

МОРФОМЕТРИЧНІ ТА ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ СЕЛЕЗІНКИ ЩУРІВ У ПІЗНІ ТЕРМІНИ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУКОВАНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ ЗА УМОВ КОРЕКЦІЇ ІНСУЛІНОМ ТА ДАПАГЛІФЛОЗИНОМ

О.Б. Ханенко, Ю.І. Попович

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

Діабет – це хронічне захворювання, яке суттєво впливає на роботу імунної системи. Одним з органів, що зазнає змін під впливом цього захворювання, є селезінка.

Мета дослідження – встановити особливості морфометричних та імуногістохімічних показників структурних елементів селезінки у пізньому періоді експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету та в умовах корекції його інсуліном і дапагліфлозином.

Матеріали і методи. Дослідження виконані на 27 щурах-самцях. До першої групи (контрольної) віднесені щури без цукрового діабету. Індукцію цукрового діабету (ЦД, друга група) здійснювали шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення стрептозотоцину фірми «Sigma» (США) на 0,1 М цитратному буфері (рН 4,5) із розрахунку 6 мг / 100 г маси тіла. Щури третьої групи з ЦД отримували щоденні ін'єкції інсуліну-гларгіну (препарат «Соліква», «Санофі Авентіс», Німеччина) в дозі 0,5-1,0 ОД/кг маси тіла/добу підшкірно. Четверта група – корекція ЦД інсуліном у поєднанні з дапагліфлозином (0,1 мг/кг маси тіла/добу). Під час роботи з лабораторними тваринами дотримувались рекомендацій Європейської комісії щодо проведення медико-біологічних досліджень із використанням тварин. Роботу схвалено на засіданні комісії з біоетики Івано-Франківського національного медичного університету та надано експертний висновок № 131/22 від 24.11.2022р. Евтаназію тварин здійснювали шляхом декапітації під тіопенталовим наркозом. Зразки селезінки забирали на 42 та 56 доби експерименту. Для гістологічних досліджень селезінку щурів фіксували в 10% нейтральному формаліні. Виготовляли зрізи товщиною 5-8 мкм, із наступним забарвленням їх гематоксиліном і еозином. Гістологічні препарати вивчали під світловим мікроскопом. Морфометрію виконували за допомогою програмного забезпечення NIH USA «Image J». Експресію CD3⁺, CD20⁺, CD138⁺ маркерів визначали шляхом імуногістохімічного дослідження тканинних зразків після відповідної обробки. Для виконання статистичного аналізу використовували пакет програмного забезпечення Python. Дані виражали у вигляді середніх значень та стандартного відхилення. Рівень статистичної значущості приймали за стандартом $p < 0,05$, для порівняння двох груп використовували t-тест.

Результати. Проведене експериментальне дослідження у пізні терміни цукрового діабету встановило значне зменшення діаметрів лімфатичних вузликів, гермінативних центрів, просвіту центральної артерії, а також ширину мантійної та маргінальної периартеріальної зон селезінки щурів. При корекції інсуліном і, особливо, при його поєднанні з дапагліфлозином, ці зміни були менш виражені, однак навіть при поєднанні препаратів показники відрізнялися від тих же у контролі. Імуногістохімічний аналіз виявив характерний компартментний розподіл CD3⁺ і CD20⁺ лімфоцитів у різних функціональних зонах селезінки. CD3⁺ лімфоцити переважно локалізувалися в периартеріальних лімфоїдних ніхвах (ПАЛП), тоді як CD20⁺ В-лімфоцити демонстрували максимальну експресію в первинних і вторинних вузликах. CD68⁺ макрофаги частіше спостерігали в маргінальній зоні та ПАЛП. У пізні терміни цукрового діабету відмічали дифузну інфільтрацію білої пульпи CD68⁺ макрофагами з вираженою проліферацією клітин у маргінальній зоні. CD138⁺ плазматичні клітини формували масивні периваскулярні інфільтрати в червоній пульпі та частіше спостерігалися в мантійній зоні та міжфолікулярному просторі білої пульпи.

Висновок. Стрептозотоцин-індукований цукровий діабет зменшує діаметр лімфоїдних вузликів, гермінативних центрів і ширину функціональних зон селезінки. Комбінована терапія інсуліном та дапагліфлозином нормалізує експресію маркерів лімфоцитів, плазматичних клітин і макрофагів, що сприяє

Ключові слова:

цукровий діабет, селезінка, морфологічні зміни, лімфоцити, імунна система.

Клінічна та експериментальна патологія 2025. Т.24, № 4 (94). С. 66-74.

DOI 10.24061/1727-4338.XXIV.4.94.2025.10

E-mail: olexandrkh29@gmail.com

частковому відновленню її структури та покращенню імунного гомеостазу, проте повного відновлення структурної організації селезінки не настає.

MORPHOMETRIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL FEATURES OF THE SPLEEN IN RATS IN LATE STAGES OF STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES MELLITUS UNDER CONDITIONS OF INSULIN AND DAPAGLIFLOZIN CORRECTION

O.B. Khanenko, Y.I. Popovych

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

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

Clinical and experimental pathology
2025. Vol. 24, № 4 (94).
P. 66-74.

Diabetes is a chronic disease that affects the immune system significantly. The spleen undergoes changes under the influence of this disease. Constantly elevated blood glucose levels in diabetes lead to immune cell dysfunction, which makes the body more vulnerable to infection.

The purpose – to determine the peculiarities of the morphometric and immunohistochemical results of the structural elements of the spleen in the late period of experimental streptozotocin diabetes mellitus and in the conditions of its correction with insulin and dapagliflozin.

