

Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitāte
Veterinārmedicīnas fakultāte
Preklīniskais institūts



Jevgēnija Kondratjeva

promocijas darbs

**KORTIKOSTEROĪDU IZRAISĪTĀS MORFOFUNKCIONĀLĀS
IZMAIŅAS AKNĀS UN TO REVERSIJAS IESPĒJAS SUŅIEM**

***CORTICOSTEROID-INDUCED MORPHOFUNCTIONAL CHANGES IN
LIVER AND THEIR REVERSAL POTENTIAL IN DOGS***

zinātnes doktora grāda (*Ph.D.*) iegūšanai

Lauksaimniecības, meža un veterinārās zinātnes nozarē

Promocijas darba zinātniskās vadītājas

Dr.med.vet., profesore **Aija Ilgaža**

Dr.habil.biol., profesore **Edīte Birģele**

Promocijas darba autore

JELGAVA
2026

ANOTĀCIJA

Jevgēnijas Kondratjevas promocijas darbs “Kortikosteroīdu izraisītās morfofunkcionālās izmaiņas aknās un to reversijas iespējas suņiem” veikts laika periodā no 2012. gada līdz 2025. gadam Latvijas Biozinātņu un Tehnoloģiju universitātes Veterinārmedicīnas fakultātē (iepriekš – Latvijas Lauksaimniecības universitāte), Veterinārmedicīnas fakultātes Preklīniskajā institūtā.

Darba mērķis ir izvērtēt ilgstošas darbības kortikosteroīda metilprednizolona acetāta izraisītās funkcionālās, morfoloģiskās un ultrastrukturālās izmaiņas suņu aknās, kā arī noteikt hepatoprotektīvās terapijas ietekmi uz šo izmaiņu smagumu, dinamiku un reversijas iespējām.

Darba uzdevumi:

1. izpētīt aknu funkcionālā un/vai morfoloģiskā stāvokļa izmaiņas klīniski veseliem suņiem un suņiem ar patoloģijām pēc metilprednizolona acetāta lietošanas;
2. noskaidrot, vai hepatoprotektīvā terapija spēj mazināt aknu funkcionālā stāvokļa izmaiņas metilprednizolona acetāta lietošanas laikā;
3. izvērtēt antioksidanta mitokvinola mezilāta ietekmi uz aknu audu patoloģisko izmaiņu reversijas procesu suņiem metilprednizolona acetāta lietošanas fonā;
4. izpētīt metilprednizolona acetāta un mitokvinola mezilāta ietekmi uz hepatocītu ultrastruktūru, īpašu uzmanību pievēršot kodolu un mitohondriju morfoloģijai.

Promocijas darbs sastāv no ievada, literatūras apskata, materiāla un metodoloģijas apraksta, rezultātiem, diskusijas, secinājumiem, ieteikumiem praksei un izmantotās literatūras saraksta.

Pētījumā apvienota klīniskā un eksperimentālā daļa. Klīniskajā pētījumā tika analizētas asins seruma aknu enzīmu (ALAT, GGT, AP un kortikosteroīdu inducētās AP frakcijas) aktivitātes izmaiņas suņiem ar patoloģijām pēc metilprednizolona acetāta ievadīšanas, kā arī izvērtēta hepatoprotektīvās terapijas ietekme. Eksperimentālajā daļā klīniski veseliem suņiem pēc metilprednizolona acetāta ievadīšanas papildus asins serums aknu enzīmiem, tika veikta arī aknu biopātņu histoloģiskā un imūnhistoķīmiskā analīze, izvērtējot hepatocītu morfoloģiju, glikogēna akumulāciju (PAS reakcija), stellāta šūnu aktivācijas pazīmes (α -SMA), kā arī hepatocītu ultrastrukturālas izmaiņas ar fluorescences metodēm (kodolu un mitohondriju morfoloģija) pēc metilprednizolona acetāta ievadīšanas un izvērtēta hepatoprotektīvās terapijas ietekme.

Rezultāti parādīja, ka metilprednizolona acetāts izraisa izteiktas morfofunkcionālas aknu izmaiņas, kas izpaužas ar nozīmīgu aknu enzīmu aktivitātes paaugstināšanos, hepatocītu vakuolizāciju un glikogēna akumulāciju, kā arī stellāta šūnu aktivācijas pazīmēm. Hepatoprotektīvā terapija bija saistīta ar mērenu funkcionālo rādītāju stabilizāciju un atsevišķu morfoloģisko parametru labvēlīgāku dinamiku, tomēr pilnīga steroīdu izraisīto pārmaiņu novēršana netika panākta.

Darba noslēgumā formulēti pieci secinājumi un sniegti pieci ieteikumi praksei.

Promocijas darbs izklāstīts 93 lappusēs, ietver 29 attēlus un 23 tabulas, izmantoti 244 literatūras avoti.

SATURA RĀDĪTĀJS

ATTĒLU SARAKSTS.....	5
TABULU SARAKSTS	7
PROMOCIJAS DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI	8
IEVADS	10
1. LITERATŪRAS APSKATS	14
1.1. Aknu vispārējais raksturojums	14
1.1.1. Aknu uzbūve.....	14
1.1.2. Asinsrite aknās.....	15
1.1.3. Žults cirkulācija aknās	17
1.2. Kortikosteroīdu grupas vispārējais apskats. Steroīdās hepatopātijas diagnostika.....	18
1.2.1. Kortikosteroīdi – vēsture un mūsdienās pielietojamie medikamenti.....	18
1.2.2. Kortikosteroīdu farmakokinētika un farmakodinamika	19
1.2.3. Mitohondriju funkcijas un oksidatīvā stresa ietekme uz aknu šūnām	21
1.2.4. Kortikosteroīdu izraisītās izmaiņas asins bioķīmiskajos rādītājos	22
1.2.5. Kortikosteroīdu ietekme uz aknu morfofunkcionālo stāvokli suņiem.....	23
1.2.6. Aknu histopatoloģiskā izmeklēšana	23
1.2.7. Citas metodes hepatopātijas apstiprināšanai.....	25
1.3. Hepatoprotektanti	26
1.3.1. Augu valsts izcelsmes produkti ar hepatoprotektīvām īpašībām.....	27
1.3.2. Vitamīnu nozīme aknu funkciju uzturēšanā un atjaunošanā	28
1.3.3. Aminoskābes aknu funkciju atbalstam	29
1.3.4. Antioksidanti aknu šūnu aizsardzībā	30
1.4. Literatūras apskata kopsavilkums	32
2. MATERIĀLS UN METODES	35
2.1. Pētījuma laiks, vieta un materiāla raksturojums.....	35
2.2. Pētījuma kopējā shēma.....	35
2.3. Pētījumā izmantotās metodes	38
2.3.1. Dzīvnieku klīniskā izmeklēšana un veselības stāvokļa novērtēšana	38
2.3.2. Asins paraugu iegūšana	38
2.3.3. Aknu audu paraugu iegūšana.....	38
2.3.4. Asins paraugu bioķīmiskā izmeklēšana.....	39
2.3.5. Aknu audu materiāla sagatavošana un krāsošana.....	40
2.3.6. Paraugu mikroskopiskā analīze	42
2.3.7. Datu statistiskā analīze	44
3. PĒTĪJUMA REZULTĀTI.....	46

3.1. Klīniskās izmeklēšanas rezultāti	46
3.2. Aknu funkcionālā un morfoloģiskā stāvokļa izmaiņas suņiem pēc MPA ievadīšanas	46
3.2.1. Aknu funkcionālā stāvokļa izmaiņas KP suņiem pēc MPA ievadīšanas.....	46
3.2.2. Aknu funkcionālā stāvokļa izmaiņas EP suņiem pēc MPA ievadīšanas	47
3.2.3. Aknu funkcionālā stāvokļa salīdzinājums KP un EP suņiem pēc MPA ievadīšanas	49
3.2.4. Aknu morfoloģiskās izmaiņas EP suņiem pēc MPA ievadīšanas	50
3.3. Hepatoprotektīvās terapijas ietekme uz aknu morfofunkcionālo stāvokli suņiem pēc MPA ievadīšanas	53
3.3.1. Hepatoprotektīvās terapijas ietekme uz aknu funkcionālo stāvokli KP suņiem pēc MPA ievadīšanas	53
3.3.2. Hepatoprotektīvās terapijas ietekme uz aknu funkcionālo stāvokli EP suņiem pēc MPA ievadīšanas	57
3.3.3. Antioksidanta mitokvinola mezilāta ietekme uz aknu audu morfoloģisko stāvokli EP suņiem pēc MPA ievadīšanas.....	70
3.4. Metilprednizolona acetāta un mitokvinola mezilāta ietekme uz hepatocītu ultrastruktūru morfoloģiju EP suņiem	74
3.4.1. Metilprednizolona acetāta un mitokvinola mezilāta ietekme uz hepatocītu kodolu morfoloģiju EP suņiem	74
3.4.2. Metilprednizolona acetāta un mitokvinola mezilāta ietekme uz hepatocītu mitohondriju morfoloģiju EP suņiem	76
3.5. Pētījuma rezultātu kopsavilkums	78
DISKUSIJA	80
SECINĀJUMI	92
PRIEKŠLIKUMI	93
LITERATŪRAS SARAKSTS	94
PIELIKUMI	107

ATTĒLU SARAKSTS

Attēlu numuri	Attēlu virsraksti	Lpp.
1.1.	Normālu aknu stellāta šūnu morfoloģija (Friedman, 2008)	15
1.2.	Shematisks aknu daiviņas daļas attēlojums palielinājumā (Reece et al., 2015)	16
1.3.	Biežāk sastopamie klīniskie terapeitiskie kortikosteroīdu efekti šūnās, audos un orgānos (Buttgerei et al., 2005)	20
1.4.	Aknu histoloģiskā uzbūve H&E x100 (Chan et al., 2014)	24
1.5.	Šūnu aktivizēšanās mehānisma sakarība starp hepatocītu apoptozi un aknu fibrinoģenēzi (Guicciardi un Gores, 2010)	25
2.1.	Krusteniskā pētījuma dizaina shematisks attēlojums	37
2.2.	EP norises laikā veikto manipulāciju shematisks attēlojums	37
2.3.	Biopsijas adatas ievadīšana ultrasonogrāfijas kontrolē	39
3.1.	Reprezentatīvi attēli ar normālu aknu histoloģiju (a) un steroīdu hepatopātiju suņiem pēc metilprednizolona ievadīšanas: (b) vieglas, (c) vidēji smagas un (d) smagas pārmaiņas	51
3.2.	Reprezentatīvi attēli ar negatīvu (a) un pozitīvu glikogēnaakumulāciju suņiem pēc metilprednizolona ievadīšanas: (b) vieglas, (c) vidēji smagas un (d) smagas pārmaiņas	52
3.3.	Alanīnaminotransferāzes koncentrācijas izmaiņas asinīs KP suņiem	54
3.4.	Gammaglutamiltransferāzes koncentrācijas izmaiņas asinīs KP suņiem	55
3.5.	Sārmains fosfatāzes koncentrācijas izmaiņas asinīs KP suņiem	57
3.6.	Kortikosteroīdu inducētās sārmains fosfatāzes koncentrācijas izmaiņas asinīs KP suņiem	56
3.7.	Alanīnaminotransferāzes koncentrācijas izmaiņas asinīs EP suņiem pirmajā periodā	58
3.8.	Gammaglutamiltransferāzes koncentrācijas izmaiņas asinīs EP suņiem pirmajā periodā	59
3.9.	Sārmains fosfatāzes koncentrācijas izmaiņas asinīs EP suņiem pirmajā periodā	60
3.10.	Kortikosteroīdu inducētās sārmains fosfatāzes koncentrācijas izmaiņas asinīs EP suņiem pirmajā periodā	60
3.11.	Alanīnaminotransferāzes koncentrācijas izmaiņas asinīs EP suņiem otrajā aktīvajā periodā	62
3.12.	Gammaglutamiltransferāzes koncentrācijas izmaiņas asinīs otrajā periodā	63
3.13.	Sārmains fosfatāzes koncentrācijas izmaiņas otrajā periodā	64
3.14.	Kortikosteroīdu inducētās sārmains fosfatāzes koncentrācijas izmaiņas asinīs EP suņiem otrajā periodā	65
3.15.	Alanīnaminotransferāzes koncentrācijas izmaiņas asinīs EP suņiem pēc krusteniskā pētījuma dizaina analīzes	67
3.16.	Gammaglutamiltransferāzes koncentrācijas izmaiņas asinīs EP suņiem pēc krusteniskā pētījuma dizaina analīzes	68
3.17.	Sārmains fosfatāzes koncentrācijas izmaiņas asinīs EP suņiem pēc krusteniskā pētījuma dizaina analīzes	68
3.18.	Kortikosteroīdu inducēta sārmains fosfatāze koncentrācijas izmaiņas asinīs EP suņiem krusteniskā pētījuma dizaina analīzes	69

Attēlu numuri	Attēlu virsraksti	Lpp.
3.19.	α -SMA imūnhistoķīmiskā reakcija: negatīvā kontrole (A) un pozitīvi krāsotas stellāta šūnas (B)	73
3.20.	Hepatocītu kodolu DAPI krāsojums suņiem: A – hepatocītu kodoli ar saglabātu regulāru formu un vienmērīgāku fluorescences sadalījumu; B – hepatocītu kodoli ar izteiktāku signāla heterogenitāti un neregulārām kodolu kontūrām, (405 nm kanāls, 400x)	75
3.21.	Aknu audu imunofluorescences krāsojums: A – negatīvā kontrole TOMM20 marķējumam; specifisks zaļš fluorescences signāls nav novērojams; B – hepatocītu mitohondriji – zaļie fluorescējošie objekti citoplazmā (Alexa Fluor 488), kodoli – zilā krāsā (DAPI)	76

TABULU SARAKSTS

Tabulu numuri	Tabulu virsraksti	Lpp.
2.1.	Kvantitatīvā vērtēšanas sistēma steroīdās hepatopātijas pakāpes noteikšanai aknās suņiem H&E krāsojumā	43
3.1.	Aknu enzīmu aktivitātes dinamika KP suņiem pēc MPA ievadīšanas	46
3.2.	Aknu enzīmu aktivitātes palielinājums (reizes) salīdzinājumā ar sākuma vērtībām KP suņiem pēc MPA ievadīšanas	47
3.3.	Aknu enzīmu aktivitātes dinamika EP suņiem pēc MPA ievadīšanas	48
3.4.	Aknu enzīmu aktivitātes palielinājums (reizes) salīdzinājumā ar sākuma vērtībām EP suņiem pēc MPA ievadīšanas	49
3.5.	Aknu enzīmu aktivitātes salīdzinājums (reizes) KP un EP suņiem pēc MPA ievadīšanas	49
3.6.	Aknu histoloģisko izmaiņu kvantitatīvs raksturojums EP placebo grupu (P) suņiem pēc MPA ievadīšanas dažādos pētījuma laika punktos	50
3.7.	Glikogēna akumulācijas un stellāta šūnu izmaiņu dinamika EP placebo grupu (P) suņiem pēc MPA ievadīšanas dažādos pētījuma laika punktos	52
3.8.	Aknu enzīmu aktivitātes palielinājums (reizes) salīdzinājumā ar sākuma vērtībām KP suņiem pēc MPA ievadīšanas, lietojot hepatoprotektantu	57
3.9.	Aknu enzīmu aktivitātes palielinājums (reizes) salīdzinājumā ar sākuma vērtībām EP MQ1 grupai	61
3.10.	Aknu enzīmu aktivitātes palielinājums (reizes) salīdzinājumā ar sākuma vērtībām EP P1 grupai	61
3.11.	Aknu enzīmu aktivitātes palielinājums (reizes) salīdzinājumā ar sākuma vērtībām EP MQ2 grupai	65
3.12.	Aknu enzīmu aktivitātes palielinājums (reizes) salīdzinājumā ar sākuma vērtībām EP P2 grupai	66
3.13.	Aknu enzīmu aktivitātes palielinājums (reizes) salīdzinājumā ar sākuma vērtībām EP MQK grupai	70
3.14.	Aknu enzīmu aktivitātes palielinājums (reizes) salīdzinājumā ar sākuma vērtībām EP PK grupai	70
3.15.	Histoloģiskās pārmaiņas dzīvniekiem MQ1 un P1 grupās	71
3.16.	Histoloģiskās pārmaiņas dzīvniekiem MQ2 un P2 grupās	72
3.17.	Glikogēna uzkrāšanās hepatocītos EP suņiem	73
3.18.	Stellāta šūnu skaita dinamika EP suņiem aknu parenhīmā	74
3.19.	Hepatocītu kodolu morfoloģisko parametru dinamika EP suņiem 1. periodā pēc MPA ievadīšanas ar un bez mitokvinola lietošanas	74
3.20.	Hepatocītu kodolu morfoloģisko parametru dinamika EP suņiem 2. periodā pēc MPA ievadīšanas ar un bez mitokvinola lietošanas	75
3.21.	Hepatocītu mitohondriju morfoloģisko parametru dinamika EP suņiem 1. periodā pēc MPA ievadīšanas ar un bez mitokvinola lietošanas	77
3.22.	Hepatocītu mitohondriju morfoloģisko parametru dinamika EP suņiem 2. periodā pēc MPA ievadīšanas ar un bez mitokvinola lietošanas	77

PROMOCIJAS DARBĀ LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

Saīsinājums	Angliski	Latviski
α -SMA	Alpha smooth muscle actin	Gludās muskulatūras alfa aktīns
AKTH	Adrenocorticotrophic hormone	Adenokortikotropais hormons
ALAT	Alanine transaminase	Alanīnaminotransferāze
AP	Alkaline phosphatase	Sārmainā fosfatāze
ASV	United States of America	Amerikas Savienotās Valstis
ATF	Adenosine triphosphate	Adenozīntrifosforskābe
BSEP	Bile salt export pump	Žults sāļu eksporta sūknis
CEUS	Contrast-enhanced ultrasound	Kontrasta pastiprināta ultraskaņa
CNS	Central nervous system	Centrālā nervu sistēma
COG ₂	Cyclooxygenase two	Ciklooksigenāze divi
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-diamidino-2-fenilindols
DNS	Deoxyribonucleic acid	Dezoksiribonukleīnskābe
ES	European Union	Eiropas Savienība
FXR	Farnesoid X Receptor	Farnesoīda X receptors
GAE	Glucocorticoid response element	Kortikosteroīdu atbildes elements
GGT	Gamma-glutamyl transferase	Gamma glutamiltransferāze
H&E	Hematoxylin and eosin	Hematoksilīns un eozīns
HGF	Hepatocyte growth factor	Hepatocītu augšanas faktors
HIF	Hypoxia-inducible factor	Hipoksijas inducējamais faktors
HPA	Hypothalamic-pituitary-adrenal axis	Hipotalāma-hipofīzes-virsnieru sistēma
HRP	Horseradish Peroxidase	Mārrutku peroksidāze
ICADA	International Committee on Allergic Diseases of Animals	Starptautiskā dzīvnieku alerģisko slimību komiteja
IgG	Immunoglobulin G	Imūnglobulīns G
IHK	Immunohistochemistry	Imūnhistokīmija
IL-1 β	Interleukin one beta	Interleikīns viens beta
IL-2	Interleukin two	Interleikīns divi
IL-4	Interleukin four	Interleikīns četri
IL-6	Interleukin six	Interleikīns seši
kAP	Thermostable alkaline phosphatase	Termostabilā sārmainā fosfatāze
LLU	Latvian University of Agriculture	Latvijas Lauksaimniecības universitāte
MAFLD	Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease	Ar vielmaiņas traucējumiem saistīta taukainā aknu slimība
METAVIR	Meta-analysis of Histological Data in Viral Hepatitis	Vīrushepatīta histoloģisko datu metaanalīze
MitoQ	Mitoquinole	Mitokvinols
MMP	Matrix metalloproteinases	Matricas metaloproteināze
MPA	Medroxyprogesterone acetate	Medroksiprogesterona acetāts
MQ	Group of dogs treated with mitoquinol mesylate	Suņu grupa, kurai lietoja mitokvinola mezilātu
MQ1	Group of dogs treated with mitoquinol mesylate in period 1	Suņu grupa, kurai lietoja mitokvinola mezilātu 1.periodā
MQ2	Group of dogs treated with mitoquinol mesylate in period 2	Suņu grupa, kurai lietoja mitokvinola mezilātu 2. periodā

Saīsinājums	Angliski	Latviski
MQK	Group of dogs treated with mitoquinol mesylate after a crossover design	Suņu grupa, kurai lietoja mitokvinola mezilātu pēc krusteniskā pētījuma dizaina
MR	Magnetic Resonance Imaging	Magnētiskā rezonanse
NAFLD	Nonalcoholic fatty liver disease	Bezalkoholiskā taukaino aknu slimība
NAS	NAFLD Activity Score	Bezalkoholiskā taukaino aknu slimības skala
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B	Nukleārais 9actors kappa B
NTCP	Sodium taurocholate cotransporting polypeptide	Nātrija tauroholāta ko-transportējošais polipeptīds
P	Group of dogs treated with placebo	Suņu grupa, kurai lietoja placebo
P1	Group of dogs treated with placebo in period 1	Suņu grupa, kurai lietoja placebo 1.periodā
P2	Group of dogs treated with placebo in period 2	Suņu grupa, kurai lietoja placebo 2.periodā
PAS	Periodic acid-Schiff	Periodskābes Šifs
PBS	Phosphate-buffered saline	Fosfātu buferšķīdums
PBST	Phosphate Buffered Saline with Tween-20	Fosfātu buferēts fizioloģiskais šķīdums ar Tween-20
PDGF	Platelet-derived growth factor	Trombocītu augšanas faktors
PK	Group of dogs treated with placebo after a crossover design	Suņu grupa, kurai lietoja placebo pēc krusteniskā pētījuma dizaina
PVD	Food and Veterinary Service	Pārtikas un veterinārais dienests
RNS	Ribonucleic acid	Ribonukleīnskābe
ROI	Region of Interest	Interesējošais reģions
ROS	Reactive oxygen species	Reaktīvais skābekļa savienojums
SAF	Steatosis-Associated Fibrosis Estimator	Steatozes aktivitātes fibrozes skala
SAM	S-Adenosyl methionine	S-adenozilmetionīns
SEM	Standard Error of the Mean	Vidējā standarta kļūda
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances	Tiobarbitūrskābes reaģējošas vielas
TBS	Tris-Buffered Saline	Tris buferšķīdums
TGF-β	Transforming growth factor beta	Transformējošais augšanas faktors beta
TGR5	Takeda G protein-coupled receptor 5	G-proteīnam piesaistītais receptors 5
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases	Metaloproteināzes audu inhibitori
TNFα	Tumor necrosis factor alpha	Audzēja nekrozes faktors alfa
TOMM20	Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 20	Ārējās mitohondriju membrānas translokāze 20
U L ⁻¹	Units per Liter	Vienības litrā
VEGF	Vascular endothelial growth factor	Asinsvadu endotēlija augšanas faktors
VMF	Faculty of Veterinary Medicine	Veterinārmedicīnas fakultāte
WSAVA	World Small Animal Veterinary Association	Pasaules mazo dzīvnieku veterinārā asociācija

IEVADS

Veterinārmedicīnā kortikosteroīdi tiek plaši izmantoti, jo tie nodrošina spēcīgu pretiekaisuma un imūnsupresīvu iedarbību, kas ir būtiska dažādu iekaisuma, autoimūnu un alerģisku slimību ārstēšanā. Tie tiek lietoti arī šoka terapijā, dermatoloģisko slimību, bronhu spazmu un citu sistēmisku patoloģiju gadījumos. Neraugoties uz to terapeitisko efektivitāti, kortikosteroīdu lietošana ir saistīta ar virkni potenciālu komplikāciju, tostarp pankreatītu, cukura diabētu, hipertensiju, kataraktu veidošanos un jatrogēnu Kušinga sindromu. Tomēr, neskatoties uz šīm blaknēm, kortikosteroīdi joprojām ir vieni no visbiežāk lietotajiem farmakoloģiskajiem līdzekļiem veterinārmedicīnā (Elkholly et al., 2020).

Kortikosteroīdi iedarbojas uz vairākām organisma sistēmām, tostarp endokrīno un hepatobiliāro. To ilgstoša lietošana izraisa izteiktas metabolisma izmaiņas, tai skaitā glikoneoģenēzes stimulāciju, pastiprinātu glikogēna uzkrāšanos hepatocītos un traucējumus mitozīdītājiem, ir novērojama izteikta jutība pret kortikosteroīdu iedarbību aknu līmenī, kas var izraisīt kortikosteroīdo hepatopātiju. Šai patoloģijai raksturīga hepatocītu vakuolizācija, kodolu perifēra dislokācija un izteikta glikogēna uzkrāšanās, visbiežāk centrilobulārajās zonās. (Feldman & Nelson, 2004; Assawarachan et al., 2020; Karić et al., 2024).

Aknu enzīmu aktivitātes, īpaši sārmainās fosfatāzes (AP) un gamma glutamiltransferāzes (GGT), paaugstināšanās ir viens no agrākajiem kortikosteroīdu ietekmes marķieriem. Kortikosteroīdu inducētā AP (kAP) ir suņiem unikāls izoenzīms, kura klātbūtne atspoguļo hepatocītu inducētu enzīmu sintēzi, nevis tiešu hepatocītu bojājumu (Teske, 1999). Tomēr vairāki pētījumi liecina, ka histoloģiskās izmaiņas aknās ne vienmēr korelē ar bioķīmiskajiem parametriem, kas sarežģī diagnostiku un prasa morfofunkcionālu pieeju (Oikonomidis & Milne, 2023; Tintle et al., 2023; Jablonski et al., 2024).

Šie procesi tiek uzskatīti par atgriezeniskiem, tomēr reversijas ilgums un šūnu strukturālās atjaunošanās dinamika līdz šim ir maz dokumentēta (Jablonski et al., 2024). Kusaba et al. (2024) savā darbā uzsvēra, ka ar vecumu un vielmaiņas izmaiņām mainās arī kortikosteroīdu inducēto enzīmu aktivitāte, kas var ietekmēt aknu atjaunošanās potenciālu.

Aknas ir viens no funkcionāli nozīmīgākajiem vielmaiņas orgāniem, kas intensīvi iesaistās dažādu vielu, tostarp medikamentu, detoksikācijā un izvadīšanā. Šie procesi var izmainīt aknu šūnu darbību un veicināt bojājumu attīstību, kas saistīti ar oksidatīvo stresu, mitohondriju funkcijas traucējumiem un imūnajām reakcijām (Li et al., 2015; Wang, 2024; Borgne-Sanchez & Fromenty, 2025). Mitohondriji nodrošina aknu šūnām nepieciešamo adenoizīna trifosfātu (ATF) oksidatīvās fosforilēšanas ceļā. To struktūras vai funkcijas traucējumi, piemēram, samazināta respiratorās ķēdes darbības efektivitāte, reaktīvo skābekļa savienojumu (ROS) pieaugums vai membrānas destabilizācija, var veicināt vielmaiņas disbalansu un iekaisuma ceļu aktivāciju (Murphy, 2016; Spinelli & Haigis, 2018; Zhang et al., 2021). Oksidatīvā stresa nozīme aknu bojājumā un reversijas procesā tiek uzskatīta par centrālu, tam veltīti vairāki jaunākie pārskata darbi (Blanca et al., 2024; Perez-Montero et al., 2024). Šie pētījumi apstiprina nepieciešamību turpināt eksperimentālos darbus, lai padziļināti izprastu aknu pārmaiņu patoģenēzi, to ilgtermiņa sekas un iespējamās reversijas mehānismus, lietojot hepatoprotektīvus līdzekļus. Ir pierādīts, ka dažiem savienojumiem, piemēram, S-adenozilmetionīnam, fosforu saturošiem kompleksiem un vitamīnu preparātiem, ir spēja stabilizēt hepatocītu membrānas (Center et al., 2005; Deniz et al., 2009). Tomēr literatūrā joprojām ir ierobežota informācija par šo līdzekļu efektivitāti kortikosteroīdu izraisīto aknu izmaiņu gadījumos, īpaši suņiem.

Uzsākot pētījumu, izvirzījām sekojošas **aizstāvamās tēzes**:

1. ilgstošas darbības kortikosteroīda metilprednizolona acetāta vienreizēja lietošana devā 2 mg kg⁻¹ suņiem vienmēr izraisa gan funkcionālās, gan morfoloģiskās izmaiņas aknās;
2. hepatocītu ultrastruktūru izmeklēšana sniegs jaunās zināšanas par kortikosteroīdu ietekmi uz kodoliem un mitohondrijiem;

3. hepatoprotektantu lietošana kortikosteroīdu terapijas laikā veicina aknu funkcionālā stāvokļa saglabāšanu un mazina bojājumu intensitāti;
4. antioksidanta mitokvinola mezilāta lietošana pēc metilprednizolona acetāta ievadīšanas suņiem paātrina aknu audu reversijas procesu.

Promocijas darbam “Kortikosteroīdu izraisītās morfofunkcionālās izmaiņas aknās un to reversijas iespējas suņiem” ir izvirzīta sekojošā **hipotēze**: ir iespējama aknu morfofunkcionālā stāvokļa ātrāka reversija suņiem kortikosteroīdu lietošanas laikā, izmantojot hepatoprotektīvo terapiju.

Darba **mērķis** ir izvērtēt ilgstošas darbības kortikosteroīda metilprednizolona acetāta izraisītās funkcionālās, morfoloģiskās un ultrastrukturālās izmaiņas suņu aknās, kā arī noteikt hepatoprotektīvās terapijas ietekmi uz šo izmaiņu smagumu, dinamiku un reversijas iespējām.

Lai sasniegtu mērķi, tika izvirzīti sekojoši **uzdevumi**:

1. izpētīt aknu funkcionālā un/vai morfoloģiskā stāvokļa izmaiņas klīniski veselīem un suņiem ar patoloģijām pēc metilprednizolona acetāta lietošanas;
2. noskaidrot, vai hepatoprotektīvā terapija spēj mazināt aknu funkcionālā stāvokļa izmaiņas suņiem metilprednizolona acetāta lietošanas laikā;
3. noskaidrot, vai antioksidanta mitokvinola mezilāta izmantošana ietekmē aknu audu patoloģisko izmaiņu reversijas procesu suņiem, lietojot metilprednizolona acetātu;
4. izvērtēt metilprednizolona acetāta un antioksidanta mitokvinola mezilāta ietekmi uz hepatocītu ultrastruktūru (kodolu un mitohondriju) morfoloģiju.

Darba zinātniskā novitāte

1. Pirmo reizi veterinārmedicinā Latvijā veikts komplekss pētījums par aknu morfofunkcionālā stāvokļa izmaiņām eksperimentālajiem suņiem pēc ilgstošas darbības kortikosteroīda metilprednizolona acetāta lietošanas.
2. Iegūti jauni, zinātniski nozīmīgi dati par kortikosteroīdu inducētajām ultrastrukturālajām un funkcionālajām pārmaiņām hepatocītos, papildinot līdzšinējās zināšanas par kortikosteroīdu hepatopātijas patoģenētiskajiem mehānismiem.
3. Pirmo reizi sistemātiski novērtēta dažādu hepatoprotektantu efektivitāte aknu funkcionālā stāvokļa stabilizēšanā un to potenciālā loma kortikosteroīdu izraisīto izmaiņu mazināšanā suņiem.
4. Pirmo reizi suņu modelī eksperimentāli pielietots antioksidants mitokvinola mezilāts, iegūstot jaunus datus par tā iespējamo ietekmi uz aknu audu patoloģisko izmaiņu reversijas procesu steroīdās hepatopātijas gadījumā.

