

Л.М. Грицишин
Ю.І. Попович




Івано-Франківський
національний медичний
університет
Івано-Франківськ, Україна

Надійшла: 12.09.2023
Прийнята: 15.10.2023

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.3.36-39>

УДК: 616-092.9+616.33+616.379-008.64

ОСНОВНІ АСПЕКТИ ВВЕДЕННЯ АДЕ- МЕТІОНІНУ НА РАННІХ ЕТАПАХ ЕКСПЕРИМЕНТУ ПРИ КОРЕКЦІЇ СТРЕПТОЗОТОЦИН-ІНДУКОВАНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ З ХАРАКТЕРИ- СТИКОЮ НАЯВНОСТІ ТА ТОПОГРАФІЇ ЛІПІДНИХ ВКЛЮЧЕНЬ У ПЕЧІНЦІ

Hrytsyshyn L.M.  , Popovych Yu.I.  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.

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


ABSTRACT. Background. The basis of the morphological changes of the liver in diabetes is the accumulation of fatty inclusions with the subsequent development of non-alcoholic fatty liver disease, which leads to insulin resistance. Hepatoprotective therapy allows these negative interrelated processes to be eliminated. Ademethionine (Heprtral) is effective for such changes. **Objective:** to establish the main aspects of ademethionine administration after 14 and 28 days of the experiment with the assessment of the presence, possible dynamics and topography of fatty inclusions in the liver of rats with streptozotocin diabetes and its correction. **Methods.** 40 sexually mature male Wistar rats weighing 150-190 g were divided into 3 groups: I - 4 intact; II - includes 3 subgroups of 10 rats with simulated streptozotocin diabetes (with streptozotocin "Sigma", USA): 2A - without treatment; 2B - insulin correction from the 14th day; 2C - insulin and ademethionine were administered from the 14th day; III - 6 control. **Results.** In subgroup 2A, diffuse small vacuole lipid inclusions appear after 14 days. Topographically, they are most in zona intermedia (II) and peripherica (I). Zona centralis (III) is practically free. On the 28th day, a significant increase in the number of fat droplets is noted in subgroup 2A. There are massive small- and medium-caliber, sometimes of a showery nature in zones II and I. Zona III - small and isolated medium-caliber inclusions. There are significantly fewer inclusions in subgroup 2B; single small droplets, most in zone II. In subgroup 2C are practically no fatty inclusions. **Conclusion.** The optimal starting dose of ademethionine for the correction of decompensated diabetes is 4 mg/kg of body weight per day. It is not recommended 12 mg/kg. Maintenance - 8 mg/kg, in which the level of lipid inclusions corresponded to the norm.


Key words: liver, streptozotocin diabetes, diabetic hepatopathies, experimental research.


Citation:

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.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2023.3.36-39>

 Hrytsyshyn L.M. 0000-0001-5946-3112

 Popovych Yu.I. 0000-0002-2401-4699

 Iyudashenka555@gmail.com

© Dnipro State Medical University, «Morphologia»

Вступ

Цукровий діабет (ЦД) є одним із найпоширеніших неінфекційних захворювань, частота якого невпинно щороку зростає. До 2030 року очікується, що 643 млн людей у світі будуть страждати даною недугою [1]. Поруч з цим відзначається швидкий розвиток різноманітних метаболічних ускладнень, ранньої інвалідизації та

смертності хворих.

Досліджено, що при незадовільній компенсації обмінних порушень у хворих з ЦД першого та другого типів, як одне із його ускладнень, є формування діабетичної гепатопатії (ДГ). Це в свою чергу призводить до погіршення прогнозу ЦД. Утворюється так зване патологічне ендокринно-обмінне замкнене коло. Також відомо,

що печінка завдяки специфічним гепатокінам (фетуніну-А, бетатрофін/ангіопоетин-подібному білку 8 (ANGPTL8), фактору росту фібробластів 21) та іншими механізмами регулює гомеостаз глюкози в людському організмі [2]. В основі морфологічних змін печінки при ЦД є накопичення жирових включень з наступним розвитком неалкогольної жирової хвороби печінки (НАЖХП), яка веде до інсулінорезистентності (ІР). Ланцюг негативних взаємообумовлених процесів можна усунути застосуванням гепатопротекторної терапії [3,4].