Materials and methods. The studies were performed on 27 male rats. The first group (control) included rats without diabetes. Induction of diabetes mellitus (DM, second group) was carried out by a single intraperitoneal injection of streptozotocin from Sigma (USA) in 0.1 M citrate buffer (pH 4.5) at the rate of 6 mg / 100 g of body weight. Rats of the third group with DM received daily injections of insulin glargine (Soliqua, Sanofi Aventis, Germany) at a dose of 0.5–1.0 U / kg body weight / day subcutaneously. The fourth group - correction of DM with insulin in combination with dapagliflozin (0.1 mg / kg body weight / day). When working with laboratory animals, the recommendations of the European Commission on conducting biomedical research using animals were followed. The work was approved at a meeting of the Bioethics Commission of Ivano-Frankivsk National Medical University and expert opinion No. 131/22 dated 11/24/2022 was provided. Euthanasia of animals was carried out by decapitation under thiopental anesthesia. Spleen samples were taken on days 42 and 56 of the experiment. For histological studies, the spleen of rats was fixed in 10% neutral formalin. Sections 5–8 μm thick were prepared, followed by staining with hematoxylin and eosin. Histological preparations were studied under a light microscope. Morphometry was performed using the NIH USA "Image J" software. The expression of CD3⁺, CD20⁺, CD138⁺ markers was determined by immunohistochemical examination of tissue samples after appropriate processing. The Python software package was used to perform statistical analysis. Data were expressed as mean values and standard deviation. The level of statistical significance was set at $p < 0.05$, and a t-test was used to compare two groups.

Results. Our experimental study in the late stages of diabetes mellitus revealed a significant decrease in the diameters of the lymph nodes, germinal centers, and central artery lumen, as well as the width of the mantle and marginal periarterial zones of the rat spleen. When corrected with combination with dapagliflozin, these changes were less pronounced; however, even in the latter case, the indicators differed from those in the control. Immunohistochemical analysis revealed a characteristic compartmentalized distribution of CD3⁺ and CD20⁺ lymphocytes in the different functional areas of the spleen. CD3⁺ lymphocytes were predominantly localized in the periarterial lymphoid sheaths (PALS), whereas CD20⁺ B lymphocytes showed maximum expression in primary and secondary nodules. CD68⁺ macrophages were more frequently observed in the marginal zone and PAP. In the late stages of diabetes mellitus, diffuse infiltration of white CD68⁺ macrophages was noted with marked cell proliferation in the marginal zone. CD138⁺ plasma cells form massive perivascular infiltrates in the red pulp and are more often observed in the mantle and interfollicular spaces of the white pulp.

Conclusion. Streptozotocin-induced diabetes mellitus reduces the diameter of lymphoid nodules, germinal centers, and width of the functional zones of the spleen. Combined therapy with insulin and dapagliflozin normalizes the expression of lymphocyte, plasma cell, and macrophage markers, which contributes to the partial restoration of its structure and improvement of immune homeostasis, but there is no complete restoration of the structural organization of the spleen.

Вступ

Цукровий діабет (ЦД) є одним із найбільш поширених хронічних захворювань, яке характеризується прогресуючим порушенням метаболічного гомеостазу, хронічним запаленням та оксидативним стресом. Ці патогенетичні механізми значною мірою впливають на стан імунної системи, включаючи селезінку — орган, що виконує важливі функції у фільтрації крові, регуляції імунної відповіді та гомеостазі лімфоїдної тканини [1, 2]. Патологічні зміни у селезінці при ЦД включають деструкцію тканин, порушення мікроциркуляції, зміну імуноклітинного складу та посилення прозапальної активності. Це може погіршувати загальний стан імунної системи, знижувати резистентність організму до інфекцій та сприяти розвитку системних ускладнень, як-от серцево-судинні порушення та нефропатія [3, 4].

Одним із перспективних напрямів терапії ЦД є застосування інгібіторів натрій-глюкозного котранспортера 2 типу (iN3KTT-2), зокрема, дапагліфлозину. Цей препарат схвалений для зниження рівня глікемії у пацієнтів із недостатньою ефективністю дієтотерапії та фізичних вправ і може використовуватись самостійно або в комбінації з іншими цукрознижувальними засобами, включаючи інсулін [5].

Дапагліфлозин здійснює значний вплив на зниження рівня глюкози через індукцію глюкочурії, що не залежить від дії інсуліну [6, 7]. Його застосування також пов'язують зі зниженням рівня маркерів оксидативного стресу, зокрема, активних форм кисню та малонового діальдегіду, а також підвищенням активності антиоксидантних ферментів, включаючи супероксиддисмутазу і каталазу [8, 9]. До того ж, дапагліфлозин позитивно впливає на імунну систему, зокрема через зменшення продукції прозапальних цитокінів IL-1 β , IL-6 та TNF- α . Він також сприяє поляризації макрофагів у бік M2-фенотипу, що супроводжується зменшенням запальної активності та підвищенням регенеративних властивостей тканин [10, 11].

У літературі є докази серцево-судинних та ниркових ефектів дапагліфлозину, однак існує помітна прогалина в розумінні специфічного впливу дапагліфлозину на селезінку при цукровому діабеті. Враховуючи роль селезінки в імунній функції та фільтрації крові, важливо дослідити, чи впливає дапагліфлозин на селезінку при цукровому діабеті.

Мета дослідження

Встановити особливості морфометричних та імуногістохімічних показників структурних елементів селезінки у пізньому періоді експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету та в умовах корекції його інсуліном і дапагліфлозином.

Матеріал і методи дослідження

Дослідження виконані на 27 щурах-самцях. До першої групи (контрольної) віднесені щури без цукрового діабету. Індукцію цукрового діабету здійснювали шляхом одноразового

внутрішньоочеревинного введення стрептозотоцину фірми «Sigma» (США) на 0,1 М цитратному буфері (рН 4,5) із розрахунку 6 мг / 100 г маси тіла [12]. Щури другої групи з експериментальним ЦД отримували щоденні ін'єкції інсуліну-гларгіну (препарат «Соліква», «Санофі Авентіс», Німеччина) в дозі 0,5-1,0 ОД/кг маси тіла/добу підшкірно. Третя група тварин – корекція цукрового діабету інсуліном у поєднанні з дапагліфлозином (0,1 мг/кг маси тіла/добу). Під час роботи з лабораторними тваринами дотримувались рекомендацій Європейської комісії щодо проведення медико-біологічних досліджень із використанням тварин. Роботу схвалено на засіданні комісії з біоетики Івано-Франківського національного медичного університету та надано експертний висновок № 131/22 від 24.11.2022р. Евтаназію тварин здійснювали шляхом декапітації під тіопенталовим наркозом. Зразки селезінки забирали на 42 та 56 доби експерименту.

