів та їх гермінативних центрів білої пульпи, ширини мантієвої та маргінальної зон селезінки, ширини періартеріальної лімфоїдної муфти, а також діаметрів просвітів центральної артерії та капілярів. У маргінальній зоні значно знижена густина розташування лімфоцитів.

Результати нашого дослідження корелюють з відомостями, наведеними в інших роботах, в яких у щурів із СЦД спостерігається значне зменшення загальної маси тіла, атрофія селезінки, підвищений рівень активних форм кисню, порушення фагоцитарної активності та гістологічні зміни в тканині селезінки, такі як атрофія та виснаження білої пульпи, розширення червоної пульпи. Ці зміни свідчать про ураження селезінки і можуть призвести до імунологічної

дисфункції [6].

Селезінка є найбільшим лімфоїдним органом в організмі, який виконує велику кількість важливих функцій. Вона діє як фільтр крові, зберігає лімфоцити та тромбоцити, метаболізує гемоглобін зі старих еритроцитів [7, 8]. Мікροанатомія селезінки відображає її різноманітні функції. Вона містить спеціалізовані імунні клітини, такі як В-клітини, природні клітинки-кілери та макрофаги, відіграючи значну роль як у природженому, так і в адаптивному імунітеті [9].

Цукровий діабет має значний вплив на селезінку, що призводить до структурних змін та функціональних порушень. Дослідження показали, що пошкодження селезінки, спричинене цукровим діабетом, характеризується окиснювальним стресом, запаленням та імунною дисфункцією [10, 11]. Цукровий діабет призводить до атрофії селезінки, посилення апоптозу та зміни експресії генів, пов'язаних з окислювальним стресом у селезінці [12]. Крім того, він впливає на імунну відповідь у селезінці, сприяючи зниженню імунної функції [13]. Загалом, цукровий діабет чинить багатогранний негативний вплив на селезінку, підкреслюючи важливість вивчення терапевтичних стратегій захисту функції селезінки у діабетиків.

У ранній термін експериментального цукрового діабету спостерігаються значні структурні та функціональні зміни в селезінці, що відображають загальний вплив гіперглікемії на організм. На мікроскопічному рівні спостерігається дистрофія лімфоїдних структур. Зниження кількості лімфоцитів відбивається на структурній цілісності лімфоїдних фолікулів, що призводить до спостережуваної дегенерації. Лімфоїдні фолікули, які є основними компонентами імунної відповіді, демонструють зменшену площу та збільшену дегенерацію, це спостерігається в інших дослідженнях [10, 11, 13].

Періартеріальна лімфоїдна оболонка (ПАЛО) відіграє вирішальну роль в імунній відповіді та може впливати на перебіг діабетичних ускладнень. Дослідження показали, що при діабеті спостерігається зниження кількості лімфоцитів, зменшення в розмірах та втрата своєї структурної компактності, що може впливати на ефективність імунного моніторингу та реакції на антигени. Оскільки ПАЛО служить центральним вузлом для міграції лімфоцитів та імунних реакцій, особливо зовнішня частина ПАЛО, де ініціюються Т-залежні реакції В-клітин і генуються проліферативні вогнища [15]. Подібні дані були отримані в інших дослідженнях [10, 11, 13, 14, 15]. Дослідження ролі ПАЛО в імунних відповідях має важливе значення для розуміння того, як зміни в цій структурі можуть вплинути на імунну систему і потенційно сприяти ускладненням діабету.

У нашому дослідженні маргінальна зона (МЗ) селезінки також піддається деструктивним змінам. Це може проявлятися зменшенням діаметра та неправильністю контурів, що вказує на порушення її структурної цілісності. Схожі зміни визначалися в інших дослідженнях [10, 11, 13].

МЗ селезінки бере участь в імунній відповіді і вивчається при ЦД1 та його імунопатогенезу [16, 17, 18, 19]. Однак сучасні дослідження безпосередньо не зосереджені на змінах у МЗ селезінки, зумовлених діабетом, що залишає прогалину в розумінні ролі МЗ при розвитку діабету. Таким чином, хоча МЗ селезінки

Оригінальні дослідження

є важливим місцем для імунної функції, прямий вплив діабету на МЗ не був чітко описаний у доступній літературі. Експансія В-клітин МЗ у мишачій моделі ЦД 1-го типу NOD вказує на потенційний зв'язок між цукровим діабетом та змінами в МЗ [16], але необхідні подальші дослідження для з'ясування специфічних змін, спричинених діабетом, та їх впливу на патогенез захворювання.

Висновки. У ранні терміни експериментального

цукрового діабету в селезінці відзначаються значні структурні зміни, які можуть серйозно впливати на її функціональність. Мікроскопічний аналіз виявляє дистрофію лімфоїдних структур.

Ці висновки підкреслюють необхідність подальших досліджень для розуміння механізмів патологічних змін у селезінці та розробки нових підходів у лікуванні цукрового діабету та його ускладнень.

