

УДК 616-092.9+616.33+616.379-008.64
DOI: 10.24061/1727-0847.23.3.2024.53

Л. М. Грицишин, Ю. І. Попович*

*Кафедра дитячої хірургії з курсом клінічної анатомії та оперативної хірургії (зав. – проф. О. Д. Фофанов); *кафедра фармакології (зав. – проф. Ю. І. Попович) Івано-Франківського національного медичного університету*

ЗМІНИ ПЕЧІНКИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЇ АНАЛОГОМ ІНСУЛІНУ ТРИВАЛОЇ ДІЇ ТА S-АДЕНОЗИЛ L-МЕТІОНІНОМ (АДЕМЕТІОНІНОМ)

Резюме. Питання селективної гепатопротекторної терапії при цукровому діабеті, зокрема, морфологічно підтвердженої ефективності адеметіоніну є маловивченими. Мета: через 56 діб встановити морфологічний стан печінки з визначенням вмісту ліпідних включень при стрептозотинному діабеті та застосуванні інсуліну деглюдек та адеметіоніну з особливостями його введення. Матеріал і методи. Для експерименту використано 20 інтактних щурів самців, які розподілені на групи (по 5 тварин): 1 – інтактні; 2В – зі стрептозотинним цукровим діабетом (СЦД) та введенням з 14 дня інсуліну деглюдек; 2С-СЦД і застосуванням з 14 д. аналогу інсуліну тривалої дії та адеметіоніну; 3 – контроль. Виготовляли гістопрепарати, забарвлені гематоксиліном та еозином; досліджували рівень жирових включень на кріостатних зрізах розчином Судану III за Герксгеймером (у модифікації). Результати дослідження. Через 56 днів експерименту в підгрупі 2В спостерігалися: інтенсивні порушення з боку судинної стінки, помірні зміни архітекtonіки центральної ділянки, іноді повністю був зруйнований ендотелій центральної вени, клітинні інфільтрати в паренхімі печінки, збільшення кількості жирових включень, перебудова порталних трактів та судинного русла. При введенні адеметіоніну, на відміну від введення тільки інсуліну деглюдек відмічалися: менше виражені структурні порушення центральної зони, десквамація ендотелію судин та дисконфлексія печінкових балок, нижчий рівень перебудови порталних трактів, клітинної інфільтрації навколо триад та судинних порушень. Рівень ліпідних включень був в межах норми. Висновок. При стрептозотинному цукровому діабеті з 6-ти тижневою корекцією інсуліном деглюдеком та адеметіоніном (поступовому збільшенні дози до 12 мг/кг) у щурів, при додатковому введенні гепатопротектора, спостерігається кращий морфологічний стан печінки, її судин, триад та рівень ліпідних включень практично відповідав інтактним тваринам.

Ключові слова: морфологічні зміни печінки, цукровий діабет, стрептозотин-індукований діабет, адеметіонін, інсулін деглюдек, жирові включення в печінці, експериментальне дослідження на щурах.

Цукровий діабет (ЦД) є глобальною світовою проблемою в галузі охорони здоров'я, який швидко призводить до різноманітних ускладнень, зокрема й до морфофункціональних змін печінки. В основі пошкодження даного органу є розвиток стеатозу, який призводить до інсулінорезистентності та погіршення перебігу ЦД. Дані порушення виникають внаслідок дисбалансу синтезу та катаболізму вільних жирних кислот, підвищеного рівня окислювального стресу, який виникає при окисленні β - та ω -жирних кислот. Ендотоксином (TLR4) активуються процеси в імунній системі з вивільненням різноманітних цитокинів і виникають порушення в ендоплазматичній сітці клітин. Гепатоцелюлярне пошкодження являє собою некротичні та апоптичні зміни, які призводять до

фіброзу та навіть можуть завершуватись цирозом печінки [1-3].

Проте, особливості гепатопротекторної терапії та селективного вибору певних лікарських засобів, які були б найефективнішими при діабетичних змінах печінки є малодослідженими. Адеметіонін є препаратом вибору при багатьох гепатологічних порушеннях, який є донором метильних груп у біохімічних реакціях [4, 5]. Але його ефективність є маловивчена, щодо редукції морфологічних та гістохімічних (зниження вмісту жирових включень) гепато-біліарних змін, особливо впродовж тривалого перебігу ЦД.

