

DOI: 10.21802/artm.2024.1.29.33
УДК 616-092.9+616.33+616.379-008.64

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ ПЕЧІНКИ ПРИ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУКОВАНОМУ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТИ ТА ВВЕДЕННІ ІНСУЛІНУ ТА АДЕМЕТІОНІНУ НА РАННІХ ЕТАПАХ ЕКСПЕРИМЕНТУ

Л.М. Грицишин¹, Ю.І. Попович²

Івано-Франківський національний медичний університет,

¹кафедра дитячої хірургії з курсом клінічної анатомії та оперативної хірургії,

²кафедра фармакології, м. Івано-Франківськ, Україна.

ORCID: 0000-0001-5946-3112, e-mail: lyudashenka555@gmail.com

ORCID: 0000-0002-2401-4699, e-mail: yuropovych@ifnmu.edu.ua

Резюме. Адеметіонін широко використовують при різноманітних гепатологічних порушеннях, проте його використання при діабетичних гепатопатіях є недослідженим.

Мета: встановити морфологічний стан печінки при стрептозотоцин-індукованому цукровому діабеті (СЦД) та його корекції інсуліном та адеметіоніном на ранніх етапах експерименту (через 14 та 28 діб).

Матеріали і методи. Для дослідження взято 42 інтактних щурів-самців масою 150-190 г, які розподілені на 3 групи. I – 6 інтактні. II група включає 3 підгрупи по 10 тварин, яким змодельований СЦД (вводили стрептозотоцин 6 мг на кожні 100 г маси тіла): 2А- без лікування; 2В – з 14 дня вводився інсулін (Трисіба); 2С– з 14 дня застосовували інсулін та адеметіонін (Гептрал). III група – 6 контроль.

Результати дослідження. При СЦД через 14 днів виникли зональні дистрофічні зміни печінки на фоні активізації репараційних процесів, що найбільше виражені в центральній зоні та периваскулярно. Перебудова судинного русла та триад.

Через 28 днів спостерігалися значні порушення структури центральної зони, гіперемія, стаз. Виражена десквамація ендотелію центральної вени, розширені синусоїди, перебудова триад з утворенням довгих звивистих приток та клітинною інфільтрацією.

У тварин зі СЦД та інсулінокорекцією були незначні деструктивні зміни печінки в центральній зоні, десквамація ендотелію центральної вени. Перебудова та клітинна інфільтрація портальних трактів, клітинні інфільтрати в периферичній зоні.

При введенні інсуліну та адеметіоніну загалом спостерігалось збереження структури центральної зони із незначними порушеннями стінки центральної вени, легкою десквамацією ендотелію центральної вени та незначно розширені синусоїди.

Висновки. При СЦД декомпенсованого перебігу через 14 днів експерименту виникають структурно-дистрофічні зміни центральної зони печінки з активацією регенераційних процесів. При 2-х тижневій корекції інсуліном та адеметіоніном, спостерігається кращий стан архітектоники печінки та ендотелію центральних вен, відсутні судинні порушення, збережені структури триади.

Ключові слова: печінка, щури, експериментальне дослідження, стрептозотоцин-індукований цукровий діабет, морфологія печінки, адеметіонін (Гептрал), діабетичні гепатопатії, гепатопротектори.

Вступ. Захворюваність на цукровий діабет (ЦД) щорічно невпинно зростає. За останніми даними, у світі налічується 540 млн людей, що страждають даною недугою [1]. За прогнозами, до 2050 року понад 1,31 млрд людей матимуть діабет [2]. ЦД часто призводить до різноманітних метаболічних ускладнень, зокрема й до порушень з боку гепато-біліарного тракту, зокрема до діабетичних гепатопатій. Основним проявом морфологічних порушень печінки при цукровому діабеті є неалкогольна жирова хвороба печінки (НАЖХП) (на сьогодні з'явився новий термін – стеатогепатит з метаболічною дисфункцією), що призводить до таких змін як фіброз та цироз. НАЖХП являє собою стеатоз печінки без наявних причин вторинного стеатозу, який може бути спровокований алкоголем, медикаментами, вродженими моногенними захворюваннями.