Для гістологічних досліджень селезінку щурів фіксували в 10% нейтральному формаліні. Виготовляли зрізи товщиною 5-8 мкм, із наступним забарвленням їх гематоксиліном і еозином. Гістологічні препарати вивчали під світловим мікроскопом. Морфометрію виконували за допомогою програмного забезпечення NIH USA «Image J» у ручному режимі при збільшенні об'єктива x40 та x10, окуляра – x10.

Для імуногістохімічного дослідження тканинні зразки селезінки фіксували у 10% нейтрально-буферному формаліні протягом 24 годин, після чого здійснювали заливку в парафін для подальшого виготовлення мікротомних зрізів товщиною 4–6 мкм. Зрізи, нанесені на предметні скельця, висушували у термостаті при температурі 37°C протягом 12 годин. Парафін зі зрізів видаляли обробкою у ксилолі, а потім поступово гідратували через зниження концентрації спиртів. Далі наносили первинні антитіла, розведені у відповідному буфері (1% BSA у PBS), інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. Після цього зрізи промивали у Tris-буферному розчині. На наступному етапі застосовували вторинні антитіла, кон'юговані з ферментами (пероксидазою). Для виконання статистичного аналізу використовували пакет програмного забезпечення Python, який є потужною мовою програмування з бібліотеками для статистичної обробки даних – NumPy, SciPy, які використовували у дослідженні.

Усі отримані дані виражали у вигляді середніх значень та стандартного відхилення, що дає змогу охарактеризувати центральну тенденцію та ступінь варіабельності морфометричних показників. Для статистичного аналізу застосовували односторонній дисперсійний аналіз (ANOVA), який дозволяє оцінити наявність статистично значущих відмінностей між трьома групами, що є важливим для порівняння результатів у різних експериментальних умовах. Рівень статистичної значущості приймали за стандартом $p < 0,05$, що є загальноприйнятим критерієм для підтвердження достовірності результатів. Для порівняння двох груп

використовували t-тест.

Робота є фрагментом НДР кафедри анатомії Івано-Франківського національного медичного університету «Особливості патоморфогенезу деяких органів нервової та репродуктивної систем при цукровому діабеті та його корекції в умовах хронічного стресу» з номером державної реєстрації 012U113918.

Результати та їх обговорення

Проведений нами морфометричний аналіз встановив, що діаметр лімфатичних вузликів (ЛВ) у інтактних тварин становив $(439,09 \pm 11,49)$ мкм (рис. 1). Через 42 доби після індукції цукрового діабету у щурів цей показник зменшився на 18,8%, до $(356,27 \pm 9,76)$ мкм. При корекції стрептозотоцин-

індукованого цукрового діабету (СЦД) інсуліном через 42 доби діаметр лімфатичних вузликів зменшився менш суттєво – на 9,9% до $(395,58 \pm 16,21)$ мкм відносно величин у інтактних щурів ($p < 0,05$), а після поєднаного застосування інсуліну та дапагліфлозину ЛВ зменшувалися лише на 3,3% $(424,48 \pm 11,16)$ мкм, що мало відрізняє їх від контрольних показників ($p > 0,05$).

Через 56 днів після індукції цукрового діабету діаметр лімфатичних вузликів зменшувався до $(305,63 \pm 10,24)$ мкм, що становило 30,4% відносно контрольної групи ($p < 0,01$). При комбінованому застосуванні інсуліну і дапагліфлозину через 56 днів СЦД діаметр лімфатичних вузликів стосовно контролю зменшувався на 7,1% і дорівнював $(408,02 \pm 15,8)$ мкм ($p < 0,05$).