Zinātniskā darba aprobācija

Publikācijas, kas indeksētas **SCOPUS** un/vai **Web of SCIENCE** datu bāzēs:

- 1) **Jevgenija Kondratjeva**, Madara Nikolajenko, Aija Ilgaža. Hepatoprotective Effects of Mitoquinol Mesylate on Methylprednisolone Acetate-Induced Steroid Hepatopathy in Dogs: A randomized crossover study. *Veterinary World*, pp. 1356 – 1367, Vol. 19, Issue 3. doi: 10.14202/vetworld.2026.1356-1367
- 2) **Jevgenija Kondratjeva**, Madara Nikolajenko, Aija Ilgaza. Time-dependent hepatic histopathological and biochemical changes following a single dose of methylprednisolone acetate in dogs. *Rural Sustainability Research*, pieņemts publikācijai, aprīlis, 2026.
- 3) **Jevgenija Kondratjeva, Aija Ilgaža**. What is the evidence for long-acting methylprednisolone acetate in dogs? *Veterinary World*, pieņemts publikācijai, aprīlis, 2026

- 4) **Jevgēnija Kondratjeva**, Edīte Birģele. Corticosteroid-Induced Alteration in Liver Function in Dogs and its Decrease Possibilities. *Research for Rural Development*, 2014, volume 1, pp. 195 – 198.
- 5) **Jevgēnija Kondratjeva**, Edīte Birģele. Corticosteroid-induced hepatopathy in dogs. *Research for Rural Development*, 2015, volume 1, pp. 179 -182.

Publikācija citos žurnālos:

- 1) **Jevgēnija Kondratjeva**, Edīte Birģele. Steroid hepatopathy in dogs. Steroīdā hepatopātija suņiem. International Scientific Conference. Animals. Health. Food Hygiene. Proceedings of Conference „Research and Practice in Veterinary Medicine – 2014”.
- 2) Charline Pressanti, Line-Alice Lecru, Daniel Combarros, Fabien Moog, **Jevgenija Kondratjeva** et Marie-Christine Cadiergues. Les glucocorticoïdes en dermatologie chez le chien et le chat. *Le Nouveau Praticien Vét canine & féline* Volume 16, Numéro 73, 2019 (Populārzinātniskais raksts)

Tēzes konferenču rakstu krājumos:

- 1) **Kondratjeva J.**, Ilgaza A. Changes in some blood serum enzymes after the use glucocorticoids. *Journal of Veterinary Science and Technology*, Vol. 7(7), 2016, p. 62. ISBN 2157-7579
- 2) Nikolajenko M., **Kondratjeva J.** Short-term stress effects on home and shelter dogs. *World Small Animal Veterinary Association Congress Proceedings*, 2017
- 3) **Jevgēnija Kondratjeva**, Madara Nikolajenko, Aija Ilgaža. Long-Acting Methylprednisolone Acetate Associated Hepatic Changes in Experimental Canine Model. *Research for Rural Development* 2025. Jelgava, Latvia
- 4) **Jevgenija Kondratjeva** „Mitoquinol Modulates Liver Responses to Long-Acting Methylprednisolone Acetate in Dogs”, *Veterinarija ir Zootehnika* 2025;83(1) Supplement 4: 205-250
- 5) **Jevgenija Kondratjeva**, Aija Ilgaza. DAPI Staining And Hepatocyte Nuclear Changes In Dogs With Steroid Hepatopathy With And Without Mitoquinol Mesylate Treatment. *7th international conference on food agriculture and animal sciences proceeding book*. ISBN: 978-625-99950-3-8

Ziņojumi zinātniskajās konferencēs:

- 1) **Jevgēnija Kondratjeva**, Edīte Birģele. Corticosteroid-Induced Alteration in Liver Function in Dogs and its Decrease Possibilities. *Research for Rural Development* 2014.
- 2) **Jevgēnija Kondratjeva**, Edīte Birģele. Steroid hepatopathy in dogs. Steroīdā hepatopātija suņiem. Animals. Health. Food Hygiene, 27th – 28th November 2014, Jelgava, Latvia
- 3) **Jevgēnija Kondratjeva**, Edīte Birģele. Corticosteroid-induced hepatopathy in dogs. *Research for rural development* 2015.
- 4) **Jevgenija Kondratjeva**, Aija Ilgaža. Personal working experience with the group of experimental dogs in Latvia. 20th International Scientific Conference “Laboratory animals in research” (Balt-LASA and Vilnius University), Vilnius, Lithuania. 24-25.11.2016.
- 5) **Kondratjeva J.**, Ilgaza A. Changes in some blood serum enzymes after the use glucocorticoids. 6th Global Veterinary Summit 2016
- 6) Nikolajenko M., **Kondratjeva J.** Short-term stress effects on home and shelter dogs. In: 11th International Scientific Conference “Students on their Way to Science”: Latvia University of Agriculture. Jelgava, 2016, p. 36. ISSN 2255-9566
- 7) **Jevgēnija Kondratjeva**, Madara Nikolajenko, Aija Ilgaža. Long-Acting Methylprednisolone Acetate Associated Hepatic Changes in Experimental Canine Model. *Research for Rural Development* 2025. Jelgava, Latvia
- 8) **Jevgenija Kondratjeva** „Mitoquinol Modulates Liver Responses to Long-Acting Methylprednisolone Acetate in Dogs”, 3rd International Scientific Conference “Animal

Assisted Therapy: Impact on Human Health and Future Prospects” 16-17 October 2025, Kaunas, Lithuania

- 9) **Jevgenija Kondratjeva**, Aija Ilgaza. DAPI Staining And Hepatocyte Nuclear Changes In Dogs With Steroid Hepatopathy With And Without Mitoquinol Mesylate Treatment. International Congress on Food, Agriculture and Animal Sciences. 13-16 November 2025, Antalya, Türkiye

Promocijas darbs izstrādāts ar projekta atbalstu: “LBTU institucionālās kapacitātes stiprināšana izcilībai studijās un pētniecībā”, saņemot Atveseļošanas fonda finansējumu.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Aknu vispārējais raksturojums

1.1.1. Aknu uzbūve

Aknas (latīņu valodā *hepar*) ir lielākais gremošanas dziedzeris organismā. Tās atrodas vēdera dobuma intratorakālajā apvidū, piegulstot gandrīz visam ieliektajam diafragmas kupolam. Aknu labā laterālā un kaudālā daiva 13. ribas apvidū pieskaras labajai nierei. Abas aknu sānu malas stiepjas gar ribu lokiem. Izpalpējama caur vēdera sienu ir vienīgi aknu ventrālā mala. Aknu viscerālā virsma saskaras ar kuņģi, zarnām un labo nieri (Brūveris, 2007; Brūveris, 2015; Jaffey, 2022).

Aknās notiek tādi dzīvībai svarīgi procesi kā žults izdalīšana, aizsargreakcijas, dažādu vielu (vitamīnu, minerālvielu, olbaltumvielu, tauku, ogļhidrātu, holesterīna) metabolisms un dzelzs apmaiņu. Viena no svarīgākajām aknu funkcijām ir kaitīgo vielu atindēšana, hormonu un dažādu medikamentu inaktivācija (Dālmane, 2004; Aberberga-Augškalne un Koroļova, 2007; Brūveris, 2015; Negasee, 2021).

Aknas ir viens no svarīgākajiem vielmaiņas orgāniem, kurā veidojas vairākas organismam nepieciešamas vielas. Tās sintezē glikogēnu, kas kalpo kā enerģijas rezerve un vajadzības gadījumā glikagona un adrenalīna ietekmē tiek pārvērsts glikozē, palīdzot uzturēt nemainīgu glikozes līmeni asinīs. Aknas piedalās arī žults pigmenta un žultsskābju veidošanā, kā arī nodrošina vairāku asins plazmas olbaltumvielu, piemēram, fibrinogēna, albumīnu un protrombīna, sintēzi. Tur uzkrājas taukos šķīstošie vitamīni (A, D, E un K). Embrionālās attīstības pirmajos piecos mēnešos aknas pilda arī hemopoēzes funkciju, taču pēc šī perioda tā pakāpeniski samazinās un pēc dzimšanas izzūd (Dālmane, 2004; Brūveris, 2015; Reece et al., 2015; Habermass et al., 2024; Habermass et al., 2025).

Suņiem relatīvā aknu masa ir aptuveni 3% no dzīvmasas, mazām suņu šķirnēm tā var būt līdz 3,25%, bet lielajām suņu šķirnēm var būt vien 1,83% no dzīvnieka dzīvmasas. Aknas parasti ir sarkanbrūnā krāsā, badinātiem dzīvniekiem tās ir tumšākā krāsā, bet, uzkrājot taukaudus, aknas kļūst iedzeltenas. Aknu parenhīma ir elastīgas konsistences, tāpēc apkārtējie orgāni tajās var veidot iespiedumus (Brūveris, 2007; Klein, 2019).

No ārpus aknas klāj serozais apvalks, kas cieši saaudzis ar fibrozo kapsulu. No kapsulas uz aknu parenhīmu iespiežas saistaudi, kas lokalizējas galvenokārt ap asinsvadiem un žultsvadiem, īpaši aknu vārtos (latīniski *porta hepatis*). Pārējie saistaudi sadala aknu daiviņās, kas ir aknu morfofunkcionālā pamatvienība. Tās ir neregulāras ar piecstūrainu vai sešstūrainu prizmas formu, kas var arī saplūst kopā. Daiviņas centrā ir centrālā vēna (latīniski *v. centralis*) (Brūveris, 2015; Yamazaki et al., 2024).

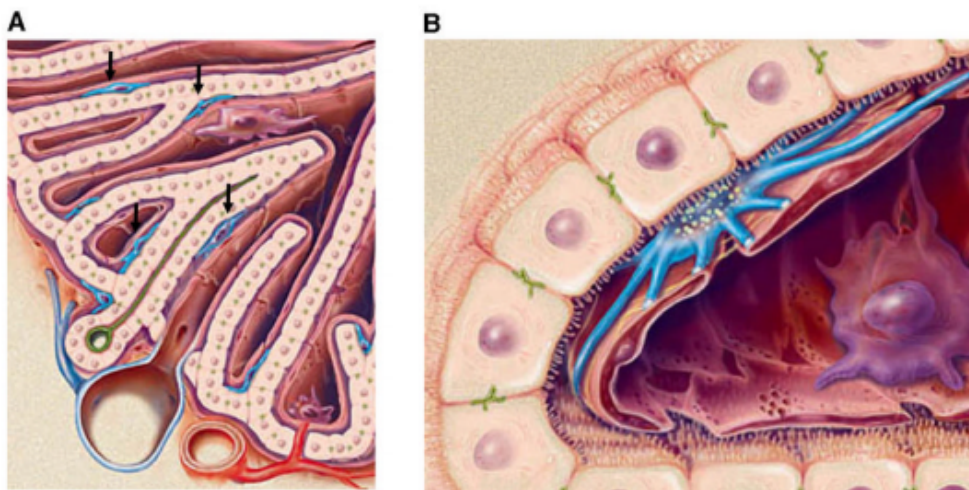
Aknu daiviņas parenhīma sastāv no hepatocītiem, kas telpiski izskatās pēc plātnītēm. Hepatocīti ir daudzšķautņaini ar vienu vai diviem ieapaļiem kodoliem, labi attīstītiem organoīdiem, kā arī glikogēna un tauku ieslēgumiem citoplazmā. Glikogēns lēnām sadalās, un līdz ar to asinīs pakāpeniski palielinās glikozes līmenis (Dālmane, 2004; Brūveris, 2015; Furusato, 2025).

Hepatocītu citoplazmā, tāpat kā citās organisma šūnās, ir dažādu funkciju veicoši organoīdi. Granulārā endoplazmatiskā tīkla ribosomas sintezē asins plazmas olbaltumvielas, gluda endoplazmatiskais tīkls piedalās tauku un glikogēna sintezē, Goldži komplekss un lizosomas piedalās žults sekrēcijā (Dālmane, 2004; Brūveris, 2015; Cogliati, 2023).

No sinusoīdiem aknu hepatocīti uzņem jauktās venozās un arteriālās asinis, atkarībā no to vajadzības pēc skābekļa vai barības vielām. Hepatocīti atpakaļ caur sinusoīdiem asinsritē uz centrālo vēnu nodod jau jaunas, sintezētas vielas, piemēram, proteīnus un glikozi. Tāpat arī asinsritē nokļūst aknās sintezētie triglicerīdi ar zema brīvuma lipoproteīnu starpniecību (Reece et al., 2015; Negasee, 2021).

Hepatocītiem tiek izšķirti divi poli – biliārais un vaskulārais. Biliārais pols vērsts pret žultsvadu, bet vaskulārais pret sinusoīdu. Starp hepatocīta vaskulāro polu un sinusoīda sienu ir šaura sprauga – perisinusoīdālā telpa jeb Disē sprauga, caur kuru notiek vielu maiņa. Šeit caur endoteliocītiem uz hepatocītiem nokļūst asins plazmas daļiņas un sākās limfas attece, kā arī asinīs nokļūst glikoze, urīnviela un citas vielas (Dālmāne, 2004; Brūveris, 2015).

Perisinusoīdālajā telpā atrodas III tipa kolagēns, kas balsta kapilārus, un stellāta šūnas, sauktas arī par Ito šūnām un lipocītiem (skat. 1.1 attēlu). Tajās ir tauku ieslēgumi, un tās kalpo kā A vitamīna rezervju uzkrāšanās vieta (Dālmāne, 2004; Brūveris, 2015). Aknu bojājumu gadījumā tās aktivizējas, pārveidojas par miofibroblastiem un pastiprināti sintezē kolagēnu, lai norobežotu bojājuma vietu un aizkavētu tā tālāku izplatīšanos aknās (Reece et al., 2015; Liu, 2024). Aktivētās stellātās šūnas piedalās arī ekstracelulārās matrica remodelācijā (MMP un TIMP sintēze), aknu mikrocirkulācijas regulācijā, kā arī imūnās atbildes procesos – tās spēj darboties kā antigēnu prezentējošās šūnas, producēt citokīnus un ķīmokīnus un inducēt T limfocītu toleranci (Friedman, 2008). Turklāt stellāta šūnas izdala dažādus augšanas faktorus (piem., TGF- β , HGF, PDGF, VEGF), kas ietekmē hepatocītu proliferāciju un aknu reģenerāciju, kā arī iesaistās lipoproteīnu un eikosanoīdu metabolismā (Friedman, 2010).



1.1. att. **Normālu aknu stellāta šūnu morfoloģija** (Friedman, 2008)

A – ar „→” norādīta stellāta šūnu novietojums pret aknu sinusoīdiem un hepatocītiem;

B – lielāka palielinājuma grafiskais attēlojums, kur redz stellāta šūnu (zilā krāsā) subendoteliālajā telpā.

Hepatocītu struktūra un šūnas uzbūve ir lielā mērā atkarīga no organisma funkcionālā stāvokļa un dažādu nelabvēlīgu apstākļu un vielu ietekmes uz tiem. Aknu slimības bieži vien noris smagi, jo organisms papildus saindējas ar aknu vielmaiņas gala produktiem (Dālmāne, 2004; Brūveris, 2015; Xiong, 2023).

1.1.2. Asinsrite aknās

Starp daiviņām esošie saistaudi veido aknu stromu, kurā lokalizējas asinsvadi, nervi, limfvadi un žultsvadi (Klein, 2019; Oh et al., 2023).

Asinis aknās tiek pievadītas caur divām sistēmām – vārtu vēna un aknu artērija, bet aizvadīta caur aknu vēnām uz kaudālo dobo vēnu. Asiņu pievadošo sistēmu var iedalīt vēl sīkāk – lobārās, segmentālās, interlobulārās vēnas un artērijas (Brūveris, 2015; Poisson et al., 2017; Davé et al., 2022).

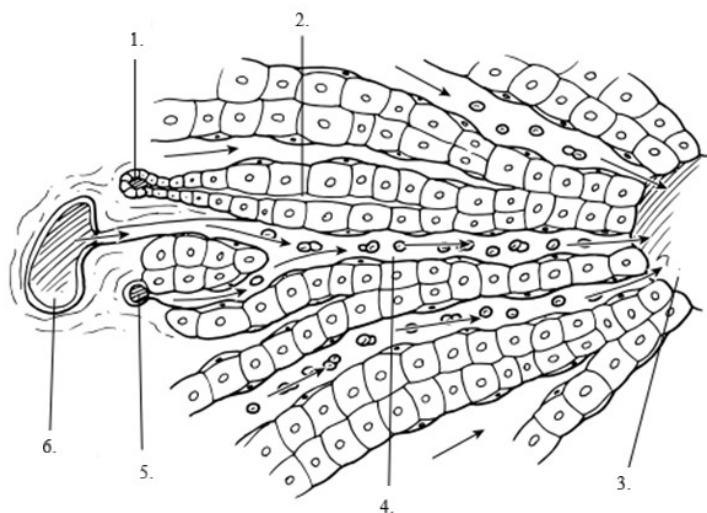
Asinis, kas piesātināta ar vielām no gremošanas trakta, aknās ieplūst pa vārtu vēnu. Asinis uz vārtu vēnu ieplūst no zarnu gļotādas un zemgļotādas kapilāriem. Šīs venozās asinis transportē sagremotos oglekļahidrātus un olbaltumvielas, lai tie aknās tiktu tālāk pārstrādāti (Reece et al., 2015; Tilg et al., 2022). Barībai pārstrādājoties gremošanas traktā, aknās veidojas

hiperēmija. Nepieciešamības gadījumā aknas var funkcionēt kā asiņu depo (Dālmāne, 2004). Daļa no absorbētajiem cukuriem tiek izmantoti enerģijas veidošanai, lai nodrošinātu aknu metaboliskos procesus, bet pārējie tiek pārvērsti glikogēnā un kā rezerves noglabātas hepatocītos. Venozajās asinīs esošās aminoskābes aknās tiek izmantotas, lai veidotu dažādus plazmas proteīnus (albumīnu, globulīnu, dažādi asinsreces faktori, akūtās fāzes proteīns) (Reece et al., 2015).

Savukārt aknu artērija aknām piegādā skābekli (Dālmāne, 2004; Poisson et al., 2017). Lipīdi, kas absorbēti gremošanas laikā nonāk hilomikronos limfritē un pašās aknās nonāk caur aknu artēriju. Šos lipīdus aknas vai nu piesātina ar skābekli, kas tālāk tiek izmantots dažādos metaboliskajos procesos kā enerģijas avots, vai arī pārveidoti par zema blīvuma lipoproteīnu molekulām (Reece et al., 2015; Davé et al., 2022).

Viena no svarīgākajām aknu asinsvadu sistēmām ir aknu triāde (*trias hepatis*), kas sastāv no interlobulārās vēnas, artērijas un žultsvada. Vēna ir triādes lielākais asinsvads, kurš sastāv no plāna endotēlija, atsevišķi cirkulāri novietotām gludajām muskuļšūnām un saistaudu kārtas jeb adventīcijas (Brūveris, 2015). Pa šīm vēnām plūst mazoksigenētas asinis, kas piesātinātas ar gremošanas procesā uzsūktajām vielām (Reece et al., 2015; Trefts et al., 2017). Artērijas sienas uzbūve ir tāda pati kā vēnai, bet tās diametrs ir salīdzinoši mazāks. Savukārt triādes žultsvadu veido kubiskais epitēlijs (Brūveris, 2015). Šī artērija piegādā aknām augstas koncentrācijas oksigenētas asinis un iepriekšminētos hilomikronus ar lipīdu pilieniem (Reece et al., 2015; Davé et al., 2022).

No interlobularajām vēnām un artērijām atzarojas perilobulārās vēnas un artērijas, kas apņem aknu daiviņu un sadalās daudzos, plašos kapilāros jeb sinusoīdos (Brūveris, 2015; Klein, 2019). Sinusoīdi aknu daiviņās cieši piegulst aknu šūnām un atveras centrālajā daiviņas vēnā, tātad pa tiem plūst asinis no triādes vēnas un artērijas uz daiviņas centrālo vēnu, kas shematiski attēlots 1.2 attēlā (Reece et al., 2015). Sinusoīdi veidoti no plakanām logota endotēlija šūnām ar platām spraugām starp šūnām, lai caur tām viegli var izklūt dažāda lieluma proteīni un citi savienojumi asinīs (Aberberga-Augškalne un Koroļova, 2007; Brūveris, 2015; Reece et al., 2015; DeLeve, 2015).



1.2. att. Shematisks aknu daiviņas daļas attēlojums palielinājumā (Reece et al., 2015)

- 1. – žultsvads;
- 2. – žults kapilāri;
- 3. – centrālā vēna;
- 4. – sinusoīds;
- 5. – aknu artērija;
- 6. – interlobulārā vēna.

Ar „→” norādīts asinsrites virziens no aknu triādes uz centrālo vēnu.

Sinusoīdi nodrošina to, ka asinis caur aknām plūst lēni, jo šie kapilāri starp hepatocītiem ir smalki, bet sakarā ar to, ka to ir daudz, tad aknām cauri spēj izplūst liels tilpums asiņu (Dālmane, 2004; Brūveris, 2015). Vienlaikus mikroasinsrites traucējumi (mikrotromboze, sinusoidu obstrukcija) veicina hipoksiju un fibrozes progresiju (Poisson et al., 2017).

Starp endotēlija šūnām izkļaidus atrodas zvaigžņveida makrofāgi jeb Kupfera šūnas, kuras inaktīvā T-limfocītu limfokīnī. Tās darbojas kā viens no aknu aizsargmehānismiem. Vajadzības gadījumā Kupfera šūnas noapaļojas un virzās no kapilāra sienas (Dālmane, 2004; Reece et al., 2015). Makrofāgi aktīvi atbrīvo asins plazmu no kaitīgiem komponentiem, fagocitējot baktērijas, antigēna-antivielas kompleksus (Aberberga-Augškalne un Koroļova, 2007; Guillems et al., 2022).

1.1.3. Žults cirkulācija aknās

Žults izvadsistēma sākas ar žults kapilāriem, kas ir ieapaļas spraugas starp hepatocītiem, un tiem nav izšķirama atsevišķa sastāva sieniņa – to veido hepatocītu citolemma. Žults kapilāri atrodas starp hepatocītiem, kurus neatdala sinusoīdi, bet tie ir savstarpēji saistīti, kas shematiski redzams 1.2 attēlā. Žults virzās pretējā virzienā kā aknu asinsrite, tas ir, nevis centrālās vēnas virzienā, bet gan uz aknu triādes žultsvadu (Reece et al., 2015; Dyce et al., 2017; König et al., 2020; Oh & Jeong, 2023). Parasti aknu histoloģiskajos preparātos žults kapilāri nav redzami, ja vien tie nav speciāli apstrādāti ar sudrabu vai žultsceļos nav injicēta kontrastviela. Gadījumos, kad paraugs ir īpaši apstrādāts, var redzēt to, ka žults kapilāri sākas daiviņas vidū ar noslēgtu galu un virzās perifēri. Kapilāri pārveidojas par daivīņstarpas jeb interlobulārajiem žultsvadiem. Tie saplūst un veido žultsvadus triādes sastāvā (Dālmane, 2004; Brūveris, 2015; Dyce et al., 2017). Interlobulārajiem žultsvadiem apvienojoties, veidojas lielāki žultsvadi, kuru sieniņas struktūra kļūst daudzveidīgāka. To veido cilindriskais epitēlijs un irdeno saistaudu kārtā, veidojot gļotādas pamatkārtu, kas lielākiem žultsvadiem ir biezāka ar elastīgajām šķiedrām un atsevišķām muskuļšūnām. Tālāk šie lielākie žultsvadi savienojas un veido kopējo aknu vadu, kas saplūst ar žultspūšļa izvadu, veidojot kopējo žultsvadu. Kopējais žultsvads atveras divpadsmitpirkstu zarnā (Brūveris, 2015; König et al., 2020). Žultsvadu epitēlijs ir metaboliski aktīvs un spēj izmainīt žults sastāvu, pievienojot tam ūdeni un elektrolītus, īpaši bikarbonātus (Klein, 2013; Reece et al., 2015; Dyce et al., 2017; Fuchs et al., 2025).

Barības gremošanas laikā žults izdalās divpadsmitpirkstu zarnā un iesaistās barības sagremošanas procesā. Tievajās zarnās žults emulgē taukus un veicina to uzsūkšanos, aktivizē lipāzi, stimulē zarnu peristaltiku un dezinficē zarnas (Dālmane, 2004; Reece et al., 2015; König et al., 2020). Kopā ar žulti izdalās arī holesterīns, žults pigments, dzelzs, kalcijs. Par cik hepatocīti piedalās atindēšanas procesā, tad liela daļa no uzņemtajām zālēm un toksīniem, piemēram, kortikosteroīdie hormoni, alkaloīdi un dažādas antibiotikas, tiek izvadīti ar žults palīdzību. (Dālmane, 2004; Dyce et al., 2017). Aknās toksīni tiek pakļauti divu fāžu pārstrādei, pirms tie nonāk žultsritē. Pirmajā fāzē toksīni ir pakļauti oksidatīvajai reakcijai, izjaucot to normālo struktūru, kas padara šo savienojumu nekaitīgu organismam. To panāk, pievienojot vienu vai divas hidroksilgrupas molekulai oksidācijas procesā ar dažādu aknu enzīmu, piemēram, citohroma P450 monoksigenāzes, palīdzību. Otrajā fāzē pārveidotā toksīna molekula ar enzīmu palīdzību konjugējas ar glikoronīda vai sulfāta molekulu, kas padara šo savienojumu ūdenī nešķīstošu un nonāk žultsritē (Reece et al., 2015; König et al., 2020). Ja gremošanas process nenotiek, tad izdalītā žults uzkrājas žultspūslī. Tā siena sastāv no gļotādas, muskuļapvalka un fibrozā apvalka (Dālmane, 2004; Dyce et al., 2017).

Tādiem dzīvniekiem, kā žurkai, zīrgam, briedim, alnim un stirnai nav attīstīts žultspūslis, tāpēc šiem dzīvniekiem divpadsmitpirkstu zarnā atveras kopējais aknu žultsvads (Brūveris, 2015; Reece et al., 2015; König et al., 2020).

Mūsdienu pētījumi papildus uzsver, ka žultsskābes nav tikai emulsifikatori tauku gremošanā, bet arī spēcīgas signālmolekulas, kas regulē aknu vielmaiņu, iekaisumu un

reģenerāciju, iedarbojoties caur FXR un TGR5 receptoriem (Fuchs et al., 2025; Zeng et al., 2023). Hepatobiliārie transportieri, piemēram, NTCP un BSEP, ir būtiski žultsskābju homeostāzei, un to darbības traucējumi izraisa holestāzi un hepatocītu bojājumu (Ghanem & Manautou, 2022). Holestāze tiek sasaistīta ar oksidatīvo stresu un fibrozes progresiju, īpaši aktivējot stellāta šūnas un imūnās reakcijas (Wang et al., 2024). Jaunas *in vitro* un *single-cell* tehnoloģijas ļauj detalizēti pētīt žults kanāliņu uzbūvi un transporteru lokalizāciju, kas būtiski paātrina arī zāļu drošuma novērtēšanu (Frank et al., 2024).

1.2. Kortikosteroīdu grupas vispārējais apskats. Steroīdās hepatopātijas diagnostika

1.2.1. Kortikosteroīdi – vēsture un mūsdienās pielietojamie medikamenti

Kortikosteroīdi pieder pie steroīdo hormonu klases, tie fizioloģiski tiek sintezēti virsnieru garozā (Papich, 2015; Ramamoorthy & Cidlowski, 2016; Sri-Jayantha et al., 2022). Klīniskajā praksē kortikosteroīdus pirmo reizi sāka lietot 1948. gadā reimatoīdā artrīta ārstēšanai, izmantojot kortizonu kā virsnieru garozas hormona sintētisko formu. Nozīmīgu ieguldījumu šīs terapijas attīstībā sniedza amerikāņu ārsts un pētnieks Filips Henčs (Philip Showalter Hench), kurš par šo atklājumu 1950. gadā saņēma Nobela prēmiju medicīnā (Loyd, 2002; Buttgereit et al., 2005). Šī terapijas ieviešana iezīmēja būtisku pagrieziena punktu medicīnas vēsturē, un literatūrā nereti tiek minēts, ka laiks tika iedalīts periodos “pirms kortizona” un “pēc kortizona” atklāšanas. Sākotnēji kortikosteroīdu lietošana tika uzskatīta par revolucionāru, taču jau drīz pēc to ieviešanas tika novērotas arī blaknes, tostarp steroīdā hepatopātija suņiem (Wimberly et al., 1969; Loyd, 2002; Sri-Jayantha et al., 2022).

Turpmākajos gados tika sintezēti vairāki jauni preparāti, kas būtiski paplašināja terapeitiskās iespējas. 1960. gados klīniskajā praksē parādījās prednizolons, metilprednizolons un deksametazons, kas joprojām tiek plaši izmantoti gan humānajā, gan veterinārajā medicīnā (Glyn, 1998; Buttgereit et al., 2005; Catley, 2007; Papich, 2015). Šie sintētiskie kortikosteroīdi atšķiras ar darbības ilgumu, receptoru saistīšanās spējām, pretiekaisuma efektivitāti un minerālkortikoīdu aktivitāti, kas nosaka to izvēli dažādās klīniskās situācijās (Papich, 2015; Ramamoorthy & Cidlowski, 2016; Jablonski et al., 2024).

Metilprednizolona acetāts (Depo-Medrol) tika ieviests 1960. gadā, sākotnēji izmantojot to intratekāli mugurkaula disku slimību un multiplās sklerozes ārstēšanā humānajā medicīnā (Nelson, 1993). Tā ir ilgstošas darbības forma – esterificēšana ar acetātu padara vielu vāji šķīstošu ūdenī, tāpēc preparāts suspensijas veidā lēni uzsūcas un nodrošina efektu vairākas nedēļas (3–4 nedēļas pēc intramuskulārās injekcijas). Metilprednizolona acetāts tiek uzskatīts par apmēram 1,25 reizes spēcīgāku nekā prednizolons, un tam praktiski nav minerālkortikoīdu īpašību (Lowe, 2010; Papich, 2011). Šīs īpašības padara preparātu piemērotu pacientiem, kuriem nepieciešams ilgstošs efekts vai nav iespējama regulāra perorāla terapija, tomēr jaunākie pētījumi uzsver arī metabolisma blakņu risku, piemēram, diabetoģenitāti kaķiem (Leal et al., 2022).

Veterinārajā praksē visbiežāk izmantotie kortikosteroīdi ir prednizolons, deksametazons (akūtās un kritiskās situācijās), metilprednizolona acetāts (depo forma injekcijām), triamcinolona acetonīds/hekzacetonīds (intraartikulārām injekcijām ortopēdijā), kā arī inhalējamie kortikosteroīdi – budezonīds, flutikazons un ciklesonīds, kas arvien biežāk tiek izmantoti elpceļu slimību terapijā ar mazāku sistēmisku blakņu risku. Jaunākie pētījumi apliecina inhalējamo un lokālo kortikosteroīdu potenciālu, piemēram, flutikazonu un budesonīdu hronisku elpceļu slimību gadījumos vai triamcinolonu intraartikulārās injekcijās, kā arī jaunus eksperimentālus risinājumus (piem., deksametazona konjugāti ar uzlabotu audu penetrāciju) (Barchilon & Reiner, 2023; Chan & Johnson, 2023; Leal et al., 2022; Talavera-López et al., 2023). Tomēr klīniskajā praksē un starptautiskajās vadlīnijās hronisku slimību ārstēšanā joprojām dominē klasiskie preparāti – sistēmiskie kortikosteroīdi, kuri ir iekļauti gan

World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) Essential Medicines sarakstā (Steagall et al., 2020) un *International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA)* vadlīnijās (Olivry et al., 2015).