Адеметіонін (Гептрал) – дієвий при НАЖХП, сприяє синтезу фосфатидилхоліну (забезпечує відновлення структури мембран гепатоцитів), глутатіону (має антиоксидантну та дезінтоксикаційну дію), таурину (виводить токсичні жовчні кислоти), нейромедіаторів (знижують прояви вираженої астенії при гепатопатіях). Препарат ефективний при розвитку гепатиту чи фіброзу печінки, порушенні синтезу та виділення жовчі, стимулює ендогенне вироблення адеметіоніну, що має гепаторегенераційний ефект [5].

Мета: встановити основні аспекти введення адеметіоніну через 14 та 28 діб експерименту з оцінкою наявності, можливої динаміки та топографії жирових включень у печінці щурів при стрептозотозин-індукованому цукровому діабеті (СЦД) та його корекції.

Матеріали та методи

Дизайн дослідження: 40 лабораторних інтактних статевозрілих щурів-самців лінії Wistar масою 150-190 г. Тварини рандомізовано розподілені на 3 групи. Перша - 4 інтактні тварини. Друга – включала 3 підгрупи по 10 щурів: 2А - з модельованим СЦД; 2В – з СЦД, що корегований з 14 дня інсуліном; 2С – щурам з СЦД, яким з 14 дня вводили інсулін та адеметіонін. Третя – 6 тварин контрольної групи, яким вводився в еквівалентній кількості цитратний буфер.

СЦД моделювали за допомогою стрептозотозину («Sigma», США), розведеному на 0,1 М цитратному буфері, із значенням рН - 4,5. Препарат вводився в дозі – 6 мг / 100 г маси тіла тварини, одноразово внутрішньоочередово [6]. Для кращої сприйнятливості до стрептозотозину, попередньо призначалась дієта з підвищеним вмістом жирів.

Щурам підгрупи 2В – вводили ультрапродлонгований інсулін (Трисіба – «Novo Nordisk», Данія) п/ш, щодня, в один і той же час. Доза підбиралась експериментально, індивідуально до кожної тварини, враховуючи рівень глікемії та масу тіла. У підгрупі 2С – корекцію також проводили адеметіоніном (Гептрал фірми «Delpharm Saint Remy», Франція). Оптимальна ефективна доза підбиралась у ході експерименту. Усі препарати застосовували з постійною зміною місця ін'єкції для профілактики ускладнень.

Рівень глюкози в крові вимірювали за допомогою глюкометра та тест-смужок виробника «Accu-Chek Active» (Німеччина). Кров забирали із хвостової вени, проколюючи скарифікатором кінчик хвоста щура, щоденно натще вранці в один і той же час. Забір матеріалу виконувався зранку натще, з дотриманням усіх принципів біоетики, що викладені в Декларації Хельсінкі та Законі України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 1759-VI від 15.12.2009), через 14, 28 доби експерименту. Експертний висновок комісії з питань етики ІФНМУ протокол №124/21 від 29.11.2021 р. Шматочки печінки фіксували у 10% забуференому формаліні. Виявлення жирових включень проводили лужним розчином Судану III за Герксгеймером у модифікованій методиці.

Результати та їх обговорення

Оптимальна, ефективна доза адеметіоніну була підібрана в експерименті. Даних про особливості його введення при ЦД в інструкції немає. Вказано, що початкова добова доза може варіювати від 5 до 12 мг/кг маси тіла. Вибрано початкову (стартову) дозу – 4 мг/кг, так як траплялися випадки загибелі тварин при введенні в максимальній дозі 12 мг/кг маси. Препарат був введений 16 експериментальним тваринам, 2 (12,5%) з них на наступний день загинуло. Припускаємо, що це пов'язано з тим, що печінка, як і організм тварин при цукровому діабеті, досить чутливі та неспроможні адекватно реагувати на початкове введення препарату у максимально можливій дозі. А також враховуючи високий рівень глікемії, у тварин спостерігались грубі порушення всіх видів обміну та кожен препарат в тій чи іншій мірі є гепатотоксичним. Після зниження дози у 3 рази (до 4 мг/кг) випадків загибелі щурів не було. Проведене додаткове дослідження, щодо безпечності введення гептралу в максимальній дозі щурам без ЦД. Змодельована аналогічна ситуація, це й же препарат вводився одноразово – 12 мг/кг інтактним 10 тваринам, випадків смерті не спостерігалось.