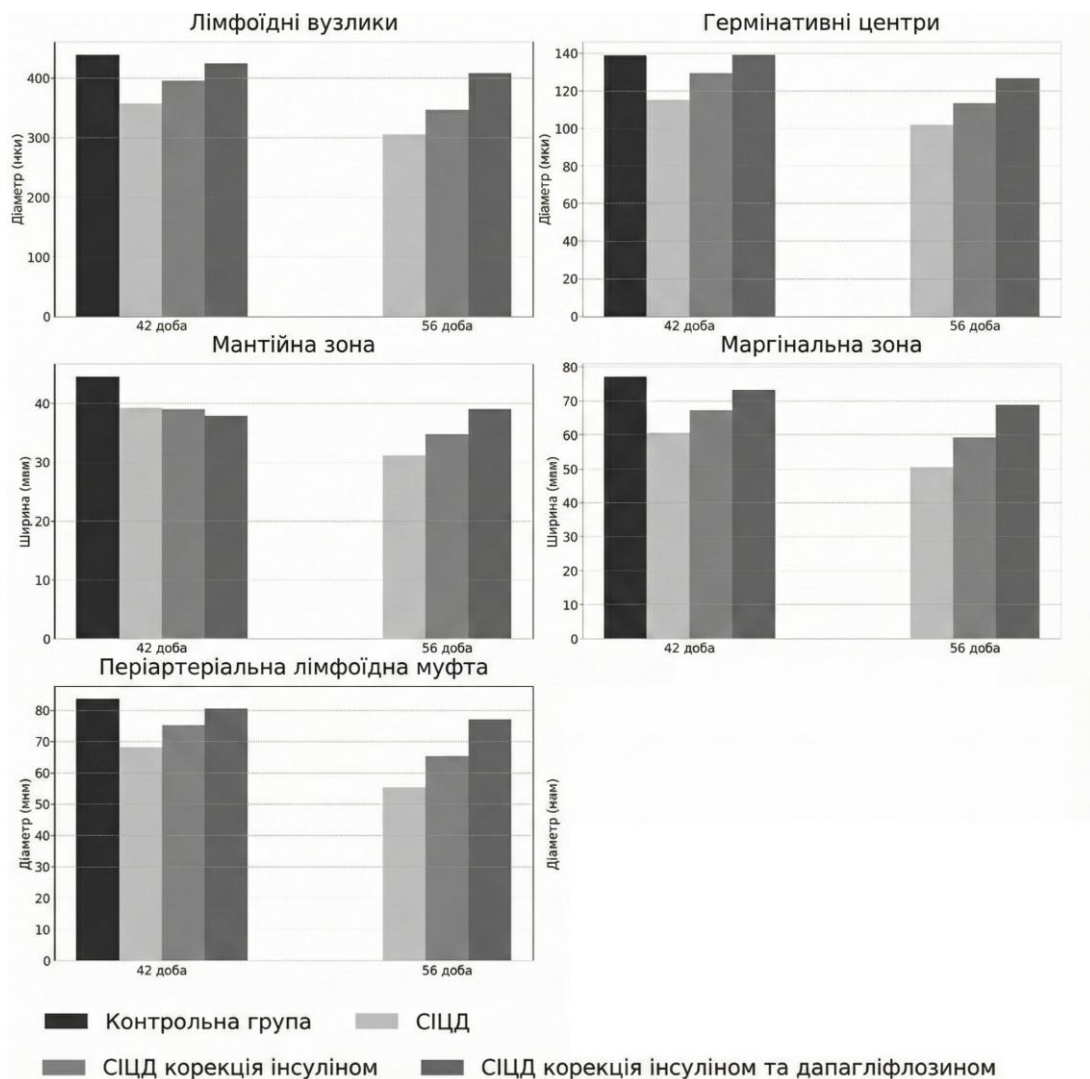


Рис. 1. Динаміка морфометричних показників селезінки в умовах стрептозотоцинового цукрового діабету, при корекції його інсуліном та дапагліфлозином

Діаметр гермінативних центрів (ГЦ) лімфатичних вузликів селезінки у тварин контрольної групи становив $(138,84 \pm 4,40)$ мкм; у щурів із СЦД через 42 доби він зменшився на 17,2% порівняно з контрольними показниками і становив $(114,87 \pm 5,44)$ мкм (див. рис. 1). При застосуванні інсуліну на 42-гу добу діаметр ГЦ ЛВ став на 6,9% меншим $(129,2 \pm 4,76)$ мкм, ніж у контролі, проте перевищував величини, характерні для СЦД. При поєднанні інсуліну та дапагліфлозину діаметр ГЦ у цей термін майже не відрізнявся від показників у інтактних тварин $(139,1 \pm 6,64)$ мкм ($p > 0,05$). Через 56 днів перебігу цукрового діабету діаметр ГЦ ЛВ зменшився ще суттєвіше – до $(101,57 \pm 3,72)$ мкм і на

Клінічна та експериментальна патологія. 2025. Т.24, № 4 (94)

26,8% був нижчим, ніж у контролі. При комбінованій корекції інсуліном і дапагліфлозином через 56 діб діаметр ГЦ ЛВ становив $(126,24 \pm 8,22)$ мкм, що на 9,0% менше ніж у контролі, однак більше ніж при СПД та корекції його інсуліном відповідно на 9,0 % та 10,0 % ($p < 0,05$).

Ширина мантийної зони лімфоїдних вузликів у щурів контрольної групи становила $(44,47 \pm 0,96)$ мкм. У щурів зі стрептозотин-індукованим цукровим діабетом (СПД) після 42 доби ширина мантийної зони зменшилася на 12,1% порівняно з інтактними тваринами, досягаючи $(39,1 \pm 0,89)$ мкм ($p < 0,05$). Ця зміна може бути наслідком хронічного запалення, спричиненого гіперглікемією, яка призводить до деструктивних процесів у структурі лімфоїдних вузликів.

При корекції інсуліном ширина мантийної зони селезінки залишалася майже незмінною і становила $(38,91 \pm 1,21)$ мкм, що на 12,5% менше контрольного показника. Застосування комбінованої корекції інсуліном і дапагліфлозином через 42 доби не призводило до збільшення ширини мантийної зони і становило $(37,85 \pm 0,81)$ мкм.

Через 56 діб досліду у щурів із СПД спостерігали найменшу ширину мантийної зони — $(30,99 \pm 1,42)$ мкм, що на 30,3% менше відносно показника щурів інтактною групи. Це відображає прогресуюче порушення структури ЛВ, зумовлене тривалим перебігом діабету. Водночас корекція інсуліном дещо покращувала показник у цей термін, однак він все ще залишався значно нижчим за контрольні значення $(34,69 \pm 1,36)$ мкм. Комбіноване застосування інсуліну та дапагліфлозину через 56 діб спричиняло збільшення ширини мантийної зони до $(38,92 \pm 2,55)$ мкм, що на 25,5% більше, ніж у щурів із СПД без корекції ($p < 0,05$).

Ширина маргінальної зони у лімфоїдних вузликів інтактних щурів становила $(77,05 \pm 4,09)$ мкм. У щурів зі СПД через 42 діб цей показник зменшувався на 21,6%, досягаючи $(60,41 \pm 1,58)$ мкм ($p < 0,05$). При застосуванні інсуліну ширина маргінальної зони становила $(67,25 \pm 2,91)$ мкм, що було на 12,7% нижче контрольних значень, однак значно перевищувало показники щурів із СПД без корекції. При комбінованому застосуванні інсуліну та дапагліфлозину через 42 доби перебігу СПД ширина маргінальної зони становила $(73,21 \pm 2,61)$ мкм, що практично дорівнювало показникам інтактною групи і було на 21,2% вище, ніж у щурів, які отримували лише інсулін ($p < 0,05$).

Через 56 діб у щурів зі СПД спостерігали найменшу ширину маргінальної зони — $(50,19 \pm 1,71)$ мкм, що на 34,9% менше від контрольного показника. При корекції інсуліном цей параметр зростав до $(59,08 \pm 2,15)$ мкм, однак він залишався на 23,3% нижчим від контрольних значень. При комбінованій корекції інсуліном і дапагліфлозином ширина маргінальної зони становила $(68,67 \pm 1,91)$ мкм, що на 12,2% нижче показників інтактною групи, але на 16,2% перевищувало значення, характерні для групи щурів з інсулінокорекцією, і на 36,8% — для тварин із СПД.