Згідно з даними нещодавніх досліджень, дане захворювання може бути значно поширене через надлишкову масу тіла, тобто пов'язане з метаболічним синдромом [3]. А також інсулінорезистентність та

гіперінсулінемія є предикторами прогресування захворювання печінки [4]. І, незважаючи на винайдення нових сучасних медичних препаратів, все частіше при ЦД 1 типу зустрічається вісцеральне ожиріння, інсулінорезистентність та метаболічний синдром [5].

Печінка має вагомий вплив на вуглеводний та ліпідний обміни та застосування гепатопротекторної терапії може мати протективний вплив на розвиток вище описаних процесів. Адеметіонін - виробляється в нормі в людському організмі та при зниженні якого виникають деструктивні зміни в печінці. Його широко використовують з метою природньої замісної терапії при різноманітних гепатологічних порушеннях. Проте його використання при діабетичних гепатопатіях є недослідженим.

Мета: встановити морфологічний стан печінки при стрептозотин-індукованому цукровому діабеті та його корекції інсуліном та адеметіоніном на ранніх етапах експерименту (через 14 та 28 діб).

Матеріали та методи. Для дослідження взято 42 інтактних статевозрілих білих щурів-самців лінії

Вістар. Маса яких становила 150-190 г. Які рандомізовано розподілені на 3 групи. Перша – 6 інтактних тварин, яким не проводилось жодних маніпуляцій. Друга група включає 3 експериментальні підгрупи по 10 тварин у кожній, яким змодельований стрептозотозин – індукований цукровий діабет: 2А- без лікування; 2В – з 14 дня вводився інсулін; 2С – з 14 дня застосовували інсулін та адеметіонін. Третя група – 6 контрольних тварин, яким вводили внутрішньоочеревинно цитратний буфер в еквівалентній дозі. Моделювали стрептозотозинний діабет за допомогою одноразового внутрішньоочеревинного введення стрептозотозину (фірми «Sigma», виробник - США), розведеному на свіжоприготовленому 0,1 М цитратному буфері (рН - 4,5). Препарат вводився зранку натще в дозі – 6 мг на кожні 100 г маси тіла тварини [6]. Для виникнення цукрового діабету саме декомпенсованого перебігу, при якому найчастіше розвиваються діабетичні гепатопатії, попередньо протягом 1 місяця тваринам призначалась дієта з підвищеним вмістом жирів. Це підвищувало сприйнятливості тварин до стрептозотозину. У експерименті взяли участь тільки щури-самці. Оскільки естрогени мають протективний вплив на де-структивні зміни бета-клітин острівців Лангерганса підшлункової залози та знижують ймовірність виникнення цукрового діабету.

Лабораторним щурам з підгрупи 2В вводили інсулін ультрапродлонгованої дії (Трисіба, фірми «Novo Nordisk», виробник - Данія). В експериментальних умовах проводився оптимальний підбір дози для кожної тварини, враховуючи рівень цукру крові та масу тіла. Препарат застосовували п/ш, щодня, в один і той же час. Щоденно змінювали місце ін'єкції для профілактики ускладнень, зокрема жирової ліподистрофії.

Тваринам підгрупи 2С, крім інсуліну, також вводили адеметіонін (Гептрал, препарат фірми «Delpharm Saint Remy», виробник - Франція), внутрішньом'язово, щодня. Оптимальна ефективна та безпечна доза була підібрана під час експерименту. Стартова доза у перші 5 днів становила – 4 мг/кг маси тіла тварини. Потім поступово збільшували дозу до підтримуючої – 8 мг/кг, через проміжну дозу 6 мг/кг [7].

Щоденно натще вранці в один і той же час забирали кров із хвостової вени та визначали рівень глюкози за допомогою глюкометра та тест-смужок виробника «Accu-Chek Active» (Німеччина).

Тварин з експерименту виводили шляхом декапітації при наркозі проведеним тіопенталом натрію. Дотримувались усіх принципів біоетики, що викладені в Декларації Хельсінкі та Законі України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 1759-VI від 15.12.2009). Експертний висновок комісії з питань етики Івано-Франківського національного медичного університету протокол №124/21 від 29.11.2021 р. Виконували забір матеріалу зранку натще, через 14, 28 доби експерименту. Шматочки печінки фіксували у 10% нейтральному формаліні. Потім промивали, проводили зневоднення та виготовляли парафінові блоки.