Мета дослідження: на пізніх етапах (через 56 діб) встановити закономірності морфологічних змін печінки з визначенням вмісту ліпід-

них включень при стрептозотинному діабеті та його корекції інсуліном деглюдеком та S-аденозил L-метіоніном (адеметіоніном) з особливостями його введення в експерименті.

Матеріал і методи. Науково-дослідницьку роботу проведено з використанням 20-ти інтактних щурів самців (породи Вістар, вагою 150,0-190,0 г). I група (5 щурів) – інтактні. II – експериментальні тварини з індукованим стрептозотинним діабетом (6 мг на 100,0 г маси тіла щура [6]). 2В – 5 тварин, яким з 14 дня проводили щоденні підшкірні ін'єкції інсуліну деглюдеку (**Трисіба**, «Novo Nordisk», Данія). 2С – 5 щурів, яким окрім інсуліну з 14 дня внутрішньом'язово кожного дня вводили адеметіонін (Гептрал, «Delpharm Saint Remy», Франція). III – 5 контрольних тварин, яким внутрішньоочередово вводився цитратний буфер, яким розводили стрептозотин («Sigma», США). Попередньо впродовж 30-ти днів тварини отримували дієту з підвищеним вмістом жирів у низьких дозах.

Вранці натще щодня проводили забір крові для визначення рівня глікемії. Забір біологічного матеріалу проводився згідно усіх міжнародних вимог, щодо гуманного поводження з тваринами (заключення від 29.11.2021 року комісії Івано-Франківського національного медичного університету з питань біоетики, протокол № 124/21).

Тварин з експерименту виводили передозуванням тіопенталового наркозу. Фіксацію печінки проводили у 10 % забуференому нейтральному формаліні. З парафінових блоків робили зрізи 5-7 мкм, які фарбували гематоксиліном Бемера та еозинном. За допомогою лужного розчину Судану III за Герксгеймером (у модифікації) проводили визначення жирових включень на кріостатних зрізах печінки тварин, товщиною 10-15 мкм.

Результати дослідження та їх обговорення.

У підгрупі 2В через 14 діб експерименту середній рівень цукру крові становив – 29,8 (у ммоль/л); через 56 діб – 20,3. У підгрупі 2С – 31,2 та 17,8 відповідно. Для ефективної корекції змін печінки при стрептозотинному діабеті декомпенсованого перебігу, дозу адеметіоніну підбирали експериментально, враховуючи рівень ліпідних включень, морфологічні та біохімічні параметри печінки. Оптимальна чотириступенева схема: стартова доза 4 мг/кг (1 тиждень) з поступовим переходом до підтримувальної дози 8 мг (вводили 3 тижні), підтримувальна максимальна доза – 12 мг/кг (наступні 3 тижні), потім збільшення дози до 16 мг при необхідності, із врахуванням індивідуальної чутливості тварини. Через 28 діб застосування препарату

спостерігали збільшення кількості жирових крапель, тому підтримуючу дозу 8 мг/кг збільшували до максимально допустимої – 12 мг/кг, що призводило до позитивного ефекту.

У інтактних тварин та з групи контролю, печінка мала збережену, типову, анатомічну будову, судинних порушень та патологічних змін не спостерігалось. Практично не було ліпідних включень, рідко – поодинокі дрібнокаліберні жирові краплі в паренхімі печінки.

Через 56 днів експерименту в підгрупі 2В спостерігалися інтенсивні порушення з боку судинної стінки, помірні зміни архітектоніки центральної зони печінки, яка іноді була без значних структурних порушень. Стан стінки центральної вени характеризувався деструктивними процесами різної глибини, від легких до грубих порушень. Іноді практично повністю був зруйнований ендотелій центральної вени (рис. 1) та виявлялися клітинні інфільтрати в паренхімі печінки. Найбільше збережена анатомічна структура периферичної зони. Судинні порушення були у вигляді розширеного просвіту судин, стазу, який був вираженим в центральних венах, що призводило до симптому «монетних стовпчиків». Спостерігалася перебудова судинного русла та виражена десквамація ендотелію міжчасточкової вени з широкими притоками (рис. 2). Локально незначно розширені синусоїди були у всіх зонах, проте найбільше – в центральній та проміжній. Зустрічалось повнокрів'я міжчасточкових вен з широкою притокою і на периферії від неї були різко розширені синусоїди. Невеликі еритроцитарно-клітинні інфільтрати в просвіті судин та проліферація Купферівських клітин в центральній зоні.