Kortikosteroīdi veterinārajā praksē tiek lietoti plaši, pateicoties to spējai nomākt iekaisuma mediatoru veidošanos un modulēt imūnsistēmas darbību. Tie ir neaizstājami akūtu alerģisku un anafilaktisku reakciju gadījumos, autoimūnu slimību (piemēram, pemfigus komplekss, sistēmiskā vilkēde, imūnmediēta hemolītiskā anēmija) ārstēšanā, limfomu un citu neoplāziju terapijā, kā arī dermatoloģijā (atopiskais dermatīts, kontaktdermatīts, citas iekaisīgas dermatozes), elpceļu slimībās un endokrīno slimību kontrolē (Lucerna et al., 1999; Feldman & Nelson, 2004; Hensel et al., 2015; Viviano, 2022).

Lielbritānijā VetCompass projekts, analizējot vairāk nekā 455 tūkstošus suņu, parādīja, ka 6,2% pacientu tika nozīmēta sistēmiska kortikosteroīdu terapija, pārsvarā prednizolons vai deksametazons (Elkholly et al., 2019). Citā pētījumā, kas aptvēra trīs lielas klīnikas, sistēmiskā terapija tika nozīmēta 14,6% gadījumu (O'Neill et al., 2012). Austrālijā retrospektīvs pētījums par prednizolona lietošanu atklāja, ka to plaši izmanto pretiekaisuma devās (mediāni 0,8 mg/kg/dienā), un vieglas blaknes (polifāģija, polidipsija, poliūrija, uzvedības izmaiņas) bija retas (<5%), taču imūnsupresīvu devu gadījumā blakņu biežums ievērojami pieauga (Purcell et al., 2023).

Ilgstošas darbības formas, piemēram, metilprednizolona acetāts, ir praktiskas, taču saistītas ar augstāku vielmaiņas blakņu un jatrogēnas hiperadrenokorticisma risku. Eksperimentālos pētījumos pierādīta arī virsnieru atrofija pēc ilgstošas prednizolona lietošanas (Boretti et al., 2025). Blaknes variē no viegliem simptomiem (poliūrija-polidipsija, muskuļu atrofija) līdz nopietnām komplikācijām (sekundārās infekcijas, aknu izmaiņas, jatrogēns hiperadrenokorticisms). Tāpēc arvien lielāka nozīme ir individualizētai pieejai, devas pielāgošanai un īsākas darbības preparātu izmantošanai, ja iespējams (Hensel et al., 2015; Luís et al., 2019; Purcell et al., 2023).

1.2.2. Kortikosteroīdu farmakokinētika un farmakodinamika

Kortikosteroīdi ir steroīdie hormoni, kas sintezējas no holesterīna virsnieru garozā, un šo procesu regulē hipofīzes priekšējās daivas adrenokortikotropais hormons (*AKTH*) (Papich, 2015; Ramamoorthy & Cidlowski, 2016). Pēc aknās notiekošas metabolizācijas kortikosteroīdi konjugējas ar glikuronskābi vai sulfātiem un tālāk tiek izvadīti ar urīnu (Feldman & Nelson, 2004; Cain & Cidlowski, 2017). Jaunākie pētījumi liecina, ka arī aknu mikrobioma un oksidatīvā stresa līmenis var ietekmēt kortikosteroīdu biotransformāciju, kas skaidro atšķirības starp indivīdiem (Morris & Ridlon, 2017).

Gan sintētiskie, gan dabīgie kortikosteroīdi spēj pasīvi difundēt caur šūnas membrānu, kur tie savienojas ar kortikosteroīdu receptoriem (Pratt et al., 2006; Catley, 2007; Ramamoorthy & Cidlowski, 2016). Kortikosteroīdu iedarbība nav selektīva un ietekmē ne tikai "mērķa audus", bet arī citas organisma sistēmas. Gandrīz katrai organisma šūnai citoplazmā ir kortikosteroīdu receptori, kas piesaista šo vielu, līdz ar to tā darbība skar visas šūnas, kurām tiek piesaistīta. Pēc kortikosteroīda sasaistīšanās ar receptoru, tas nokļūst šūnas kodolā, kur ietekmē gēnu transkripciju, tāpēc kortikosteroīdu saturošie preparāti var izraisīt izmaiņas dažādās orgānu sistēmās, t.sk. aknu morfofunkcionālajā stāvoklī (Dillon et al., 1980; Badyalak et al., 1981; Cohn, 1991; Behrend & Kempainen, 1997; Newton, 2000; Abraham et al., 2006; Cain & Cidlowski, 2017). Jaunākie molekulārie pētījumi apstiprina, ka kortikosteroīdu receptoru aktivitāti ietekmē arī epigenētiskās izmaiņas un miRNS regulācija, kas var mainīt šūnu atbildes intensitāti (Bartlett et al., 2019; Clayton et al., 2018).

Kortikosteroīdi uz organismu iedarbojas caur vairākiem mehānismiem, svarīgākais no tiem – caur gēnu transkripciju. Tie spēj iekļūt šūnas kodolā un ietekmēt DNS, kur atrodas „kortikosteroīdu atbildes elements” (GAE). Savienojoties ar GAE, notiek palielināta vai

samazināta gēnu transkripcija un jaunu proteīnu veidošana, kas var rezultēties ar ilgāku, klīniski sākumā nepamanāmu, preparāta iedarbību (Cohn, 1991; Saklatvala, 2002; Lowe, 2010; Clarisse et al., 2024). Pēdējos gados aprakstīta arī tā sauktā kortikosteroīdu rezistence, kas var attīstīties hronisku iekaisuma slimību gadījumā un saistīta ar receptoru ekspresijas un signālu ceļu traucējumiem (Oakley & Cidlowski, 2017; Mata-Greenwood et al., 2024).

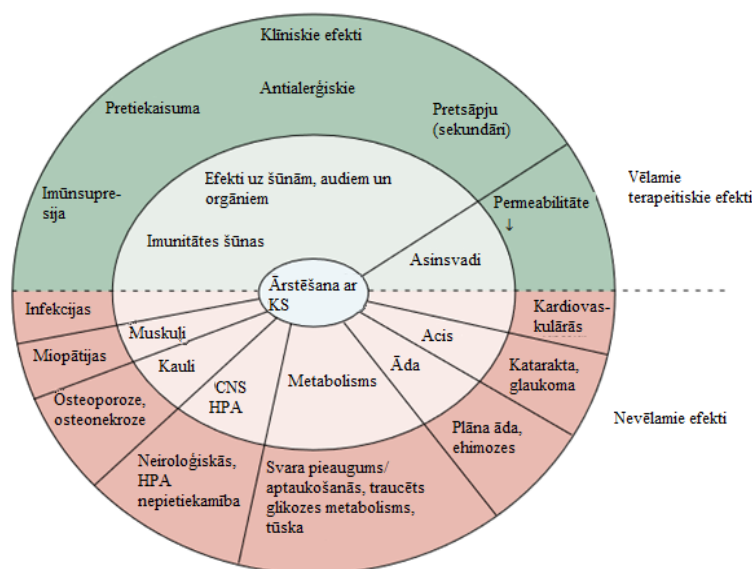
Pielietotās kortikosteroīdu devas tiek nosacīti iedalītas trijās grupās: fizioloģiskās, pretiekaisuma un imūnsupresīvās. Nepieciešamība imūnsistēmas supresijā ir viena no biežākām indikācijām kortikosteroīdu lietošanai (Lowe, 2010; Olivry et al., 2015; Viviano, 2022). Jaunākās vādlīnijas iesaka skaidri nošķirt pretiekaisuma un imūnsupresīvās devas, lai mazinātu nevēlamo blakņu risku (Swann, 2019; Richards et al., 2022; Viviano, 2022).

Pretiekaisuma devas izmanto pie alerģiskām reakcijām, atopiskā dermatīta un citiem iekaisuma stāvokļiem (Purviņš un Purviņa, 2011; Hensel et al., 2015). Imūnsupresīvās devas lietojamas pie autoimūnām saslimšanām, piemēram, pemphigus foliaceus vai imūnmediētās hemolītiskās anēmijas (Lowe, 2010; Viviano, 2022). Pētījumi rāda, ka ilgstošā terapijā devas bieži nepieciešams kombinēt ar citiem imūnmodulatoriem (piemēram, ciklosporīnu), lai samazinātu kortikosteroīdu devas un blakņu risku (Viviano, 2022).

Ilgstoša lietošana ietekmē asinsrades procesus – samazinās eozinofili un limfocīti, palielinās eritrocīti un neitrofili. Kortikosteroīdi stimulē aknu glikoneoģenēzi un glikogēna sintēzi, kavē olbaltumvielu sintēzi, izraisa negatīvu slāpekļa bilanci, veicina lipolīzi un tauku uzkrāšanos aknās. Tie izjauc glikēmisko kontroli un var izraisīt hiperglikēmiju, kataraktu, glaukomu, hipertensiju un muskuļu atrofiju (Schäcke et al., 2002; Cain & Cidlowski, 2017; Boretti et al., 2025).

Kortikosteroīdi ir vieni no visbiežāk lietotajiem pretiekaisuma medikamentiem, pateicoties spējai nomākt mediatoru darbību un regulēt imūno atbildi. Tomēr ilgstoša lietošana kavē arī brūču dzīšanu un ietekmē augšanas faktoru, citokīnu un proteīnu aktivitāti (Ramamoorthy & Cidlowski, 2016). Pētījumi apstiprina, ka pat īslaicīga, bet augstu devu lietošana var mainīt fibroblastu funkciju un kavēt kolagēna sintēzi, kas jāņem vērā ķirurģiskajos pacientos (Slominski & Zmijewski, 2017). To lietošana var izraisīt specifiskas izmaiņas, piemēram, arteriālo hipertensiju, kuņģa-zarnu trakta asiņošanu, kortikosteroīdo diabētu un nervu sistēmas traucējumus (Purviņš un Purviņa, 2011; Elkholly et al., 2020; Leal et al., 2022).

1.3. attēlā redzams terapeitisko efektu salīdzinājums ar kortikosteroīdu izraisītajā blakusparādībām.



1.3. att. Biežāk sastopamie klīniskie terapeitiskie kortikosteroīdu efekti šūnās, audos un orgānos (Buttgerei et al., 2005, teksts tulkots latviešu valodā)

1.2.3. Mitohondriju funkcijas un oksidatīvā stresa ietekme uz aknu šūnām

Aknas ir viens no svarīgākajiem orgāniem, kur notiek dažādi vielmaiņas procesi un organisma attīrīšana no dažādām substancēm, tāpēc tās ir visvairāk pakļautas medikamentu toksicitātei; toksicitātes patoģenēzē iesaistās šūnu oksidatīvais stress, mitohondriālie bojājumi un specifiskas imūnatbildes (Li et al., 2015; Wang, 2024; Borgne-Sanchez & Fromenty, 2025). Specifiskā aknu metabolisma dēļ tās var tikt sekundāri skartas no slimības procesiem citur (piemēram, sepse, hipoksija, hiperadrenokorticismi), izraisot sekundāro hepatopātiju (Assawarachan et al., 2023; Jablonski et al., 2024). Aknas ir komplekss orgāns ar dažādām funkcijām, un lai tās tiktu pienācīgi veiktas, aknu šūnām ir nepieciešama enerģija, kura tiek veidota mitohondrijos. Mitohondriji ir unikāli ar to, ka tie ir vienīgās šūnas organellas, kas sastāv no atsevišķa genoma un visa nepieciešamā, lai veiktu ģenētisko transkripciju un translāciju dažādos proteīnos šūnas DNS un RNS sastāvos (Huang et al., 2023; Spinelli & Haigis, 2018; Ott et al., 2016).

Mitohondriji nodrošina organisma šūnas ar enerģiju, lai tās spētu uzturēt normālu organisma funkciju un metabolismu; enerģija veidojas oksidatīvās fosforilēšanas laikā (respiratorā ķēdē), un bojājumi šajā sistēmā samazina ATF veidošanos un var veicināt mutācijas, līdz ar to traucējot šūnu funkciju (Murphy, 2016; Wang et al., 2016; Spinelli & Haigis, 2018; Zhang et al., 2021). Tajā pašā laikā respiratorajā ķēdē skābeklis daļēji reducējas par superoksīdu, brīvo radikāli, tāpēc mitohondriji cieš no oksidatīvā stresa vairāk nekā citas šūnas (Murphy, 2016; Borgne-Sanchez & Fromenty, 2025). Reaktīvās skābekļa daļiņas bojā lipīdus (lipīdu peroksidācija), olbaltumvielas un membrānas; šis process norit ķēdes reakcijā un var strauji izplatīties (Murphy, 2016; Bhatti et al., 2017; Mooli et al., 2022). Īpaši uzņēmīga ir šūnu DNS – ikdienā uzkrājas oksidatīvi bojājumi, kas veicina mutācijas un saistās ar vairākām patoloģijām (Xuan et al., 2020). Oksidatīvo stresu pastiprina novecošana, jonizējošais starojums un ķīmiskas vielas; kad endogēno antioksidantu rezerves izsīkst, pieaug ļaundabīgu audzēju, hroniska iekaisuma, išēmijas un autoimūnu slimību risks, tāpēc nozīmīgi ir ar pārtiku uzņemtie antioksidanti (Pizzino et al., 2017; Sies & Jones, 2020; Kalogerakou & Antoniadou, 2024).

Aknu darbība – vielmaiņa, kaitīgo vielu neitralizācija, žults veidošanās un reģenerācija – cieši ir atkarīga no skābekļa pieejamības un mitohondriju darbības šūnās; jaunākie pētījumi rāda, ka skābekļa gradients aknu audos, hipoksijas signālu aktivācija un mitohondriju bojājumi ir centrāli faktori MAFLD/NAFLD, išēmijas-reperfūzijas bojājumu un fibrozes progresijā (Zhang et al., 2021; Fromenty et al., 2023; Deng et al., 2024). Aknās fizioloģiski veidojas skābekļa gradients: vairāk skābekļa portālajā zonā un mazāk perivenozajā, kas nosaka zonālos metabolisma režīmus (piem., glikoneoģenēze pretī detoksikācijai); ja asinsrite mainās, pārslēdzas transkripcijas programmas un atjaunošanās potenciāls (Cunningham & Porat-Shliom, 2021; Panday, 2022). Hipoksija aktivē HIF signālus, kas pārorientē enerģijas ieguvu uz mazāk efektīviem ceļiem, veicina tauku uzkrāšanos, iekaisumu un fibrozi (Solanki & Shah, 2024). Mitohondriju bojājumi izraisa ATF kritumu, ROS pieaugumu un mitohondriālās DNS izdalīšanos, kas aktivē iekaisuma ceļus; to bloķēšana eksperimentāli mazina aknu bojājumu (Xu et al., 2023). Išēmijas-reperfūzijas situācijās mitohondriji ir gan mērķis, gan bojājuma pastiprinātājs, un aizsardzības pieejas ietver mērķētus antioksidantus, mitofāģijas/dinamiskas regulāciju un pat mitohondriju transplantāciju dzīvnieku modeļos (Xu et al., 2024; Zhou et al., 2024). Taukaino aknu slimības gaitā mitohondriju kompensācija sākumā var būt pietiekama, bet progresējot mazinās oksidatīvā kapacitāte, pieaug ROS un iekaisums, veicinot pāreju uz NASH un fibrozi; līdz ar to mitohondriju homeostāzes atjaunošana ir nozīmīgs terapeitisks mērķis (Zhang et al., 2021; Deng et al., 2024; Fromenty et al., 2023). Jaunās metodes: telpiskā transkriptomika, viēnšūnas analītika un “aknu čipi” palīdz sasaistīt lokālo oksigenāciju ar mitohondriju fenotipiem un attīstīt mērķētākas terapijas, kā arī identificēt prognostiskus marķierus pēc rezekcijas vai transplantācijas (Deng et al., 2024; Zhou et al., 2024).

1.2.4. Kortikosteroīdu izraisītās izmaiņas asins bioķīmiskajos rādītājos

Aknu enzīmu jeb fermentu noteikšana asins serumā tiek plaši pielietota klīniskajā laboratoriskajā diagnostikā, lai netieši identificētu aknu slimības, novērotu to gaitu, izvērtētu smaguma pakāpi, noteiktu medikamentu ierosinātu toksicitāti, kā arī lai sekotu ārstēšanas efektivitātei (Oikonomidis & Milne, 2023; Loan et al., 2025). Savukārt, tikai pēc izmaiņām asins bioķīmiskajos rādītājos nevar uzstādīt gala diagnozi, bet analīžu rezultāti ir jāiekļauj kopējā klīniskajā un speciālajā izmeklēšanā (Bexfield & Watson, 2009).

Zināms, ka aknu funkcionālo stāvokli netieši atspoguļo atsevišķu fermentu daudzums asins serumā, bet tieši to apstiprina aknu biopsijas paraugu histoloģiskās izmeklēšanas rezultāti. Dažu bioķīmisko rādītāju paaugstināšanās asins serumā pie steroīdās hepatopātijas raksturīgajiem aknu bojājumiem suņiem zināmā mērā ir specifiskas. Hepatocītu nekrozes un šūnu membrānu bojājumu brīdī aknu šūnu fermenti pārmērīgos daudzumos iekļūst asins cirkulācijā, tāpēc to bioķīmiskās izmeklēšana rezultātā noteiktais līmenis asins serumā ļauj spriest par iepriekš aprakstīto patoloģijas esamību, attīstību un citiem faktoriem (Bexfield & Watson, 2006; Szarek et al., 2014; Habermaass et al., 2025; Berlin et al., 2024).

Alanīnaminotransferāze (ALAT) ir specifisks un jutīgs rādītājs aknu problēmu gadījumā. Daudzi autori atzīst, ka paaugstināts šī fermentu līmenis asins serumā norāda uz šūnu membrānu funkcionālās integritātes zudumu aknās hepatocītu nekrozes dēļ. Šūnu bojājumu rezultātā ALAT atbrīvojas, paaugstinot tā aktivitāti asins plazmā. Kaut arī ALAT tiek uzskatīts par aknām specifisku enzīmu, nelielos daudzumos tas var būt arī nierēs, sirds un skeleta muskuļšūnās. Akūtu hepatocelulāru bojājumu gadījumā ALAT paaugstināšanās nebūs novērojama uzreiz, bet vien 24 līdz 48 stundas pēc. Tas notiek tāpēc, ka no šūnām atbrīvotais ALAT sākumā tiek katabolizēts aknās un tikai tad nokļūst asins plazmā. Šī rādītāja paaugstināšanās var norādīt arī uz tauku šūnu lipocītu izmaiņām aknās, kā arī uz kortikosteroīdu vai antikonvulsantu lietošanu, kas rada hepatocelulāros bojājumus jeb hepatopātiju Szarek et al., 2014; Abdou et al., 2013; Loan et al., 2025; Assawarachan et al., 2023).

Gammaglutamiltransferāze (GGT) ir suņiem specifisks aknu enzīmu darbības rādītājs un paaugstinās tikai pie aknu un žultsceļu slimībām, jo ir saistīts ar šūnu membrānām distālajos žultsvados. Tāpat kā ALAT, arī paaugstināts GGT enzīma līmenis asins serumā var norādīt uz tauku akumulāciju hepatocītos, papildus norādot par oksidatīvā stresa ietekmi uz aknu šūnām. Gadījumos, kad hepatocīti ir pakļauti oksidatīvajam stresam, GGT paaugstinās, lai palīdzētu regulēt reducēšanās un oksidēšanās procesus, sadalot ektracelulāro glutationu (Oikonomidis & Milne, 2023; Habermaass et al., 2025).

Īpaši nozīmīgs rādītājs ir arī sārmainās fosfatāzes (AP) pieaugums, kas bieži tiek novērots pie aknu slimībām, bet veterinārajā medicīnā īpaša uzmanība tiek pievērsta tās kortikosteroīdu inducētajam izofermentam – kAP. Paaugstinātu AP produkciju asinīs izraisa glikogēna uzkrāšanās aknās, paaugstināts žults spiediens un hepatocītu vakuolizācija (). AP pieaugums tiek uzskatīts par jutīgu holestāzes marķieri suņiem, tomēr jāņem vērā, ka šis enzīms atrodas gandrīz visos audos, tāpēc paaugstinājums iespējams arī osteoblastu pastiprinātas darbības gadījumos vai pie endokrīnām slimībām. Kortikosteroīdu inducēto fermentu hepatocīti sāk sintezēt, reaģējot uz ilgstošu vai atkārtotu kortikosteroīdu iedarbību, un tas ir specifisks tikai suņiem. Atšķirībā no citām AP izoformām, kAP ir termostabils, un šo īpašību izmanto laboratorijā, lai diferencētu kortikosteroīdu inducētu hepatopātiju no citu aknu slimību izraisītas AP palielināšanās (Teske, 1999; Feldman & Nelson, 2014; Szarek et al., 2014; Abdou et al., 2013; Sieber-Ruckstuhl et al., 2019; Chen et al., 2025).

Jaunākie pētījumi uzsver kAP kā vienu no nozīmīgākajiem diferenciāldiagnostiskajiem marķieriem suņiem ar paaugstinātu aknu enzīmu aktivitāti. Piemēram, (Tinted et al. 2023) & (Assawarachan et al. 2023) parāda, ka kAP noteikšana serumā palīdz ne tikai diagnosticēt kortikosteroīdo hepatopātiju, bet arī atšķirt to no citām hepatobiliārām slimībām, kurām raksturīgs AP pieaugums. Tādējādi kAP mūsdienās tiek uzskatīts par vienu no svarīgākajiem bioķīmiskajiem rādītājiem veterinārajā hepatoloģijā.

1.2.5. Kortikosteroīdu ietekme uz aknu morfofunkcionālo stāvokli suņiem

Kortikosteroīdu terapija suņiem bieži izraisa raksturīgas aknu strukturālās un funkcionālās izmaiņas, kas literatūrā pazīstamas kā steroīdā hepatopātija. Šīs pārmaiņas var attīstīties jau dažu dienu laikā pēc terapijas uzsākšanas (Feldman & Nelson, 2014; Elkholly et al., 2020). Jaunākie pētījumi apstiprina, ka steroīdā hepatopātija ir viena no biežākajām iatroģenajām aknu patoloģijām suņiem, un tās attīstībā nozīmīga ir ne tikai glikogēna uzkrāšanās hepatocītos, bet arī oksidatīvā stresa un mitohondriju disfunkcijas mehānismi, kas var izraisīt progresējošu hepatocītu bojājumu (Boretti et al., 2025). Ir konstatēts, ka ilgstoša kortikosteroīdu lietošana veicina stellāta šūnu aktivāciju un fibrozes attīstību, kas var būt neatgriezeniska, īpaši predisponētām šķirnēm, piemēram, retrīveriem (Peyron et al. 2015). Turklāt jaunākie darbi uzsver, ka šīs izmaiņas biežāk novērojamas vecākiem dzīvniekiem, kuriem samazināta aknu reģeneratīvā spēja un lielāka jutība pret metabolisko stresu (Elkholly et al., 2020).

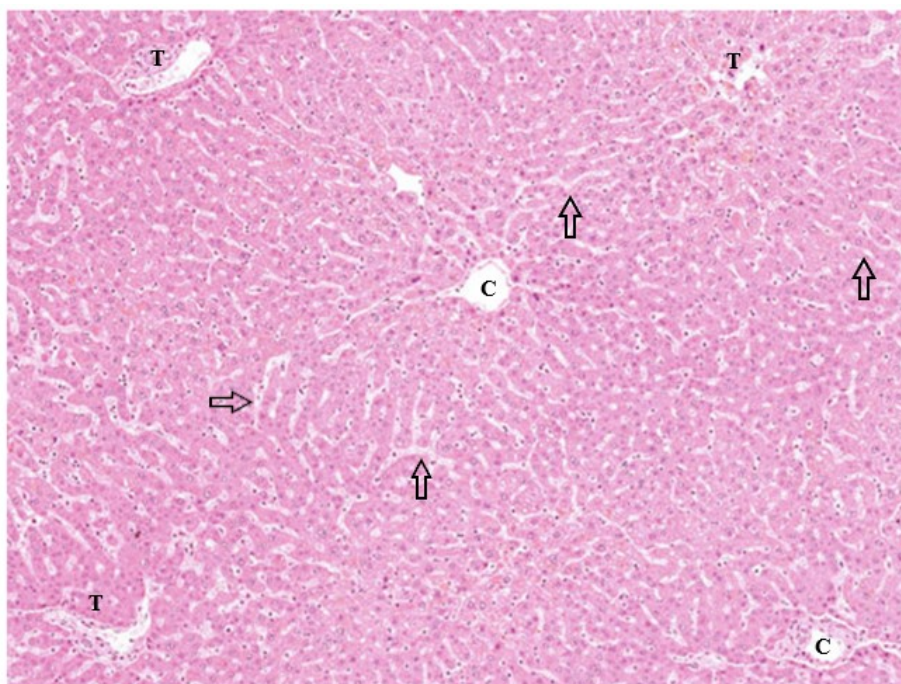
Pētījumos ar bīgliem, kuriem intramuskulāri tika ievadīts prednizolona acetāts devā 4 mg/kg dienā līdz 24 dienām, konstatēts ievērojams aknu enzīmu aktivitātes pieaugums, īpaši AP, GGT un ALT (Rutgers et al., 1995). Mikroskopiski hepatocītos novērota vakuolizācija, intracelulāra glikogēna uzkrāšanās un šūnas tilpuma palielināšanās. Savukārt elektronmikroskopiskajā līmenī aprakstīta organellu pārbīde uz citoplazmas perifēriju un žults kanāliņu izplešanās (Sobczak-Filipiak et al., 2014).

Klasiskajos pētījumos pierādīts, ka suņiem, kuri saņēma prednizolonu gan orāli, gan intramuskulāri, hepatocītu izmērs palielinājās līdz pat 5-10 reizēm, citoplazmā konstatēta masīva glikogēna uzkrāšanās, organellu samazināšanās un to pārvietošana uz šūnas perifēriju. Kortikosteroīdu inducētās hepatopātijas gadījumos izmaiņas skar ne tikai hepatocītus, bet arī perisinusoidālās stellāta šūnas, kas aktivācijas rezultātā sāk proliferēt. Šīs šūnas veicina kolagēna uzkrāšanos sinusoīdu sienās, kas sākotnēji izraisa tikai subklīniskas pārmaiņas, bet ilgtermiņā var veicināt strukturālus aknu bojājumus un fibrotisku procesu attīstību (Sobczak-Filipiak et al., 2014).

1.2.6. Aknu histopatoloģiskā izmeklēšana

Aknu histopatoloģiskā izmeklēšana var sniegt ieskatu par izmaiņu smagumu un progresijas pakāpi, histoloģiski izvērtējot to, kā aknu bojājums ir ietekmējis daiviņu kopējo struktūru un izmainījis asinsvadus. Lai varētu aprakstīt un interpretēt patoloģiskās izmaiņas aknās, ir svarīgi zināt veselu aknu mikroskopisko anatomiju. Tāpat ir svarīgi zināt pareizas aknu biopsijas ieguves tehnikas, parauga apstrādes un krāsošanas metodes, lai pēc iespējas precīzāk identificētu morfoloģiskās izmaiņas un spētu tās atšķirt no artefaktiem (Chan et al., 2014; Cavin, 2025).

Veselu aknu funkcionālo pamatstruktūru veido epitēlija šūnas – hepatocīti, kas sakārtoti kā plānas plātnītes un atdalīti ar sinusoīdiem. Histoloģiski krāsojot ar hematoksilīnu un eozīnu (H&E) krāsošanas metodi, hepatocītus redz kā eozinofīlās krāsas plātnes ar tumšu, apaļu kodolu. Savukārt sinusoīdus redz kā bāli iekrāsotu telpu starp hepatocītiem (Young et al., 2011; Chan et al., 2014, Cavin, 2025). Normāla aknu histoloģija apskatāma 1.4. attēlā:



1.4. att. Aknu histoloģiskā uzbūve H&E x100 (Chan et al., 2014)

C – centrālā vēna;

T – aknu triāde (interlobulārā vēna, artērija, žultsvads);

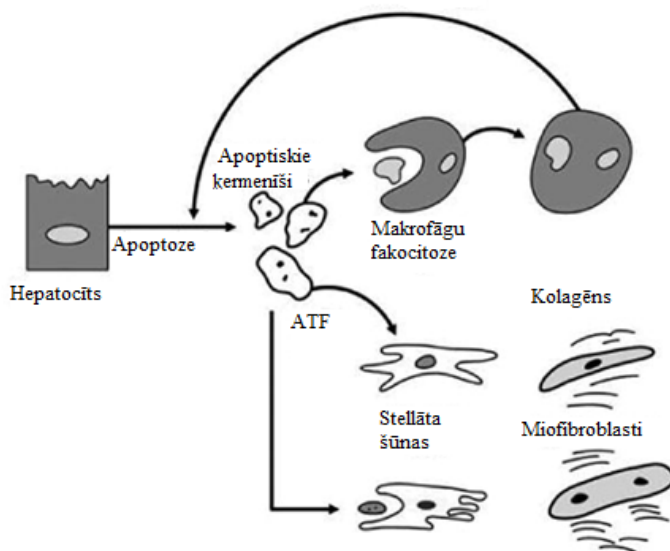
→ - sinusoīdi.

Kortikosteroīdu izraisītas hepatopātijas gadījumos hepatocīti palielinās izmērā divas līdz desmit reizes; citoplazmā redzams smalks tīklojums un dažādu izmēru brīvas telpas, bet kodoli bieži tiek pārvietoti uz šūnas perifēriju. Šūnās novēro arī vakuolizāciju, ko var izraisīt glikogēna, ūdens vai lipīdu uzkrāšanās. Aknu parenhīmā var būt novērojama neliela segmentkodolaino neitrofilo leukocītu infiltrācija. Glikogēns uzkrājas joslās vai ir izkliedēts kā atsevišķas neregulāras granulas, vai arī novērojams kā sakopojumi (t.s. glikogēna rozetes) hepatocīta citoplazmā (Young et al., 2011; Szarek et al., 2014; Chan et al., 2014, Cavašin, 2025). Kortikosteroīdu izraisītas hepatopātijas histoloģiskajā izmeklēšanā aknās saskaņā ar J. Szarek un līdzautoru pētījumu rezultātiem (2014) var redzēt dažādu izmēru vai lielākus par normāliem hepatocītus ar nobīdītiem kodoliem, neregulāru glikogēna uzkrāšanos un stellāta šūnu skaita palielināšanos. Retākas pārmaiņas ir lipīdu vakuolas hepatocītos, daži neitrofilie leukocīti mazajos asinsvados, pericelulāra fibroze un kolagēna šķiedras.

Lai pierādītu augstāk minētās izmaiņas, aknu histoloģiskos paraugus pakļauj rutīnas izmeklēšanai ar hematoksilīnu un eozīnu (H&E) krāsošanu. Savukārt krāsojot ar Massona trihroma (Masson's Trichrome) krāsām, var redzēt tādas izmaiņas kā fibroze un ciroze. Lai noteiktu specifiskas vielas, piemēram, glikogēnu, var izmantot periodskābes Šifa (PAS) krāsošanas metodi (Rothuizen et al., 2006).

Aknu saistaudu izcelsmes stellāta šūnas (Ito šūnas, lipocīti) var tikt novērotas perisinusoīdajā Disē telpā viscauri aknu parenhīmai. Stellāta šūnas ir daudzfunkcionālas gan normālos apstākļos, gan aknu bojājumu gadījumos. Tās akumulē A vitamīnu, regulē normālu asinsriti caur sinusoīdiem, piedalās medikamentu detoksikācijā, kā arī producē kolagēnu un nodrošina imunoloģiskās reakcijas. Gadījumos, kad novērojami aknu bojājumi, šīs šūnas proliferē, producē vairāk kolagēna un veido miofibroblastus, kā arī ir primārais svarīgākais komponents aknu fibrinoģenēzē (Young et al., 2011; Puche et al., 2013; Szarek et al., 2014).