Робили зрізи на санному мікромомі товщиною 5-8 мкм, які забарвлювали гематоксиліном та 1% спиртовим розчином еозину.

Результати дослідження та їх обговорення.

В інтактного лабораторного щура встановлено, що орган має типову часточкову структуру. У центрі часточки розміщується центральна вена, від якої радіально відходять балки. Кожна з яких складається з двох рядів гепатоцитів, що мають полігональну форму. У центрі цитоплазми яких розташовується ядро сферичної форми, великих розмірів, що включає 1-2 ядра. Цитоплазма зерниста, багата на включення. Сполучна тканина, що розмежовує часточки печінки практично не виражена. У групі контролю при введенні в еквівалентній дозі цитратного буферу, яким розчиняли стрептозотозин, змін архітекtonіки печінки не виявлено.

Через 14 днів всіх тварин, що мали рівень глікемії менше ніж 11 ммоль/л, виключено з експерименту, через те, що в них не розвинувся ЦД. Середній рівень глікемії через 14 діб експериментального дослідження становив - 24 ммоль/л. У дев'яти тварин спостерігався дуже високий рівень глюкози в крові (вище 33,3 ммоль/л).

При стрептозотозинному діабеті через 14 днів експерименту виникли зональні дистрофічні зміни печінки на фоні активізації репараційних процесів. Структурні зміни найбільше виражені в центральній зоні (рис. 1) та незначні - периваскулярно.

Найбільше збережена периферична зона, в якій відзначається тільки незначна дисконкомплексация печінкових балок. Наявні порушення в судинній системі печінки. Перебудова судинного русла, просвіт судин розширений, спостерігається стаз крові. Звивисті розширені притоки від центральної вени та в зоні порталних трактів. Перебудова триад, співвідношення між міжчасточковими артерією та веною порушене. Наявні клітинні інфільтрати навколо міжчасточкової вени печінки (рис. 2). Зустрічається зміна форми гепатоцитів і втрата їх полігональності. Поліморфізм клітин та їх ядер. Деякі гепатоцити центральної зони з вираженим гіперхромним ядром. Збільшується кількість двоядерних клітин в зона centralis.

Через 28 днів експерименту в підгрупі 2А (щури зі стрептозотозинним діабетом без лікування) спостерігаються значні порушення структури печінки, що найбільше виражені у центральній зоні (рис. 3). Наявне посилене кровонаповнення, стаз, сладжі еритроцитів в просвіті судин. Зона просвіту центральної вени з десквамацією ендотелію. Розширення синусоїдів, особливо у центральній зоні та периваскулярно. Незначне розширення синусоїдів наявне і в периферичній зоні. Виражена дисконкомплексация печінкових балок. Перебудова триад, утворення довгих звивистих приток від них та від центральної вени. Спостерігається клітинно-еритроцитарний субстрат в просвіті судин. Клітинні інфільтрати навколо міжчасточкової артерії (рис. 4).