Відмічалось збільшення кількості округлих, світлооптичних, прозорих ділянок (ознаки жирових включень (рис. 3)), особливо поблизу триад, в ділянці периферичної зони та дифузні дрібнокаліберні в *zona centralis*. Характерна поліморфність клітин печінки, «клітини тіні», в яких відбувся повний лізис ядра. Збільшення кількості гепатоцитів на різних стадіях розвитку, з пікнотичними ядрами, з їх гіперхромією. Збільшується кількість двоядерних гепатоцитів у центральній зоні та в ділянці елементів триади. Спостерігалася перебудова порталних трактів, підвищене кровонаповнення судин триад із клітинною інфільтрацією навколо (рис. 4), яка іноді була вираженою. Потовщення призматичного епітелію жовчних проток та їх незначне розширення. Наявні темні включення в цитоплазмі гепатоцитів у проміжній ділянці та поблизу порталних триад.

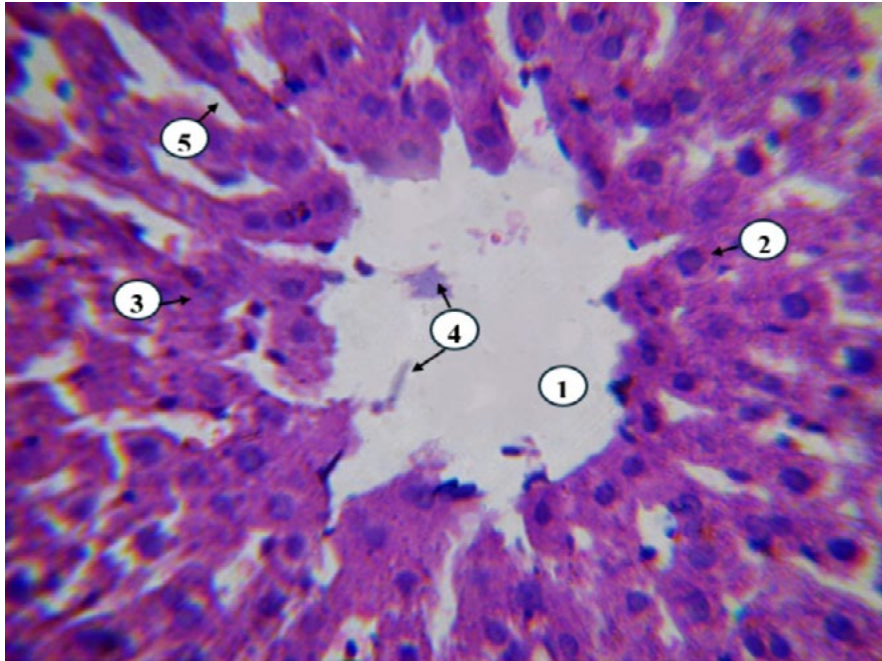


Рис. 1. Гістопрепарат печінки щура: зруйнований ендотелій центральної вени при стрептозотоцин-індукованому цукровому діабеті та застосуванні аналогу інсуліну тривалої дії через 56 діб експерименту. Забарвлення: гематоксилін, еозин. Збільшення $\times 400$. Позначення: 1 – просвіт центральної вени; 2 – гепатоцит; 3 – дисконкомплексована печінкова балка; 4 – залишки десквамованого ендотелію центральної вени; 5 – синусоїд