Aknu hepatocītu bojājuma gadījumā notiek to apoptoze, kas ierosina divas reakcijas, kas attēlotas 1.5 attēlā, stellāta šūnu aktivācija un pārveidošanās par miofibroblastiem (izraisa fibrozi un vēlāk cirozi) vai arī apoptotisko šūnu fagocitoze. Stellāta šūnas pēc aktivācijas pārveidojas par gludās muskulatūras α -aktīnu (α -SMA), ko histoloģiski iespējams noteikt ar imūnhistoķīmiju (Guicciardi & Gores, 2010; Szarek et al., 2014).



1.5. att. Šūnu aktivizēšanās mehānisma sakarība starp hepatocītu apoptozi un aknu fibrinoģenēzi (Guicciardi & Gores, 2010)

Mūsdienās aknu histopatoloģiskā izmeklēšana tiek uzskatīta par zelta standartu hronisku aknu slimību diagnostikā, jo tā ļauj tieši novērtēt iekaisuma aktivitāti, steatozi un fibrozes pakāpi, kas ir būtiski slimības prognozes noteikšanai un ārstēšanas izvērtēšanai. Biopsija ir īpaši nozīmīga gadījumos, kad neinvazīvie izmeklējumi nesniedz pietiekamu precizitāti vai ir pretrunīgi (Cavasin, 2025). Histoloģiskajā praksē plaši tiek izmantotas validētas gradācijas sistēmas, piemēram, NAS un SAF, kā arī Ishak un METAVIR fibrozes skalas, kas palīdz standartizēti noteikt bojājuma smagumu un salīdzināt datus dažādos pētījumos (Leow et al., 2022; Takahashi et al., 2023; Habermaass et al., 2025).

Jaunākie pētījumi liecina, ka digitālā patoloģija un mākslīgais intelekts ļauj precīzāk novērtēt steatozes apjomu un fibrozes sadalījumu, samazinot vērtētāja subjektivitāti (Yuan et al., 2024; Kostadinova et al., 2024). Papildus klasiskajām metodēm arvien lielāku nozīmi iegūst telpiskās un molekulārās pieejas, kas integrē histoloģisko novērtējumu ar transkriptomu vai proteomu datiem, sniedzot iespēju atklāt slimības heterogenitāti audu līmenī un dziļāk izprast patoģenēzi (Watson et al., 2025; Xin et al., 2023). No klīniskā viedokļa biopsijas rezultāti bieži ir prognostiski nozīmīgāki par neinvazīvām metodēm, īpaši fibrozes pakāpes noteikšanā, kas ir galvenais aknu slimību progresijas faktors (Frączek et al., 2025). Nākotnes virziens ir histoloģijas integrācija ar digitālām un molekulārām metodēm, lai samazinātu diagnostikas kļūdas un paaugstinātu izmeklējumu precizitāti (Yuan et al., 2024; Kostadinova et al., 2024).

1.2.7. Citas metodes hepatopātijas apstiprināšanai

Dzīvniekam aknu slimību klīniskās pazīmes parādās tikai tad, kad aknu funkcionālās rezerves ir izsmeltas, kas parasti notiek jau smagā un bieži vien neatgriezeniskā slimības stadijā. Arī klīniskās pazīmes bieži vien ir nespecifiskas – depresija, anoreksija, letargija, svara zudums, poliūrija un polidipsija, icterus (Webster & Cooper, 2020). Ir svarīgi noskaidrot hepatopātijas cēloni – vai tas ir primārs vai sekundārs. Sekundārās aknu slimības parasti pāriet pašas, ja

primārās slimības cēlonis ir pareizi ārstēts un novērsts. Tā kā šīs pazīmes ir nespecifiskas un var neparādīties visiem dzīvniekiem, tad ir nepieciešama relatīvi viegla un neinvazīva izmeklēšanas metode, kā, piemēram, vēdera dobuma ultrasonogrāfija un radiogrāfija (Butler & Bexfield, 2024; Gandini et al., 2021).

Viena no visprecīzākajām neinvazīvās diagnostikas metodēm difūzu aknu bojājumu un cirozes diagnostikā ir ultrasonogrāfija, jo izmantojot to var novērtēt aknu parenhīmas struktūru (Kemp et al., 2013; Assawarachan et al., 2019). Normāli aknu parenhīma ir homogēna, un vairāk ehogēna nekā liesa (aknu-liesas ehogenitāte). Ehogenitātes palielināšanās ir tipiska tādām slimībām kā limfosarkoma, aknu lipidoze, ciroze vai kortikosteroīdu izraisīta hepatopātija (Assawarachan et al., 2019). Nevar izslēgt arī to, ka ultrasonogrāfiskā izmeklēšana var neuzrādīt izmaiņas aknās arī pie smagām saslimšanām (Kemp et al., 2013). Jaunākie pētījumi uzsver, ka ultrasonogrāfijas diagnostisko vērtību iespējams būtiski uzlabot, izmantojot kontrastvielu (CEUS) un elastogrāfiju, kas ļauj precīzāk novērtēt fibrozes pakāpi un hemodinamiskās izmaiņas aknās (Burti et al., 2020; Cha et al., 2022; Pi et al., 2023).

Vēdera dobuma radiogrāfisko izmeklēšanu var pielietot, lai noskaidrotu aknas izmēru, novietojumu un formu, kā arī papildus abdominālās patoloģijas, ja tādas ir. Iegūtajā attēlā novērtē, vai aknas ir palielinātas vai samazinātas, un nosaka, kāda ir to forma. Gadījumos, kad ir pievienojies ascīts, radiogrāfiskā izmeklēšana ir apgrūtināta, jo šķidrums vēdera dobumā apgrūtinā vizualizēt vēdera dobuma orgānus (Gandini et al., 2021).

Klīniskās patoloģijas un vizuālās diagnostikas atradnes ne vienmēr var skaidri norādīt uz konkrētām aknu slimībām, tāpēc diferenciāldiagnozei izmeklējumus ieteicams papildināt ar ultrasonogrāfijas kontrolē veiktu aknu biopsiju, lai pēc iegūtā biopātā histoloģiskās izmeklēšanas noteiktu galīgo diagnozi (Abdou et al., 2013; Kemp et al., 2013). Var tikt pielietota arī aknu citoloģiskā izmeklēšana, paraugus iegūstot ar t.s. “adatas lūmena aspirācijas” („fine needle aspiration”) metodi, kas ir minimāli invazīva, neprasa speciālu aprīkojumu un ir pietiekoši droša, bet šai metodei ir ierobežotas diagnostiskās iespējas (Courtman & Quilez, 2025; Fleming et al., 2019). Pēdējos gados aprakstīta arī šķidrumā balstītās citoloģijas (liquid-based cytology) izmantošana, kas uzlabo šūnu saglabāšanos un ļauj detalizētāk izvērtēt hepatocītu morfoloģiju (Brilhante-Simões et al., 2025). Tomēr tieši histopatoloģiskais novērtējums ir izšķirošs, lai noteiktu aknu slimību, slimības cēloni un iespējamās sekas (Webster et al., 2019; Assawarachan et al., 2023). Dzīvnieks pēc aknu biopsijas jānovēro vismaz 12 stundas, lai pārliecinātos, ka nav iekšējās asiņošanas no biopsijas ņemšanas vietas (Assawarachan et al., 2023). Jaunākās pieejas ietver digitālās patoloģijas un mākslīgā intelekta pielietošanu aknu histopatoloģisko izmeklējumu analīzē, kas ļauj samazināt vērtētāja subjektivitāti un nodrošina augstāku reproducējamību (Onoiu et al., 2025; Kostadinova et al., 2024; Yuan et al., 2024).

1.3. Hepatoprotektanti

Saprotot ne tikai vēlamās kortikosteroīdu terapeitiskos efektus, bet arī to negatīvo ietekmi uz aknām, zinātnieki meklē un pēta iespējas, kā mazināt hepatopātijas attīstību. Šādus līdzekļus kopumā dēvē par hepatoprotektantiem. Hepatoprotektanti stabilizē metabolismu aknu šūnās, aktivizējot intracelulāro metabolismu un aknu fermentu aktivitāti, nomāc lipīdu peroksidāciju un aizsargā šūnu apvalkus no bojājumiem, veicina šūnās olbaltumvielu sintēzi, neitralizē brīvos radikāļus un pastiprina reģeneratīvos procesus aknu parenhīmā. Izpētīts, ka šo pozitīvo ietekmi uz aknām var veikt dažādi augu ekstrakti, vitamīni, aminoskābes un citas bioloģiski aktīvas vielas, kas aknās veicina dabīgos šūnu aizsargprocesus. (Center et al., 2005; Mishra et al., 2013; Elhosiny et al., 2024; Giannetto et al., 2022; Khalphallah et al., 2025; Lee et al., 2025).

1.3.1. Augu valsts izcelsmes produkti ar hepatoprotektīvām īpašībām

Ārstniecisko augu pielietošana pacientiem ar aknu slimībām ir sākusies Ķīnas tautas medicīnā 20. gs. vidū, kur tika izmantotas dažādu augu kombinācijas hepatīta ārstēšanā. Savukārt mūsdienās šāda ārstēšanas sistēma balstās uz jaunākajām diagnostikas metodēm un terapijā izmantotām augu valsts produktu dažādām kompozīcijām (Cohen, 2008). Augu ekstrakti neārstē, bet gan var aizkavēt aknu šūnu bojājumu un fibrozes veidošanos (Westra et al., 2014). Šiem preparātiem piemīt antioksidatīvas spējas, kas tiek realizētas caur bioaktīvo mehānismu, novēršot brīvo radikāļu veidošanos un mazinot to izraisīto šūnu oksidatīvo stresu (Miccadei et al., 2008; Machado et al., 2023). Pēdējos gados arvien vairāk pētījumu apliecina, ka fitogēnie savienojumi, īpaši polifenoli, flavonoīdi un saponīni, spēj ne tikai samazināt oksidatīvo stresu, bet arī regulēt iekaisuma citokīnu ekspresiju, uzlabot lipīdu metabolismu un aknu mikrocirkulāciju (Akçakaya, 2024; Cao et al., 2024; Quesada-Vázquez et al., 2024).

Pasaulē ir izmēģinātas daudzas un dažādas augu grupas, bet tikai dažas no tām ir tuvāk izpētītas tieši aknu šūnu aizsardzībai. Kā populārākie un efektīvākie augu valsts pārstāvji tiek minēti mārdadzis (*Silybum marianum*), kurkuma (*Curcuma longa*), artišoks (*Cynara scolymus*) (Luper, 1999; Hewlings & Kalman, 2017; Abenavoli et al., 2018; Miccadei et al., 2008; Panahi et al., 2018). Turklāt jaunākajos pētījumos tiek uzsvērtā šo augu sinerģiskā iedarbība, kombinējot tos ar citiem komponentiem, piemēram, holīnu, L-cisteīnu un E vitamīnu. Šādas kombinācijas būtiski uzlabo aknu enzīmu profilu, samazina ALAT, ASAT un ALP aktivitāti, kā arī mazina hepatocītu vakuolizāciju un oksidatīvā stresa marķierus (Giannetto et al., 2022).

Silybum marianum (mārdadzis) ir pasaulē viens no labāk izpētītajiem un senāk lietotajiem augiem aknu slimību ārstēšanā. Sākotnēji tas tika izmantots kā žults dzenošais līdzeklis, kā arī, lai novērstu aknu un liesas asinsvadu obstrukciju. No tā augļiem un sēklām iegūst ekstrakta maisījumu, ko pazīst kā silimarīnu. Relatīvi nesenos pētījumos atklāts, ka silimarīns paātrina akūtu un hronisku aknu slimību ārstēšanu. Tam piemīt antioksidatīva, hepatoprotektīva, antifibrotiska, membrānu stabilizējoša un pretiekaisuma darbība, ko pastiprina silimarīna sastāvā esošās neaizvietojamās taukskābes (Abenavoli et al., 2018; Bijak, 2017). Jaunākie darbi apstiprina, ka silimarīns var modulēt arī hepatocītu mitohondriju funkciju, samazinot brīvo radikāļu veidošanos un uzlabojot ATF sintēzi, kas būtiski uzlabo aknu šūnu reģeneratīvo potenciālu (Surai, 2015).

Silimarīns, nonākot organismā, izdalās caur žultsvadiem, nodrošinot tiešu iedarbību aknās. Tas pasargā aknu šūnas no toksīnu iedarbības, išēmijas, radiācijas un virusālā hepatīta. Papildus tam silimarīns samazina stellāta šūnu proliferāciju, kā arī novērš šo šūnu pārveidošanos par miofibroblastiem, kas izraisa fibrozi (Bijak, 2017).

Eksperimentos ar žurkām, kurām eksperimentāli ar nātrija nitrītu tika izraisīta aknu patoloģija, silimarīns uzrādīja ārstniecisko efektu, veicinot antioksidatīvus, pretiekaisuma, antiapoptotisku un antifibrotisku iedarbību (Sherif & Al-Gayyar, 2013). Turklāt jaunākajos salīdzinošajos pētījumos, kuros tika novērtēta augu maisījuma (kurkumas un granātābola mizas ekstrakts) efektivitāte, pierādīts, ka šāda kombinācija spēj samazināt kortikosteroīdu inducētu hepatopātiju un atjaunot aknu histoloģisko struktūru ievērojami efektīvāk nekā sintētiski preparāti (Khalphallah et al., 2025).

Humānajā medicīnā ir daudzkārt pierādīts, ka silimarīna lietošana būtiski samazina tādu aknu enzīmu aktivitāti kā GGT, ALAT un ASAT (novērots pēc četrus nedēļus līdz sešu mēnešu lietošanas), kā arī ir redzami ievērojami uzlabojumi histopatoloģiskajā ainā – būtiski samazināts fibrozo audu daudzums. Pēc silimarīna lietošanas parasti nav novērojami blakusefekti neatkarīgi no devas un lietošanas ilguma (Surai, 2015; Loguercio, 2011; Federico et al., 2017).

Pēdējo gadu pētījumi rāda, ka kurkumīns (no *Curcuma longa* saknēm) izrāda hepatoprotektīvu, antioksidatīvu un pretiekaisuma efektu aknām. Pētījumos dzīvnieku modeļos ir konstatēta samazināta taukskābju akumulācija hepatocītos, paaugstināta glutathiona S-transferāzes aktivitāte, toksīnu izvadīšanas procesa aktivizācija un aknu audu fibrozes

progresijas palēnināšanās. Piemēram, meta-analīze ar dzīvniekiem atklāja, ka kurkumīna terapija būtiski uzlaboja aknu funkcijas un samazināja fibrozes grādu (Huang et al., 2024). Turklāt pārskats par hroniskām aknu slimībām norāda, ka kurkumīns var iedarboties caur vairākām molekulārajām ceļiem (piemēram, NF- κ B), lai kavētu iekaisumu, oksidatīvo stresu un ekstracelulārā matricas veidošanos (Sun, 2025). Tomēr cilvēku klīniskajā praksē pierādījumu apjoms joprojām ir ierobežots, nesniedzot klīniskais pētījums ar nano-kurkumīnu parādīja aknu enzīmu uzlabošanos, bet izmaiņas fibrozes vai steatozes indeksā netika statistiski nozīmīgi apstiprinātas (Gerami et al., 2025).

Cynara scolymus (artišoks) ekstraktam piemīt antioksidatīva un pretiekaisuma iedarbība, un tas nodrošina arī aknu detoksikācijas procesus. Artišoks fitoterapijā tiek izmantots augstā polifenola un inulīna satura dēļ. No lapām iegūtais ekstrakts tiek uzskatīts par hepatoprotektīvu. Jaunākos pētījumos novērots, ka artišoka ekstrakts var uzlabot arī hepatocītu lipīdu profilu un samazināt oksidatīvā stresa marķierus, īpaši kombinācijā ar silimarīnu un kurkumīnu (Miccadei et al., 2008; Ben Salem et al., 2017; Porro et al., 2024; Colak et al., 2016; Giannetto et al., 2022).

1.3.2. Vitamīnu nozīme aknu funkciju uzturēšanā un atjaunošanā

Vitamīni ir dažādas ķīmiskas uzbūves organiski savienojumi, kas normālu dzīvības procesu nodrošināšanai dzīvnieka un cilvēka organismā salīdzinājumā ar galvenajām uzturvielām (olbaltumvielām, taukiem, ogļhidrātiem un minerālvielām) ir nepieciešami mazākā daudzumā. Daļa no vitamīniem organismā netiek sintezēti, tāpēc tie jāuzņem ar dzīvnieku vai augu izcelsmes barības produktiem (Purviņš un Purviņa, 2011). Jaunākie pētījumi liecina, ka noteikti vitamīni, piemēram, E un D vitamīns, kā arī B grupas vitamīni un antioksidatīvie savienojumi, tādi kā C un A vitamīni, spēj būtiski ietekmēt hepatocītu oksidatīvo statusu, samazinot lipīdu peroksidāciju, uzlabojot glutatona metabolismu un mazinot iekaisuma citokīnu, tostarp TNF- α un IL-6, ekspresiju dažādos aknu bojājuma modeļos (Reda et al., 2023; Vogli et al., 2023; Tao et al., 2020).

Holīns (B₄ vitamīns) ir būtisks hepatocītu strukturāls un funkcionāls komponents, kas stabilizē šūnu membrānas, piedalās fosfolipīdu sintēzē un veicina normālu tauku transportu aknās, novēršot taukaino deģenerāciju. Pierādīts, ka holīna deficīts izraisa izteiktu triglicerīdu akumulāciju hepatocītos un veicina nealkoholiskās taukaino aknu slimības progresēšanu (Corbin & Zeisel, 2012). Eksperimentālie pētījumi ar dzīvniekiem rāda, ka optimāla holīna un betaina uzņemšanas attiecība būtiski mazina aknu lipīdu uzkrāšanos un uzlabo tauku metabolismu, kas īpaši svarīgi aptaukošanās un ar uzturu inducētas hepatopātijas gadījumos (Chang et al., 2022). Savukārt cilvēku epidemioloģiskie dati liecina, ka uztura holīna nepietiekamība ir saistīta ar paaugstinātu NAFLD risku, savukārt pietiekama tā uzņemšana (piemēram, ar olām) uzlabo aknu lipīdu līdzsvaru un samazina metabolisko slodzi radīto bojājumu (Yiannakou et al., 2025). Tā kā organisms pats nespēj sintezēt pietiekamu holīna daudzumu, monogastriskiem dzīvniekiem un cilvēkiem tas obligāti jāuzņem ar uzturu vai uztura bagātinātājiem.

Piridoksīns jeb B6 vitamīns organismā fosforilējas par koenzīma piridoksālfosfātu, kas organismā, tai skaitā aknās, piedalās dažādos slāpekļa vielmaiņas procesos (aminoskābju transaminēšana, dezaminēšana un dekarboksilēšana) (Purviņš un Purviņa, 2011). Papildu jaunākie dati liecina, ka B6 vitamīna pietiekamība ir būtiska oksidatīvā stresa un homocisteīna līmeņa samazināšanai, tādējādi mazinot fibrozes progresēšanu (Peng et al., 2025).

Cianokobalamīns jeb B12 vitamīns ir ūdenī šķīstošs, tas ir komplekss savienojums, kura molekulā ir kobalta atoms. Organisma audi šo vitamīnu neveido, bet to sintezē mikroorganismi (baktērijas, aktinomīces, aļģes). Tomēr zarnu mikroflora šo vitamīnu nespēj sintezēt pietiekamā daudzumā, tāpēc tas papildus jāuzņem ar zivīm, pienu un gaļu. Uzsūcoties organismā, B12 vitamīns saistās ar plazmas proteīnu transkobalmīnu, ar kura palīdzību vitamīns nokļūst audos

un depo orgānos – aknās un nierēs. Aktīvā koenzīma forma piedalās kustīgo metilgrupu un ūdeņraža pārveidā, līdz ar to ietekmējot nukleīnskābju un olbaltumvielu metabolismu. B12 vitamīns ir nepieciešams asinsradē, epitēlijšūnu veidošanā, nervu sistēmas funkcionēšanā, augšanas un reģenerācijas procesos visā organismā (Purviņš un Purviņa, 2011). Jaunākie pētījumi rāda, ka B12 vitamīna deficīts korelē ar paaugstinātu oksidatīvo stresu un glutaciona samazināšanos, tāpēc tā papildināšana hepatopātiju laikā palīdz atjaunot aknu antioksidatīvo kapacitāti (Talari et al., 2022; van de Lagemaat et al., 2019).

Alfa-tokoferols jeb vitamīns E ir taukos šķīstošs antioksidants, kas galvenokārt novērš organismā zema blīvuma lipoproteīnu oksidāciju un peroksīdu veidošanos (Frei, 1994). Papildus antioksidatīvajām īpašībām E vitamīnam novērta spēja kavēt gludās muskulatūras proliferāciju, leukocītu adhēziju un normālas vazodilatācijas saglabāšanu (Purviņš un Purviņa, 2011). Turklāt jaunākie pētījumi ar suņiem un laboratorijas dzīvniekiem pierāda, ka E vitamīna papildināšana var būtiski samazināt kortikosteroīdu izraisīto hepatocītu bojājumu, atjaunojot šūnu membrānu stabilitāti un samazinot malondialdehīda līmeni serumā (Demirel-Yalciner et al., 2021).

Retinols jeb vitamīns A arī ir taukos šķīstošs antioksidants, bet nav tik iedarbīgs kā vitamīns E. Tas pilda svarīgu lomu oksidēšanās un reducēšanās procesos organismā, kā arī piedalās mukopolisaharīdu, olbaltumvielu un lipīdu sintēzē, kalcija absorbcijā. Nodrošina normālu redzi (piedalās acs tīklenes redzes pigmenta rodopsīna sintēzē), ādas, gļotādas un dziedzeru normālu epitēlijšūnu stāvokli un funkciju (Purviņš un Purviņa, 2011). Jaunākie dati liecina, ka retinola un tā metabolītu (retinoīdu) regulēta signālu pārraide stellāta šūnās var būt būtisks mehānisms fibrozes mazināšanā un aknu reģenerācijas veicināšanā (Chen, 2023).

Askorbīnskābe jeb vitamīns C, atšķirībā no vitamīna A un E, ir ūdenī šķīstošs antioksidants. Tas piedalās kolagēna, kateholamīnu biosintēzē, novērš reaktīvo skābekļa molekulu un brīvo radikāļu veidošanos (Frei, 1994; Zheng et al., 2024). C vitamīns jeb askorbīnskābe organismā neveidojas, tas jāuzņem galvenokārt ar augu valsts produktiem – saknēm, ogām, augļiem. Askorbīnskābe pastiprina asins recēšanu, samazina kapilāru caurlaidību, stimulē audu reģenerāciju un kortikosteroīdu sintēzi, aktivē dažādus fermentus organismā. Audu reģenerācijas stimulāciju nodrošina ar kolagēna sintēzes procesa veicināšanu, kā rezultātā nostiprinās asinsvadu sienas, samazinās to caurlaidība un paātrinās audu reģenerācija (Purviņš un Purviņa, 2011). Pētījumi pēdējos gados apstiprina, ka C vitamīns var sinerģiski pastiprināt E vitamīna antioksidatīvo efektu un mazināt kortikosteroīdu inducētu oksidatīvo bojājumu hepatocītos (He et al., 2021; Ogunleye et al., 2025).

1.3.3. Aminokābes aknu funkciju atbalstam

S-adenosilmetionīns (SAM) ir endogēna molekula, kura tiek veidota organismā no aminoskābēm un adenozintrifosforskābes (ATF). Šī molekula ir īpaši svarīga aknu šūnu sastāvdaļa, jo palīdz saglabāt šūnu membrānas struktūru, sastāvu un funkciju. SAM piedalās glutaciona produkcijā, kas savukārt aizsargā aknas no oksidatīva stresa. Papildus tas piedalās normālu iekaisuma procesu veidošanā un veicina analģēziju, kā arī piedalās šūnu fosfolipīdu sintēzē, kas savukārt nodrošina šūnas veselumu, membrānu noturību un funkciju (Center et al., 2002; Baden et al., 2024).

Cilvēkiem ir novērots, ka SAM veidošanās ir traucēta pie dažādām aknu saslimšanām, kas rezultējas ar samazinātu glutaciona produkciju un paaugstinātiem oksidatīvā stresa rādītājiem. Suņiem līdzīgas izmaiņas var novērot pie steroīdās hepatopātijas. Tāpēc ir dažādi hepatoprotektanti, kuru sastāvā ir atrodams S-adenosilmetionīns. Tas paaugstina glutaciona koncentrāciju, kā arī tas nav toksisks ne veseliem, ne slimiem dzīvniekiem (Baden et al., 2024).

Tomēr jaunākie sistemātiskie pārskati un klīniskie pētījumi liecina, ka S-adenosilmetionīna (SAM) efektivitāte hronisku aknu bojājumu gadījumos ir neviennozīmīga un lielā mērā atkarīga no slimības stadijas un etioloģijas. Metaanalīzē par dažādām hroniskām

aknu slimībām SAM lietošana uzlaboja atsevišķus bioķīmiskos rādītājus (piemēram, bilirubīna un ASAT līmeni), taču netika pierādīta konsekventa ietekme uz fibrozes regresiju vai pacientu izdzīvošanu, turklāt pieejamie pētījumi vērtēti kā mazas kvalitātes un ar nelielām izlases kopām (Guo et al., 2015). Plašāki pārskati par SAM metabolismu hronisku aknu slimību un NAFLD kontekstā uzsver, ka gan SAM deficīts, gan vienoglekļa metabolisma traucējumi ir iesaistīti fibrozes progresēšanā, tomēr līdz šim nav pietiekamu datu, lai SAM rekomendētu kā primāru hepatoprotektantu dekompensētas cirozes stadijā, un tā lietošana drīzāk vērtējama kā iespējama papildterapija agrīnākos posmos (Anstee & Day, 2012; Li et al., 2020; Fernández-Ramos et al., 2022).

N-acetilcisteīns ir aminoskābes L-cisteīna acetilētā forma, kas hidrolizēta par cisteīnu. Tāpat kā SAM, arī N-acetilcisteīns piedalās glutathiona sintēzē, kas savukārt palīdz dažādu medikamentu detoksikācijā aknās (Li et al., 2023). Pētījumos ar suņiem un grauzējiem N-acetilcisteīns pierādījis spēju samazināt hepatocelulāro bojājumu, inducētu ar kortikosteroīdiem un acetaminofēnu, kā arī uzlabot aknu enzīmu aktivitāti un histoloģisko struktūru (Albeltagy, 2023; Li et al., 2023).

L-karnitīns ir aminoskābju derivāts, kas tiek sintezēts aknās, bet ir atrodamas arī skeleta un sirds muskulatūrā. Šī aminoskābe ir neaizstājams kofaktors, kas nodrošina taukskābju pārvešanu cauri mitohondriju membrānai, lai piedalītos oksidācijas procesos. Samazināta L-karnitīna koncentrācija organismā rezultējas ar šūnu oksidatīvo stresu. Jaunākie pētījumi liecina, ka L-karnitīna papildināšana samazina mitohondriju disfunkciju un lipīdu akumulāciju aknās, uzlabojot hepatocītu enerģijas metabolismu un kavējot fibrozes attīstību (Savic et al., 2020; Li & Zhao, 2021; Liu et al., 2023).

1.3.4. Antioksidanti aknu šūnu aizsardzībā

Iekaisuma, hemodinamikas traucējumu (t.sk. pazemināta asinsspiediena), toksīnu un citu aknu slimību gadījumos hepatocītos aktivējas reaktīvo skābekļa formu veidošanās un attīstās oksidatīvais stress, kas bojā šūnu membrānas, starpšūnu kontaktus un ekstracelulāro matrici, veicinot fibrozes un cirozes progresēšanu (Cichoż-Lach & Michalak, 2014; Banerjee et al., 2023; Allameh et al., 2023). Tas saistīts ar to, ka aknas ir galvenais organisma detoksikācijas orgāns ar augstu metabolo aktivitāti – hepatocīti pastāvīgi ir pakļauti ROS, kas rodas mitohondriju oksidatīvās fosforilācijas un ksenobiotiķu biotransformācijas laikā (Hurtado-Carneiro et al., 2021). Lipīdu peroksidācijas produkti, kas veidojas, oksidējoties polinepiesātinātajām taukskābēm šūnu membrānās, ne tikai pastiprina steatozi, bet arī aktivē aknu stellāta šūnas un veicina fibrozes un hepatocelulārās karcinomas attīstību (Fu et al., 2018; Zhou et al., 2022).

Jaunākie pētījumi apstiprina, ka oksidatīvais stress un mitohondriju disfunkcija ir būtiski mehānismi hronisku aknu slimību un fibrozes attīstībā cilvēkiem un dzīvniekiem; tie saistīti ar traucētu enerģijas metabolismu, pastiprinātu ROS veidošanos un lipīdu peroksidāciju hepatocītos (Cichoż-Lach & Michalak, 2014; Shi et al., 2021; LeFort et al., 2024). Suņiem ar hiperkortisolismu un eksperimentāliem kortikosteroīdu modeļiem pierādīts, ka paaugstinās oksidatīvā stresa marķieri (piemēram, proteīnu karbonilācija, TBARS), kas atspoguļo kortikosteroīdu inducētu bojājumu hepatocītos (Kim et al., 2022; Karić et al., 2024). Eksperimentālos grauzēju aknu bojājuma modeļos ir konstatēts, ka mitohondriju mērķētie antioksidanti, piemēram, mitokvinola mezilāts un MitoTEMPO, spēj samazināt mitohondriju ROS un lipīdu peroksidāciju, mazināt iekaisuma mediatoru ekspresiju, hepatocītu apoptozi un aknu fibrozes progresēšanu dažādos toksiska bojājuma veidos (Rehman et al., 2016; Tao et al., 2024; Du et al., 2018).

Antioksidanti samazina reaktīvo skābekļa daļiņu veidošanos, pirms tie pagūst smagi bojāt organisma bioloģiskās makromolekulas, piemēram, nukleīnskābes, proteīnus un ogļhidrātus, kā arī novērš oksidatīvo bojājumu straujo izplatību, pārtraucot lipīdu peroksidācijas reakciju.

Oksidatīvais stress ietekmē arī šūnas organellas – galvenokārt mitohondrijus. Mitohondriju bojājumu sekas ir šūnu apoptoze vai skarto orgānu audu nekroze. Traucēta ir arī šūnu aizsargatbilde, jo tiek izjaukta citokīnu balance, kas atbild par iekaisuma veidošanu vai novēršanu. Tāpēc tiek meklēti antioksidanti, kuru sastāvā ir pietiekami mazas molekulas, lai tās varētu šķērsot mitohondriju sienas un uzkrāties tajos. Tie tiek saukti par mitohondriju mērķētiem antioksidantiem (Kelso et al., 2001; Murphy, 2008; Guicciardi & Gores, 2010; Wang, 2014; Lawrence & Steiner, 2015; Rehman et al., 2016; Murphy, 2016; Oyewole & Birch-Machin, 2015; Jiang et al., 2020; Fields et al., 2023).

Normālos metaboliskajos apstākļos katra organisma šūna ir pakļauta superoksīda molekulām ik dienas. Ja šie brīvie radikāļi nonāk savienojumā ar dzelzi vai varu, tad veidojas hidroksilradikāļi, kas ir ārkārtīgi reaktīvi un var nodarīt papildus smagus bojājumus šūnām un audiem kopumā, tāpēc arī jāievēro šo elementu līdzsvars organismā (Jomova et al., 2023).