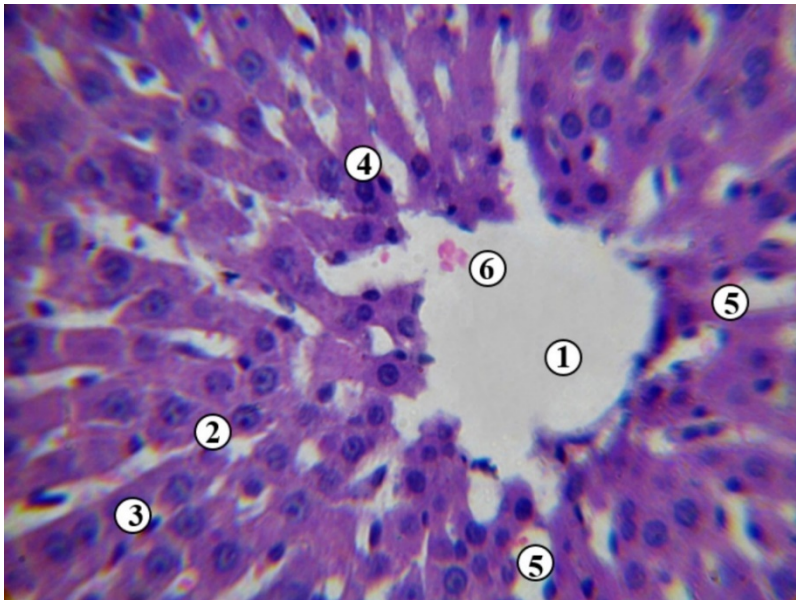


Рис.1. Деструктивні зміни центральної зони печінки щура при стрептозотоциновому діабеті через 14 днів експерименту. Забарвлення: гематоксилін, еозин. Збільшення $\times 400$. Позначення: 1 - просвіт центральної вени; 2 - гепатоцит; 3 – печінкова балка; 4 – гіперхромне ядро; 5 – синусоїд; 6 - еритроцити.

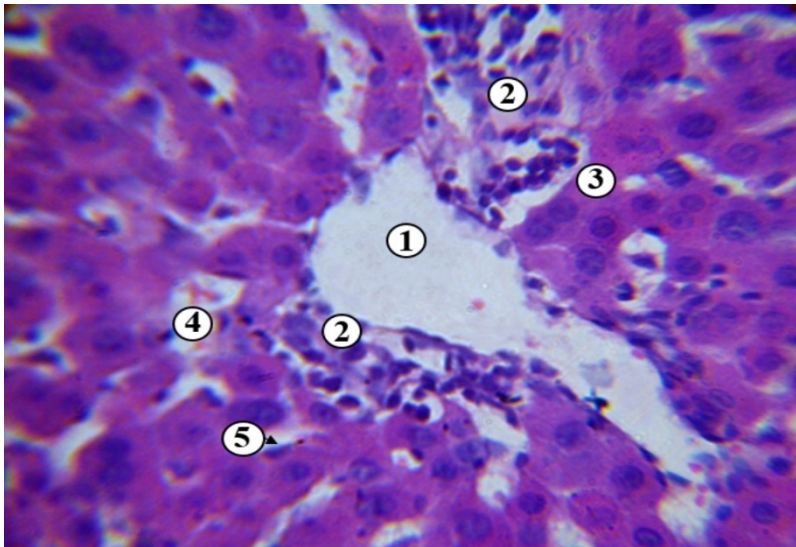


Рис. 2. Перебудова печінкової триади з лімфоцитарною інфільтрацією у щура зі стрептозотоциновим діабетом через 14 днів експерименту. Забарвлення: гематоксилін, еозин. Збільшення $\times 400$. Позначення: 1- просвіт міжчасточкової вени; 2- лейкоцитарні інфільтрати; 3 – печінкова балка; 4 – синусоїд; 5 - клітина Купфера.