Ширина періартеріальної піхви у лімфоїдних

вузликах інтактних тварин становила $(83,46 \pm 3,46)$ мкм. У щурів зі СПД через 42 доби дослідження цей показник знизився на 18,4% ($p < 0,05$), що засвідчує про патологічні зміни, зумовлені цукровим діабетом. Корекція інсуліном сприяла частковому відновленню ширини зони до $(75,08 \pm 1,92)$ мкм, що на 10,1% нижче контрольних значень. При одночасному застосуванні інсуліну і дапагліфлозину спостерігали ще більше відновлення ширини періартеріальної піхви, яка досягала $(80,34 \pm 1,76)$ мкм і практично дорівнювала контрольним значенням ($p > 0,05$).

Через 56 діб у щурів із СПД ширина лімфатичної періартеріальної піхви становила лише $(55,13 \pm 2,56)$ мкм, що на 34,0% менше порівняно з інтактними тваринами. Під впливом корекції інсуліном у цей термін показник збільшувався до $(65,35 \pm 3,38)$ мкм, однак він залишався на 21,7% нижчим за контрольні значення. Комбінована корекція інсуліном і дапагліфлозином виявилася значно ефективнішою за монокорекцію інсуліном, оскільки ширина періартеріальної зони досягла $(77,08 \pm 3,54)$ мкм, що перевершувало показник у щурів з інсулінокорекцією на 17,9% і у тварин зі СПД на 39,9% ($p < 0,05$).

Імуногістохімічний аналіз імунокомпетентного компартменту селезінки при СПД виявив суттєві патологічні зміни клітинного складу як у білій, так і в червоній пульпі. Дослідження показало зменшення експресії маркера CD20⁺ лімфоцитів у ЛВ білої пульпи ($p < 0,001$) та зниження експресії CD138⁺ клітин у червоній пульпі ($p < 0,001$). Корекція інсуліном із додаванням дапагліфлозину мала виражений імуномодулюючий ефект: порівняно з групою СПД у маргінальній зоні експресія CD3⁺, CD20⁺, CD138⁺ зросла ($p < 0,01$; $p < 0,01$; $p < 0,05$ відповідно), при цьому ефективно пригнічувалася макрофагальна інфільтрація, про що засвідчило зменшення кількості макрофагів ($p < 0,01$).

Кореляційний аналіз імунологічних та морфометричних параметрів селезінки при експериментальному цукровому діабеті виявив значущі кореляційні взаємозв'язки між компонентами імунної відповіді. Встановлено високу позитивну кореляцію між експресією CD3⁺ Т-лімфоцитів у періартеріальній та маргінальній зонах ($p < 0,001$), а також між CD20⁺ В-лімфоцитами та CD3⁺ Т-лімфоцитами ($p < 0,001$), що відображає координовану відповідь адаптивного імунітету. Виявлено сильну позитивну кореляцію між CD138⁺ плазматичними клітинами та лімфоцитарними популяціями ($p < 0,001$) та реципрокний характер взаємовідносин між CD68⁺ макрофагами та лімфоїдними клітинами ($p < 0,001$).

Отже, сукупний аналіз отриманих результатів засвідчує, що комбінована корекція виявилася найефективнішою у нормалізації морфофункціональної організації селезінки, що підтверджується частковим або повним відновленням структурних параметрів до референтних значень.

Комбінована корекція інсуліном і дапагліфлозином нормалізує також експресію маркерів лімфоцитів, плазматичних клітин, експресію маркера макрофагів та відновлює

структурну організацію селезінки, що засвідчує про покращення імунного гомеостазу в умовах ЦД.

Селезінка є важливим регулятором, як вродженого, так і адаптивного імунітету. Вона фільтрує кров, видаляючи старі, пошкоджені або дефектні еритроцити, тромбоцити, антигени та інші шкідливі елементи [8, 9]. Селезінка також є ключовим місцем розвитку гуморальних імунних реакцій. У її білій пульпі містяться Т- і В-лімфоцити, які є важливими для адаптивного імунітету. Т-клітинні зони, відомі як періартеріальні лімфоїдні піхви (оболонки) (ПАЛП), і лімфоїдні вузлики – це місце, де відбувається презентація антигена та активація лімфоцитів [8, 9]. Зародкові центри в лімфоїдних вузликах є місцем проліферації В-клітин, диференціації в плазматичні клітини і вироблення високоафінних антитіл [8, 10, 11, 13].

При дослідженні мікроанатомії селезінки щурів ми виявили значні зміни, які підтверджують вплив СЦД на структуру та функцію органу, що відповідає даним літератури. Найбільш помітні зміни ми спостерігали щодо діаметрів ПАЛП та лімфоїдних вузликів, що засвідчує про зниження активності лімфоцитів і, як наслідок, зменшення функціональної здатності селезінки. Зокрема, ми зафіксували значне зменшення діаметра ПАЛП та лімфоїдних вузликів у щурів зі СЦД порівняно з контрольною групою. Це відповідає результатам інших досліджень, де також відзначали зменшення розмірів лімфоїдних елементів при діабеті, що може бути наслідком зниження лімфоцитарної активності та порушення функцій імунного фільтру організму при захворюванні [14, 15].

Ці зміни можуть бути пов'язані із загальним пригніченням імунної функції організму при діабеті, що узгоджується з результатами інших досліджень. Зменшення розмірів лімфоїдних вузликів та зон білої пульпи може засвідчувати про зниження активності лімфоцитів, що негативно впливає на здатність організму до протидії інфекціям. Такі зміни відмічено в інших експериментальних дослідженнях [15, 16].

Зміни ширини мантийної, крайової та періартеріальної зон, встановлені нами, також підтверджують вплив цукрового діабету на структурну організацію селезінки. Зокрема встановлено, що ширина мантийної, крайової та періартеріальної зон зменшувалася при діабеті, що може бути наслідком зниження лімфоцитарної активності та порушення кровообігу у селезінці [14, 15].

Отримані результати узгоджуються з літературними даними, що описують вплив цукрового діабету на імунну систему [14, 15]. Вони підтверджують, що цукровий діабет викликає суттєві зміни в структурі та функції селезінки, що може впливати на загальну імунну реактивність організму. Додавання до корекції дапагліфлозину суттєво покращує результати. CD20+ і CD3+ є важливими маркерами для дослідження імунних реакцій при цукровому діабеті, особливо типу 1. CD20+ є специфічним антигеном на поверхні В-лімфоцитів, тоді як CD3+ є частиною Т-клітинного рецептора. У

Клінічна та експериментальна патологія. 2025. Т.24, № 4 (94)

дослідженні на мишах зі стрептозотоцин-індукованим діабетом виявлено значне збільшення CD3+ Т-клітин у нирках, але не було істотних змін у популяції Т-клітин у селезінці порівняно з контрольними мишами [17].