Medicīnā viens no senāk pazīstamajiem antioksidantiem ir koenzīms Q (vitamīns Q) jeb ubikvinons. Tas ir vienīgais taukos šķīstošais antioksidants, ko dzīvnieka šūnas var sintezēt. Šis antioksidants ir dabīga mitohondriju respiratorās ķēdes sastāvdaļa un tiek sintezēts gandrīz visās organisma šūnās. Ubikvinons kā antioksidants inhibē lipīdu peroksidāzi bioloģiskajās šūnu membrānās un asins serumā esošajos zema blīvuma lipoproteīnos. Iekaisuma gadījumā tas novērš brīvo radikāļu veidošanos no neitrofilajiem leikocītiem. Ir pierādīts, ka koenzīms Q aizsargā mitohondriju iekšējo membrānu proteīnus un DNS no oksidatīvā stresa, novēršot lipīdu peroksidāciju (Ernster & Dallner, 1995; Kelso et al., 2001; Acosta et al., 2016; Hidalgo-Gutiérrez et al., 2021).

Ūdenī zemās šķīdības dēļ ubikvinonu ir grūti izmantot in vitro pētījumos. Lai paaugstinātu šī antioksidanta līmeni organismā un tieši mitohondrijos, dzīvniekiem tas jāuzņem ilgstoši. Tāpēc zinātnieku galvenais uzdevums bija izstrādāt mitohondriju selektīvu derivātu, kas spēj iekļūt tieši mitohondrijos un novērst tur veidojošos oksidatīvo bojājumu (Kelso et al., 2001).

Šobrīd par vienu no visefektīvākajiem mitohondriju antioksidantiem tiek uzskatīts mitokvinola mezilāts, kura struktūra nodrošina augstu selektivitāti mitohondrijos un spēju samazināt oksidatīvo stresu, iekaisuma mediatoru aktivitāti un hepatocelulāro bojājumu smagumu (Murphy, 2008; Fink et al., 2009; Rehman et al., 2016; Murphy, 2016; Wang et al., 2016; Rehman et al., 2016; Dou et al., 2021; Sulaimon et al., 2021; Turkseven et al., 2023). Jaunākajos pētījumos ar graužējiem un šūnu kultūrām pierādīts, ka mitokvinols ievērojami samazina aknu fibrozes un lipīdu uzkrāšanās pakāpi, kavējot stellāta šūnu aktivāciju un uzlabojot mitohondriju ATF sintēzi (Fink et al., 2021; Pang et al., 2025).

Mitokvinols ir ubikvinona derivāts ar selektīvu darbību tieši uz mitohondrijiem, bloķējot oksidatīvo iedarbību uz tiem. Šo selektivitāti nodrošina kovalents savienojums ar lipofilo trifenilfosfonijs katjonu caur alifātisko oglekļa ķēdi. Šie katjoni šķērso mitohondriju membrānu, kur tie savienojas ar lipīdu slāni un tiek reducēti respiratorajā ķēdē. Tādējādi mitokvinola mezilāts pārtrauc lipīdu peroksidāciju un pasargā mitohondrijus no oksidatīvajiem bojājumiem. Pēc reaktīvo skābekļa molekulu detoksifikācijas ubikvinona derivāts nokļūst atpakaļ respiratorajā ķēdē, kur atkal tiek pārstrādāts par aktīvu antioksidantu (Murphy, 2016).

Antioksidanti kā aknu citoprotektanti tiek izmantoti dažādās formās un no dažādiem izcelsmes produktiem, tomēr to iespēja pilnībā novērst vai atjaunot aknu funkcionālo stāvokli pēc kortikosteroīdu lietošanas suņiem joprojām nav pietiekami pētīta un zinātniski pierādīta (Bexfield & Watson, 2006). Lai gan jaunākie pētījumi cilvēkiem un laboratorijas dzīvniekiem liecina par antioksidantu pozitīvu ietekmi uz oksidatīvā stresa mazināšanu un hepatocītu aizsardzību (Rehman et al., 2016; Sulaimon et al., 2021; Turkseven et al., 2023; Jomova et al., 2023), specifiski dati par to efektivitāti kortikosteroīdu inducētās hepatopātijas gadījumā veterinārajā praksē šobrīd nav pieejami. Šī joma joprojām tiek uzskatīta par perspektīvu virzienu turpmākiem pētījumiem, īpaši attiecībā uz mitohondriju mērķētajiem antioksidantiem un to iespējamo lomu kortikosteroīdu izraisītu aknu bojājumu profilaksē un terapijā.

1.4. Literatūras apskata kopsavilkums

Aknas (*hepar*) ir centrālais vielmaiņas un detoksikācijas orgāns, kas vienlaikus nodrošina žults veidošanu un izdalīšanu, barības vielu (ogļhidrātu, tauku, olbaltumvielu, vitamīnu un minerālvielu) metabolismu, plazmas olbaltumvielu sintēzi, enerģijas rezervju uzkrāšanu glikogēna formā, kā arī hormonālu un medikamentozu vielu inaktivāciju. Suņiem aknu relatīvā masa ir ievērojama (vidēji ap 3% no dzīvmasas, ar šķirņu variācijām), un tās funkcionālā rezerve ir liela, tomēr aknu slimību klīniskās pazīmes parasti parādās tikai vēlīnās stadijās, kad kompensācijas mehānismi jau ir izsmelti. Tas padara aknu bojājumu agrīnu atpazīšanu, patoģenēzes izpratni un preventīvo aizsardzību iespēju izvērtējumu par īpaši aktuālu klīniskajā praksē.

Aknu morfofunkcionālā pamatvienība ir aknu daiviņa ar centrālo vēnu un perifēri izvietotu aknu triādi (interlobulārā vēna, artērija un žultsvads). Šīs struktūras nodrošina unikālu dubulto asins pieplūdi: vārtu vēna nogādā vielām bagātas venozās asinis no gremošanas trakta, bet aknu artērija piegādā oksigenētas asinis. Sinusoīdu īpašā uzbūve (logotais endotēlijs ar spraugām) ļauj intensīvu vielu apmaiņu starp asinīm un hepatocītiem perisinusoidālajā Disē telpā. Šajā telpā atrodas arī stellāta (Ito) šūnas, kas fizioloģiski uzkrāj A vitamīnu un regulē mikrocirkulāciju, bet bojājuma gadījumā aktivējas, transformējas par miofibroblastiem, pastiprināti sintezē kolagēnu un kļūst par galveno fibroģenēzes “dzinējspēku”. Tādējādi jebkurš ilgstošs kaitīgs stimul aknās potenciāli var ierosināt strukturālas pārmaiņas ar fibrozes risku, kas klīniski ir nozīmīgs, jo fibrozes pakāpe ir viens no galvenajiem aknu slimību prognozi noteicošajiem faktoriem.

Žults cirkulācija aknās noris pretēji asinsrites virzienam: žults veidojas žults kapilāros starp hepatocītiem un virzās uz triādes žultsvadiem, tālāk uz kopējo žultsvadu un divpadsmitpirkstu zarnu. Žults ir būtiska tauku emulsifikācijai, peristaltikas stimulācijai un zarnu mikrovides regulācijai, bet vienlaikus tā ir arī nozīmīgs eliminācijas ceļš holesterīnam, pigmentiem un dažādām ksenobiotikām, t. sk. medikamentiem un hormoniem. Mūsdienu pētījumi papildus uzsver žultsskābju lomu kā signālmolekulām (FXR, TGR5), kas regulē vielmaiņu, iekaisumu un reģenerāciju; transportieru (NTCP, BSEP) disfunkcija veicinaolestāzi, oksidatīvo stresu un stellāta šūnu aktivāciju. Tas ir būtiski, jo kortikosteroīdi un citi bieži lietoti preparāti var ietekmēt hepatobiliāro homeostāzi, un pat relatīvi “funkcionālas” izmaiņas var pāraugt strukturālās, ja stimul ir ilgstošs vai atkārtots.

Kortikosteroīdi ir viens no biežāk lietotajiem pretiekaisuma un imūnsupresīvajiem medikamentiem veterinārajā medicīnā, ar plašām indikācijām (alerģiskas reakcijas, atopiskais dermatīts un citas dermatozes, autoimūnas slimības, onkoloģija, kritiskas situācijas u. c.). To klīniskā nozīme ir vēsturiski izcila, taču jau drīz pēc ieviešanas tika aprakstītas arī būtiskas blaknes, tostarp steroīdā hepatopātija suņiem. Epidemioloģiski dati no lieliem datubāzu pētījumiem rāda, ka ievērojama suņu daļa praksē saņem sistēmisku kortikosteroīdu terapiju, kas nozīmē, ka pat “salīdzinoši reti” sarežģījumi populācijas līmenī kļūst klīniski bieži. Īpaša uzmanība jāpievērš ilgstošas darbības depo formām (piemēram, metilprednizolona acetātam), kas ir praktiskas, bet mazina iespēju ātri titrēt devu vai pārtraukt terapiju blakņu gadījumā, tādējādi palielinot jatroģēnu komplikāciju risku.

Kortikosteroīdu farmakodinamika balstās uz receptoru mediētu ietekmi uz gēnu transkripciju: gandrīz visām šūnām ir kortikosteroīdu receptori, līdz ar to iedarbība ir sistēmiska un daudzorgānu. Aknās kortikosteroīdi stimulē glikoneoģenēzi un glikogēna sintēzi, traucē lipīdu un olbaltumvielu metabolismu, veicina tauku uzkrāšanos, izraisa negatīvu slāpekļa bilanci un var destabilizēt glikēmisko kontroli. Klīniski tas atspoguļojas kā specifisks laboratorisko izmaiņu un morfoloģisko bojājumu spektrs. Tieši šī plašā, mehāniski pamatotā ietekme uz aknu metabolismu pamato pētījuma aktualitāti: aknas ir galvenais “metaboliskais filtrs”, kur kortikosteroīdu terapijas cena nereti tiek “samaksāta” ar funkcionālām un strukturālām pārmaiņām.

Steroīdās hepatopātijas diagnostikā būtiska loma ir asins bioķīmiskajiem rādītājiem, lai gan tie nav pietiekami galīgai diagnozei bez klīniskā konteksta un papildu izmeklējumiem. Alanīnaminotransferāze (ALAT) ir jutīgs hepatocelulāra bojājuma rādītājs, gammaglutamiltransferāze (GGT) suņiem ir specifiskāka hepatobiliāra marķieris, savukārt sārmainās fosfatāzes (AP) pieaugums ir bieži novērojams un īpaši nozīmīgs, jo suņiem ir specifisks kortikosteroīdu inducēts izoferments (kAP), kas palīdz diferenciāldiagnostikā. kAP termostabilitāte laboratorijā ļauj atšķirt kortikosteroīdu inducētu enzīmu pieaugumu no citu iemeslu radītām AP izmaiņām, un jaunākie pētījumi kAP uzsver kā vienu no nozīmīgākajiem marķieriem suņiem ar aizdomām par steroīdo hepatopātiju. Tomēr bioķīmija atspoguļo procesu netieši, un tā nepasaka, cik dziļi bojājums skar audus un vai tas ir atgriezenisks.

Tāpēc zelta standarts aknu bojājuma smaguma un rakstura noteikšanai joprojām ir histopatoloģija. Kortikosteroīdu izraisītai hepatopātijai raksturīga hepatocītu palielināšanās (bieži vairākas reizes), vakuolizācija un masīva glikogēna uzkrāšanās, kodolu pārvietošana uz perifēriju, kā arī, atsevišķos gadījumos, iekaisuma šūnu infiltrācija un pericelulāra fibroze. Specifiskas krāsošanas metodes (H&E rutīnai, PAS glikogēnam, Massona trihroms fibrozei) un imūnhistoķīmija (piem., α -SMA stellāto šūnu aktivācijas noteikšanai) ļauj ne tikai apstiprināt diagnozi, bet arī kvantificēt bojājumu un potenciāli modelēt reversijas dinamiku. Mūsdienu attīstība digitālajā patoloģijā, telpiskajā analītikā un mākslīgā intelekta risinājumos vēl vairāk palielina iespējas objektīvi izvērtēt steatozes un fibrozes sadalījumu un samazināt vērtētāja subjektivitāti, kas ir īpaši svarīgi zinātniskos pētījumos par reversijas iespējām.

Darba aktualitāti pastiprina arī mūsdienu izpratne par mitohondriju disfunkciju un oksidatīvo stresu kā centrāliem mehānismiem medikamentu izraisītā aknu bojājumā. Aknu šūnām ir augsta enerģijas vajadzība, un mitohondriji ir gan ATF ražošanas centrs, gan nozīmīgs reaktīvo skābekļa formu avots. Oksidatīvais stress bojā lipīdus, olbaltumvielas un DNS, aktivē iekaisuma ceļus, var ierosināt hepatocītu apoptozi un sekmēt fibrogēnēzi, tostarp caur stellāto šūnu aktivāciju. Tādējādi kortikosteroīdu inducētas morfofunkcionālās izmaiņas aknās nav tikai “glikogēna uzkrāšanās stāsts”, bet komplekss process, kurā var iesaistīties mitohondriju bojājums, ROS pieaugums un progresējošas strukturālas pārmaiņas. Tieši šeit rodas kritisks zināšanu un prakses jautājums: kurā brīdī izmaiņas ir pilnībā atgriezeniskas, un kad tās kļūst par fibrozes/strukturālas remodelācijas risku?

Nemot vērā kortikosteroīdu plašo lietojumu, depo formu praktisko pievilcību, biežo steroīdās hepatopātijas sastopamību un potenciāli neatgriezenisku pārmaiņu risku dzīvniekiem, ir vitāli nepieciešami pētījumi, kas sistemātiski raksturo aknu morfofunkcionālās izmaiņas un to reversijas iespējas. Papildus tam literatūra norāda uz perspektīvu, bet nepietiekami izpētītu virzienu – hepatoprotektantu un īpaši mitohondriju mērķētu antioksidantu (piem., mitokvinola mezilāts) potenciālu mazināt oksidatīvo stresu, lipīdu peroksidāciju un fibrogēnos signālus. Lai gan augu ekstrakti, vitamīni un aminoskābju derivāti (silimarīns, kurkumīns, artišoks, holīns, E vitamīns, SAM, N-acetilcisteīns, L-karnitīns u. c.) ir aprakstīti kā vielas ar hepatoprotektīvām īpašībām un dažos modeļos uzrāda labvēlīgu efektu, specifiski, klīniski pārliecinoši dati tieši par kortikosteroīdu inducētas hepatopātijas profilaksi un reversiju suņiem joprojām ir ierobežoti. Tādēļ šis temats ir ne tikai teorētiski nozīmīgs, bet arī praktiski steidzams: tas tieši ietekmē ikdienas terapijas drošību, ārstēšanas individualizāciju un ilgtermiņa prognozi pacientiem, kuriem kortikosteroīdi bieži ir neaizstājami.

Kopumā literatūras apskats parāda loģisku ķēdi, kas pamato darba aktualitāti: (1) aknas ir kritisks metabolismu un detoksikāciju nodrošinošs orgāns ar sarežģītu mikrocirkulāciju un fibrogēnēzes potenciālu; (2) kortikosteroīdi ir plaši lietoti un ietekmē aknu vielmaiņu receptoru mediētā, sistēmiskā veidā; (3) suņiem attīstās raksturīga steroīdā hepatopātija ar bioķīmiskām, t. sk. kAP kā nozīmīgu marķieri, ultrasonogrāfiskām un histoloģiskām pazīmēm; (4) patoģenēzē arvien vairāk izceļas mitohondriju bojājums un oksidatīvais stress, kas var veicināt progresiju līdz strukturālām pārmaiņām; (5) diagnostikas “zelta standarts” ir histopatoloģija ar arvien modernākām kvantitatīvām pieejām; (6) hepatoprotekcijas un reversijas stratēģijas (īpaši

mitohondriju mērķētie antioksidanti) ir perspektīvas, bet veterinārajā kontekstā vēl nepietiekami pierādītas.

Līdz ar to darbs par kortikosteroīdu izraisītām morfofunkcionālām izmaiņām aknās un to reversijas iespējām suņiem ir aktuāls gan zinātniski (mehānismu, biomarkķieru un audu remodelācijas izpratne), gan klīniski (drošāka terapija, riska pacientu identificēšana un potenciālas aizsargstrategijas).

2. MATERIĀLS UN METODES

2.1. Pētījuma laiks, vieta un materiāla raksturojums

Paraugu iegūšana un izmeklēšana tika veikta divās daļās. Pirmā daļa bija **klīniskais pētījums** (KP), kura objektus atlasījām pēc vairākiem kritērijiem: iepriekš uzstādītas diagnozes, kuras ārstēšanā tika izmantots kortikosteroīds metilprednizolona acetāts; anamnēzē un klīniskajā izmeklēšanā nebija datu, kas liecinātu par aknu patoloģijām; asins analīzēs nebija izmaiņu, kas norādītu uz aknu darbības traucējumiem. Klīniskajā pētījumā tika izmantoti asins paraugi, kas laika posmā no 2013. gada janvāra līdz 2014. gada janvārim tika paņemti diagnostiskos nolūkos vairākās Rīgas veterinārajās klīnikās un nebija tieši saistīti ar šo pētījumu. Paraugu izmantošana tika saskaņota ar klīniku vadību un dzīvnieku īpašniekiem (skat. pielikumu Nr. 1). Tā kā asins ņemšana tika veikta klīniskās aprūpes ietvaros, pētījuma dēļ dzīvniekiem netika veiktas papildu manipulācijas, un līdz ar to netika radītas papildu sāpes vai diskomforts. Pēc atlases pētījumā tika iekļauti 28 pieauguši atšķirīga vecuma, dzimuma un šķirņu suņi. No katra dzīvnieka tika analizēti četri asins paraugi; kopā apstrādāti 112 paraugi.

Otrajā daļā notika **eksperimentālais pētījums** (EP), kurā tika iekļauti septiņi divus gadus veci, sieviešu dzimtas nekastrēti bīglu šķirnes klīniski veseli eksperimenta suņi (PVD atļauja Nr 70, skat. pielikumu Nr. 2), iepirkti ES sertificētā eksperimentālo dzīvnieku audzētavā, Francijā. Pētījuma eksperimentālā daļa tika veikta Latvijas Lauksaimniecības universitātes Veterinārmedicīnas fakultātes (LLU VMF) Preklīniskajā institūtā laika posmā no 2015. gada 10. aprīļa līdz 2015. gada 31. jūlijam.

Pirms un EP laikā dzīvnieki dzīvoja LLU VMF Eksperimentālo dzīvnieku novietnē. Suņi tika turēti individuāli 15-21 °C temperatūrā un 45-65% relatīvajā mitrumā, ar dabisku gaismas-tumsas ritmu, baroti ar rūpnieciski ražotu pilnvērtīgu sausās barības diētu *Josera Lamb & Rice* (*Josera GmbH & Co. KG*, Vācija). Barība tika dozēta atbilstoši ražotāja rekomendācijām, ņemot vērā dzīvnieku ķermeņa masu un enerģijas vajadzības. Saskaņā ar ražotāja norādīto analītisko sastāvu barība saturēja kopproteīnu – 24%, koptaukus – 12%, šķiedrvielas – 3,5% un pelnus – 7%, ar metabolizējamo enerģētisko vērtību apmēram 3,65 Mcal/kg (3650 kcal/kg). Galvenās sastāvdaļas: rīsi ($\geq 40\%$), jēra gaļas milti (18%), māļputnu tauki, biešu mīkstums, hidrolizēti dzīvnieku proteīni, kukurūza un minerālvielas. Papildus barības piedevas vai uztura bagātinātāji netika izmantoti. Dzeramais ūdens bija pieejams *ad libitum*. Divas reizes dienā dzīvnieku boksi un turēšanas telpas tika tīrītas, mazgātas un, ja nepieciešams, arī dezinficētas. Vides bagātināšana ietvēra gulvietu un košļājamās rotaļlietas, ikdienas kontaktu ar cilvēku, kā arī vizuālu un dzirdes kontaktu ar citiem suņiem. Dienakts gaišajā laikā dzīvniekiem bija pieejams bagātināts, drošs āra voljers. Pirms pētījuma dzīvnieki tika pieradināti pie eksperimentālajām procedūrām.

Dzīvnieki tika vakcinēti saskaņā ar Latvijas Republikas normatīvajiem aktiem – pret trakumsērgu (*Nobivac Rabies, Intervet International B.V.*, Nīderlande), kā arī papildus pret leptospirozi (*Nobivac L, Intervet International B.V.*, Nīderlande), parvovīrusu, adenovīrusa-1 un adenovīrusa-2 infekciju un suņu mēri (*Nobivac DHPPi, Intervet International B.V.*, Nīderlande). Visi dzīvnieki tika regulāri apstrādāti pret ekto- un endoparazītiem.

Eksperimenta gaitā no katra dzīvnieka noteiktajos laika posmos tika iegūti asins un aknu audu paraugi, kopumā iegūstot 70 asins un 42 aknu paraugus.

2.2. Pētījuma kopējā shēma

Klīniskais pētījums. Klīniskajā pētījumā dzīvnieki tika nosacīti sadalīti divās grupās. Pirmajā grupā (Grupa Nr. 1) iekļāva 14 dzīvniekus, kuri saņēma tikai kortikosteroīdu, savukārt otrajā grupā (Grupa Nr. 2) bija 14 suņi, kuri pēc kortikosteroīda injekcijas papildus saņēma hepatoprotektantu.

Kā kortikosteroīds tika izvēlēts ilgstošas darbības metilprednizolona acetāts *Depo-Medrol*, 40 mg ml⁻¹ (*Pfizer*, ASV), iepakots sterilās 2 ml ampulās. Preparātu injicēja intramuskulāri vienu reizi pētījuma pirmajā dienā devā 2 mg kg⁻¹.

Kā hepatoprotektants tika izmantots preparāts *GlutaMax* (*Candioli*, Itālija), kas satur mārdadža ekstraktu (*Silybum marianum*, 33 mg tabletē), kurkumas ekstraktu (*Curcuma longa*, 33 mg tabletē), artišoka ekstraktu (*Cynara scolymus*, 66,6 mg tabletē), holīnu, lecitīnu, B grupas vitamīnus, N-acetilcisteīnu, cinku un citas palīgvielas. Hepatoprotektantu dzīvniekiem ievadīja *per os* vienu reizi dienā 45 dienas pēc kārtas, sākot no pētījuma pirmās dienas; to deva dzīvnieku īpašnieki, aprēķinot devu kā vienu tableti (2000 mg) uz 15 kg dzīvnieka svara.

Lai novērtētu hepatoprotektanta ietekmi uz suņu organismu un izvērtētu tā spēju pasargāt aknas no kortikosteroīdu iedarbības, asins serumā noteica šādus aknu enzīmu rādītājus: alanīnaminotransferāzi (ALAT), gammaglutamiltransferāzi (GGT), sārmaino fosfatāzi (AP) un kortikosteroīdu inducēto termostabilo sārmaino fosfatāzi (kAP). Šie bioķīmiskie rādītāji nosacīti atspoguļo aknu funkcionālo darbību suņiem.

Asins paraugi tika iegūti pētījuma 0., 14., 30. un 45. dienā, skaitot no kortikosteroīdu ievadīšanas dienas.

Eksperimentālais pētījums. Kā kortikosteroīdu preparātu izmantojām ilgstošas darbības metilprednizolona acetātu *Depo-Medrol*, 40 mg ml⁻¹ (*Pfizer*, ASV), iepakotu sterilās 2 ml ampulās. Preparātu ievadījām intramuskulāri vienreiz pētījuma pirmajā dienā devā 2 mg kg⁻¹.

Kā hepatoprotektantu EP izvēlējamies humānajā medicīnā lietotu jaunākās paaudzes antioksidantu – mitokvinola mezilātu (*MitoQ*, *Antipodean Pharmaceuticals Ltd.*, Jaunzēlande), kura aktīvā viela tika ievadīta *per os* 20 mg dienā. Kapsulas, papildus aktīvajai vielai, saturēja arī tapiokas pulveri. Balstoties uz literatūras datiem, antioksidanta ieteicamais minimālais lietošanas ilgums ir 28 dienas (Murphy, 2016). Kontroles vajadzībām tika sagatavotas identiskas kapsulas ar tapiokas pulveri (placebo), kas nesaturēja mitokvinola mezilātu (*Antipodean Pharmaceuticals Ltd.*, Jaunzēlande). Placebo izmantoja, lai izvērtētu tieši aktīvās vielas, nevis palīgvielu ietekmi uz organismu. To ievadīja *per os* vienu reizi dienā 28 dienas pēc kārtas.

Eksperimenta plānojumā tika izmantots *crossover* jeb krusteniskais pētījuma dizains (Grizzle, 1965). Šis dizains tika izvēlēts, lai:

1. ievērotu 3R principu, samazinot pētījumā iekļauto dzīvnieku skaitu, vienlaikus nodrošinot pietiekamu datu apjomu statistiskajai analīzei;
2. iegūtu informāciju par iespējamu vēlinu jeb latentā perioda ietekmi uz organismu.

Ir zinātniski pierādīts, ka medikamenta vēlinā ietekme var kļūt klīniski novērojama pēc atkārtota lietošanas kursa, pat ja tas tiek veikts pēc zināma laika intervāla – pārnese efekts (angl. *carryover effect*) (Mills et al., 2009; Wellek & Blettner, 2012). Pētījumā tika izmantots divu preparātu un divu periodu krusteniskais pētījuma dizains, kurā katrs dzīvnieks dažādos eksperimenta posmos kalpo gan kā eksperimentālā, gan kā kontroles vienība (Jones & Kenward, 2003).

Eksperimenta laiks tika sadalīts trīs posmos (skat. 2.1. attēlu):

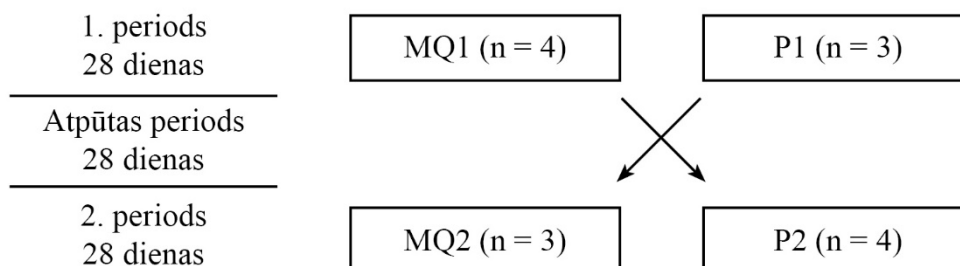
- pirmais periods – no 0. līdz 28. dienai,
- atpūtas periods – no 28. līdz 56. dienai (bez jebkādām manipulācijām),
- otrais periods – no 56. līdz 84. dienai.

Dzīvnieki tika sadalīti divās grupās pēc nejaušības principa: pirmajā grupā bija četri dzīvnieki, otrajā – trīs. Grupas nosaucām pēc lietotā preparāta: MQ – mitokvinola mezilātu saturošas kapsulas, un P – placebo, tapiokas pulveri saturošas kapsulas. EP pirmajā periodā grupas tika apzīmētas kā MQ1 un P1, otrajā periodā – MQ2 un P2 (skat. 2.1. attēlu).

Pirmajā periodā P1 grupas dzīvnieki saņēma MPA injekciju un placebo kapsulas, bet MQ1 grupas dzīvnieki – MPA injekciju un mitokvinola mezilāta kapsulas. Atpūtas periodā dzīvniekiem netika veiktas manipulācijas. Otrā perioda sākumā, kad visi dzīvnieki bija klīniski

veseli, grupas tika mainītas atbilstoši pārējas principam: bijusī P1 kļuva par MQ2, bet MQ1 – par P2 grupu (skat. 2.1. attēlu).

Šāda pieeja ļāva ar to pašu dzīvnieku skaitu iegūt divu preparātu salīdzināmos datus, jo katrs dzīvnieks abos periodos saņēma gan mitokvinola mezilātu, gan kontroles preparātu. Metode nodrošināja iespēju savstarpēji salīdzināt divas eksperimentālās un divas kontroles grupas no dažādiem pētījuma periodiem.

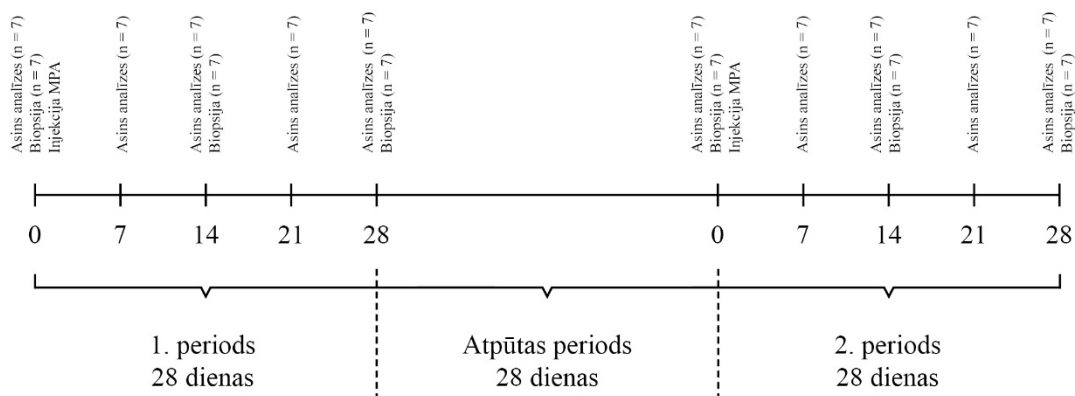


2.1. att. Krusteniskā pētījuma dizaina shematisks attēlojums

„MQ1” un „MQ2” – dzīvnieku grupas, kuras saņēma mitokvinola mezilātu;

„P1” un „P2” – dzīvnieku grupas, kuras saņēma placebo – tapiokas pulveri;

Darbā izmantotie apzīmējumi „MQK” un „PK” attiecas uz apvienotajām grupām, kurās iekļauti visi dzīvnieki, kas jebkurā no eksperimenta periodiem saņēma attiecīgi mitokvinola mezilātu (MQK) vai tapiokas pulvera preparātu (PK). 2.2. attēlā atspoguļota eksperimenta shēma ar norādēm par dzīvniekiem veiktajām manipulācijām katrā periodā un dienā. „Injekcija” norāda kortikosteroīda ievadīšanas dienu, bet „asins analīzes” un „biopsija” – attiecīgās procedūras noteiktajās dienās.



2.2 att. EP norises laikā veikto manipulāciju shematisks attēlojums

Dzīvnieku organisma izmaiņas tika novērtētas, balstoties uz klīnisko stāvokli un asins seruma bioķīmiskajiem rādītājiem (ALAT, GGT, AP, kAP). Asins paraugi tika iegūti ik pēc septiņām dienām piecas reizes katrā periodā: 0., 7., 14., 21. un 28. dienā. Aknu audu paraugi ar ultrasonogrāfijas kontroli tika iegūti tajās pašās dienās (sk. 2.2. attēlu).

2.3. Pētījumā izmantotās metodes

2.3.1. Dzīvnieku klīniskā izmeklēšana un veselības stāvokļa novērtēšana

Dzīvnieku klīniskā izmeklēšana tika veikta pēc vispārpieņemtas veterinārās klīniskās izmeklēšanas shēmas, ietverot gan vispārējo, gan speciālo izmeklēšanu (Jemeljanovs et al., 2007).

Vispārējai izmeklēšanai tika izmantotas inspekcijas un palpācijas metodes. Dzīvnieki sākotnēji tika novēroti to turēšanas vietā, nosakot ārējo izskatu (*habitus*) – ķermeņa stāvokli telpā (normāli brīvs, nepiespiests), temperamentu (dzīvs), miesas stāvokli jeb kondīciju (labs līdz vidēji labs), ķermeņa uzbūvi (vidēji spēcīga) un konstitūciju (smalki blīva).