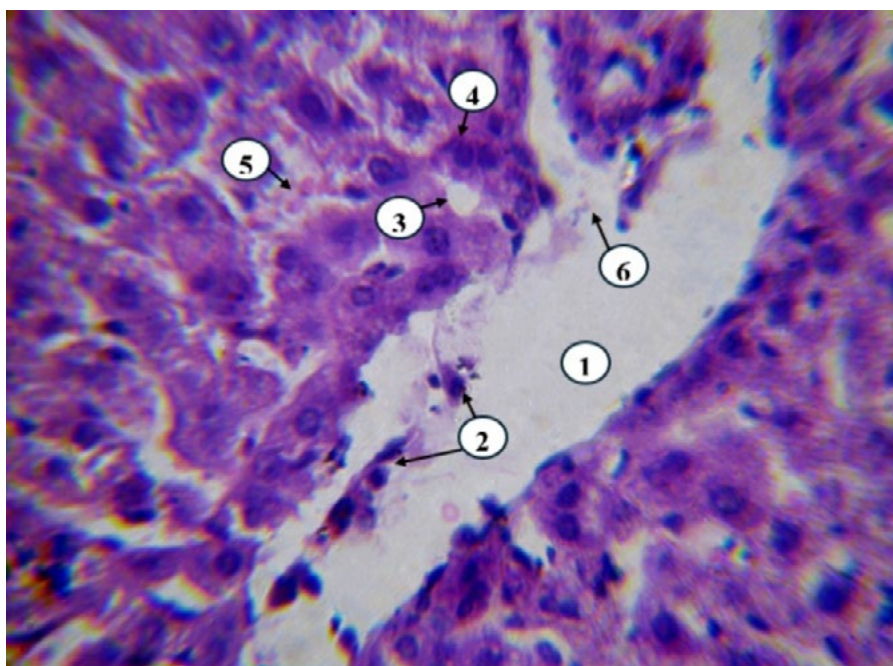


Рис. 2. Гістопрепарат печінки щура: виражена десквамація ендотелію міжчасточкової вени при стрептозотоцин-індукованому цукровому діабеті та застосуванні інсуліну деглюдеку через 56 діб експерименту. Забарвлення: гематоксилін, еозин. Збільшення $\times 400$. Позначення: 1 – просвіт міжчасточкової вени; 2 – десквамований ендотелій стінки міжчасточкової вени; 3 – світлооптична, прозора ділянка (що відповідає ознакам жирового включення середнього калібру); 4 – двоядерний гепатоцит; 5 – синусоїд, що переповнений еритроцитами; 6 – широка притока до міжчасточкової вени

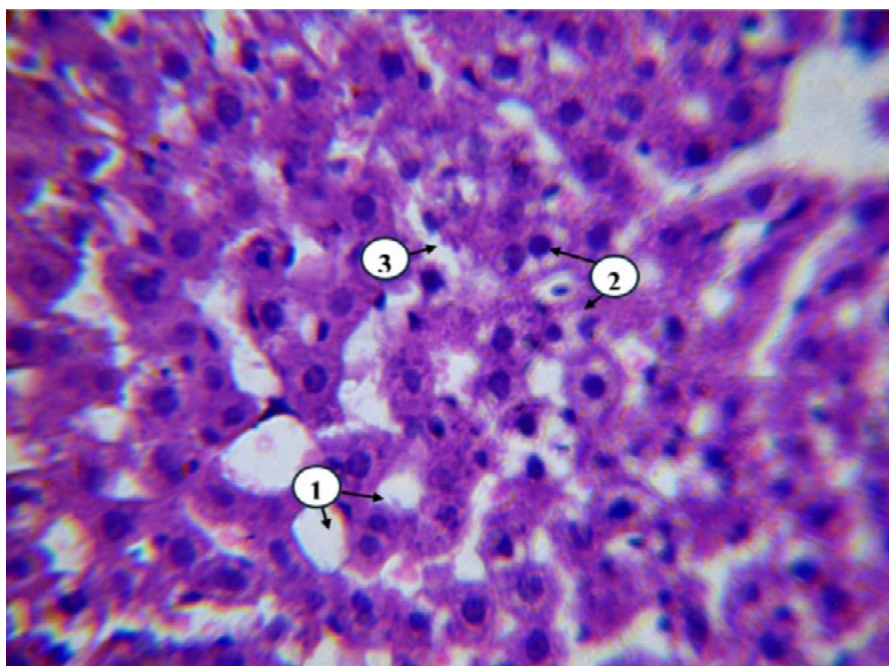


Рис. 3. Гістопрепарат печінки щура: збільшення кількості світлооптичних, прозорих ділянок (жирових включень) при стрептозотозин-індукованому цукровому діабеті та застосуванні аналогу інсуліну тривалої дії через 56 днів експерименту. Забарвлення: гематоксилін, еозин. Збільшення $\times 400$. Позначення: 1 – світлооптична, прозора ділянка (що відповідає ознакам жирового включення); 2 – двоядерний гепатоцит; 3 – синусоїд