Тому впродовж першого тижня (перші 5 днів) початкова, безпечна доза при декомпенсованому перебігу ЦД складала 4 мг/кг маси тіла тварини на добу. Середній рівень глікемії натще тварин через 14 днів експерименту становив 31,2 ммоль/л, а у 2-х щурів – більше 33,3 ммоль/л. Починаючи з 6-го дня введення адеметіоніну ми переходили до застосування підтримуючої дози. Початкову дозу поступово збільшували в 2 рази до 8 мг/кг маси тіла тварини на добу, після адаптивного періоду до нового препарату (5 днів), через проміжну дозу 6 мг/кг. Вміст жирових включень при такій кількості лікарського засобу відповідав такому ж у інтактного щура. Встановлено, що в групах інтактних щурів та у контролі: жирових включень практично немає (рис. 1).

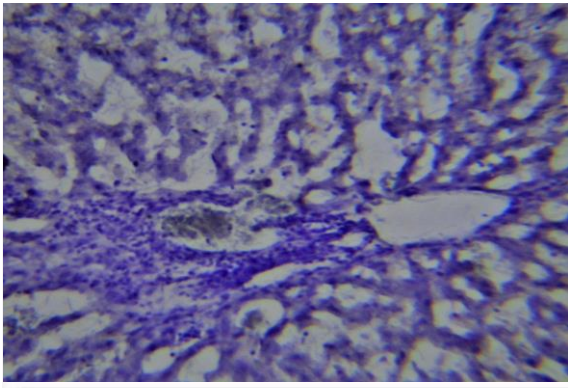


Рис. 1. Кріостатний зріз печінки інтактного щура. Забарвлення лужним розчином судану III за Герксгеймером у модифікації. $\times 300$.

Через 14 днів експерименту, усі тварини, що мали рівень глюкози нижче 11 ммоль/л, тобто у них не розвинувся ЦД, були виведені з експерименту.

У тварин групи 2А через 14 днів середній рівень глюкози становив 27,61 ммоль/л. На зрізах печінки при гістохімічному дослідженні із забарвленням лужним розчином судану III за Герксгеймером характерна поява дифузних дрібно-вакуольних ліпідних включень (рис. 2). Іноді вони пілоподібні і викривають все поле зору. Топографічно: найбільше таких включень відмічається у *zona intermedia* (II) та *zona peripherica* (I). Практично вільна від включень – *zona centralis* (III).

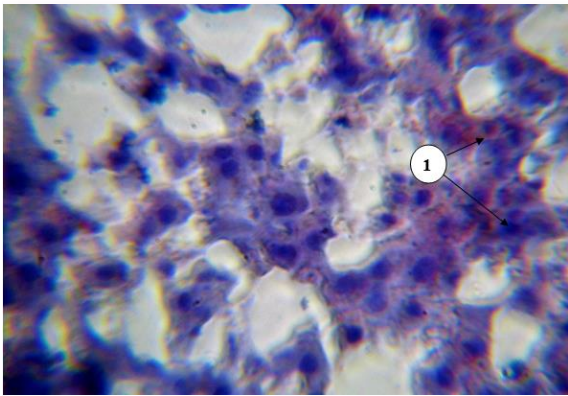


Рис. 2. Кріостатний зріз печінки щура через 14 днів стрептозотоцинового діабету. Забарвлення лужним розчином судану III за Герксгеймером у модифікації. $\times 400$. 1 – жирове включення.

