

## ВПЛИВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЇ НА МОРФОМЕТРИЧНІ ПОКАЗНИКИ ЛІМФОЦИТІВ Т-КЛІТИННОЇ ЗОНИ СЕЛЕЗІНКИ

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

**Анотація.** Досліджено морфометричні показники лімфоцитів селезінки на пізніх стадіях експериментального стрептозотоцинового цукрового діабету та під впливом медикаментозної корекції інсуліном і дапагліфлозином. Щурів самців розподілили на п'ять груп: інтактну, контрольну, стрептозотоцинового цукрового діабету, з корекцією його інсуліном і з корекцією інсуліном та дапагліфлозином. Зразки селезінки відбирали на 42-у і 56-у доби. Гістологічні зрізи фарбували гематоксиліном та еозином. Морфометричний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення ImageJ. Для класифікації популяцій лімфоцитів за їхніми морфометричними характеристиками використовували кластеризацію методом *k*-середніх. При цукровому діабеті істотно зменшувалася частка малих лімфоцитів і збільшувалася – середніх і великих лімфоцитів; морфометрично значно зменшувалася площа профілю клітини і ядра та відмічена деформація клітин. При корекції інсуліном частково відновлювався вміст лімфоцитів різного розміру, тоді як при комбінованому його застосуванні з дапагліфлозином отримані кращі результати. Застосування корекції інсуліном сприяло частковому відновленню ядерно-цитоплазматичних співвідношень, більш виражене у поєднанні з дапагліфлозином, і морфометричні показники наближались до рівня контрольної групи. Найбільші зміни спостерігалися у популяції великих лімфоцитів. Комбінована корекція інсуліном і дапагліфлозином забезпечила найбільш помітний відновний ефект. Отримані результати свідчать, що корекція метаболічних порушень може частково запобігати або сповільнювати морфо-функціональні зміни лімфоцитів селезінки у пізній стадії експериментального цукрового діабету.

**Ключові слова:** цукровий діабет, селезінка, лімфоцити, морфометрія, інсулін, дапагліфлозин, стрептозототин.

**Abstract.** Morphometric parameters of splenic lymphocytes were investigated in the late stages of streptozotocin-induced diabetes mellitus and under the influence of drug correction with insulin and dapagliflozin. Male rats were divided into five groups: intact, control, streptozotocin-induced diabetes mellitus, diabetes with insulin treatment, and diabetes with insulin and dapagliflozin treatment. Spleen samples were collected on days 42 and 56 of the experiment. Histological sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E). Morphometric analysis was performed using the ImageJ software. K-means clustering was used to classify the lymphocyte populations based on their morphometric characteristics. In diabetes mellitus, the proportion of small lymphocytes decreased significantly, whereas the proportion of medium- and large-sized lymphocytes increased. Morphometric analysis revealed a significant decrease in cell and nuclear profile areas, along with notable cell deformation. Insulin correction partially restored the lymphocyte content of different sizes, whereas its combined application with dapagliflozin yielded better results. Insulin correction partially restored the nuclear-cytoplasmic ratio, which was more pronounced when combined with dapagliflozin, with morphometric parameters approaching those of the control group. The most significant changes were observed in the large lymphocyte population. Combined correction with insulin and dapagliflozin had the most notable restorative effect. The obtained results indicate that the correction of metabolic disorders can partially prevent or slow down morpho-functional changes in splenic lymphocytes during the late stages of experimental diabetes mellitus (DM).

**Key words:** diabetes mellitus, spleen, lymphocytes, morphometry, insulin, dapagliflozin, streptozotocin.

### Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

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

### Вступ.

Цукровий діабет є складним метаболічним захворюванням, що супроводжується системними імунологічними порушеннями та запальними процесами в різних органах і тканинах. Селезінка, як важливий периферичний імунний орган, відіграє ключову роль у підтримці імунного гомеостазу та є основним ре-

зервуаром імунокомпетентних клітин, включаючи макрофаги, лімфоцити та моноцити [1, 2].

При розвитку діабету спостерігаються значні структурно-функціональні зміни в клітинному складі селезінки. Гіперглікемічні умови та метаболічні порушення призводять до активації запальних процесів в тканинах селезінки [3, 4]. Ці клітинні зміни характеризуються дисбалансом між прозапальними субпопуляціями та протизапальними клітинами, що призводить до порушення імунної толерантності [5, 6, 7].

### Мета дослідження.

Встановлення особливостей морфометричних показників лімфоцитів селезінки у пізньому періоді експериментального стрептозотоцинового цукрово-

го діабету (СЦД) та в умовах корекції інсуліном і дапагліфлозином.