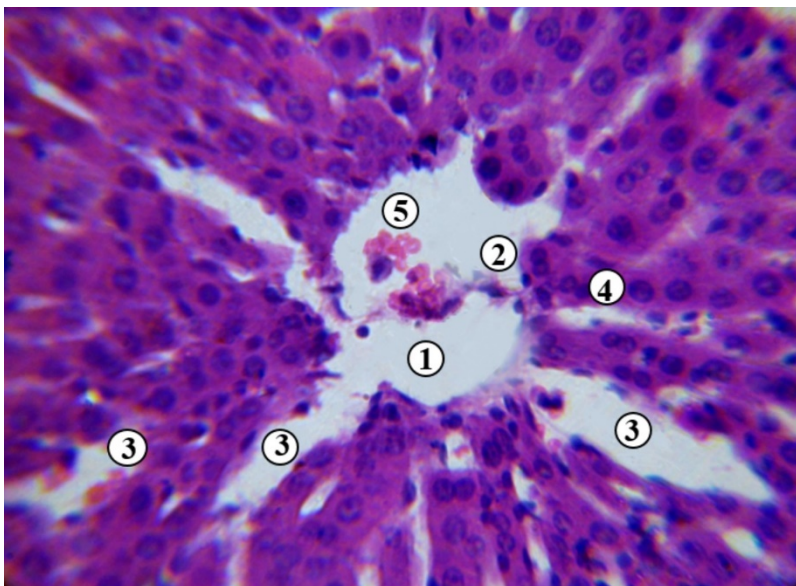


Рис. 3. Гістопрепарат печінки щура при стрептозотоциновому діабеті через 28 днів експерименту. Забарвлення: гематоксилін, еозин. Збільшення $\times 400$. Позначення: 1- просвіт центральної вени; 2 – десквамований ендотелій центральної вени; 3 – розширений синусоїд; 4 – печінкова балка; 5 – сладж еритроцитів.

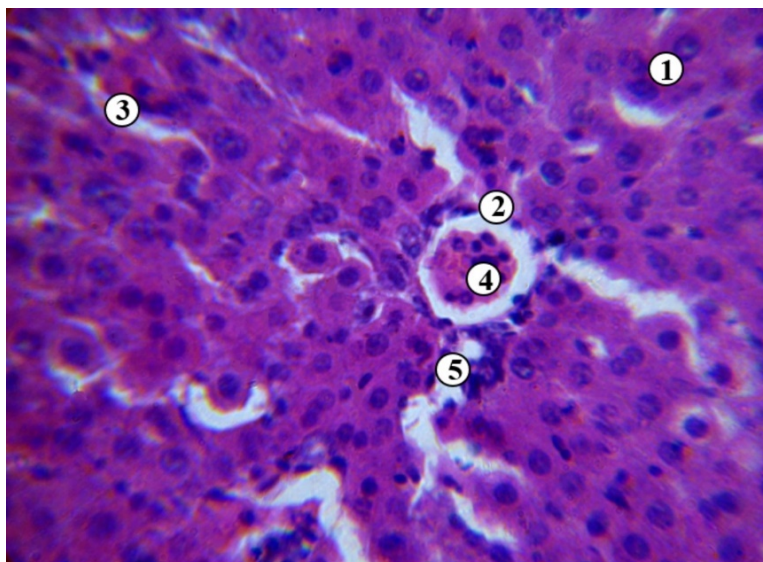


Рис.4. Гістопрепарат печінки щура при стрептозотоциновому діабеті через 28 днів експерименту. Забарвлення: гематоксилін, еозин. Збільшення $\times 400$. Позначення: 1 – гепатоцит; 2 – елементи печінкової тріади із множинними звивистими притоками; 3 – дисконкомплексована печінкова балка; 4 – клітинно-еритроцитарний субстрат в просвіті судин тріади; 5 – жовчна протока.

У підгрупі 2В (щури зі стрептозотоциновим діабетом та інсулінокорекцією) спостерігаються незначні деструктивні зміни паренхіми печінки, що найбільше виражені в центральній зоні (III). Виражена десквамація ендотелію центральної вени (рис. 5). Найбільше збережена архітектоніка печінки

периферичної зони. Найявні судинні порушення: простір венозних судин дещо розширений, гіперемія, незначний стаз. Дещо підвищене кровонаповнення у III і частково у проміжній (II) зонах. Розширення синусоїдів, що найбільше виражене в проміжній та центральній зонах (рис. 6) та навколо порталних трактів.