Через 28 днів в щурів підгрупи 2А відзначається значне збільшення кількості жирових крапель. Наявні масові дрібно- та середньокаліберні включення, подекуди зливного характеру. Зрідка реєструються великі ліпідні включення. Топографічно: найчастіше вони розташовуються в II та I зонах. *Zona centralis* також містить дрібно- та поодинокі середньокаліберні ліпідні включення (рис. 3).

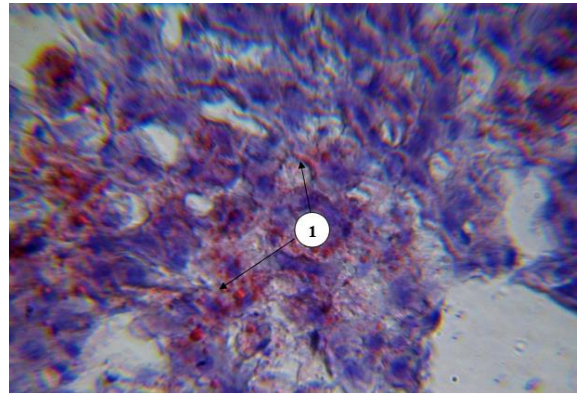


Рис. 3. Кріостатний зріз печінки щура через 28 днів стрептозотоцинового діабету. Забарвлення лужним розчином судану III за Герксгеймером у модифікації. $\times 400$. 1 – жирове включення.

Через 28 днів у тварин підгрупи 2В (СЦД з інсулінокорекцією) середній рівень глюкози становив 18 ммоль/л, проти 29,75 ммоль/л через 14 днів СЦД без інсулінокорекції. На кріостатних зрізах печінки виявлялось значно менше ліпідних включень. Фіксувалися поодинокі дрібно-крапельні включення, що найбільше розташовувались у зоні II, іноді – пілоподібні в III та I. У *zona intermedia* – зрідка спостерігалися гепатоцити, що мали правильну, округлу форму ядра, цитоплазма якого повністю була заповнена ліпідними включеннями дрібного калібру, що зливались між собою. У щурів 2С середнє значення глюкози складало 15,57 ммоль/л. До введення інсуліну та адеметіоніну – 31,2 ммоль/л. На гістологічних зрізах печінки жирових включень практично не виявлялося (рис. 4).

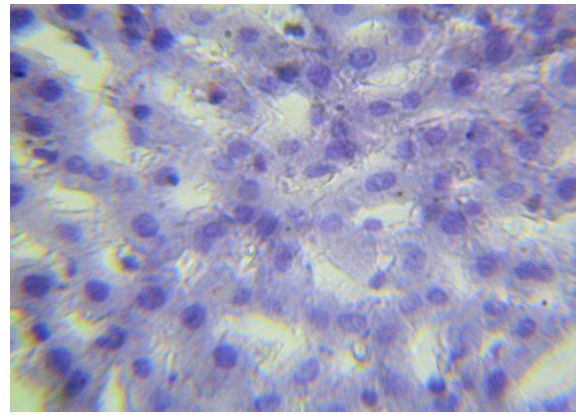


Рис. 4. Кріостатний зріз печінки щура через 28 днів стрептозотоцинового діабету після корекції інсуліном та гепатопротектором. Забарвлення лужним розчином судану III за Герксгеймером у модифікації. $\times 400$.

Висновки

1. Оптимальна початкова доза адеметіоніну, протягом перших 5 днів, при корекції декомпенсованого СЦД становить 4 мг/кг маси тіла на добу. Збільшення до підтримуючої дози – 8 мг/кг

бажано здійснювати поступово через застосування проміжної дози – 6 мг/кг, з 6-го по 14 дні. При цьому рівень накопичення ліпідних включень відповідав нормі.

2. Недоцільна початкова доза 12 мг/кг при корекції СЦД з декомпенсованим перебігом.

3. Відмічено, що при однакових схемах інсулінотерапії, на ранніх етапах корекції СЦД, у групі, де вводився адеметіонін середній рівень глікемії був децю нижчим.