Tālāk tika novērtēts apmatojums – tā vienmērīgums, gludums, spīdums, tīrība un noturība ādā. Izmeklējot ādu, noteica tās krāsu, smaržu, temperatūras sadalījuma vienmērīgumu, valgumu, elastīgumu, apjoma izmaiņas un iespējamās kopsakara traucējumus, kā arī izvērtēja ādas veidojumus, tostarp nagu stāvokli.

Palpācijas ceļā tika izmeklēti virspusējie limfmezgli (*ln. mandibularis, ln. poplitei, ln. prescapularis, ln. axillaris, ln. inguinalis*), novērtējot to lielumu, sāpīgumu, bīdāmību, virsmas raksturu, konsistenci, sedzošās ādas temperatūru un simetriskumu.

Papildus tika novērtēts mutes gļotādu un acs konjunktīvas stāvoklis – apkārtnes tīrība, gļotādu krāsa, gludums, valgums un spīdīgums. Vispārējās izmeklēšanas noslēgumā tika mērīta rektālā temperatūra.

Speciālās izmeklēšanas laikā tika novērtēta asinsrites un elpošanas orgānu darbība. Kreisās puses 7.-8. ribstarpā palpācijas ceļā noteica sirds grūdienu (*ictus cordis*), novērtējot tā lokalizāciju, laukumu, spēcīgumu un ritmiskumu. Sirds auskultācijas laikā tika izvērtēts sirds toņu spēcīgums, dzirdamība, ritms un akcentācija. Pulss tika palpēts *arteria femoralis*, nosakot tā frekvenci un novērtējot pulsa kvalitāti – lielumu, spēcīgumu, pildījumu, spraigumu un ritmiskumu.

Elpošanas kustību biežumu noteica, ar inspekcijas metodi skaitot krūšu kurvja kustības vienas minūtes laikā. Papildus tika veikta plaušu auskultācija, lai novērtētu elpošanas pamattrokšņus un iespējamās novirzes no normas.

2.3.2. Asins paraugu iegūšana

Asins paraugu iegūšanai dzīvnieki tika fiksēti manuāli. Parauga noņemšanas vieta bija *vena cephalica* priekšējās kājas kraniālajā daļā zem elkoņa locītavas. Pirms punkcijas apmatojums tika noskūts un āda dezinficēta ar 70% etilspirtu. Asinis ieguvām no intravenoza katetra (*Fioniavet Bjebo*, Dānija), uzreiz pēc tā ievadīšanas. Sešu mililitru tilpumā paraugi tika savākti vakutaineros *Vacutest Clot Activator* seruma bioķīmiskajai izmeklēšanai (*Vacutest Kima*, Itālija). Pēc procedūras punkcijas vietai uzlikts spiedošs pārsējs uz 15 minūtēm.

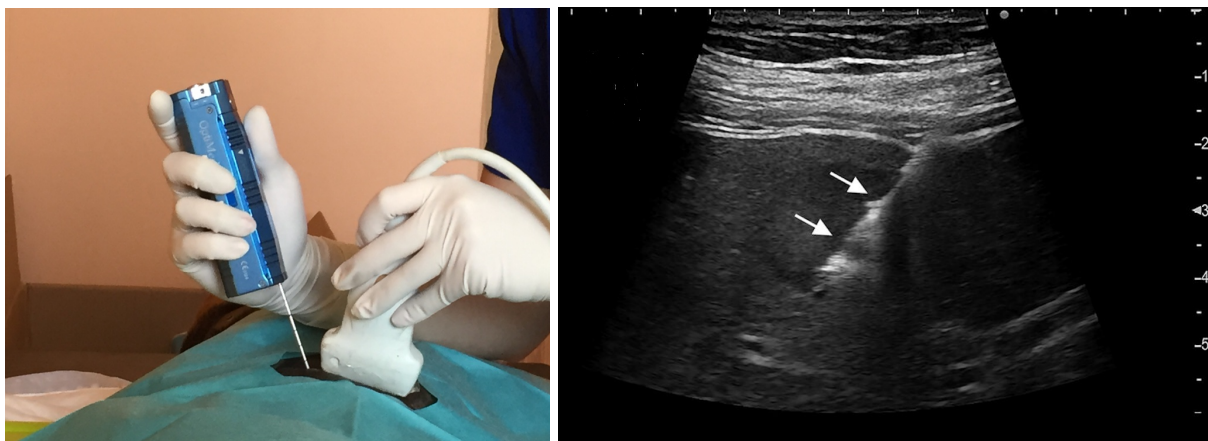
2.3.3. Aknu audu paraugu iegūšana

Saskaņā ar „*World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) Liver Standardization Group*” vadlīnijām (Rothuizen et al., 2006) aknu biopsijas var veikt bez vispārējās anestēzijas pielietošanas. Šajā pētījumā sedācijai tika izmantots propofola šķīdums *Propofol (Peckforton)*, Lielbritānija), 10 mg ml⁻¹, devā 6 mg kg⁻¹ intravenozi (ieteicamā anestēzijas deva bez premedikācijas – 6-8 mg kg⁻¹). Propofols iedarbojas tieši uz centrālo nervu sistēmu, nodrošinot tūlītēju, īslaicīgu sedāciju bez analgētiska efekta.

Manipulācija tika veikta ultrasonogrāfiskā kontrolē, lai izvairītos no lielu asinsvadu, žultsvadu vai aknu saistaudu kapsulas bojājuma. Lai stimulētu žultspūšļa iztukšošanos un

samazinātu tā perforācijas risku, 30 minūtes pirms biopsijas katram dzīvniekam tika izbaroti 30 ml olīveļļas. Dzīvniekus novietojām labajā laterālajā guļā, sagatavojot laukumu procedūras veikšanai – apmatojumu noskujot un attaukojot ādu. Ādas attaukošanai izmantojām 70% alkoholu, bet ultraskaņas viļņu pārraides uzlabošanai – ultrasonogrāfisko gēlu *Transound* (*EF Medica SRL*, Itālija), ko vienmērīgi uzklājām uz visa iepriekš sagatavotā laukuma. Izmeklēšanai izmantojām sonogrāfu *MyLab30 Vet Gold* (*Esaote*, Itālija). Viļņa garumu pielāgojām katram dzīvniekam individuāli, tomēr, ņemot vērā, ka visi dzīvnieki bija vienas šķirnes, tas variēja šaurās robežās – no 5 līdz 7,5 MHz. Ultrasonogrāfisko kontroli veicām pēc vispārpieņemtās metodikas: virzoties gar ribu loku pa labi, *cartilago xyphoidea* apvidū un laterālāk vizualizējot aknas. Atradot vēlamo biopsijas vietu, papildus tika veikta lokāla anestēzija un analgēzija, padarot nejutīgu ādu, zemādas slāni un vēdera sienas muskulatūru, injicējot 2 ml lidokaīna šķīduma (*Lidocaine*, 20 mg ml⁻¹, *Grindeks*, Latvija) zemādā. Anestēzija iestājās pēc 5-7 minūtēm pēc ievadīšanas.

Aknu audu paraugu iegūšanai tika izmantota vienreizējas lietošanas sterila biopsijas adata *TrueCut* 14G, 10 cm (*Baxter*, Vācija), ievietota biopsijas aparātā *Vitesse Biopsy Gun* (*OptiMed*, Vācija) (2.3. attēls). Operācijas lauks sagatavots, apmatojums noskūts un āda dezinficēta ar jodu un spirtu. Biopsijas adatas ievadīšanas vietā veikts aptuveni 3 mm garš ādas grieziens ar skalpeli. Adatu virzījām laterodorsokraniālā virzienā līdz tā tika ievadīta aknu parenhīmā vismaz 1 cm dziļumā.



2.3. att. **Biopsijas adatas ievadīšana ultrasonogrāfijas kontrolē**

Ar baltām bultiņām (→) norādīta adatas ēna aknu parenhīmā.

Iegūtos aknu paraugus sadalījām un fiksējām atbilstoši paredzētajiem izmeklējumiem – histoloģiskajai un imunohistoķīmiskajai analīzei. Aknu biopsija suņiem tikai ļoti retos gadījumos izraisa dzīvībai bīstamu asiņošanu. Šo risku vēl vairāk samazina ultrasonogrāfiskā kontrole, kas tika veikta arī pēc procedūras – ik pēc 30 minūtēm četru stundu garumā.

2.3.4. Asins paraugu bioķīmiskā izmeklēšana

Seruma atdalīšanai asinis tika centrifugētas 10 minūtes ar ātrumu 1300 apgr./min (Gulbis, 2011). Seruma analīze tika veikta ne vēlāk kā 15 minūtes pēc atdalīšanas. Seruma bioķīmiskie rādītāji tika noteikti ar automātisko analizatoru *Mindray BS-120* (*Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co. Ltd.*, Ķīna).

Kortikosteroīdu izraisītās termostabilās sārmainās fosfatāzes aktivitāti noteicām pēc E. Teske aprakstītās metodes (Teske, 1999). Asins serums tika inkubēts 15 minūtes 60 °C temperatūrā, kā rezultātā saglabājās tikai termostabils izoferments. Pēc apstrādes fermenta aktivitāte tika noteikta ar iepriekš minēto analizatoru.

2.3.5. Aknu audu materiāla sagatavošana un krāsošana

No visiem dzīvniekiem ($n = 7$) eksperimenta laikā tika iegūti 42 aknu audu paraugi ($n = 42$). Katrs paraugs tika izmeklēts, izmantojot rutīnas histoloģijas un imūnhistoķīmijas metodes.

Iegūtos aknu audu paraugus sagatavojām pēc vispārpieņemtas metodikas, fiksējot 10% formalīnā (kas atbilst aptuveni 4% formaldehīda šķīdumam) (Pearse, 1960; Grizzle, 2009). Fiksators tika pagatavots no 36-38% formaldehīda šķīduma (*Sigma-Aldrich Inc.*, ASV), atšķaidot to līdz 500 ml: 450 ml destilēta ūdens un 50 ml 36-38% formaldehīda. Paraugi pirms tālākās apstrādes tika fiksēti 24-48 stundas.

Preparātu atūdeņošanai un parafrīna bloku sagatavošanai tika izmantots audu autoprocetors *Citadel 69810040* (*Shandon*, ASV). Audu paraugi tika apstrādāti pēc noteiktas shēmas: pirmajā posmā tie vienu stundu tika turēti krāna ūdenī, lai izskalotu formalīna atlikumu, pēc tam secīgi ievietoti spirta šķīdumos ar pieaugošu koncentrāciju – 70%, 80%, 96% un trīs 100% denaturēta spirta šķīdumi (*Sigma-Aldrich Inc.*, ASV), katrā posmā audus izturējot 30 - 60 minūtes. Pēc spirta apstrādes paraugi tika attīrīti divas reizes ksilolā šķīdumā (*Sigma-Aldrich Inc.*, ASV), lai pilnībā izvadītu spirtu un nodrošinātu optimālu parafrīna infiltrāciju. Pēc tam paraugi tika ievietoti šķidrā parafrīnā (*Histosec*, *Merck*, Vācija) un ieguldīti blokos.

No iegūtajiem parafrīna blokiem preparāti tika griezti mikrotomā *SLEE Mainz Cut* (*SLEE Medical*, Vācija), sagatavojot 4 μ m biezus griezumus histoloģiskajai izmeklēšanai (griezumu skaits $n = 168$) un 3 μ m biezus griezumus imūnhistoķīmiskajai un imūnfluorescentajai analīzei (griezumu skaits $n = 168$). Griezumus, paredzētus histoloģiskajai izmeklēšanai, uznesa uz priekšmetstikliņiem ($n = 84$; priekš H&E $n = 42$; priekš PAS $n = 42$) (*Deltalab*, Spānija), imūnhistoķīmiskajai ($n = 42$) un imūnfluorescences ($n = 42$) – uz priekšmetstikliņiem *ICH Microscope Slides* (*Dako*, K8020, ASV), uz katra priekšmetstikliņa izvietojot divus griezumus. Pēc griezumu uzlikšanas uz priekšmetstikliņiem tie tika žāvēti termostātā 60 °C temperatūrā 20 - 30 minūtes.

Paraugu krāsošana pēc Hematoksilīna-Eozīna (H&E) metodes. Aknu parenhīmas morfoloģiskā stāvokļa novērtēšanai preparāts tika krāsots ar H&E metodi pēc Rothuizen et al. (2006). Deparafinizācija tika veikta ksilolā divas reizes (katru reizi 2 minūtes), kam sekoja rehidratācija spirta rindā ar pakāpeniski dilstošu koncentrāciju (100%, 96%, 90% un 70%; katrā posmā 2 minūtes) un skalošana destilētā ūdenī 2 minūtes.

Krāsošanā izmantoja hematoksilīnu *Mayer's Hematoxylin* (*Bio-Optica Milano*, Itālija), iedarbības laiks 2–5 minūtes, pēc kā preparāti tika skaloti zem tekoša krāna ūdens 5 minūtes. Pēc tam tos iekrāsoja eozīnā *Eosin Y alcoholic 0.5%* (*Bio-Optica Milano*, Itālija) 2–5 minūtes un atkārtoti skaloja tekošā ūdenī 5 minūtes. Pēc krāsošanas veica dehidratāciju 96% etanolā divas reizes (katru reizi 1 minūti), dzidrināšanu ksilolā divas reizes (katru reizi 5 minūtes) un preparātus pārklāja ar ksilolā šķīstošu montēšanas līmi (*AppliChem*, Vācija), uzliekot segstikliņu (*DiaPath*, Itālija).

Paraugu krāsošana pēc Perjodskābes-Šifa (PAS) metodes. Otrs no sagatavotajiem parafrīna griezumiem tika krāsots ar perjodskābes-Šifa (PAS) metodi, izmantojot McManus protokolu (McManus, 1948). Preparāti tika deparafinizēti ksilolā divas reizes (katru reizi 5 minūtes) un rehidratēti spirta rindā ar pakāpeniski samazinātu etanola koncentrāciju: 100% etanolā divas reizes (pa 5 minūtēm), 96% etanolā divas reizes (pa 5 minūtēm) un 70% etanolā vienu reizi (5 minūtes). Pēc tam preparāti tika noskaloti destilētā ūdenī.

Preparātus oksidēja 1% perjodskābes šķīdumā (*Bio-Optica*, Itālija) 10 minūtes, pēc kā tos noskaloja destilētā ūdenī. Tālāk preparātus inkubēja Šifa reaģentā (*Sigma-Aldrich*, ASV) 20 minūtes un atkārtoti noskaloja destilētā ūdenī. Pēc tam veica kodolu pretkrāsošanu ar *Mayer's Hematoxylin* (*Bio-Optica Milano*, Itālija) 2 minūtes, kam sekoja skalošana tekošā ūdenī 5 minūtes.

Pēc krāsošanas preparātus dehidratēja etanola rindā: 70% (1 minūte), 96% (1 minūte) un 100% (2 minūtes), dzidrināja ksilolā divas reizes (pa 5 minūtēm) un pārklāja ar ksilolā šķīstošu montēšanas vidi, uzliekot segstikliņu.

Paraugu imūnhistokīmiskā krāsošana. Griezumi tika sagatavoti imūnhistokīmiskajai izmeklēšanai, izmantojot *Dako EnVision* HRP sistēmu (Kammerer et al., 2001; Zhao & Burt, 2007). Tika veikta deparafinizācija ksilolā divas reizes pa piecām minūtēm, kam sekoja rehidratācija 100% absolūtajā etanolā (divas reizes pa piecām minūtēm), 96% etanolā (divas reizes pa piecām minūtēm) un 70% etanolā (vienu reizi piecas minūtes). Pēc rehidratācijas paraugi tika skaloti destilētā ūdenī 5 minūtes.

Epitopu atbrīvošana tika veikta ar *HIER* buferšķīdumu (*Dako Target Retrieval Solution*, pH 9, S2367, *Dako*, Dānija), ievietojot paraugus mikroviļņu krāsnī (750 W) līdz vārīšanās temperatūrai un pēc tam atdzesējot līdz 70°C. Process tika atkārtots trīs reizes, pēc kā paraugi ar buferšķīdumu tika atdzesēti līdz istabas temperatūrai.

Endogēnās peroksidāzes aktivitātes bloķēšana tika veikta, izmantojot *Dako Endogenous Enzyme Block* šķīdumu ar ekspozīcijas laiku 5 minūtes, pēc tam paraugus skalojot TBS buferšķīdumā (*Dako Wash Buffer*, pH 7.4, *Dako*, Dānija) divas reizes pa piecām minūtēm.

Primārā antivielu *Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin*, *Clone 1A4* (M0851, *Dako*, Dānija) tika izmantota atšķaidījumā 1:100, izmantojot antivielu šķīdinātāju *Dako Antibody Diluent with Background Reducing Components* (S3022, *Dako*, Dānija). Paraugi tika inkubēti 30 minūtes istabas temperatūrā, pēc tam atkārtoti skaloti TBS buferšķīdumā divas reizes pa piecām minūtēm.

Sekundārā antivielu sistēma tika izvēlēta atbilstoši primārās antivielas izcelsmei: *Dako EnVision+ System-HRP Labelled Polymer, Anti-Mouse* (K4000, *Dako*, Dānija). Inkubācijas laiks – 30 minūtes, kam sekoja atkārtota skalošana TBS buferšķīdumā divas reizes pa piecām minūtēm. Primārās un sekundārās antivielas kompleksi tika vizualizēti ar *DAB* reaģentu (*Dako DAB Liquid+ Substrate Chromogen System*, K3468, *Dako*, Dānija) ar ekspozīcijas laiku 5 minūtes, pēc kā paraugi tika skaloti destilētā ūdenī 5 minūtes.

Tālāk veikta pretkrāsošana ar hematoksilīnu 2 minūtes un skalošana tekošā ūdenī 5 minūtes. Preparāti tika dehidratēti 70% etanolā (1 minūte), 96% etanolā (1 minūte) un 100% absolūtajā etanolā (2 minūtes), pēc kā izturēti ksilolā divas reizes pa piecām minūtēm. Visbeidzot paraugi pārsegti ar ksilolā šķīstošu līmi un segstikliņu.

Katrs aknu audu paraugs tika salīdzināts ar negatīvo kontroli, kurai netika pievienota primārā antivielu. Pozitīva reakcija tika vērtēta pēc α -SMA ekspresijas brūnā tonī, īpašu uzmanību pievēršot perisinusoidālajai telpai (aktivētās stellāta šūnas/miofibroblasti) un asinsvadu sienām (gludā muskulatūra) (Rockey et al., 1992; Ijzer et al., 2005).

Imūnfluorescences metode. Mitochondriju morfoloģisko pārmaiņu novērtēšanai hepatocītos tika veikta imūnfluorescentā krāsošana parafīna griezumos, kam sekoja vizualizācija ar konfokālo lāzera skenējošo mikroskopiju.

Parafīna griezumi (3 μ m) tika deparafinizēti ksilolā (2 $\times$ 5 min) un rehidratēti spirta rindā (100%, 95%, 70%) līdz destilētam ūdenim. Antigēnu atvēršanai (*HIER*) tika izmantots 10 mM nātrija citrāta buferšķīdums (pH 6,0) 95°C temperatūrā 20 minūtes, pēc tam paraugi tika atdzesēti tajā pašā šķīdumā līdz istabas temperatūrai.

Permeabilizācija tika veikta PBS šķīdumā (*Sigma-Aldrich Inc.*, ASV) ar 0,1% *Triton X-100* (*Sigma-Aldrich Inc.*, ASV) 10 minūtes, kam sekoja blokēšana PBS ar 5% normālu kazas serumu (*Sigma-Aldrich Inc.*, ASV) un 0,05% *Tween-20* (*Sigma-Aldrich Inc.*, ASV) 30 minūtes istabas temperatūrā, lai samazinātu nespecifisku antivielu saistīšanos.

Mitochondriju marķēšanai tika izmantota primārā antivielu *anti-TOMM20* (ab78547; atšķaidījums 1:500, *Abcam*, Apvienotā Karaliste). Primārā antivielu tika uzklāta uz paraugiem un inkubēta mitrā kamerā 4 °C temperatūrā 12 stundas. Pēc inkubācijas paraugi tika skaloti PBST (PBS + 0,05% *Tween-20*) trīs reizes pa 5 minūtēm.

Kā sekundārā antivielā tika izmantota *Alexa Fluor™ 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)* (A21245; atšķaidījums 1:500, *Invitrogen/Thermo Fisher Scientific*, ASV). Sekundārā antivielā tika inkubēta uz paraugiem 60 minūtes istabas temperatūrā tumsā, pēc tam paraugi tika mazgāti PBST (3 × 5 min).

Autofluorescences mazināšanai tika izmantots *TrueBlack® Plus Lipofuscin Autofluorescence Quencher* (23014-T, *Biotium*, ASV) saskaņā ar ražotāja protokolu (1 min inkubācija, skalošana PBS).

Kodolu kontrastkrāsošanai tika izmantots DAPI (*ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI*, P36931, *Invitrogen/Thermo Fisher Scientific*, ASV), un preparāti tika pārsegti ar *antifade* montējošo vidi (*Invitrogen/Thermo Fisher Scientific*, ASV) un segstikliņu.

2.3.6. Paraugu mikroskopiskā analīze

Hematoksilīna-eozīna (H&E) krāsoto paraugu mikroskopiskā analīze. Ar H&E krāsojumu iegūtajos aknu histoloģiskajos preparātos hepatocītu mikroskopiskās izmaiņas katrā paraugā izvērtējām desmit mikroskopa redzes laukos, izmantojot vispārpieņemtu morfoloģiskās novērtēšanas metodi. Tika analizēts hepatocītu izmērs, šūnas tīklojuma struktūra, kodola novietojums attiecībā pret šūnas centru, vakuolu skaits un izmērs. Īpaša uzmanība tika pievērsta segmentkodolaino neitrofīlo leukocītu iespējamās infiltrācijas noteikšanai un stellāta šūnu klātbūtnei starpšūnu telpā (Young et al., 2011; Abdou et al., 2013; Szarek et al., 2014).

Histoloģiskos preparātus dažādos palielinājumos izvērtējām gaismas mikroskopā *Leica DM5000B* (*Leica Microsystems*, Vācija) LLU VMF Preklīniskā institūta laboratorijā.

Pamatojoties uz iegūtajiem rezultātiem, hepatocītu morfoloģiskās pārmaiņas nosacīti iedalījām četrās kategorijās pēc Szarek et al. (2014) aprakstītā principa. Morfoloģisko pārmaiņu pakāpe tika kodēta skaitliski (0-3), kur 0 atbilda pārmaiņu neesamībai, 1 – vieglām, 2 – vidēji smagām un 3 – smagām pārmaiņām (skat. 2.1. tabulu).

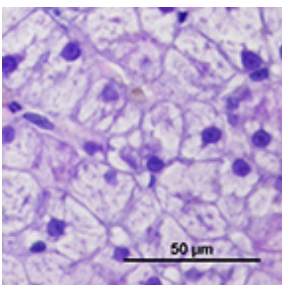
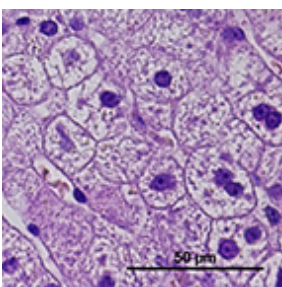
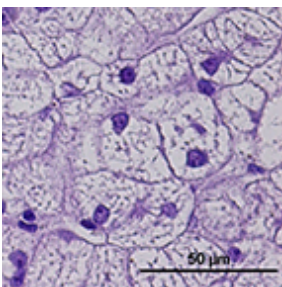
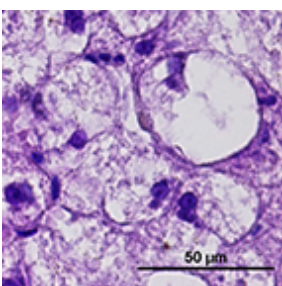
- Hepatocīti nav izmainīti – nav pārmaiņu (0).
- Līdz 1/3 redzes laukā izmainītu hepatocītu, redzams tīklojums, maz vakuolu vai to nav, kodoli centrā – vieglas pārmaiņas (1).
- Līdz 2/3 redzes laukā izmainītu hepatocītu, redzams tīklojums un vakuolas, lielākajai daļai kodolu novietojums perifērijā – vidēji smagas pārmaiņas (2).
- Gandrīz visi hepatocīti izmainīti, redzams izteikts tīklojums, dažāda izmēra vakuolas, kodoli šūnu perifērijā – smagas pārmaiņas (3) (skat. 2.1. tabulu).

Segmentkodolaino neitrofīlo leukocītu infiltrāciju aknu parenhīmā un asinsvados novērtējām, nosakot vidējo šūnu skaitu ± standartklūda vienā mikroskopa redzes laukā (Szarek et al., 2014).

Novērotās pārmaiņas tika nosacīti iedalītas četrās grupās.

- Leikocītu nav – negatīvs.
- 1-10 leikocīti vienā redzes laukā – mazs leikocītu daudzums.
- 10-20 leikocīti vienā redzes laukā – vidēji daudz leikocītu.
- 20-40 leikocīti vienā redzes laukā – daudz leikocītu.

**Kvantitatīvā vērtēšanas sistēma steroīdās hepatopātijas pakāpes noteikšanai aknās
suņiem H&E krāsojumā**

Vertējums	Pārmaiņu pakāpe	Kritēriji	Attēls
0	Nav	Hepatocīti nav izmainīti	
1	Viegla	Līdz 1/3 redzes laukā izmainītu hepatocītu, redzams tīklojums, maz vakuolu vai to nav, kodoli centrā	
2	Vidēji smaga	Līdz 2/3 redzes laukā izmainītu hepatocītu, redzams tīklojums un vakuolas, lielākajai daļai kodolu novietojums perifērijā	
3	Smaga	Gandrīz visi hepatocīti izmainīti, redzams izteikts tīklojums, dažāda izmēra vakuolas, kodoli šūnu perifērijā	

Perjodskābes-Šifa (PAS) krāsoto paraugu mikroskopiskā analīze. PAS krāsojuma katrā paraugā desmit mikroskopa redzes laukus tika noteikta glikogēna uzkrāšanās (Young et al., 2011; Szarek et al., 2014). Preparātus dažādos palielinājumos izvērtējam gaismas mikroskopā *Leica DM5000B* (*Leica Microsystems*, Vācija) LLU VMF Preklīniskā institūta laboratorijā.

Novērotās izmaiņas tika nosacīti iedalītas četrās kategorijās pēc Szarek et al. (2014)

1. Glikogēna nav – negatīvs.
2. Glikogēns konstatēts mazāk nekā 1/3 šūnu – viegla pārmaiņa.
3. Glikogēns konstatēts līdz 2/3 šūnu – vidēji smaga pārmaiņa.

4. Glikogēns konstatēts gandrīz visās šūnās – smagas pārmaiņas.

Morfoloģisko pārmaiņu pakāpe tika kodēta skaitliski (0-3), kur 0 atbilda pārmaiņu neesamībai, 1 – vieglām, 2 – vidēji smagām un 3 – smagām pārmaiņām.

Imūnhistoķīmisko paraugu mikroskopiskā analīze. Stellāta šūnu daudzumu analizējām, nosakot vidējo šūnu skaitu $\pm$ standartklūda uz 100 hepatocītiem (Szarek et al., 2014). Preparātus dažādos palielinājumos izvērtējām gaismas mikroskopā *Leica DM5000B* (*Leica Microsystems*, Vācija) LLU VMF Preklīniskā institūta laboratorijā.

Novērotās izmaiņas tika nosacīti iedalītas četrās grupās pēc Szarek et al. (2014).

1. 0 šūnas/100 hepatocīti – negatīvs (stellāta šūnu aktivācija nav konstatēta).
2. 1-5 šūnas/100 hepatocīti – mazs aktivēto stellāta šūnu daudzums.
3. 6-15 šūnas/100 hepatocīti – vidēji daudz aktivēto stellāta šūnu.
4. >15 šūnas/100 hepatocīti – daudz aktivēto stellāta šūnu.

Imūnfluorescējošo paraugu mikroskopiskā analīze. Konfokālā lāzera skenējošā mikroskopija tika veikta Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātes Viedo tehnoloģiju nodaļā, izmantojot *Nikon Eclipse Ti2* konfokālo mikroskopu (*Nikon Corporation*, Japāna). Skatīšana tika veikta secīgi (*sequential*), lai novērstu signālu pārklāšanos.

Iegūtos attēlus skatījāmies ar specializētu programmatūru *Leica Application Suite X* (*Leica Microsystems*, Vācija). Imūnfluorescences attēlu analīze tika veikta, izmantojot Fiji (ImageJ, versija 2.14.0, ASV), kas nodrošina kodolu un mitohondriju morfoloģijas kvantitatīvu novērtēšanu.

Pirms analīzes attēli tika importēti 16 bitu formātā, saglabājot pilnu intensitātes dinamisko diapazonu, un pirms mērījumiem tika veikta kanālu atdalīšana. DAPI fluorescences signāls tika analizēts 405 nm (DAPI) kanālā, savukārt TOMM20 imūnfluorescences signāls tika analizēts 488 nm (*Alexa Fluor 488*) kanālā. Turpmākai kvantitatīvai analīzei katrā kanālā tika veikta signāla segmentācija, izmantojot automātisku sliekšņa noteikšanu.

Mitohondriju analīzei katrā paraugā tika analizēti trīs nejauši izvēlēti redzes lauki, katrā laukā 20-30 hepatocīti. Mitohondriju morfometrijai tika izmantota funkcija *Analyze Particles*, iegūstot šādus rādītājus: iegarenauma koeficients (garuma/platuma attiecība) un apaļīguma koeficients (0 – ļoti izstiepts, 1 – perfekts aplis). Mitohondriju signāla kvantitatīvai izvērtēšanai tika izmantota funkcija ROI, kas aptvēra hepatocītu citoplazmas zonu, un tika noteikta vidējā fluorescences intensitāte (AU) (Ramatchandirin et al., 2024).

Kodolu morfometrijai DAPI kanālā tika izmantota funkcija *Analyze Particles*, iegūstot *Feret* diametru. Papildus kodolu intensitātes izmaiņu raksturošanai tika veikta fluorescences analīze, izmantojot ROI, kas aptvēra individuālos kodolus; no katra ROI tika aprēķināts variācijas koeficients (CV) kodola iekšpusē (Kreutz et al., 2017; Liu et al., 2021; Guixé-Muntet et al., 2020).

2.3.7. Datu statistiskā analīze

Visi klīniskajā pētījumā un eksperimentā iegūtie dati tika apkopoti un analizēti, izmantojot aprakstošās un inferenciālās statistikas metodes, lai izvērtētu pētījuma periodos konstatēto rādītāju izmaiņas un atšķirības starp dzīvnieku grupām. Datu apstrāde tika veikta, ievērojot to sadalījuma veidu, mērījumu mērogu un pētījuma dizainu.

Pirms statistiskās apstrādes dati tika pārbaudīti uz ekstrēmu novērojumu klātbūtni, izmantojot Grubsa testu (Grubbs, 1950) un vizuālo novērtējumu (*box-plot* analīzi) (Tukey, 1977). Ekstrēmos novērojumus izvērtēja individuāli, ņemot vērā iespējamās bioloģiskās vai tehniskās cēloņus, un tie tika izslēgti no analīzes tikai tad, ja bija pamatotas aizdomas par tehnisku kļūdu vai mērījuma artefaktu. Tika pārbaudīta arī grupu iekšējā dispersija, lai pārliecinātos par datu viendabīgumu un variācijas robežām starp dzīvniekiem vienā grupā.