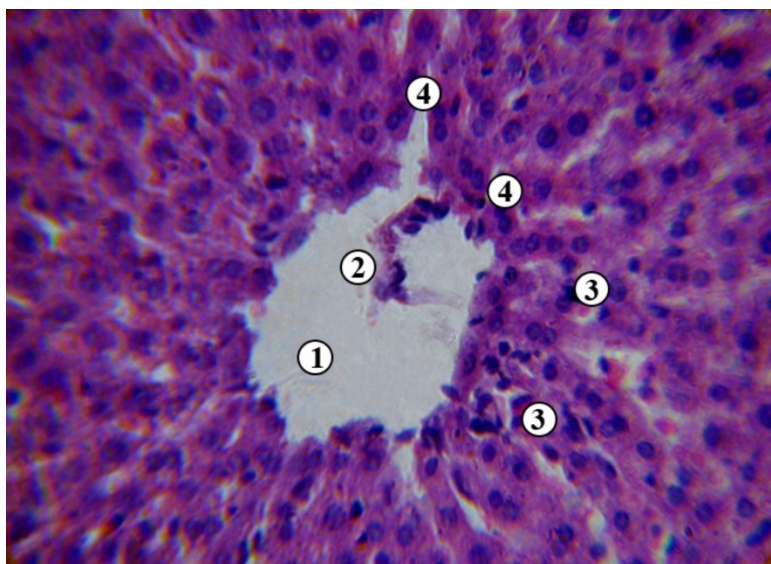


Рис 5. Десквамація ендотелію центральної вени печінки щура при стрептозотоциновому діабеті та введенні інсуліну через 28 днів експерименту. Забарвлення: гематоксилін, еозин. Збільшення $\times 400$. Позначення: 1 - просвіт центральної вени; 2 – десквамований ендотелій центральної вени; 3 – дисконкомплексована печінкова балка; 4 – двоядерний гепатоцит.

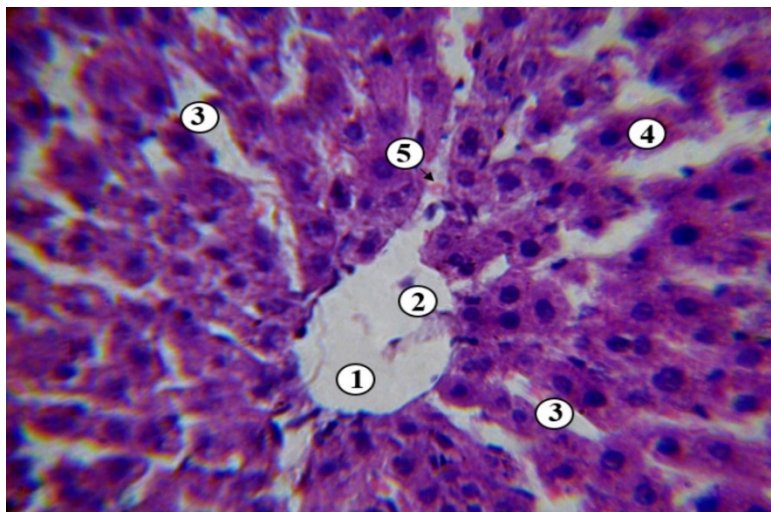


Рис. 6. Розширення синусоїдів проміжної та центральної зон печінки щура при стрептозотоциновому діабеті та введенні інсуліну через 28 днів експерименту. Забарвлення: гематоксилін, еозин. Збільшення $\times 400$. Позначення: 1 - просвіт центральної вени; 2 – десквамований ендотелій центральної вени; 3 – синусоїд; 4 – дисконкомплексована печінкова балка; 5 – еритроцит в просвіті синусоїда

Спостерігається локальне незначне розширення синусоїдів периферичної зони. Незначна перебудова та клітинна інфільтрація порталних трактів. А також є клітинні інфільтрати в паренхімі печінки периферичної зони. Найвні виражені звивисті притоки до міжчасточкових печінкових вен. Легкого ступеня дисконкомплексация печінкових пластинок, що найбільше виражена навколо центральної вени та триад.

У підгрупі 2С (щури зі стрептозототициновим діабетом та введенням інсуліну та адеметіоніну) загалом спостерігається збереження структури центральної зони із незначними порушеннями стінки центральної вени (рис.7). Відмічається незначна десквамація ендотелію центральної вени. Іноді трапляються незначні деструктивні зміни в проміжній та центральній

зонах. Архітектоніка периферичних зон повністю збережена. Кровонаповнення центральних вен помірне. Незначно розширені синусоїди в II та III зонах та невеликі локальні розширення в периферичній зоні. Структури триади в нормі. Іноді трапляється звивиста довга притока від структур триади, жовчна протока нерозширена.

У порівнянні з підгрупою 2В (введення тільки інсуліну) у підгрупі 2С краще збережена структура печінкових балок у всіх зонах печінкової часточки, архітектоніка центральних зон. Кращий стан ендотелію центральної вени, менше розширені синусоїди та відсутні порушення кровопостачання у вигляді стазу та повнокрів'я.