Перспективи подальших розробок

Вивчення особливостей введення адеметіоніну також на пізніх етапах експерименту (через

42, 56, 70 діб) дозволить скласти повноцінну схему гепатопротекції при СЦД у лабораторних шурів.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Джерела фінансування

Робота виконана в рамках науково-дослідної теми «Вікові особливості патоморфогенезу деяких органів нейроендокринної, серцево-судинної, травної та дихальної систем при цукровому діабеті».

Літературні джерела

References

1. Abraham D, author. Updated Diabetes Eradication book. 10th Edition. UK: Independently Published; 2021. 72 p.

2. Tkachuk OV, Tkachuk SS, Povar MA, Boshtan SV, Sorokhan VD. [Pathogenesis of the morphofunctional state of the liver in type 1 diabetes mellitus]. *Klinichna ta eksperymentalna patolohiia*. 2020;19(2(72)):98-101. Ukrainian.

3. Skrypnyk NV. [Pathogenetic justification of hepatoprotective therapy in patients with diabetes]. *Mizhnarodnyi endokrynolohichnyi zhurnal*. 2014;6(62):85-90. Ukrainian.

4. Fediv OI, Marchuk YuF, Voloshyna LO. [Peculiarities of lesions of the hepatobiliary system

in patients with type II diabetes]. *Bukovynskiy medychnyi visnyk*. 2008;12(4):126-130. Ukrainian.

5. Anstee QA, Day CP. S-adenosylmethionine (SAME) therapy in liver disease: A review of current evidence and clinical utility. *Journal of Hepatology*. 2012;57(5):1097-1109.

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

Грицишин Л.М., Попович Ю.І. Основні аспекти введення адеметіоніну на ранніх етапах експерименту при корекції стрептозотоцин-індукованого цукрового діабету з характеристикою наявності та топографії ліпідних включень у печінці.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Основою морфологічних змін печінки при ЦД є накопичення жирових включень з наступним розвитком неалкогольної жирової хвороби печінки, яка веде до інсулінорезистентності. Ланцюг негативних взаємообумовлених процесів можна усунути застосуванням гепатопротекторної терапії. Адеметіонін (Гептрал) – дієвий при таких змінах. **Мета:** встановити основні аспекти введення адеметіоніну через 14 та 28 діб експерименту з оцінкою наявності, можливої динаміки та топографії жирових включень у печінці шурів при стрептозотоциновому цукровому діабеті та його корекції. **Методи.** Досліджено 40 статевозрілих шурів-самців, які поділені на 3 групи: I - 4 інтактні; II – включає 3 експериментальні підгрупи по 10 шурів, яким змодельований стрептозотоциновий діабет: 2A – без лікування; 2B – з 14 дня інсулінокорекція; 2C - з 14 дня корекція інсуліном та адеметіоніном; III – 6 контроль. Діабет змодельований стрептозотоцином («Sigma», США). **Результати.** У групі 2A через 14 діб з'являються дифузні дрібновакуольні ліпідні включення. Топографічно: їх найбільше у зона *intermedia* (II) та *peripherica* (I). Практично вільною є зона *centralis* (III). Через 28 діб в зрізах печінки підгрупи 2A відзначається значне збільшення кількості жирових крапель. Найвні масові дрібно- та середньокаліберні включення, подекуди зливного характеру в II та I зонах. Зона III містить дрібні та поодинокі середньокаліберні включення. Через 28 діб у печінці підгрупи 2B включень значно менше; поодинокі дрібнокрапельні, переважно – у зоні II. Через 28 діб в печінці шурів підгрупи 2C жирових включень практично немає. **Підсумок.** Оптимальна стартова доза адеметіоніну при корекції декомпенсованого діабету складає 4 мг/кг маси тіла на добу, не рекомендована – 12 мг/кг. Підтримуюча – 8 мг/кг, при яких рівень ліпідних включень у печінці відповідав нормі.

Ключові слова: печінка, стрептозотоциновий діабет, діабетична гепатопатія, експериментальне дослідження.