### Об'єкт і методи дослідження.

Дослідження було проведено на 35 щурах-самцях, яких розподілили на п'ять груп. Інтактна група складалася з тварин, які не зазнавали жодних втручань. Тварини контрольної групи отримували внутрішньоочеревинну ін'єкцію 0,1 М цитратного буферного розчину, що слугував розчинником для стрептозотоцину. У трьох інших експериментальних групах модель цукрового діабету відтворювали шляхом одноразової інтраперитонеальної ін'єкції стрептозотоцину (Sigma, США). Препарат вводили у дозі 60 мг/кг маси тіла, попередньо розчинивши його в 0,1 М цитратному буфері з показником рН 4,5.

Після моделювання діабету щурам однієї з експериментальних груп проводили щоденну підшкірну монокорекцію інсуліном-гларгіном (Соліква, Sanofi-Aventis, Німеччина) у дозі 0,5-1,0 ОД/кг. Тваринам другої групи виконували комбіновану корекцію, що включала таку ж дозу інсуліну разом із щоденним пероральним введенням дапагліфлозину в дозі 0,1 мг/кг. Усі маніпуляції з тваринами проводилися згідно з рекомендаціями Європейської комісії з біомедичних досліджень. Забір зразків селезінки для аналізу виконували на 42-гу та 56-ту доби експерименту, для чого тварин піддавали етаназії шляхом декапітації під тіопенталовим наркозом.

Забрані зразки селезінки фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну. З фіксованого матеріалу готували гістологічні зрізи товщиною 5-8 мкм, які забарвлювали стандартним методом гематоксиліном та еозином. Вивчення препаратів та морфометричний аналіз проводили за допомогою світлового мікроскопа при збільшенні  $\times 1000$ , використовуючи програмне забезпечення ImageJ (NIH, США). Усі отримані кількісні дані були представлені як середнє значення  $\pm$  стандартне відхилення.

Для класифікації клітинних популяцій лімфоцитів на основі їхніх морфометричних характеристик застосовували метод кластерного аналізу К-середніх (K-means). Аналіз проводився у два етапи: спочатку виконувалася загальна кластеризація всієї вибірки для визначення співвідношення клітинних популяцій, після чого проводилася окрема кластеризація для кожного періоду. Алгоритм використовував наступний набір параметрів: площа профілю ядра, площа профілю клітини, коефіцієнт форми ядра, коефіцієнт форми клітини, ядерно-цитоплазматичне співвідношення. В результаті клітини з найбільш схожими багатовимірними характеристиками були автоматично згруповані у три статистично значущі та диференційовані популяції (кластери): кластер 0, кластер 1 та кластер 2. Кластерний аналіз застосовувався після розподілу клітин на малі, середні та великі за стандартною методикою для кожної з груп окремо.

### Результати дослідження та їх обговорення.

На 42-гу добу експерименту виникають суттєві зміни з боку вмісту різних за величиною лімфоцитів селезінки та їх морфометричних показників. Спостерігається різке зниження частки малих лімфоцитів з 74-78% у контролі до 38% при діабеті з одночасним зростанням популяції середніх (з 13-20% до 39%) та великих лімфоцитів (з 6-9% до 23%). Застосування

інсуліну частково відновлює вміст різних за величиною лімфоцитів, збільшуючи кількість малих клітин до 50%, а його поєднання з дапагліфлозином призводить до кращого результату: частка малих лімфоцитів зростає до 64%, а середніх та великих знижується до 29% і 7% відповідно.

При морфометричному дослідженні у тварин з СЦД відбувається виражене зменшення площі профілю клітин до 39,80 мкм<sup>2</sup> та ядер до 29,33 мкм<sup>2</sup> (проти 57,32 мкм<sup>2</sup> та 47,00 мкм<sup>2</sup> в інтактній групі). Це супроводжується деформацією клітин та зменшенням ядерно-цитоплазматичного співвідношення (ЯЦС) з 4,30 в інтактних тварин до дуже низьких значень 2,90 при СЦД. При корекції інсуліном ЯЦС частково відновлюється (3,28), а при комбінованій корекції відмічається більш виражений ефект: площа профілю клітин та ядер, коефіцієнти форми та ЯЦС статистично наближаються до параметрів контрольної групи ( $p < 0,01$ ).

У популяції середніх лімфоцитів при СЦД площа клітин найбільшого кластера С2 зменшується з 154,79 мкм<sup>2</sup> у інтактних щурів до 110,88 мкм<sup>2</sup> при СЦД, а ЯЦС – з 3,63 до 2,64. Інсулінокорекція викликає збільшення ЯЦС до 2,91, а комбінована корекція – його підвищення до 3,19. У кластері С0 комбінована корекція призводить до зростання ЯЦС до 4,54.