Цукровий діабет значно впливає на кількість клітин CD138+ у селезінці, насамперед через механізми, що включають апоптоз лімфоїдних клітин та змінений розподіл лімфоцитів. Дослідження показують, що діабет призводить до зменшення популяції лімфоцитів, включаючи клітини CD138+, через підвищення рівня апоптозу та запальних цитокінів, зокрема інтерферону І типу. Це зниження пов'язане з атрофією селезінки та порушенням імунної функції, як це спостерігається на моделях тварин із цукровим діабетом [18].

У селезінці клітини CD68+ мають вирішальне значення для контролю запалення та відповіді на патогени. Цукровий діабет значно змінює кількість і функцію клітин CD68+, що призводить до посилення запалення та ослаблення імунної відповіді. Ці клітини необхідні для фагоцитозу патогенів і клітинного сміття, у такий спосіб регулюючи запалення і сприяючи відновленню тканин. У міру прогресування діабету зміна метаболічного стану впливає на популяцію CD68+ в селезінці, що призводить до дисбалансу, який може посилити імунну дисфункцію. Хронічне запалення низького ступеня, пов'язане з цукровим діабетом, може викликати зміни в активації та функції макрофагів, що призводить до посиленого виробництва цитокінів і може сприяти інсулінорезистентності та іншим ускладненням. До того ж, модуляція активності клітин CD68+ сполуками, такими як ресвератрол, підкреслює потенційні терапевтичні шляхи для корекції запалення у пацієнтів із цукровим діабетом, враховуючи здатність регулювати імунні відповіді та впливати на шляхи запалення [19, 20, 21].

У хворих на цукровий діабет зміни в метаболізмі можуть призвести до хронічного запалення низького ступеня, сприяючи створенню середовища, сприятливого для збільшення кількості клітин CD 68+ у селезінці. Це явище може корелювати з аутоімунними реакціями, що спостерігаються при таких станах як целиакія, де імунна дисрегуляція відіграє ключову роль у прогресуванні захворювання. Крім того, діабет-асоційований хронічний гіперглікемічний стан, пов'язаний з окиснювальним стресом і подальшим залученням імунних клітин, включаючи клітини CD 68+, до тканини селезінки [21, 22]. Зі збільшенням кількості цих макрофагів зростає ризик запалення тканин, яке може посилити ускладнення, пов'язані з діабетом.

При цукровому діабеті підвищені рівні прозапальних цитокінів порушують тонкий баланс імунних відповідей, викликаючи аномальну проліферацію моноцитів і макрофагів, які експресують CD 68+, маркер, що вказує на активовані макрофаги. Ця дисрегуляція може призвести до накопичення клітин CD 68+, потенційно посилюючи запалення та сприяючи посиленню пошкодження тканин. Отже, взаємодія між хронічним запаленням і метаболічною дисрегуляцією змінює популяцію

ISSN 1727-4338 <https://www.bsmu.edu.ua>

клітин CD68+ [19, 20, 22].

Висновки

1. Стрептозотцин-індукований цукровий діабет призводить до зменшення діаметра лімфоїдних вузликів, їх гермінативних центрів та ширини різних функціональних зон селезінки.

2. Застосування інсуліну та його комбінації з дапагліфлозином сприяє нормалізації експресії маркерів лімфоцитів і плазматичних клітин, а також впливає на експресію маркера макрофагів. Це супроводжується частковим відновленням структурної організації селезінки, що може покращувати імунний гомеостаз в умовах цукрового діабету. Отже, корекція інсуліном окремо та у комбінації з дапагліфлозином зменшує вплив діабету на структуру селезінки, хоча повного її відновлення не відбувається.

Перспективи подальших досліджень

Планується вивчити вплив інших антидіабетичних препаратів на динаміку морфофункціональних змін селезінки у щурів з експериментальним цукровим діабетом.

Список літератури

- Upadhyay S, Mazumder A, Pentela B, Bansal P, Agarwal N, Baghel DS. Immunological Implications in Diabetes: A Review on Various Diseases and Conditions. *Natural Products Journal* [Internet]. 2024[cited 2025 Dec 03];15(1):E030424228579. Available from: <https://www.benthamdirect.com/content/journals/npj/10.2174/012103155298605240303181317> doi: 10.2174/012103155298605240303181317
- Tripath P, Tripath RP, Kaushik MP, editors. *Biochemical Immunology of Diabetes and Associated Complications*. Chapter 6, Sarkar E, Khan A, Khan A, Misra A. Immune response and biochemical connection in diabetes mellitus. Academic Press; 2024, p. 101-20. doi: 10.1016/B978-0-443-13195-0.00006-5
- 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* [Internet]. 2022[cited 2025 Nov 30];46(12):e14444. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfbc.14444> doi: 10.1111/jfbc.14444
- Lori A, Perrotta M, Lembo G, Carnevale D. The Spleen: A Hub Connecting Nervous and Immune Systems in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017[cited 2025 Nov 30];18(6):1216. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5486039/pdf/ijms-18-01216.pdf> doi: 10.3390/ijms18061216
- Rao L, Ren C, Luo S, Huang C, Li X. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors as an add-on therapy to insulin for type 1 diabetes mellitus: Meta-analysis of randomized controlled trials. *Acta Diabetol*. 2021;58(7):869-80. doi: 10.1007/s00592-021-01686-x
- Dhillon S. Dapagliflozin: A Review in Type 2 Diabetes. *Drugs*. 2019;79(10):1135-46. doi: 10.1007/s40265-019-01148-3
- Tentolouris A, Vlachakis P, Tzeravini E, Eleftheriadou I, Tentolouris N. SGLT2 Inhibitors: A Review of Their Antidiabetic and Cardioprotective Effects. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2019[cited 2025 Dec 02];16(16):2965. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6720282/pdf/ijerph-16-02965.pdf> doi: 10.3390/ijerph16162965
- Soto-Méndez MJ, Aguilera CM, Mesa MD, Campaña-Martín L, Martín-Laguna V, Solomons NW, et al. Strong Associations Exist among Oxidative Stress and Antioxidant Biomarkers in the Circulating, Cellular and Urinary Anatomical Compartments in Guatemalan Children from the Western Highlands. *PLoS One* [Internet]. 2016[cited 2025 Dec 02];11(1):e0146921. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4720422/pdf/pone.0146921.pdf> doi: 10.1371/journal.pone.0146921