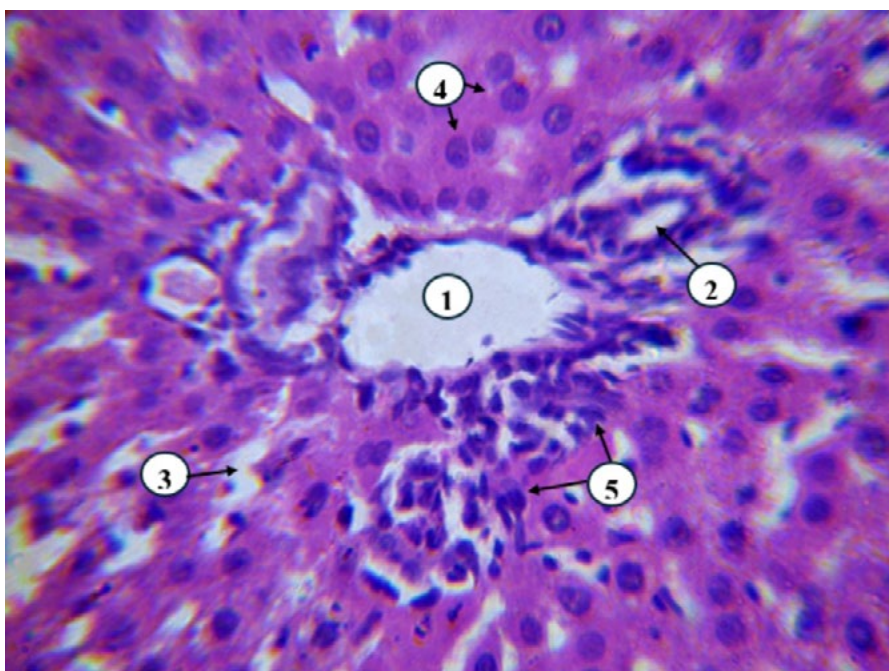


Рис. 4. Гістопрепарат печінки щура: клітинна інфільтрація навколо портального тракту при стрептозотозин-індукованому цукровому діабеті та застосуванні інсуліну деглудеку через 56 днів експерименту. Забарвлення: гематоксилін, еозин. Збільшення $\times 400$. Позначення: 1 – міжчасточкова вена; 2 – міжчасточкова жовчна протока; 3 – синусоїд; 4 – двоядерний гепатоцит; 5 – клітинна інфільтрація поблизу елементів портального тракту

У підгрупі 2С, при введенні адеметіоніну, архітектоніка печінки збережена краще, ніж при введенні тільки інсуліну (рис. 5). Проте іноді наявні порушення структури в центральній зоні зі широ-

кою притокою, незначна десквамація ендотелію міжчасточкових та центральних вен, дискмплексація печінкових балок легкого ступеня, незначно розширені синусоїди. Периферична зона загалом збереже-

на. Відмічається підвищене кровонаповнення судин портальної тріади, іноді стаз в центральних венах. Спостерігалася незначна клітинна інфільтрація поблизу великих судин (в тому числі й більших ніж міжчасточкові) (рис. 6) та іноді навколо портальних трактів. Здебільшого елементи тріади в нормі, проте в деяких випадках з перебудовою, яка наявна у двох

підгрупах (2В і 2С), проте при введенні адеметіоніну вона менш виражена. Рідко наявна розширена жовчна протока. Балкова структура печінкових часточок загалом збережена. Співвідношення темних і світлих гепатоцитів наближене до параметрів інтактного щура. Межі клітин чіткі, збільшена кількість двоядерних клітин в централобулярній ділянці.