Найбільш значні зміни на 42-гу добу є у популяції великих лімфоцитів, де патологія призводить до значної редукції розмірів та порушення ЯЦС. Площа профілю клітин кластера С2 зменшується з 177,09 мкм<sup>2</sup> до 126,86 мкм<sup>2</sup>, площа ядра – з 134,26 мкм<sup>2</sup> до 95,28 мкм<sup>2</sup>, а ЯЦС – до 3,02 (проти 4,16 у контролі). Монокорекція інсуліном лише частково компенсує ці зміни (ЯЦС 3,33), тоді як її поєднання з дапагліфлозином дозволяє відновити площу клітини до 154,94 мкм<sup>2</sup> та підвищити ЯЦС до 3,65, що наближає морфометричний профіль клітин до значень у інтактних тварин.

У тварин з корекцією СЦД через 56-днів частка малих лімфоцитів зростає до 46%, що є дещо нижчим показником, ніж на 42-гу добу (50%), але все ще значно вищим, ніж у групі СЦД. Частка середніх лімфоцитів зростає до 38%, проти 34% на 42-гу добу, а великих лімфоцитів – залишається попередньою (16%). При комбінованій корекції на 56-ту добу частка середніх лімфоцитів зменшується до 25%, проти 29% на 42-гу добу, а – великих лімфоцитів становить 12%, проти 7% на 42-гу добу.

У групі малих лімфоцитів на 56-ту добу СЦД розміри клітин дещо більші, ніж на 42-гу добу, однак площа профілю (45,54 мкм<sup>2</sup>) та ЯЦС (2,80) залишаються суттєво нижчими ніж у інтактних тварин (58,23 мкм<sup>2</sup> та 4,49 відповідно). При комбінованій корекції площа профілю клітини зростає до 54,93 мкм<sup>2</sup>, а ЯЦС досягає 3,37, що є більшими за результати отримані при монокорекції інсуліном (площа 50,24 мкм<sup>2</sup>, ЯЦС 3,09) та такими, які наближаються до показників контролю.

У популяції середніх лімфоцитів на 56-ту добу у тварин з СЦД зберігається зменшення площі профілю клітини (109,17 мкм<sup>2</sup> проти 143,30 мкм<sup>2</sup> у контролі) та знижене ЯЦС (3,22 проти 3,76).

Великі лімфоцити на 56-ту добу при СЦД зазнають подальших змін: площа профілю клітин знижується до 124,90 мкм<sup>2</sup>, а ЯЦС – 3,69, проти 163,94 мкм<sup>2</sup>

та 4,31 у інтактних щурів. Застосування комбінованої корекції забезпечує найбільш помітний відновлювальний ефект серед усіх груп: площа профілю клітини збільшується до 150,20 мкм<sup>2</sup>, майже досягаючи показників контролю, а ЯЦС зростає до 4,44.

Результати проведеного дослідження розкривають значні морфометричні зміни в клітинах селезінки щурів за умов експериментального цукрового діабету, що в цілому узгоджується з твердженням про порушення структури ядер лімфоцитів селезінки [8, 9, 10, 11, 12].

Представлені експериментальні результати демонструють наступну тенденцію: у щурів з СЦД через 42 доби спостерігається чітке зменшення площі ядер у всіх трьох кластерах клітин. Так, у Кластері 0 площа ядер у щурів з СЦД зменшилася до (38,14±1,86) мкм<sup>2</sup> порівняно з такими у контролі ((50,42±2,31) мкм<sup>2</sup>), а в Кластері 2 – до (62,52±12,51) мкм<sup>2</sup> порівняно з такими ж у контролі ((87,10±14,20) мкм<sup>2</sup>). Ця тенденція до зменшення площі ядра зберігається і на 56 добу експерименту, досягаючи (66,05±11,29) мкм<sup>2</sup> у Кластері 2. Така розбіжність може свідчити про те, що на певних етапах СЦД в певних популяціях клітин переважають не процеси набряку, а, навпаки, явища конденсації хроматину та зморщування ядра як реакція на стрес.

Водночас експериментальні дані повністю підтверджують висновки про наявність значних ушкоджень ядер. В ряді робіт зазначається про збільшення кількості клітин з явищами маргінації хроматину та ядерної фрагментації, що є характерними ознаками ушкодження клітин [8, 9, 10, 11, 12]. Таке зниження коефіцієнта форми є кількісним вираженням деформації та структурних ушкоджень ядра, спричи-

нених, імовірно, тими ж механізмами окисного стресу та ДНК-фрагментації, про які згадують Ibrahim та співавтори [13].