- Arab Sadeghabadi Z, Abbasalipourkabir R, Mohseni R, Ziamajidi N. Investigation of oxidative stress markers and antioxidant enzymes activity in newly diagnosed type 2 diabetes patients and healthy subjects, association with IL-6 level. *J Diabetes Metab Disord*. 2019;18(2):437-43. doi: 10.1007/s40200-019-00437-8
- Arab HH, Al-Shorbagy MY, Saad MA. Activation of autophagy and suppression of apoptosis by dapagliflozin attenuates experimental inflammatory bowel disease in rats: Targeting AMPK/mTOR, HMGB1/RAGE and Nrf2/HO-1 pathways. *Chemico-Biological Interactions* [Internet]. 2021[cited 2025 Nov 29];335:109368. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009279721000041> doi: 10.1016/j.cbi.2021.109368
- Chang DY, Li XQ, Chen M, Zhao MH. Dapagliflozin Ameliorates Diabetic Kidney Disease via Upregulating Crry and Alleviating Complement Over-activation in *db/db* Mice. *Front Pharmacol* [Internet]. 2021[cited 2025 Nov 29];12:729334. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8546210/pdf/fphar-12-729334.pdf> doi: 10.3389/fphar.2021.729334
- Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc* [Internet]. 2021[cited 2025 Dec 03];1(4):e78. Available from: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpz1.78> doi: 10.1002/cpz1.78
- Sprumont A, Rodrigues A, McGowan SJ, Bannard C, Bannard O. Germinal centers output clonally diverse plasma cell populations expressing high- and low-affinity antibodies. *Cell*. 2023;86(25):5486-99. doi: 10.1016/j.cell.2023.10.022
- Wang M, Xiong Y, Zhu W, Ruze R, Xu Q, Yan Z, et al. Sleeve Gastrectomy Ameliorates Diabetes-Related Spleen Damage by Improving Oxidative Stress Status in Diabetic Obese Rats. *Obes Surg* 2020;31(3):1183-95. doi: 10.1007/s11695-020-05073-3
- El-Feky AM, Aboulthana WM, El-Khair El-Sayed AB, Ibrahim NE. Chemical and Therapeutic Study of Nannochloropsis oculata on Spleen of Streptozotocin Induced Diabetes in Rats. *Der Pharma Chemica*. 2017;9(18):36-43.
- Kovrigina AM, Shalamova EA, Berezovskiy YuS, Kalinin DV, Gretsov EM, Bagdasaryan TR, et al. Pathomorphological and immunohistochemical features of lymph nodes in COVID-19 patients (autopsy study). *Clinical and experimental morphology*. 2020;9(4):12-23. doi: 10.31088/CEM2020.9.4.12-23
- Moon JY, Jeong KH, Lee TW, Ihm CG, Lim SJ, Lee SH. Aberrant recruitment and activation of T cells in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol*. 2012;35(2):164-74. doi: 10.1159/000334928
- 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 J Zool*. 2015;47(4):1109-16.
- Malaguamera L. Influence of Resveratrol on the Immune Response. *Nutrients* [Internet]. 2019[cited 2025 Nov 29];11(5):946. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6566902/pdf/nutrients-11-00946.pdf> doi: 10.3390/nu11050946
- Moffitt S, West W, Arora S, Nehila T, Koussayer B, Le NK, et al. 741 Occurrence and Outcomes of Burns in the Southeastern Diabetic Population. *J Burn Care Res*. 2024;45(Suppl 1):222. doi: 10.1093/jbcr/irae036.284
- Sánchez-López E, Gomes D, Esteruelas G, Bonilla L, Lopez-Machado AL, Galindo R, Cano A, Espina M, Etcheto M, Camins A, et al. Metal-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents: An Overview. *Nanomaterials (Basel)* [Internet]. 2020[cited 2025 Nov 29];10(2):292. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7075170/pdf/nanomaterials-10-00292.pdf> doi: 10.3390/nano10020292
- Caio G, Volta U, Sapone A, Leffler DA, De Giorgio R, Catassi C, et al. Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC* ISSN 1727-4338 <https://www.bsmu.edu.ua>

Medicine [Internet]. 2019[cited 2025 Dec 03];17(1):142. Available from: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6647104/pdf/12916_2019_Article_1380.pdf doi: 10.1186/s12916-019-1380-z