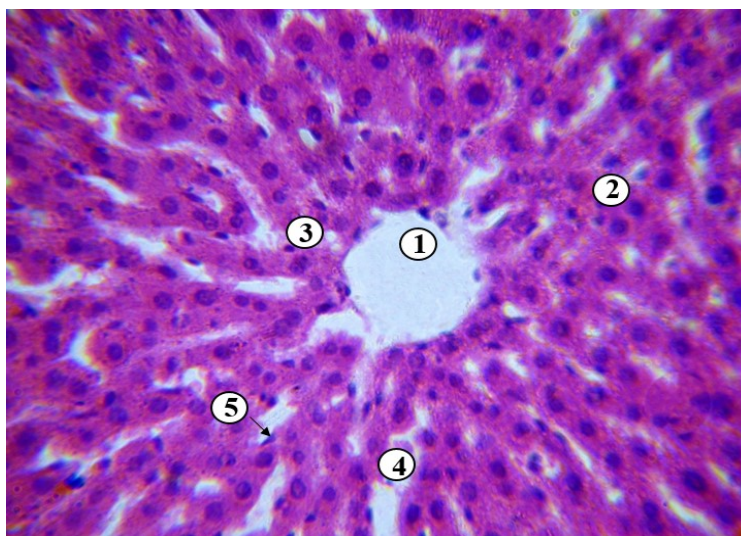


Рис 7. Гістопрепарат печінки щура при стрептозототициновому діабеті та введенні інсуліну та адеметіоніну через 28 днів експерименту. Забарвлення: гематоксилін, еозин. Збільшення $\times 400$. Позначення: 1 – просвіт центральної вени; 2 – гепатоцит; 3 – печінкова балка; 4 – синусоїд; 5 – клітина Купфера.

Висновки. При стрептозототин-індукованому цукровому діабеті декомпенсованого перебігу через 14 днів експерименту виникають структурно-дистрофічні зміни печінки з активацією репараційно-регенеративних процесів, які найбільше зосереджені в зона centralis. Через 28 днів експерименту гепатологічні порушення значно поглиблюються та характеризуються дисконкомплексация печінкових балок, розширенням синусоїдів, вираженою десквамацією ендотелію центральної вени печінкової часточки. При порівняльному аналізі 2-х тижневої корекції інсуліном (Трисібою) та в поєднанні з адеметіоніном (Гептралом), у підгрупі де вводилися обидва препарати спостерігається кращий стан архітектоніки печінки та ендотелію центральних вен, відсутні судинні порушення у вигляді стазу та повнокрів'я та збережені структури триади.

Перспективи подальших досліджень. Поглибити дані щодо морфофункціональних, ультраструктурних та морфометричних змін печінки для комплексної оцінки гепатологічних порушень при стрептозототициновому діабеті та його корекції. Такий всесторонній аналіз динаміки морфологічних та біохімічних показників печінки та вуглеводного обміну дасть можливість науково підтвердити доцільність застосування гепатопротекторів, а саме адеметіоніну (Гептралу), при діабетичних гепатопатіях.

References.

1. International Diabetes Federation (IDF) Annual Report, 2022. Available from: https://idf.org/media/uploads/2023/07/IDF_Annual_Report_2022_Final.pdf
2. GBD 2021 Diabetes Collaborators. Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *Lancet*. 2023 Jul 15;402(10397):203-234. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)01301-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01301-6)
3. Godoy-Matos AF, Silva Júnior WS, Valerio CM. NAFLD as a continuum: from obesity to metabolic syndrome and diabetes. *Diabetol Metab Syndr*. 2020 Jul 14;12:60. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13098-020-00570-y>
4. Gastaldelli A, Cusi K. From NASH to diabetes and from diabetes to NASH: Mechanisms and treatment options. *JHEP Rep*. 2019 Jul 19;1(4):312-328. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2019.07.002>
5. Tronko MD, Bolshova OV, Khovaka VV. Farmakoterapiia endokrynnykh zakhvoriuvan. Knyha 1: Tsukrovyy diabet ta yoho uskladnennia. Kyiv: Vydavnychiy dim Medknyha; 2023. 163 s. Ukrainian.
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. Ukrainian.