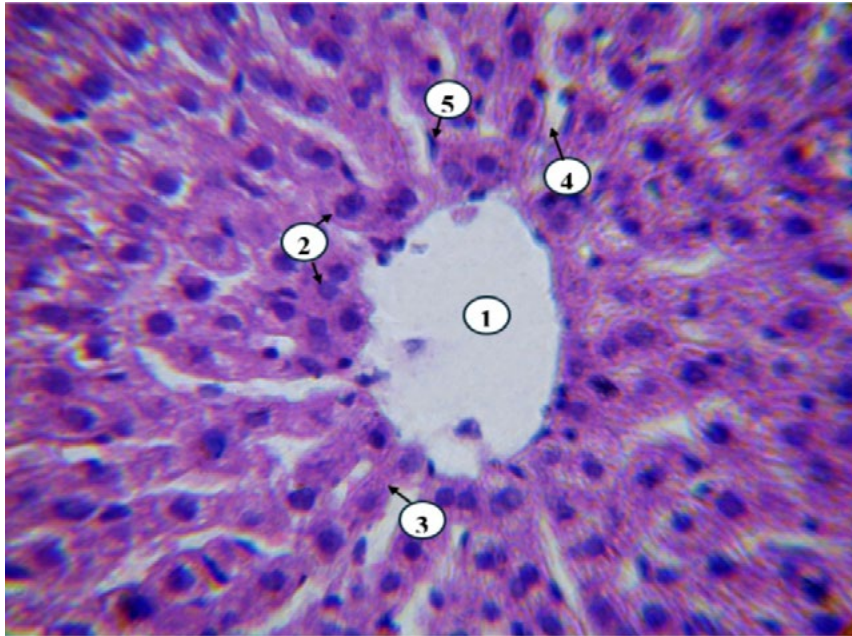


Рис. 5. Гістопрепарат печінки щура: архітектоніка центральної зони при стрептозотоциновому цукровому діабеті та застосуванні інсуліну деглюдеку та адеметіоніну через 56 діб експерименту. Забарвлення: гематоксилін, еозин. Збільшення $\times 400$. Позначення: 1 – просвіт центральної вени; 2 – двоядерний гепатоцит; 3 – печінкова пластинка; 4 – синусоїд; 5 – клітина Купфера

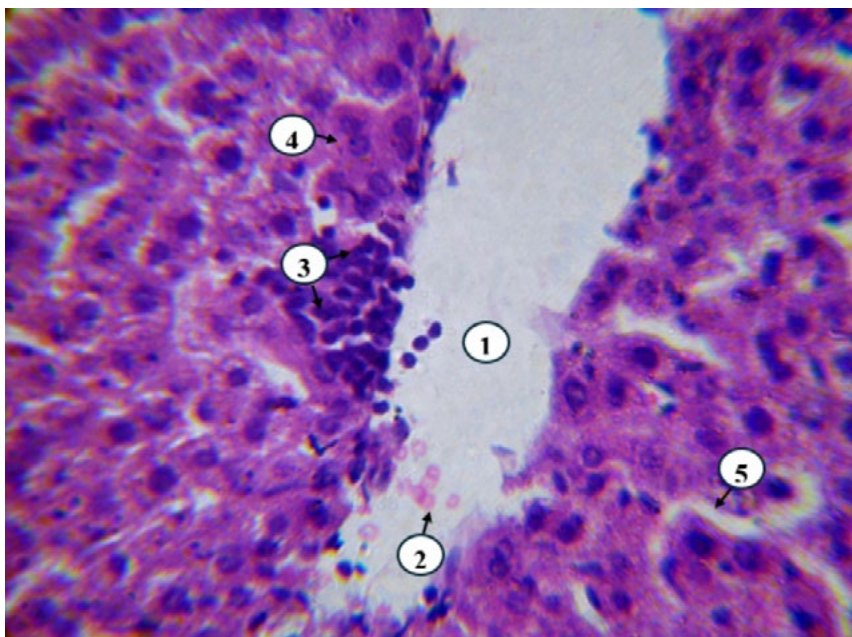


Рис. 6. Гістопрепарат печінки щура: клітинна інфільтрація поблизу великих судин при стрептозотоцин-індукованому цукровому діабеті та застосуванні інсуліну деглюдеку та адеметіоніну через 56 діб експерименту. Забарвлення: гематоксилін, еозин. Збільшення $\times 400$. Позначення: 1 – просвіт судини; 2 – еритроцит; 3 – клітинна інфільтрація; 4 – двоядерний гепатоцит; 5 – синусоїд

Через 56 діб експерименту в підгрупі 2В – збільшується кількість жирових включень. Масові дрібнокаліберні скупчення в І зоні та поодинокі

в зона centralis (III). Іноді середньокаліберні жирові краплі у II зоні. У групі 2С – зменшення рівня ліпідів практично до норми (рис. 7).