References

- Upadhyay S, Mazumder A, Pentela B, Bansal P, Agarwal N, Baghel DS. Immunological Implications in Diabetes: A Review on Various Diseases and Conditions. *Natural Products Journal* [Internet]. 2024[cited 2025 Dec 03];15(1):E030424228579. Available from: <https://www.benthamdirect.com/content/journals/npj/10.2174/012103155298605240303181317> doi: 10.2174/0122103155298605240303181317
- Tripath P, Tripath RP, Kaushik MP, editors. *Biochemical Immunology of Diabetes and Associated Complications*. Chapter 6, Sarkar E, Khan A, Khan A, Misra A. Immune response and biochemical connection in diabetes mellitus. Academic Press; 2024, p. 101-20. doi: 10.1016/B978-0-443-13195-0.00006-5
- 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* [Internet]. 2022[cited 2025 Nov 30];46(12):e14444. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfbc.14444> doi: 10.1111/jfbc.14444
- Lori A, Perrotta M, Lembo G, Carnevale D. The Spleen: A Hub Connecting Nervous and Immune Systems in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017[cited 2025 Nov 30];18(6):1216. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5486039/pdf/ijms-18-01216.pdf> doi: 10.3390/ijms18061216
- Rao L, Ren C, Luo S, Huang C, Li X. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors as an add-on therapy to insulin for type 1 diabetes mellitus: Meta-analysis of randomized controlled trials. *Acta Diabetol*. 2021;58(7):869-80. doi: 10.1007/s00592-021-01686-x
- Dhillon S. Dapagliflozin: A Review in Type 2 Diabetes. *Drugs*. 2019;79(10):1135-46. doi: 10.1007/s40265-019-01148-3
- Tentolouris A, Vlachakis P, Tzeravini E, Eleftheriadou I, Tentolouris N. SGLT2 Inhibitors: A Review of Their Antidiabetic and Cardioprotective Effects. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2019[cited 2025 Dec 02];16(16):2965. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6720282/pdf/ijerph-16-02965.pdf> doi: 10.3390/ijerph16162965
- Soto-Méndez MJ, Aguilera CM, Mesa MD, Campaña-Martín L, Martín-Laguna V, Solomons NW, et al. Strong Associations Exist among Oxidative Stress and Antioxidant Biomarkers in the Circulating, Cellular and Urinary Anatomical Compartments in Guatemalan Children from the Western Highlands. *PLoS One* [Internet]. 2016[cited 2025 Dec 02];11(1):e0146921. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4720422/pdf/pone.0146921.pdf> doi: 10.1371/journal.pone.0146921
- Arab Sadeghabadi Z, Abbasalipourkabir R, Mohseni R, Ziamajidi N. Investigation of oxidative stress markers and antioxidant enzymes activity in newly diagnosed type 2 diabetes patients and healthy subjects, association with IL-6 level. *J Diabetes Metab Disord*. 2019;18(2):437-43. doi: 10.1007/s40200-019-00437-8
- Arab HH, Al-Shorbagy MY, Saad MA. Activation of autophagy and suppression of apoptosis by dapagliflozin attenuates experimental inflammatory bowel disease in rats: Targeting AMPK/mTOR, HMGB1/RAGE and Nrf2/HO-1 pathways. *Chemico-Biological Interactions* [Internet]. 2021[cited 2025 Nov 29];335:109368. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009279721000041> doi: 10.1016/j.cbi.2021.109368
- Chang DY, Li XQ, Chen M, Zhao MH. Dapagliflozin Ameliorates Diabetic Kidney Disease via Upregulating Crry and Alleviating Complement Over-activation in *db/db* Mice. *Front Pharmacol* [Internet]. 2021[cited 2025 Nov 29];12:729334. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8546210/pdf/fphar-12-729334.pdf> doi: 10.3389/fphar.2021.729334
- Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc* [Internet]. 2021[cited 2025 Dec 03];1(4):e78. Available from: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpz1.78> doi: 10.1002/cpz1.78
- Sprumont A, Rodrigues A, McGowan SJ, Bannard C, Bannard O. Germinal centers output clonally diverse plasma cell populations expressing high- and low-affinity antibodies. *Cell*. 2023;86(25):5486-99. doi: 10.1016/j.cell.2023.10.022
- Wang M, Xiong Y, Zhu W, Ruze R, Xu Q, Yan Z, et al. Sleeve Gastrectomy Ameliorates Diabetes-Related Spleen Damage by Improving Oxidative Stress Status in Diabetic Obese Rats. *Obes Surg* 2020;31(3):1183–95. doi: 10.1007/s11695-020-05073-3
- El-Feky AM, Aboulthana WM, El-Khair El-Sayed AB, Ibrahim NE. Chemical and Therapeutic Study of Nannochloropsis oculata on Spleen of Streptozotocin Induced Diabetes in Rats. *Der Pharma Chemica*. 2017;9(18):36-43.
- Kovrigina AM, Shalamova EA, Berezovskiy YuS, Kalinin DV, Gretsov EM, Bagdasaryan TR, et al. Pathomorphological and immunohistochemical features of lymph nodes in COVID-19 patients (autopsy study). *Clinical and experimental morphology*. 2020;9(4):12-23. doi: 10.31088/CEM2020.9.4.12-23
- Moon JY, Jeong KH, Lee TW, Ihm CG, Lim SJ, Lee SH. Aberrant recruitment and activation of T cells in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol*. 2012;35(2):164-74. doi: 10.1159/000334928
- 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 J Zool*. 2015;47(4):1109-16.
- Malaguamera L. Influence of Resveratrol on the Immune Response. *Nutrients* [Internet]. 2019[cited 2025 Nov 29];11(5):946. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6566902/pdf/nutrients-11-00946.pdf> doi: 10.3390/nu11050946
- Moffitt S, West W, Arora S, Nehila T, Koussayer B, Le NK, et al. 741 Occurrence and Outcomes of Burns in the Southeastern Diabetic Population. *J Burn Care Res*. 2024;45(Suppl 1):222. doi: 10.1093/jbcr/irae036.284
- Sánchez-López E, Gomes D, Esteruelas G, Bonilla L, Lopez-Machado AL, Galindo R, Cano A, Espina M, Etcheto M, Camins A, et al. Metal-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents: An Overview. *Nanomaterials (Basel)* [Internet]. 2020[cited 2025 Nov 29];10(2):292. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7075170/pdf/nanomaterials-10-00292.pdf> doi: 10.3390/nano10020292
- Caio G, Volta U, Sapone A, Leffler DA, De Giorgio R, Catassi C, et al. Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Medicine* [Internet]. 2019[cited 2025 Dec 03];17(1):142. Available from: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6647104/pdf/12916_2019_Article_1380.pdf doi: 10.1186/s12916-019-1380-z

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.

E-mail: olexandrkh29@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5719-7121>

Попович Ю. І. – доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри фармакології, Івано-Франківський

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

E-mail: yuropovych@ifnmu.edu.ua

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2401-4699>

Information about 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.

E-mail: olexandrkh29@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5719-7121>

Popovych Yu. I. – MD, Professor, Head of the Department of Pharmacology, Ivano-Frankivsk National Medical University, Ivano-Frankivsk, Ukraine.

E-mail: yuropovych@ifnmu.edu.ua

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2401-4699>

Дата першого надходження рукопису до видання: 21.10.2025

Дата прийнятого до друку рукопису після рецензування: 12.11.2025

Дата публікації: 25.12.2025