7. Hrytsyshyn LM, Popovych YuI. [The main aspects of ademethionine administration in the early stages of the experiment in the correction of streptozotocin-induced diabetes mellitus with the characteristics of the presence and topography of lipid inclusions in the liver]. *Morphologia*. 2023;17(3):36-9. Ukrainian. Available from: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.3.36-39>

UDC 616-092.9+616.33+616.379-008.64

MORPHOLOGICAL CHANGES OF THE LIVER IN STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES AND ADMINISTRATION OF INSULIN AND ADEMETHIONINE IN THE EARLY STAGES OF THE EXPERIMENT

L.M. Hrytsyshyn¹, Yu.I. Popovych²

Ivano-Frankivsk National Medical University,

¹ *Department of pediatric surgery with a course in clinical anatomy and operative surgery.*

² *Department of Pharmacology, Ivano-Frankivsk, Ukraine*

ORCID: 0000-0001-5946-3112,

e-mail: lyudashenka555@gmail.com

ORCID: 0000-0002-2401-4699,

e-mail: yupopovych@ifnmu.edu.ua

Abstract. Ademethionine is widely used in various hepatological disorders, but its use in diabetic hepatopathies is unstudied.

Aim: to establish the morphological state of the liver in streptozotocin-induced diabetes (SID) and its correction with insulin and ademethionine in the early stages of the experiment (after 14 and 28 days).

Materials and methods. For the study, 42 intact male rats weighing 150-190 g were taken, which were divided into 3 groups. I - 6 intact rats. The II group includes 3 subgroups of 10 animals with SID simulated (streptozotocin 6 mg per 100 g of body weight was administered): 2A- no treatment; 2B – insulin (Trisiba) was administered from the 14th day; 2C– insulin and ademethionine (Heptral) were used from the 14th day. III group - 6 control animals.

Results. In SID, after 14 days, zonal dystrophic changes of the liver appeared against the background of

activation of reparative processes, which are most pronounced in the central zone and perivascularly. Reconstruction of the vascular bed, the lumen of the vessels is expanded, blood stasis is observed. Tortuous expanded tributaries from the central vein and in the zone of the portal tracts. Rearrangement of the triads, the relationship between the interlobular artery and vein is disturbed. There are cellular infiltrates around the interlobular vein.

After 28 days, significant violations of the structure of the central zone, hyperemia, and stasis were observed. Pronounced desquamation of the endothelium of the central vein, dilated sinusoids, rearrangement of triads with the formation of long tortuous tributaries and cellular infiltration, discomplexation of the liver beams. A cellular and erythrocyte substrate is observed in the vessel lumen. Cellular infiltrates around the interlobular artery.

In animals with SID and insulin correction, there were minor destructive changes in the liver in the central zone, desquamation of the endothelium of the central vein. Reconstruction and cellular infiltration of portal tracts, cellular infiltrates in the peripheral zone. Expansion of sinusoids, which is most pronounced in the intermediate and central zones and around the portal tracts.

When insulin and ademethionine were administered, the preservation of the structure of the central zone was generally observed, with minor violations of the wall of the central vein, slight desquamation of the endothelium of the central vein, and slightly dilated sinusoids.

Conclusions. With streptozotocin diabetes of the decompensated course, after 14 days of the experiment, structural and dystrophic changes of the liver occur with the activation of reparative and regenerative processes, which are most concentrated in the zona centralis. After 28 days of the experiment, hepatological disorders significantly deepen and are characterized by discomplexation of the liver beams, expansion of the sinusoids, pronounced desquamation of the endothelium of the central vein. In a comparative analysis of 2-week correction with insulin (Trisiba) and in combination with ademethionine (Heptral), in the subgroup where both drugs were administered, a better state of the architecture of the liver and the endothelium of the central veins was observed, there were no vascular disorders in the form of stasis and full blood, and preserved structures triads.

Keywords: liver, rats, experimental study, streptozotocin-induced diabetes, liver morphology, ademethionine (Heptral), diabetic hepatopathies, hepatoprotective therapy.

Стаття надійшла в редакцію 21.02.2024 р.

Стаття прийнята до друку 26.03.2024 р.