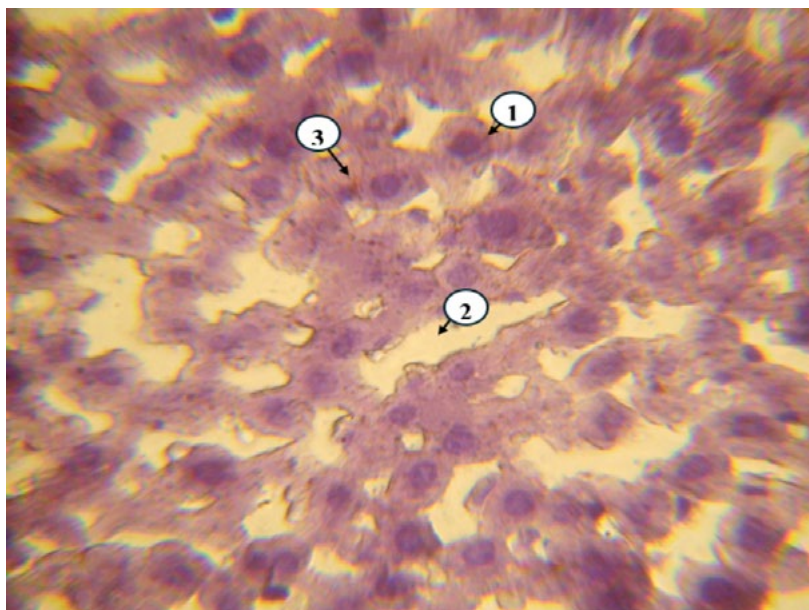


Рис. 7. Кріостатний зріз печінки щура: практично відсутні жирові включення при стрептозотоциновому цукровому діабеті та застосуванні інсуліну деглюдеку та адеметіоніну через 56 діб експерименту. Забарвлення: лужний розчин Судану III за Герксгеймером (у модифікації). Зб.: $\times 400$. Позначення: 1 – гепатоцит; 2 – синусоїд; 3 – жирове включення

У двох підгрупах (2В та 2С) найбільші су-динні порушення (особливо стаз та десквамація ендотелію центральної вени) спостерігалися при найвищих рівнях глікемії. Проте патологічні зміни з боку триад (їх перебудова та виражена інфільтрація навколо) не корелювали з рівнем глюкози і най-вираженіші зміни були навіть при середніх значеннях показників вуглеводного обміну серед тварин.

Висновок. Через 56 діб експерименту при стрептозотозин-індукованому цукровому діабеті з корекцією протягом 6-ти тижнів інсуліном деглюдеком та адеметіоніном, встановлено, що

при введенні останнього (за схемою з поступовим підвищенням дози до 12 мг/кг) краще збережена архітектоніка печінки, менше виражені зміни портальних триад та рівень ліпідних включень практично не відрізнявся від такого ж у інтактних щурів.

Перспективи подальших досліджень.

Проведення детального комплексного аналізу морфологічних, біохімічних, морфометричних та електронно-мікроскопічних змін паренхіми печінки в різні етапи експерименту при стрептозотозин-індукованому діабеті та введенні адеметіоніну та інсуліну деглюдеку.

References

1. Manilla V, Santopaolo F, Gasbarrini A, Ponziani FR. Type 2 Diabetes Mellitus and Liver Disease: Across the Gut-Liver Axis from Fibrosis to Cancer. *Nutrients*. 2023 May 29;15(11):2521. doi: 10.3390/nu15112521. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10255218>.
2. Dewidar B, Kahl S, Pafli K, Roden M. Metabolic liver disease in diabetes – From mechanisms to clinical trials. *Metabolism*. 2020 Oct;111S:154299. doi: 10.1016/j.metabol.2020.154299. 2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32569680>.
3. Terrana L, Mancuso A. Diabetes mellitus and liver disease. *AME Med J* 2018;3:93. doi: 10.21037/amj.2018.09.02 Available from: <https://amj.amegroups.org/article/view/4638/html>.
4. Saigal S, Kapoor D, Roy DS. Ademetionine in patients with liver disease: a review. *International Journal of Research in Medical Sciences*. 2019;7(6), 2482-93. Available from: <https://doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20192550>.
5. Guo T, Chang L, Xiao Y, Liu Q. S-adenosyl-L-methionine for the treatment of chronic liver disease: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2015 Mar 16;10(3): e0122124. doi: 10.1371/journal.pone.0122124. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4361566>.