Зміни торкаються різних популяцій клітин, що в нашому дослідженні продемонстровано зсувами морфометричних показників у всіх трьох кластерах, які представляють клітини різного розміру та, ймовірно, різного функціонального стану.

Крім того, результати корекції в експерименті ілюструють згадані в інших дослідженнях механізми компенсації та адаптації [14, 15]. Застосування комбінованої корекції інсуліном з дапагліфлозином призводить до помітного наближення як площі ядра, так і коефіцієнта його форми до показників контрольної групи. Це свідчить про можливість часткового відновлення морфофункціонального стану клітин селезінки, що є важливим з огляду на патофізіологічне значення виявлених змін для імунної відповіді.

### Висновки.

Проведене дослідження продемонструвало, що експериментальний цукровий діабет призводить до істотних змін морфометричних показників ядер лімфоцитів Т-клітинної зони селезінки. Ці зміни, що свідчать про структурні ушкодження ядра, які посилюються з часом.

При комбінованій корекції інсуліном та дапагліфлозином у пізні терміни (42 та 56 доби СЦД) відмічена більш виражена нормалізація площі профілю ядра, у порівнянні з монокорекцією інсуліном. Це може свідчити про те, що адекватна корекція метаболічних порушень здатна частково запобігти або призупинити морфофункціональні зміни лімфоцитів селезінки.

### Література

1. Lewis SM, Williams A, Eisenbarth SC. Structure and function of the immune system in the spleen. *Sci Immunol.* 2019;4(33):eaau6085.
2. Elmore SA. Enhanced histopathology of the spleen. *Toxicol Pathol.* 2006;34(5):648-55.
3. 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(1):15207.
4. Muller YD, Golshayan D, Ehrlich D, Wyss JC, Giovannoni L, Meier R, et al. Immunosuppressive effects of streptozotocin-induced diabetes result in absolute lymphopenia and a relative increase of T regulatory cells. *Diabetes.* 2011;60(9):2331-9.
5. Jun HS, Yoon CS, Zbytniuk L, van Rooijen N, Yurko-Mauro K, Dinarello CA, et al. The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med.* 1999;189(2):347-58.
6. Queiroz LAD, Assis JB, Guimarães JPT, Santos FO, Pontes GS, Silva TG, et al. Endangered lymphocytes: The effects of alloxan and streptozotocin on immune cells in type 1 induced diabetes. *Mediators Inflamm.* 2021;2021:9940009.
7. Parsa R, Andresen P, Gillett A, Mia S, Zhang XM, Mayans S, et al. Adoptive transfer of immunomodulatory M2 macrophages prevents type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes.* 2012;61(11):2881-92.
8. Ježek P, Jabůrek M, Plecítá-Hlavatá L. Contribution of oxidative stress and impaired biogenesis of pancreatic  $\beta$ -cells to type 2 diabetes. *Antioxid Redox Signal.* 2019;31(10):722-51.
9. Burkart V, Wang ZQ, Radons J, Heller B, Herceg Z, Stingl L, et al. Mice lacking the poly(ADP-ribose) polymerase gene are resistant to pancreatic beta-cell destruction and diabetes development induced by streptozocin. *Nat Med.* 1999;5(3):314-9.
10. Cardinal JW, Margison GP, Mynett KJ, Yates AP, Cameron DP, Elder RH. Increased susceptibility to streptozotocin-induced  $\beta$ -cell apoptosis and delayed autoimmune diabetes in alkylpurine-DNA-N-glycosylase-deficient mice. *Mol Cell Biol.* 2001;21(16):5605-13.
11. Trudeau JD, Dutz JP, Arany E, Hill DJ, Fieldus WE, Finegood DT. Neonatal beta-cell apoptosis: a trigger for autoimmune diabetes? *Diabetes.* 2000;49(1):1-7.
12. Farilla L, Hui H, Bertolotto C, Kang E, Bulotta A, Di Mario U, et al. Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats. *Endocrinology.* 2002;143(11):4397-408.
13. Ibrahim HM, El-Elaimy IA, Saad Eldien HM, Badr BM, Rabah DM, Badr G. Blocking type I interferon signaling rescues lymphocytes from oxidative stress, exhaustion, and apoptosis in a streptozotocin-induced mouse model of type I diabetes. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:148725.
14. Patel T, Patel V, Singh R, Jayaraman S. Chromatin remodeling resets the immune system to protect against autoimmune diabetes in mice. *Immunol Cell Biol.* 2011;89(1):176-85.
15. 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(1):15207.