Asins bioķīmiskajiem rādītājiem (ALAT, GGT, AP un kAP) tika aprēķināta vidējā aritmētiskā vērtība (*mean*) un standartklūda ($\pm$ SEM), lai raksturotu datu centrālo tendenci un izkliedi. Pirms salīdzinošās statistiskās analīzes tika pārbaudīta datu sadalījuma normalitāte, izmantojot Šapiro-Vilka testu (Shapiro & Wilk, 1965), kas ir īpaši piemērots mazām izlases grupām un nodrošina uzticamu novērtējumu. Savukārt, morfoloģiskajiem un fluorescences rādītājiem tika aprēķināta vidējā aritmētiskā vērtība (*mean*) un standartnovirze ($\pm$ SD).

Dati, kas neatbilda normālā sadalījuma kritērijiem, tika analizēti ar neparametriskajām metodēm, jo tās neprasa pieņēmumu par datu normalitāti un ir piemērotas mazu grupu izmēriem. Divu neatkarīgu dzīvnieku grupu (kontroles un ārstētās grupas) rādītāju salīdzināšanai tika pielietots *Mann-Whitney U* tests (Mann & Whitney, 1947), kas novērtē mediānas atšķirības starp grupām un ir piemērots nepāru datiem ar ordinālu vai kvazimetrisku skalu. Savukārt vienas un tās pašas grupas rādītāju izmaiņu analīzei dažādos laika punktos (piemēram, pirms un pēc terapijas) tika izmantots *Wilcoxon Signed-Rank* tests (Wilcoxon, 1945), kas ļauj noteikt statistiski nozīmīgas atšķirības starp saistītiem mērījumiem.

Histoloģisko, imūnhistoķīmisko un imūnfluorescences izmaiņu semikvantitatīvajā novērtējumā katram paraugam tika piešķirts punktu skaits (0-3) atbilstoši konstatēto pārmaiņu smaguma pakāpei (Altman, 1991; Gibbons & Chakraborti, 2011).

0 – bez pārmaiņām.

1 – vieglas pārmaiņas.

2 – vidēji smagas pārmaiņas.

3 – smagas pārmaiņas.

Šādi iegūtie dati tika analizēti, izmantojot *Mann-Whitney U* testu (grupu salīdzināšanai) un *Wilcoxon Signed-Rank* testu (dinamiskai analīzei dažādos eksperimenta periodos), jo tie atbilst ordinālai skalai un neievēro normāla sadalījuma pieņēmumu.

Atšķirības starp grupām tika uzskatītas par statistiski ticamām, ja *p* vērtība bija mazāka par 0,05 ($p < 0,05$). Papildus tika novērtētas arī tendences ($0,05 < p < 0,1$), kas norādīja uz iespējamu, bet statistiski nenozīmīgu efektu, kas varētu būt bioloģiski interpretējams.

Visi rezultāti tika izteikti kā vidējais $\pm$ SEM, ja vien nav norādīts citādi. Datu apstrāde, rezultātu tabulēšana un grafiskā vizualizācija tika veikta, izmantojot *IBM SPSS Statistics 23* (IBM Corporation, ASV) un *Microsoft Excel* programmatūru (Microsoft Corporation, ASV).

Iegūtie statistiskās analīzes rezultāti tika izmantoti, lai objektīvi novērtētu hepatoprotektanta ietekmi uz kortikosteroīdu izraisītajām izmaiņām aknu bioķīmiskajos, histoloģiskajos, imūnhistoķīmiskajos un imūnfluorescences rādītājos suņiem, kā arī, lai noteiktu šo pārmaiņu statistisko un bioloģisko nozīmīgumu.

3. PĒTĪJUMA REZULTĀTI

3.1. Klīniskās izmeklēšanas rezultāti

Klīniskā izmeklēšana tika veikta, lai novērtētu un kontrolētu dzīvnieku vispārējo veselības stāvokli visā pētījuma laikā. **Klīniskajā pētījumā** (KP) šī izmeklēšana bija saistīta ar suņu pamatdiagnozēm, kuru ārstēšanai tika lietoti kortikosteroīdi, tāpēc šo dzīvnieku veselības rādītāji netika iekļauti statistiskajā analizē. **Eksperimentālajā pētījumā** (EP) visiem dzīvniekiem tika veikta regulāra klīniskā izmeklēšana. Visa eksperimentālā pētījuma laikā netika konstatētas izmaiņas suņu veselības stāvoklī. Līdz ar to turpmākajās rezultātu sadaļās klīniskie novērtējumi atsevišķi netika analizēti.

3.2. Aknu funkcionālā un morfoloģiskā stāvokļa izmaiņas suņiem pēc MPA ievadīšanas

3.2.1. Aknu funkcionālā stāvokļa izmaiņas KP suņiem pēc MPA ievadīšanas

Klīniskajā pētījumā daļā aknu funkcionālais stāvoklis tika novērtēts suņiem ar patoloģijām ($n = 14$), kuru terapijā tika izmantots ilgstošas darbības MPA (2 mg kg^{-1}) un netika izmantots hepatoprotektants (grupa Nr. 1), turpmāk – KP suņi pēc MPA ievadīšanas. Asins paraugi iegūti 0., 14., 30. un 45. dienā ($n = 56$), nosakot ALAT, GGT, AP un kAP aktivitāti asins serumā (skat. 3.1. tabulu).

3.1. tabula

Aknu enzīmu aktivitātes dinamika KP suņiem pēc MPA ievadīšanas

Ferments	Normas robežas**	D0	D14	D30	D45
ALAT (U L^{-1})	0 – 94	$69,2 \pm 8,0$	$206,4 \pm 28,8^*$	$177,6 \pm 19,5^*$	$113,5 \pm 48,8$
GGT (U L^{-1})	0 – 6	$5,0 \pm 0,7$	$19,6 \pm 4,4^*$	$17,8 \pm 3,5$	$9,8 \pm 6,2$
AP (U L^{-1})	0 – 102	$59,2 \pm 5,5$	$412,8 \pm 75,3^*$	$329,2 \pm 46,7^*$	$157,2 \pm 86,4^*$
kAP (U L^{-1})	–***	$12,5 \pm 2,2$	$265,1 \pm 41,4^*$	$210,4 \pm 36,6^*$	$79,4 \pm 26,8^*$

* $p < 0,05$ salīdzinājumā ar 0. dienu

** pēc Willard & Twedten, 2012

*** – kAP references intervāls nav piemērojams

Alanīnaminotransferāze. Kā redzams 3.1. tabulā, pēc MPA ievadīšanas ALAT aktivitāte īpaši izteikti reaģēja **14. pētījuma dienā**, kad tā statistiski būtiski ($p < 0,05$) pieauga līdz $206,4 \pm 28,8 \text{ U L}^{-1}$, t.i., 3,0 reizes virs 0. dienas līmeņa ($69,2 \pm 8,0 \text{ U L}^{-1}$). Arī **30. dienā** ALAT aktivitāte saglabājās statistiski būtiski ($p < 0,05$) paaugstināta ($177,6 \pm 19,5 \text{ U L}^{-1}$), kas atbilst 2,6 reižu pieaugumam salīdzinājumā ar sākotnējo rādītāju. Turpretī **45. dienā** bija vērojama lejupslīde līdz $113,5 \pm 48,8 \text{ U L}^{-1}$ (1,6 reizes virs 0. dienas), un šajā laikā punktā atšķirība vairs nebija statistiski būtiska ($p > 0,05$).

Gammaglutamiltransferāze. GGT aktivitātes dinamika atšķīrās ar strauju, bet īslaicīgāku pīķi: **14. pētījuma dienā** tā statistiski būtiski ($p < 0,05$) palielinājās līdz $19,6 \pm 4,4 \text{ U L}^{-1}$, kas ir aptuveni 3,9 reizes vairāk nekā 0. dienā ($5,0 \pm 0,7 \text{ U L}^{-1}$). Nākamajos mērījumos, lai arī absolūtās vērtības saglabājās virs sākotnējā līmeņa, atšķirības pret 0. dienu nebija

statistiski nozīmīgas ($p > 0,05$): **30. dienā** GGT bija $17,8 \pm 3,5 \text{ U L}^{-1}$ (3,6 reizes virs 0. dienas), bet **45. dienā** – $9,8 \pm 6,2 \text{ U L}^{-1}$ (2,0 reizes virs 0. dienas) (skat. 3.1. tabulu).

Sārmainā fosfatāze. AP aktivitātes izmaiņas pēc MPA ievadīšanas bija izteikti akcentētas jau agrīni: **14. pētījuma dienā** tā statistiski būtiski ($p < 0,05$) pieauga līdz $412,8 \pm 75,3 \text{ U L}^{-1}$, salīdzinot ar 0. dienu ($59,2 \pm 5,5 \text{ U L}^{-1}$), kas atbilst aptuveni 7,0 reīzu pieaugumam. Arī **30. dienā** AP aktivitāte saglabājās statistiski būtiski ($p < 0,05$) paaugstināta, sasniedzot $329,2 \pm 46,7 \text{ U L}^{-1}$ (5,6 reizes virs 0. dienas). Lai gan **45. pētījuma dienā** bija vērojama mazināšanās līdz $157,2 \pm 86,4 \text{ U L}^{-1}$ (2,7 reizes virs sākotnējā līmeņa), rādītājs joprojām statistiski būtiski pārsniedza 0. dienas vērtību ($p < 0,05$) (skat. 3.1. tabulu).

Kortikosteroīdu inducētā sārmainā fosfatāze. Atbilstoši 3.1. tabulas datiem, kAP aktivitāte pēc metilprednizolona acetāta ievadīšanas uzrādīja īpaši izteiktu un noturīgu pieaugumu: **14. pētījuma dienā** tā statistiski būtiski ($p < 0,05$) paaugstinājās līdz $265,1 \pm 41,4 \text{ U L}^{-1}$, salīdzinot ar 0. dienu ($12,5 \pm 2,2 \text{ U L}^{-1}$), kas ir aptuveni 21,2 reizes vairāk nekā sākotnēji. **Trīsdesmitajā dienā** kAP aktivitāte saglabājās statistiski būtiski ($p < 0,05$) paaugstināta un sasniedza $210,4 \pm 36,6 \text{ U L}^{-1}$ (16,8 reizes virs 0. dienas). Neraugoties uz to, ka **45. pētījuma dienā** kAP aktivitāte samazinājās līdz $79,4 \pm 26,8 \text{ U L}^{-1}$ (6,4 reizes virs sākotnējā līmeņa), tā joprojām saglabājās statistiski būtiski augstāka nekā sākotnēji ($p < 0,05$) (skat. 3.1. tabulu).

3.2. tabula

Aknu enzīmu aktivitātes palielinājums (reizes) salīdzinājumā ar sākuma vērtībām KP suņiem pēc MPA ievadīšanas

Ferments	D0	D14	D30	D45
ALAT	1,0	3,0*	2,6*	1,6
GGT	1,0	3,9*	3,6	2,0
AP	1,0	7,0*	5,6*	2,7*
kAP	1,0	21,2*	16,8*	6,4*

* $p < 0,05$ salīdzinājumā ar 0. dienu

3.2. tabulā parādītas ALAT, GGT, AP un kAP relatīvās izmaiņas (reizes pret 0. dienu) KP suņiem pēc metilprednizolona acetāta ievadīšanas. Maksimālais pieaugums novērojams **14. dienā**, lielākajai daļai rādītāju šajos laika punktos izmaiņas ir statistiski būtiskās ($p < 0,05$). **30. dienā** enzīmu aktivitāte saglabājas paaugstināta (īpaši AP un kAP), bet **45. dienā** vērojama samazināšanās, tomēr AP un kAP joprojām ir statistiski būtiski augstāki nekā 0. dienā.

3.2.2. Aknu funkcionālā stāvokļa izmaiņas EP suņiem pēc MPA ievadīšanas

Eksperimentālajā pētījumā aknu funkcionālais stāvoklis tika novērtēts suņiem ($n = 7$) pēc MPA ievadīšanas (2 mg kg^{-1}). Lai raksturotu tikai kortikosteroīda ietekmi uz aknu enzīmu aktivitāti, šajā sadaļā analizēti dzīvnieki, kuri saņēma MPA un placebo jeb tapiokas pulveri (P grupa), turpmāk – EP suņi pēc MPA ievadīšanas. Asins paraugi iegūti 0., 7., 14., 21. un 28. dienā ($n = 35$), nosakot ALAT, GGT, AP un kAP aktivitāti asins serumā (skat. 3.3. tabulu).

Aknu enzīmu aktivitātes dinamika EP suņiem pēc MPA ievadīšanas

Ferments	Normas robežas**	D0	D7	D14	D21	D28
ALAT (U L ⁻¹)	0 – 94	45,83 ± 6,52	72,83 ± 7,99	75,54 ± 11,23	69,87 ± 10,18	51,10 ± 6,92
GGT (U L ⁻¹)	0 – 6	5,20 ± 0,29	11,37 ± 0,86*	14,36 ± 1,14*	13,90 ± 1,61*	11,37 ± 1,41*
AP (U L ⁻¹)	0 – 102	89,33 ± 14,17	210,16 ± 30,74*	213,47 ± 36,29*	242,97 ± 54,54*	189,74 ± 43,84
kAP (U L ⁻¹)	***	77,70 ± 13,16	173,56 ± 26,43*	177,33 ± 29,14*	173,56 ± 34,09*	134,77 ± 32,03

* p < 0,05 salīdzinājumā ar 0. dienu

** pēc Willard & Twedten, 2012

*** – kAP references intervāls nav piemērojams

Alanīnaminotransferāze. Saskaņā ar 3.3. tabulas datiem, pēc metilprednizolona acetāta ievadīšanas ALAT aktivitāte **7. pētījuma dienā** palielinājās līdz $72,83 \pm 7,99$ U L⁻¹, kas ir 1,6 reizes augstāka nekā 0. dienā ($45,83 \pm 6,52$ U L⁻¹), un **14. dienā** sasniedza $75,54 \pm 11,23$ U L⁻¹. **Divdesmit pirmajā dienā** ALAT aktivitāte bija $69,87 \pm 10,18$ U L⁻¹ (1,5 reizes virs 0. dienas vērtības), bet **28. dienā** samazinājās līdz $51,10 \pm 6,92$ U L⁻¹, tuvojoties sākuma vērtībām. Statistiski būtiskas izmaiņas ALAT aktivitātē netika konstatētas (p > 0,05).

Gammaglutamiltransferāze. Atbilstoši 3.3. tabulai, GGT aktivitāte pēc metilprednizolona acetāta ievadīšanas palielinājās jau **7. dienā** līdz $11,37 \pm 0,86$ U L⁻¹, kas ir 2,2 reizes augstāka nekā 0. dienā ($5,20 \pm 0,29$ U L⁻¹), un šis pieaugums bija statistiski būtisks (p < 0,05). **Četrpadsmitajā dienā** GGT aktivitāte sasniedza $14,36 \pm 1,14$ U L⁻¹ (2,8 reizes virs sākotnējā līmeņa; p < 0,05), **21. dienā** saglabājās $13,90 \pm 1,61$ U L⁻¹ (2,7 reizes virs 0. dienas; p < 0,05), bet **28. dienā** bija $11,37 \pm 1,41$ U L⁻¹ (2,2 reizes virs sākotnējās vērtības; p < 0,05).

Sārmainā fosfatāze. AP aktivitāte **7. dienā** statistiski būtiski (p < 0,05) pieauga līdz $210,16 \pm 30,74$ U L⁻¹, kas ir 2,4 reizes augstāka nekā 0. dienā ($89,33 \pm 14,17$ U L⁻¹). Arī **14. dienā** AP aktivitāte saglabājās $213,47 \pm 36,29$ U L⁻¹ (2,4 reizes virs sākotnējā līmeņa; p < 0,05), bet **21. dienā** sasniedza augstāko vidējo vērtību – $242,97 \pm 54,54$ U L⁻¹ (2,7 reizes virs 0. dienas; p < 0,05). **Divdesmit astotajā dienā** AP aktivitāte samazinājās līdz $189,74 \pm 43,84$ U L⁻¹, kas atbilst 2,1 reizes augstākam līmenim salīdzinājumā ar 0. dienu (p > 0,05) (skat. 3.3. tabulu).

Kortikosteroīdu inducētā sārmainā fosfatāze. Balstoties uz 3.3. tabulas rezultātiem, kAP aktivitāte **7. dienā** statistiski būtiski (p < 0,05) palielinājās līdz $173,56 \pm 26,43$ U L⁻¹, kas ir 2,2 reizes augstāka nekā 0. dienā ($77,70 \pm 13,16$ U L⁻¹). **Četrpadsmitajā dienā** kAP aktivitāte sasniedza $177,33 \pm 29,14$ U L⁻¹ (2,3 reizes virs sākotnējā līmeņa; p < 0,05), bet **21. dienā** saglabājās $173,56 \pm 34,09$ U L⁻¹ (2,2 reizes virs 0. dienas; p < 0,05). **Divdesmit astotajā dienā** kAP aktivitāte samazinājās līdz $134,77 \pm 32,03$ U L⁻¹, kas ir 1,7 reizes augstāka nekā sākotnēji (p > 0,05).

**Aknu enzīmu aktivitātes palielinājums (reizes) salīdzinājumā ar sākuma vērtībām
EP suņiem pēc MPA ievadīšanas**

Ferments	D0	D7	D14	D21	D28
ALAT	1,0	1,6	1,6	1,5	1,1
GGT	1,0	2,2*	2,8*	2,7*	2,2*
AP	1,0	2,4*	2,4*	2,7*	2,1
kAP	1,0	2,2*	2,3*	2,2*	1,7

*p < 0,05 salīdzinājuma ar 0. dienu

3.4. tabulā parādītas ALAT, GGT, AP un kAP relatīvās izmaiņas (reizes pret 0. dienu) EP suņiem pēc metilprednizolona acetāta ievadīšanas. Izteiktākās izmaiņas bija novērojamas pirmajās divās nedēļās: ALAT palielinājās mēreni, bez statistiski būtiskajām atšķirībām, savukārt GGT paaugstinājās un sasniedza maksimumu **14. dienā**; izmaiņas visos laika punktos bija statistiski būtiskās (p < 0,05). AP pieauga un sasniedza augstāko līmeni **21. dienā** (7.-21. dienā p < 0,05), bet **28. dienā** samazinājās. kAP paaugstinājās un sasniedza maksimumu **14. dienā** (7.-21. dienā p < 0,05), bet **28. dienā** samazinājās, tomēr saglabājoties virs sākotnējā līmeņa.

3.2.3. Aknu funkcionālā stāvokļa salīdzinājums KP un EP suņiem pēc MPA ievadīšanas

Lai salīdzinātu aknu funkcionālā stāvokļa izmaiņas KP un AP daļā pēc metilprednizolona acetāta ievadīšanas, tika analizētas aknu enzīmu aktivitātes relatīvās izmaiņas KP grupai, kas nelietoja hepatoprotektantu – grupai Nr. 1 (n = 14) un EP placebo (P) grupai (n = 7). Ņemot vērā atšķirīgo mērījumu plānojumu abās pētījuma daļās, enzīmu aktivitātes tika normalizētas, izsakot tās kā attiecību pret 0. dienas vērtību (reizes pret 0. dienu). Relatīvo izmaiņu salīdzinājums apkopots 3.5. tabulā.

**Aknu enzīmu aktivitātes salīdzinājums (reizes) KP un EP suņiem pēc MPA
ievadīšanas**

Ferments	2 nedēļas		Attiecība starp grupām	1 mēnesis		Attiecība starp grupām
	KP	EP		KP	EP	
ALAT	3,0	1,7	1,8	2,6	1,1	2,4
GGT	3,9	2,8	1,4	3,6	2,2	1,6
AP	7,0	2,4	2,9*	5,6	2,1	2,7*
kAP	21,2	2,3	9,2*	16,8	1,7	9,9*

*p < 0,05

Pēc divām nedēļām (14. dienā abās pētījuma grupās) KP grupā kopumā tika konstatēts izteiktāks enzīmu aktivitāšu pieaugums nekā EP grupā. ALAT aktivitāte KP suņiem sasniedza 3,0 reizes virs sākuma līmeņa, kamēr EP suņiem – 1,7 reizes. Līdzīga tendence novērota arī GGT gadījumā (attiecīgi 3,9 un 2,8 reizes). Izteiktākas starpgrupu atšķirības parādījās sārmainās fosfatāzes frakcijās: AP klīniskā pētījuma grupā (KP) palielinājās 7,0 reizes, bet EP

grupā – 2,4 reizes, un attiecība starp grupām šajā laika punktā bija statistiski būtiska ($p < 0,05$) (skat. 3.5. tabulu). Vislielākā atšķirība tika konstatēta kAP gadījumā – KP aktivitāte sasniedza 21,2 reizes virs sākuma līmeņa, kamēr EP grupā tā bija 2,3 reizes augstāka; arī šeit starpgrupu attiecība bija statistiski būtiska ($p < 0,05$) un atšķirās 9,2 reizēs (skat. 3.5. tabulu).

Pēc viena mēneša (KP – 30. dienā, EP – 28. dienā) KP suņiem relatīvās vērtības saglabājās izteikti paaugstinātas, savukārt EP grupā vairākiem rādītājiem bija novērojama tuvināšanās sākuma līmenim. ALAT klīniskā pētījuma grupā (KP) joprojām bija 2,6 reizes virs sākuma, bet EP grupā – 1,1 reizi. GGT aktivitāte attiecīgi saglabājās 3,6 un 2,2 reizes virs sākuma līmeņa. AP klīniskā pētījuma grupā (KP) bija 5,6 reizes, bet P grupā – 2,1 reizi virs sākotnējā līmeņa, un starpgrupu attiecība arī pēc viena mēneša saglabājās statistiski būtiska ($p < 0,05$) (skat. 3.5. tabulu). Līdzīgi kAP rādītāji norādīja uz noturīgu atšķirību starp pētījuma daļām: klīniskā pētījuma grupā kAP aktivitāte saglabājās 16,8 reizes virs sākuma līmeņa, kamēr EP grupā – 1,7 reizes, un starpgrupu attiecība bija statistiski būtiska ($p < 0,05$).

Kopumā relatīvo enzīmu aktivitāšu analīze parādīja, ka, lai gan ALAT un GGT abās pētījuma grupās paaugstinājās, visizteiktākās un statistiski apstiprinātās starpgrupu atšķirības attiecās uz AP un īpaši kAP, kas KP sasniedza daudzkārt augstāku pieaugumu un saglabājās noturīgi paaugstināts ($p < 0,05$) arī pēc viena mēneša (skat. 3.5. tabulu).

3.2.4. Aknu morfoloģiskās izmaiņas EP suņiem pēc MPA ievadīšanas

Šajā posmā histoloģiski tika analizēti visi aknu biopāti, kas iegūti no suņiem, kuriem lietoja placebo jeb tapiokas pulveri pēc metilprednizolona acetāta ievadīšanas pirmajā posmā (turpmāk – P1 grupa). Kopumā izvērtēti 9 biopāti, ($n = 9$) nodrošinot materiāla pilnīgu analīzi katram dzīvniekam visos paredzētajos laika punktos. Katram no P1 grupas suņiem tika analizēti trīs paraugi, kas iegūti 0., 14. un 28. pētījuma dienā.

Pirmais aktīvais periods

Izmaiņas hepatocītos. Pirmajā periodā, **0. dienā**, visiem dzīvniekiem aknu parenhīmā histoloģiskas pārmaiņas netika konstatētas: hepatocīti bija ar viendabīgu citoplazmu, saglabātu arhitektūru un bez redzamām vakuolām (skat. 3.1a. attēlu). **14. dienā** pēc MPA ievadīšanas tika novērotas steroīdai hepatopātijai raksturīgas smagas hepatocītu morfoloģiskās pārmaiņas: šūnu palielināšanās, citoplazmas vakuolizācija, granularitātes zudums un daļai hepatocītu perifēri novietoti kodoli (skat. 3.1d. attēlu). **28. dienā** visiem dzīvniekiem konstatētas vidēji smagas hepatocītu pārmaiņas (skat. 3.1c. attēlu), kas liecina par strukturālo izmaiņu daļēju mazināšanos salīdzinājumā ar 14. dienu (skat. 3.6. tabulu).

3.6. tabula

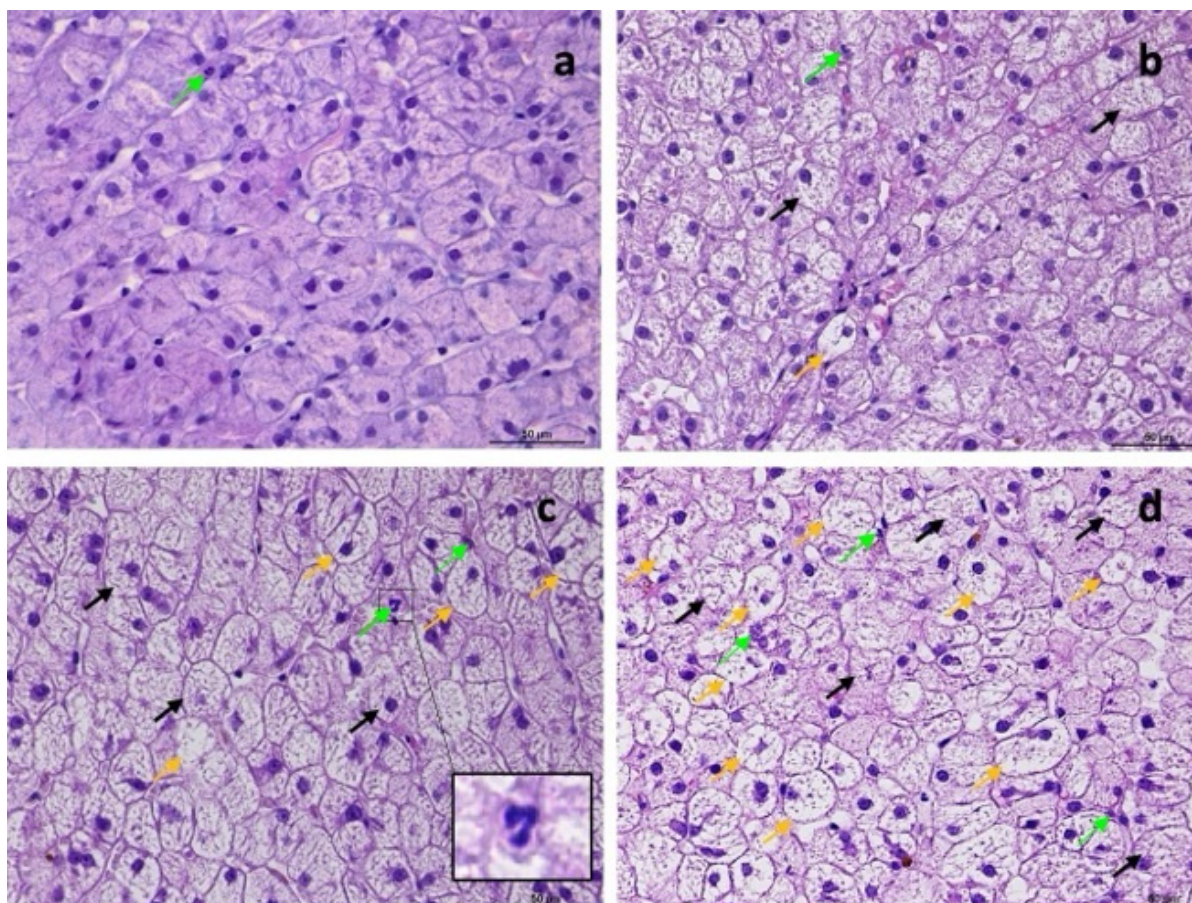
Aknu histoloģisko izmaiņu kvantitatīvs raksturojums EP placebo grupu (P) suņiem pēc MPA ievadīšanas dažādos pētījuma laika punktos

Dzīvnieku grupa	Izmaiņas hepatocītos			Neitrofīlo leukocītu skaits*		
	D0	D14	D28	D0	D14	D28
P1	0	3	2	1,00 ± 0,54	1,86 ± 0,26	3,00 ± 0,38
P2	2	2	2	3,00 ± 0,62	2,29 ± 0,42	2,14 ± 0,26

P1 – pirmā aktīvā perioda grupa, kurai pielietoja placebo;

P2 – otrā aktīvā perioda grupa, kurai pielietoja placebo;

* vidējais skaits 10 redzes laukos.



3.1. att. Reprezentatīvi attēli ar normālu aknu histoloģiju (a) un steroīdu hepatopātiju suņiem pēc metilprednizolona ievadīšanas: (b) vieglas, (c) vidēji smagas un (d) smagas pārmaiņas

Smalks retikulārs citoplazmas zīmējums (melnās bultiņas) ar citoplazmas vakuolizāciju (dzeltenās bultiņas) hepatocītos. Neitrofīlie leukocīti ir sastopami sinusoīdos (zaļās bultiņas). H&E; 400x

Neitrofīlo leukocītu infiltrācija. Segmentkodolaini neitrofīlie leukocīti **0. pētījuma dienā** apskatītajos redzes laukos tika konstatēti ļoti reti (vidēji aptuveni viens redzes laukā; skat. 3.1. attēlu un 3.6. tabulu). **14. dienā** tika novērots neliels neitrofīlo leukocītu skaita pieaugums līdz vidēji $1,86 \pm 0,26$ šūnām redzes laukā (vidējais skaits 10 redzes laukos), bet **28. dienā** – līdz $3,00 \pm 0,38$ šūnām redzes laukā. Neitrofīlie leukocīti galvenokārt lokalizējās aknu sinusoīdos un netika novēroti aknu parenhīmā. To sadalījums bija vienmērīgs, bez perēklveida uzkrājumiem un bez strukturāli destruktīvām izmaiņām vai nekrozes pazīmēm (skat. 3.1. attēlu).

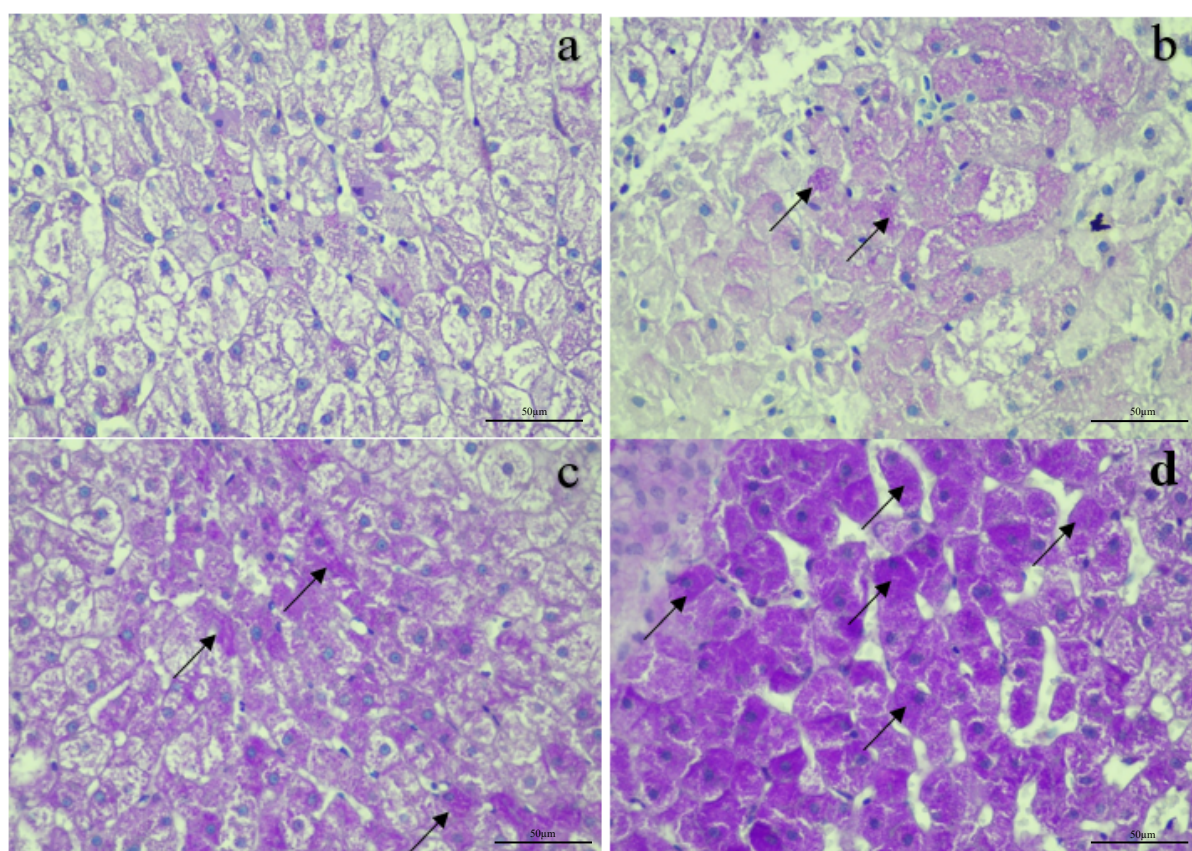
Glikogēna akumulācija hepatocītos. PAS reakcijā tika konstatēta glikogēna uzkrāšanās hepatocītu citoplazmā ar vieglu līdz vidēji smagu intensitāti (skat. 3.7. tabulu). **0. dienas** paraugos PAS pozitīvas glikogēna granulas netika novērotas, kas raksturo sākotnējo stāvokli bez izteiktas ogļhidrātu depoziācijas pazīmēm. Savukārt **14. pētījuma dienā** glikogēna uzkrāšanās tika konstatēta visiem dzīvniekiem – pārsvarā vieglas pakāpes, bet atsevišķos paraugos ar vidēji smagu intensitāti (skat. 3.2. attēlu). **28. dienā** glikogēna depoziācija saglabājās visos izmeklētajos paraugos, turklāt relatīvi biežāk tika novērota vidēji smaga uzkrāšanās. Daļā paraugu uzkrāšanās kļuva telpiski izteiktāka, ar izteiktāku lokalizāciju periportālajās zonās (skat. 3.7. tabulu).