6. Levytskyi VA, Zhurakivska OIa, Miskiv VA, Zaiats LM, Petriv RB, Yakymiv YuM, Hnatiuk RZ, vynakhidnyky; Levytskyi VA, Zhurakivska OIa, Miskiv VA, Zaiats LM, Petriv RB, Yakymiv YuM, Hnatiuk RZ, vlasnyky. [The method of modeling diabetes type 1 in animals of different ages]. Ukrainian patent UA 201101566. 2011 Sep 26. [in Ukrainian].

CHANGES OF THE LIVER IN EXPERIMENTAL DIABETES AND ITS CORRECTION WITH LONG-ACTING INSULIN ANALOGUE AND S-ADENOSYL L-METHIONINE (ADEMETIONINE)

Abstract. The issue of selective hepatoprotective therapy in diabetes mellitus, in particular, the morphologically confirmed effectiveness of ademetionine is poorly studied. Aim: after 56 days to establish the morphological state of the liver with the determination of the content of lipid inclusions in streptozotocin diabetes and its correction with long-acting insulin analogue and ademetionine with the peculiarities of its introduction in the experiment. Material and methods. For the experiment, 20 intact male rats were used, which were divided into the following groups (5 animals each): 1 – intact; 2B – with streptozotocin diabetes mellitus (SDM) and administration of insulin («Tresiba», Denmark) from the 14th day; 2C – SDM with insulin and ademetionine («Heptral», France). 3 – control. Pieces of the liver were fixed in formalin solution 10 %, sections were made from paraffin blocks, which were stained with hematoxylin and eosin. Determination of fatty inclusions was carried out on cryostat sections with an alkaline solution of Sudan III according to Herxheimer (in modification). Results. In subgroup 2B after 56 days of the experiment, the following alterations were observed: intensive violations on the part of the vascular wall, moderate changes in the architecture of the central zone, sometimes the endothelium of the central vein was completely destroyed, cellular infiltrates in the liver parenchyma, an increase in the number of fatty inclusions, remodelling of the portal triads and vessels. In contrast to the administration of only insulin, the additional introduction of ademetionine led to the following changes: less pronounced structural disorders of the central zone, desquamation of the vascular endothelium, discomplexation of the liver plates, a lower level of alterations of the portal triads and cellular infiltration around them. Various vascular disorders were less appreciable. The optimal four-stage scheme: a starting dose of 4 mg/kg (1 week) with a gradual transition to a maintenance dose of 8 mg (administer for 3 weeks), a maximum maintenance dose of 12 mg/kg (the next 3 weeks), then increasing the dose to 16 mg if necessary, taking into account the individual sensitivity of the animal. After 28 days of using the ademetionine, an increase in the number of fatty inclusions was observed, therefore the maintenance dose of 8 mg/kg was changed to the maximum permissible – 12 mg/kg, which led to a positive effect. After 56 days of the research, the level of lipid inclusions was within normal limits. Conclusion. Streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats, which is corrected with long-acting insulin analogue and ademetionine (with a gradual increase in the dose to 12 mg/kg) for 6 weeks, with additional administration of a hepatoprotector, a better morphological condition of the liver, its vessels, portal triads are observed. The level of lipid inclusions is noted practically corresponds to intact animals.

Key words: morphological changes of the liver, diabetes mellitus, streptozotocin-induced diabetes, use of hepatoprotectors in diabetes, ademetionine, long-acting insulin analogue, experimental research on rats.

Інформація про авторів:

Грицишин Людмила Мирославівна – аспірантка кафедри дитячої хірургії з курсом клінічної анатомії та оперативної хірургії Івано-Франківського національного медичного університету;

Попович Юрій Іларіонович – доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри фармакології Івано-Франківського національного медичного університету.

Information about the authors:

Hrytsyshyn Liudmyla M. – Postgraduate Student of the Department of Pediatric Surgery with a course in Clinical Anatomy and Operative Surgery of the Ivano-Frankivsk National Medical University;

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

Надійшла 05.09.2024 р.