References

1. George B, Cebioglu M, Yeghiazaryan K. Inadequate diabetic care: global figures cry for preventive measures and personalized treatment. *EPMA J.* 2010;1(1):13-8. doi: 10.1007/s13167-010-0006-5.
2. Ferlita S, Yeghiazaryan 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*. *J Clin Med.* 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. *Int J Med Sci.* 2023;20(5):652-62. doi: 10.7150/ijms.83317.
4. Golden T, Simmons RA. Immune dysfunction in developmental programming of type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2021;17(4):235-45. doi: 10.1038/s41574-020-00464-z.
5. Alblihd MA, Alsharif KF, Hamad AA, Ali FAZ, Hussein MT, Alhegaili AS, et al. Okra [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench] improved blood glucose and restored histopathological alterations in splenic tissues in a rat model with streptozotocin-induced type 1 diabetes through CD8+ T cells and NF- κ B expression. *Front Vet Sci.* 2023;10:1268968. doi: 10.3389/fvets.2023.1268968.
6. Ebaid H, Al-Tamimi J, Metwalli A, Allam A, Zohir K, Ajarem J, et al. Effect of STZ-induced diabetes on spleen of rats: improvement by camel whey proteins. *Pakistan Journal of Zoology.* 2015;47(4):1109-16.
7. Pernar LIM, Tavakkoli A. Anatomy and Physiology of the Spleen. *Shackelford's Surgery of the Alimentary.* 2019;2:1591-97. DOI: 10.1016/B978-0-323-40232-3.00136-9.
8. Shivanal U, Parashuram R, Dakshayani KR, Shwetha K. Morphometric study of adult human spleen in a cadaver. *Indian Journal of Clinical Anatomy and Physiology.* 2021;8(1):20-3. DOI: 10.18231/IJCAP.2021.005.
9. Ikpegbu E, Ibe CS, Nlebedum UC, Nnadozie O. The Spleen Morphology of the African Giant Pouch Rat (*Cricetomys gambianus*-Waterhouse, 1840) from Eastern Nigeria. *Journal of Animal Research.* 2019;9(1):13-7. DOI: 10.30954/2277-940X.01.2019.2.
10. Hanchang W, Wongmanee N, Yoopum S, Rojanaverawong W. Protective role of hesperidin against diabetes induced spleen damage: Mechanism associated with oxidative stress and inflammation. *J Food Biochem.* 2022;46(12):e14444. DOI: 10.1111/jfbc.14444.
11. Said HM, Abdelaziz H, Abd Elhaliem N, Elsharif Sh. A Comparative Study between Ginger and Echinacea Possible Effect on the Albino Rat Spleen of Experimentally Induced Diabetes. *Egyptian Journal of Histology.* 2020;43(3):763-76. DOI: 10.21608/EJH.2019.16107.1156.
12. 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 Dev.* 2017;26(24):1749-58. DOI: 10.1089/SCD.2017.0119.
13. Hashish HA, Kamal RN. 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.
14. Dewi AK, Rahardjo IB, Gunawan A. Perbedaan jumlah limfosit daerah pals (periarterial lymphoid sheat) antara mencit sehat dan mencit diabetes. *Majalah Biomorfologi.* 2014;27(1):5-8. DOI: 10.20473/MBIOM.V27I1.2014.5-8.
15. Cook MC, Basten A, Groth BFS. Outer periarteriolar lymphoid sheath arrest and subsequent differentiation of both naive and tolerant immunoglobulin transgenic B cells is determined by B cell receptor occupancy. *J Exp Med.* 1997;186(5):631-43. DOI: 10.1084/JEM.186.5.631.
16. Chen YG, Forsberg MH, Khaja S, Cieccko AE, Hessner MJ, Geurts AM. Gene Targeting in NOD Mouse Embryos Using Zinc-Finger Nucleases. *Diabetes.* 2014;63(1):68-74. doi: 10.2337/db13-0192.
17. Li C, Gao Q, Jiang H, Liu C, Du Y, Li L. Changes of macrophage and CD4+ T cell in inflammatory response in type 1 diabetic mice. *Sci Rep.* 2022;12:14929. doi: 10.1038/s41598-022-19031-9.
18. Berestova A, Karagezyan M, Spaska A, Sakharova T, Shorina D. Clinical and morphological changes of the spleen in COVID-19 patients with and without splenectomy. *Electron J Gen Med.* 2024;21(5):em602. doi: 10.29333/ejgm/14935.
19. Sutradhar S, Deb A, Singh SS. Melatonin attenuates diabetes-induced oxidative stress in spleen and suppression of splenocyte proliferation in laboratory mice. *Arch Physiol Biochem.* 2022;128(5):1401-12. doi: 10.1080/13813455.2020.1773506.

Відомості про авторів

Ханенко О.Б. – аспірант кафедри дитячої хірургії з курсом клінічної анатомії та оперативної хірургії, Івано-Франківський національний медичний університет, м. Івано-Франківськ, Україна, ORCID <https://orcid.org/0000-0001-5719-7121>.

Попович Ю.І. – завідувач кафедри фармакології, Івано-Франківський національний медичний університет, м. Івано-Франківськ, Україна, ORCID <https://orcid.org/0000-0002-2401-4699>.

Information about the authors

Khanenko O.B. – PhD student of the Department of Pediatric Surgery with a course in clinical anatomy and operative surgery, Ivano-Frankivsk National Medical University, Ivano-Frankivsk, Ukraine, ORCID <https://orcid.org/0000-0001-5719-7121>.

Popovych Yu.I. – Head of Department of Pharmacology, Ivano-Frankivsk National Medical University, Ivano-Frankivsk, Ukraine, ORCID <https://orcid.org/0000-0002-2401-4699>.

Надійшла до редакції 19.07.24
Рецензент – проф. Пашковська Н.В.
© А.В. О.Б. Ханенко, Ю.І. Попович, 2024