Glikogēna akumulācijas un stellāta šūnu izmaiņu dinamika EP placebo grupu (P) suņiem pēc MPA ievadišanas dažādos pētījuma laika punktos

Dzīvnieku grupa	Glikogēna akumulācija (PAS)			Stellāta šūnas (n/100 hepatocīti)		
	D0	D14	D28	D0	D14	D28
P1	Negatīva (0)	Vieglā (1)	Vidēji smaga (2)	1,6 ± 0,38	4,57 ± 0,37	5,4 ± 1,58
P2	Vieglā (1)	Vieglā (1)	Vidēji smaga (2)	5,00 ± 0,76	4,71 ± 0,47	3,86 ± 0,74

P1 – pirmā aktīvā perioda grupa, kurai pielietoja placebo;

P2 – otrā aktīvā perioda grupa, kurai pielietoja placebo.



3.2. att. Reprezentatīvi attēli ar negatīvu (a) un pozitīvu glikogēna akumulāciju suņiem pēc metilprednizolona ievadišanas: (b) vieglas, (c) vidēji smagas un (d) smagas pārmaiņas

Pozitīva PAS reakcija (melnās bultiņas); PAS; 400x

Stellāta šūnu aktivācijas pazīmes. α -SMA imūnhistoķīmiskajā krāsojumā visos paraugos tika konstatēta pozitīva reakcija – perisinusoidāli lokalizētas stellāta šūnas, salīdzinot ar negatīvo kontroli. **0. pētījuma dienā** α -SMA pozitīvas stellāta šūnas tika konstatētas nelielā skaitā (līdz divām uz 100 hepatocītiem). **14. dienā** to skaits palielinājās līdz vidēji $4,57 \pm 0,37$ uz 100 hepatocītiem. Savukārt **28. dienā** tika novērots turpmāks pieaugums līdz vidēji 5,4 uz 100 hepatocītiem (atsevišķos redzes laukos līdz septiņām šūnām) (skat. 3.7. tabulu; vizuālais attēlojums 73. lpp., 3.19. attēls). Neskatoties uz kvantitatīvām izmaiņām, netika konstatētas fibrozes pazīmes.

Otrais aktīvais periods

Šajā sadaļā tika analizēti EP placebo grupas dzīvnieki (P2), kuri pirms atkārtotas metilprednizolona acetāta (MPA) ievadīšanas bija izgājuši atpūtas periodu. Jāuzsver, ka līdz otrā perioda sākumam, t.i., kopumā 56 dienas pēc iepriekšējās MPA injekcijas, aknu morfoloģiskie un šūnu rādītāji nebija pilnībā atgriezušies sākotnējā stāvoklī (skat. 3.6 tabulu). Šajā periodā P2 grupā bija četri dzīvnieki, ($n = 4$), kas iepriekšējā periodā saņēma antioksidantu mitokvinola mezilātu.

Izmaiņas hepatocītos. Kā jau bija minēts, otrā perioda sākumā (**0. diena**) hepatocīti nebija atgriezušies sākotnējā morfoloģiskajā stāvoklī, liecinot par saglabātām steroīdu ierosinātām pārmaiņām arī pēc atpūtas perioda. Kopumā hepatocītu izmaiņas šajā laika punktā tika vērtētas kā vidēji smagas. Arī **14. dienā** pēc atkārtotas MPA ievadīšanas būtiska regresija netika konstatēta, un hepatocītu pārmaiņas vidēji saglabājās vidēji smagas. Savukārt **28. dienā** daļai dzīvnieku bija vērojama daļēja regresija, tomēr atsevišķos gadījumos izmaiņas joprojām saglabājās smagas, kas norāda uz nepilnīgu aknu struktūras atjaunošanos otrā perioda laikā (skat. 3.6. tabulu).

Neitrofilo leukocītu infiltrācija. Neitrofilo leukocītu skaits otrajā periodā saglabājās zems un laika gaitā būtiski nemainījās: **0. dienā** tas bija vidēji $3,00 \pm 0,62$ šūnas redzes laukā, **14. dienā** – $2,29 \pm 0,42$, bet **28. dienā** – $2,14 \pm 0,26$ šūnas redzes laukā. Neitrofilie leukocīti galvenokārt lokalizējās sinusoīdos un netika novēroti aknu parenhīmā. To sadalījums bija vienmērīgs, bez perēkļveida uzkrājumiem un bez strukturāli destruktīvām izmaiņām. Šī aina, visticamāk, atspoguļo cirkulējošas šūnas, nevis patiesu iekaisuma infiltrāciju (skat. 3.6. tabulu).

Glikogēna akumulācija hepatocītos. Atšķirībā no pirmā perioda, otrā perioda sākumā (**0. dienā**) glikogēna akumulācija jau tika konstatēta vairumam dzīvnieku, kas saskan ar secinājumu, ka aknu šūnas līdz otrā perioda sākumam nebija pilnībā atgriezušās sākotnējā metaboliski-morfoloģiskajā stāvoklī (skat. 3.7. tabulu). Pēc atkārtotas MPA ievadīšanas (**14. dienā**) glikogēna uzkrāšanās kļuva izteiktāka, bet **28. dienā** daļai dzīvnieku novērota tikai neliela regresija, saglabājoties PAS pozitīvām granulām lielākajā daļā hepatocītu.

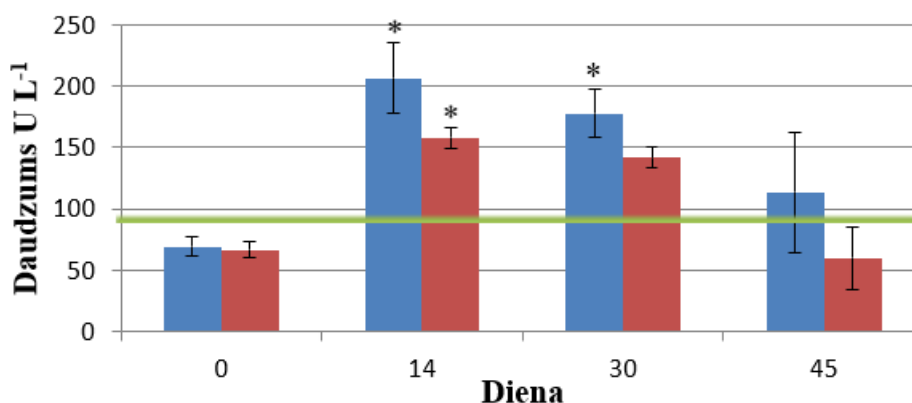
Stellāta šūnu aktivācijas pazīmes. α -SMA pozitīvas perisinusoidālās šūnas otrā perioda sākumā saglabājās, un pēc atkārtotas MPA ievadīšanas to klātbūtne tika konstatēta arī vēlākajos laika punktos (skat. 3.7. tabulu). Stellāta šūnu skaits uz 100 hepatocītiem **0. dienā** bija vidēji $5,00 \pm 0,76$, **14. dienā** – $4,71 \pm 0,47$, bet **28. dienā** – $3,86 \pm 0,74$, kas norāda uz pakāpenisku mazināšanos otrā perioda laikā. Neskatoties uz novērotajām kvantitatīvajām izmaiņām, netika konstatētas pārliecinošas fibrozes pazīmes.

3.3. Hepatoprotektīvās terapijas ietekme uz aknu morfofunkcionālo stāvokli suņiem pēc MPA ievadīšanas

3.3.1. Hepatoprotektīvās terapijas ietekme uz aknu funkcionālo stāvokli KP suņiem pēc MPA ievadīšanas

Klīniskā pētījuma (KP) daļā hepatoprotektanta iespējamā ietekme tika vērtēta, salīdzinot aknu enzīmu (ALAT, GGT, AP un kAP) aktivitātes dinamiku suņiem, kuri pēc metilprednizolona acetāta ievadīšanas hepatoprotektantu nesaņēma (grupa Nr. 1; $n = 14$), un suņiem, kuri papildus saņēma hepatoprotektantu (grupa Nr. 2; $n = 14$). Statistiskā ticamība norādīta katrā grupā salīdzinājumā ar 0. dienas vērtību un starp grupām konkrētajās dienās ($p < 0,05$).

Alanīnaminotransferāze. Grupā Nr. 2, kurai lietoja hepatoprotektantu *GlutaMax*, pēc MPA ievadīšanas ALAT aktivitāte **14. pētījuma dienā** statistiski būtiski ($p < 0,05$) palielinājās līdz $160,1 \pm 7,0 \text{ U L}^{-1}$, kas atbilst 2,3 reizu pieaugumam salīdzinājumā ar 0. dienu (skat. 3.3. attēlu; 3.6. tabulu). Savukārt, grupā Nr. 1, kurai hepatoprotektants netika lietots, 14. dienā ALAT sasniedza $206,4 \pm 28,8 \text{ U L}^{-1}$, kas ir 3,0 reizes virs sākuma līmeņa ($p < 0,05$) (skat. 3.3. attēlu).



3.3. att. Alanīnaminotransferāzes koncentrācijas izmaiņas asinīs KP suņiem

Rādītāji suņiem, kuri saņēma hepatoprotektantu (grupa Nr. 1) – zilā krāsā, nesaņēma (grupa Nr. 2) – sarkanā krāsā. Dati attēloti kā vidējā vērtība $\pm$ standartnovirze. Zaļā līnija norāda ALAT augšējo references robežu suņiem ($0-94 \text{ U L}^{-1}$) (Willard & Tvedten, 2012). * $p < 0,05$

Suņu grupā Nr. 2 **30. pētījuma dienā**, ALAT bija $141,3 \pm 8,6 \text{ U L}^{-1}$ (aptuveni 2,0 reizes virs sākuma līmeņa), un atšķirība pret 0. dienu vairs nebija statistiski nozīmīga ($p > 0,05$). Tīkmēr suņu grupā Nr. 1, ALAT saglabājās statistiski būtiski paaugstināts – $177,6 \pm 19,5 \text{ U L}^{-1}$ (2,6 reizu pieaugums; $p < 0,05$) (skat. 3.3. attēlu).

ALAT aktivitāte **45. pētījuma dienā** grupā Nr. 2 samazinājās līdz $59,9 \pm 25,5 \text{ U L}^{-1}$ (aptuveni 0,9 reizes pret 0. dienu; $p > 0,05$), savukārt suņu grupā, Nr. 1, kurai hepatoprotektants netika lietots, tā bija $113,5 \pm 48,8 \text{ U L}^{-1}$ (1,6 reizes virs sākuma; $p > 0,05$) (skat. 3.3. attēlu).

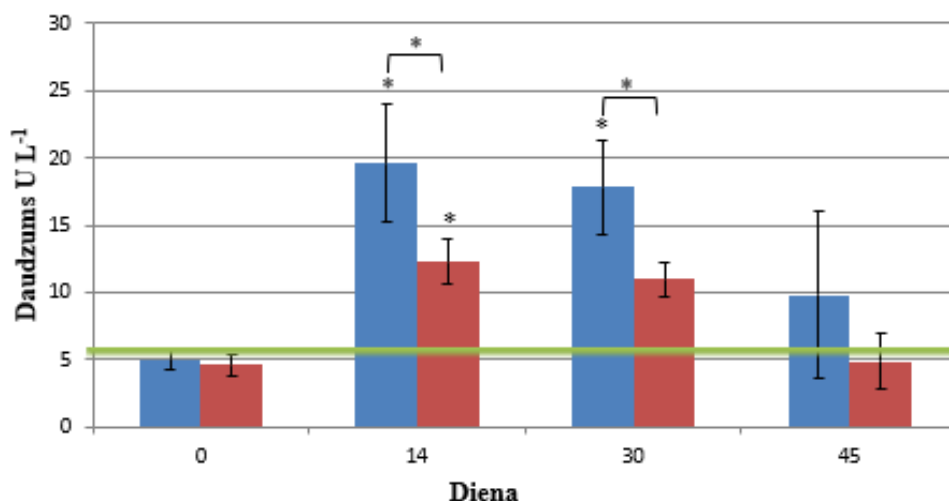
Starp suņu grupām 14., 30. un 45. pētījuma dienā statistiski būtiska atšķirība netika konstatēta ($p > 0,05$).

Gammaglutamiltransferāze. Suņu grupā Nr. 2, kurai papildus MPA lietoja arī hepatoprotektantu, **14. pētījuma dienā** GGT aktivitāte statistiski būtiski ($p < 0,05$) palielinājās līdz $12,3 \pm 1,7 \text{ U L}^{-1}$, kas atbilst 2,5 reizu pieaugumam salīdzinājumā ar 0. dienu (skat. 3.5. attēlu; 3.6. tabulu). Savukārt suņu grupā Nr. 1, kurai hepatoprotektants netika lietots, GGT tajā pašā laika punktā sasniedza $19,6 \pm 4,4 \text{ U L}^{-1}$, kas ir 3,9 reizes virs sākuma līmeņa ($p < 0,05$) (skat. 3.4. attēlu).

Suņu grupā Nr. 2 **30. pētījuma dienā**, GGT aktivitāte samazinājās līdz $11,0 \pm 1,3 \text{ U L}^{-1}$ (aptuveni 2,2 reizes virs 0. dienas līmeņa), un atšķirība pret sākuma līmeni vairs nebija statistiski nozīmīga ($p > 0,05$). Tīkmēr suņu grupā Nr. 1, kurai hepatoprotektants netika lietots, GGT saglabājās statistiski būtiski paaugstināts – $17,8 \pm 3,5 \text{ U L}^{-1}$ (3,6 reizu pieaugums; $p < 0,05$) (skat. 3.4. attēlu).

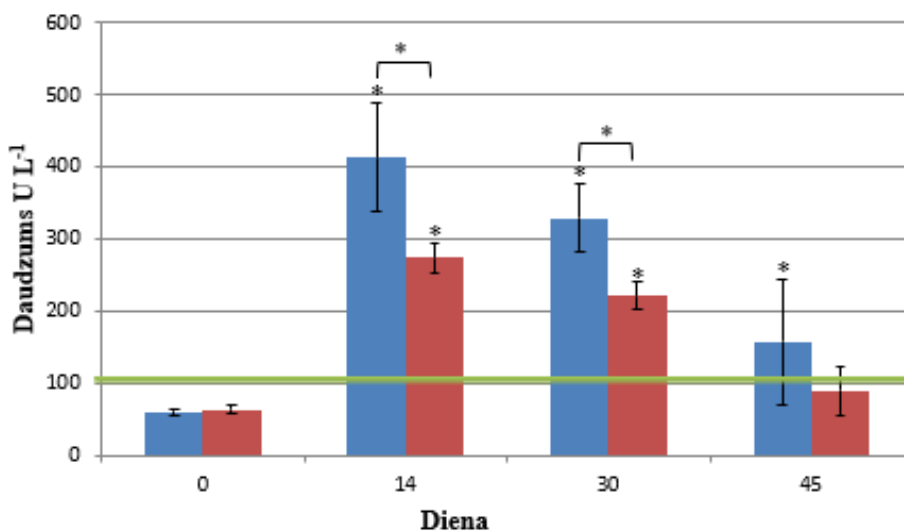
GGT aktivitāte **45. pētījuma dienā** abās grupās turpināja samazināties. Suņu grupā Nr. 2, kurai lietoja hepatoprotektantu, tā bija $4,9 \pm 2,0 \text{ U L}^{-1}$ (līdzīgi, kā 0. dienā; $p > 0,05$), savukārt suņu grupā Nr. 1, kurai hepatoprotektants netika lietots, – $9,8 \pm 6,2 \text{ U L}^{-1}$ (2,0 reizes virs sākuma; $p > 0,05$) (skat. 3.4. attēlu).

Starp suņu grupām 14. un 30. pētījuma dienā tika konstatēta statistiski būtiska atšķirība ($p < 0,05$), bet 45. dienā statistiski nozīmīga starpība netika iegūta ($p > 0,05$).



3.4. att. **Gammaglutamiltransferāzes koncentrācijas izmaiņas asinīs KP suņiem**
Rādītāji suņiem, kuri saņēma hepatoprotektantu (grupa Nr. 1) – zilā krāsā, nesaņēma (grupa Nr. 2) – sarkanā krāsā. Dati attēloti kā vidējā vērtība ± standartnovirze. Zaļā līnija norāda GGT augšējo references robežu suņiem (0-6 U L⁻¹) (Willard & Twedten, 2012). * p < 0,05

Sārmainā fosfatāze. Suņu grupā Nr. 2, kurai lietoja hepatoprotektantu, pēc metilprednizolona acetāta ievadīšanas AP aktivitāte strauji pieauga un **14. pētījuma dienā** sasniedza $274,0 \pm 20,5$ U L⁻¹, kas ir 4,6 reizes virs sākuma līmeņa; pieaugums bija statistiski būtisks (p < 0,05). Tajā pašā laika punktā suņu grupā Nr. 1, kurai hepatoprotektants netika lietots, AP pieaugums bija izteiktāks – $412,8 \pm 75,3$ U L⁻¹ jeb 7,0 reizes virs 0. dienas līmeņa (p < 0,05) (skat. 3.5. attēlu).



3.5. att. **Sārmainās fosfatāzes koncentrācijas izmaiņas asinīs KP suņiem**
Rādītāji suņiem, kuri saņēma hepatoprotektantu (grupa Nr. 1) – zilā krāsā, nesaņēma (grupa Nr. 2) – sarkanā krāsā. Dati attēloti kā vidējā vērtība ± standartnovirze. Zaļā līnija norāda AP augšējo references robežu suņiem (0-102 U L⁻¹) (Willard & Twedten, 2012). * p < 0,05

Abās grupās **30. dienā** AP aktivitāte saglabājās statistiski būtiski paaugstināta (p < 0,05), tomēr saglabājās arī atšķirība pēc pieauguma apjoma: suņu grupā Nr. 2, kurai lietoja hepatoprotektantu, tā bija $221,2 \pm 18,1$ U L⁻¹ (3,7 reizes virs sākuma līmeņa), bet suņu grupā Nr. 1, kurai hepatoprotektants netika lietots – $329,2 \pm 46,7$ U L⁻¹ (5,6 reizes virs sākuma līmeņa) (skat. 3.5. attēlu).

45. pētījuma dienā dinamika starp grupām kļuva atšķirīga: suņu grupā Nr.2, kurai lietoja hepatoprotektantu, AP samazinājās līdz $89,3 \pm 33,9 \text{ U L}^{-1}$ (aptuveni 1,5 reizes pret 0. dienas līmeni) un vairs statistiski būtiski neatšķīrās no sākotnējās vērtības ($p > 0,05$). Savukārt suņu grupā Nr. 1 AP koncentrācija joprojām bija statistiski būtiski paaugstināta – $157,2 \pm 86,4 \text{ U L}^{-1}$ (2,7 reizes virs sākuma līmeņa; $p < 0,05$) (skat. 3.5. attēlu).

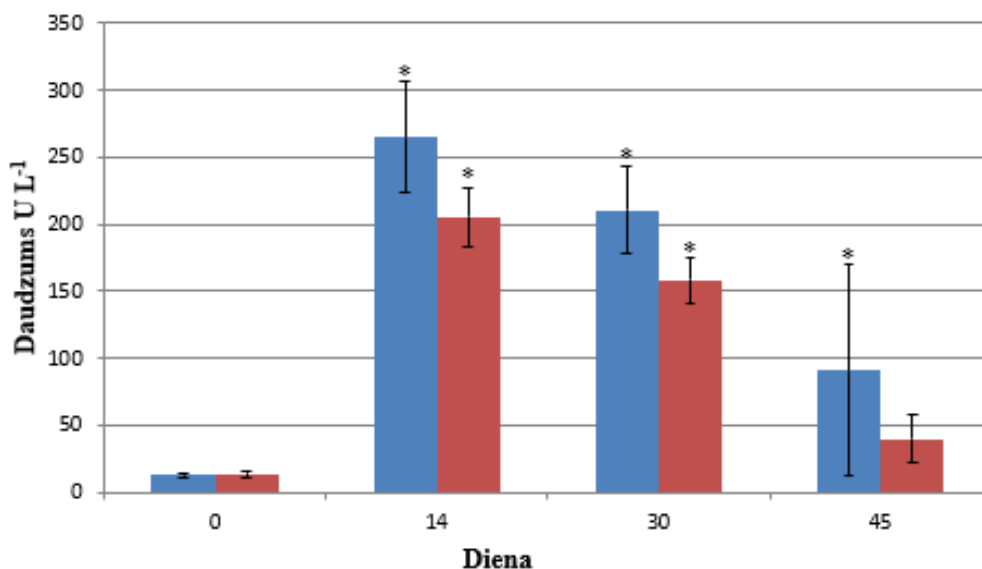
AP aktivitāte bija statistiski būtiski zemāka ($p < 0,05$) suņu grupā Nr. 2, kurai lietoja hepatoprotektantu, **14. un 30. pētījuma dienā**, bet **45. dienā** statistiski nozīmīga starpība starp grupām netika konstatēta ($p > 0,05$) (skat. 3.5. attēlu).

Kortikosteroīdu inducētā sārmainā fosfatāze. kAP aktivitātes dinamika pēc MPA ievadīšanas bija izteikti raksturīga steroīdu ietekmei – ar strauju pieaugumu un ilgstošu noturību. Suņu grupā Nr. 2, kurai lietoja hepatoprotektantu, **14. pētījuma dienā** kAP aktivitāte statistiski būtiski ($p < 0,05$) palielinājās līdz $205,2 \pm 22,5 \text{ U L}^{-1}$, kas atbilst 16,4 reižu pieaugumam salīdzinājumā ar 0. dienu. Salīdzinājumam, suņu grupā Nr. 1, kurai hepatoprotektants netika lietots, kAP tajā pašā laika punktā sasniedza $265,1 \pm 41,4 \text{ U L}^{-1}$ jeb 21,2 reizes virs sākuma līmeņa ($p < 0,05$) (skat. 3.6. attēlu).

Abās grupās **30. pētījuma dienā** kAP aktivitāte joprojām saglabājās statistiski būtiski paaugstināta ($p < 0,05$): suņu grupā Nr. 2 tā bija $158,4 \pm 17,1 \text{ U L}^{-1}$ (12,7 reizes virs 0. dienas līmeņa), bet suņu grupā Nr. 1 – $210,4 \pm 36,6 \text{ U L}^{-1}$ (16,8 reizes virs sākuma līmeņa) (skat. 3.6. attēlu).

Lai arī abās grupās bija vērojama izteikta kAP aktivitātes samazināšanās **45. pētījuma dienā**, pilnīga normalizācija nenotika vienādi. Suņu grupā Nr. 1, kAP saglabājās statistiski būtiski augstāka par 0. dienu ($79,4 \pm 26,8 \text{ U L}^{-1}$; 6,4 reizes virs sākuma līmeņa; $p < 0,05$), savukārt suņu grupā Nr. 2 tā bija $39,8 \pm 18,1 \text{ U L}^{-1}$ (aptuveni 3,2 reizes pret 0. dienas līmeni; $p < 0,05$, kā atzīmēts 3.6. attēlā).

Neraugoties uz atšķirīgo pieauguma apjomu un noturību, starp suņu grupām 14., 30. un 45. pētījuma dienā statistiski būtiska atšķirība netika konstatēta ($p > 0,05$) (skat. 3.6. attēlu).



3.6. att. **Kortikosteroīdu inducētās sārmainās fosfatāzes koncentrācijas izmaiņas asinīs KP suņiem**

Rādītāji suņiem, kuri saņēma hepatoprotektantu (grupa Nr. 1) – zilā krāsā, nesaņēma (grupa Nr. 2) – sarkanā krāsā. Dati attēloti kā vidējā vērtība $\pm$ standartnovirze. kAP references intervāls nav piemērojams. * $p < 0,05$.

Lai raksturotu hepatoprotektanta lietošanas ietekmi uz aknu enzīmu dinamiku KP suņiem pēc MPA ievadīšanas, tika analizētas ALAT, GGT, AP un kAP aktivitātes relatīvās izmaiņas dažādos pētījuma laika punktos. Lai nodrošinātu salīdzināmību starp mērījumiem, enzīmu

aktivitātes tika normalizētas, izsakot tās kā attiecību pret 0. dienas vērtību (reizes pret 0. dienu). Relatīvo izmaiņu kopsavilkums un statistiskā nozīmība salīdzinājumā ar sākuma rādītājiem apkopota 3.8. tabulā.

3.8. tabula

Aknu enzīmu aktivitātes palielinājums (reizes) salīdzinājumā ar sākuma vērtībām KP suņiem pēc MPA ievadišanas, lietojot hepatoprotektantu

Ferments	D0	D14	D30	D45
ALAT	1,0	2,3*	2,0	0,9
GGT	1,0	2,5*	2,2	1,0
AP	1,0	4,6*	3,7*	1,5
kAP	1,0	16,4*	12,7*	3,2*

* $p < 0,05$

Visizteiktākās izmaiņas konstatētas **14. pētījuma dienā**, kad visu analizēto enzīmu aktivitāte statistiski būtiski palielinājās: ALAT – 2,3, GGT – 2,5, AP – 4,6 un kAP – 16,4 reizes ($p < 0,05$) (skat. 3.8. tabulu).

Pēc agrīnā pieauguma **30. pētījuma dienā** daļai rādītāju saglabājās izteiktāka noturība: statistiski nozīmīgs pārsniegums salīdzinājumā ar 0. dienu tika konstatēts AP (3,7 reizes; $p < 0,05$) un īpaši kAP (12,7 reizes; $p < 0,05$) gadījumā. Tikmēr ALAT un GGT vērtības, lai arī vēl bija virs sākotnējā līmeņa, šajā laika punktā vairs netika apstiprinātas kā statistiski nozīmīgi atšķirīgas ($p > 0,05$), kas liecina par šo parametru dinamisku stabilizēšanos (skat. 3.8. tabulu).

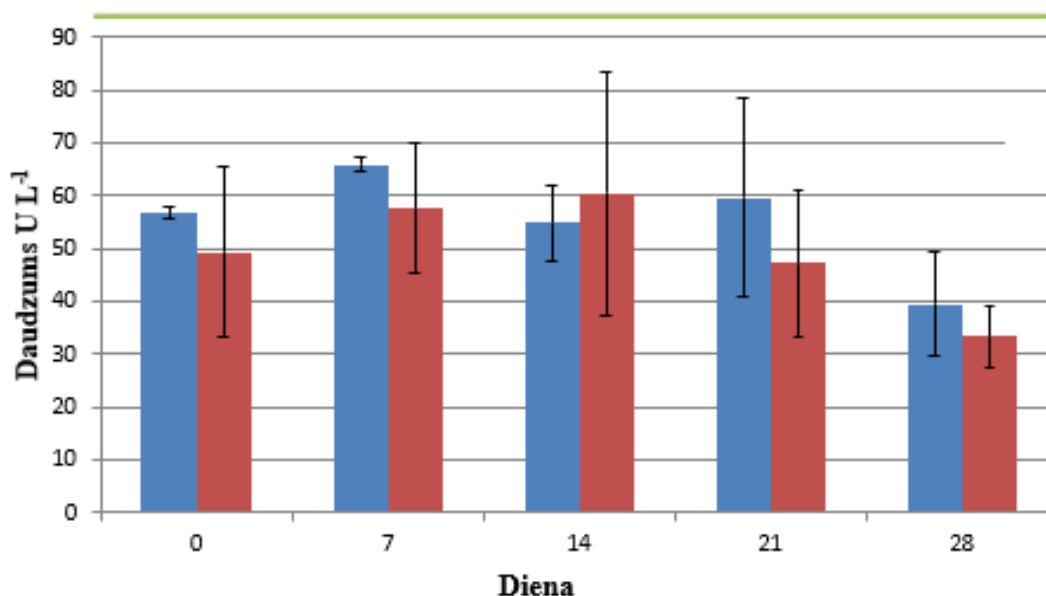
Enzīmu aktivitāte turpināja mazināties **45. pētījuma dienā**, atspoguļojot normalizācijas tendenci hepatoprotektanta lietošanas fonā. Tomēr pilnīga atgriešanās pie sākuma līmeņa nebija vienmērīga visiem rādītājiem: kAP saglabājās paaugstināts 3,2 reizes un bija interpretējams kā statistiski būtisks pārsniegums salīdzinājumā ar 0. dienu ($p < 0,05$) (skat. 3.8. tabulu).

3.3.2. Hepatoprotektīvās terapijas ietekme uz aknu funkcionālo stāvokli EP suņiem pēc MPA ievadišanas

Eksperimentālajā pētījumā (EP) hepatoprotektanta (mitokvinola mezilāts) ietekme tika izvērtēta, salīdzinot aknu enzīmu (ALAT, GGT, AP un kAP) aktivitātes dinamiku suņiem, kuri saņēma hepatoprotektantu (MQ grupa), un suņiem, kuri saņēma placebo (P grupa). Analīze veikta atsevišķi pirmajā aktīvajā periodā (MQ1 un P1), otrajā aktīvajā periodā (MQ2 un P2), kā arī apkopotajos krossovera datos (MQK un PK). Statistiskā ticamība norādīta katrai grupai atsevišķi salīdzinājumā ar 0. dienu; starpgrupu salīdzinājumi konkrētajās dienās norādīti, ja attiecīgajā laika punktā konstatēta statistiski nozīmīga atšķirība ($p < 0,05$).

Pirmais aktīvais periods (MQ1 un P1)

Alanīnaminotransferāze. Pirmā aktīvā perioda **septītajā dienā** suņiem no MQ1 grupas ALAT vidējā vērtība ($65,95 \pm 1,16 \text{ U L}^{-1}$) bija nebūtiski augstāka nekā nultajā dienā ($56,65 \pm 1,21 \text{ U L}^{-1}$), tāpat kā suņiem no P1 grupas (attiecīgi, $57,63 \pm 12,30 \text{ U L}^{-1}$ un $49,23 \pm 16,11 \text{ U L}^{-1}$) (skat. 3.7. attēlu).



3.7. att. Alanīnaminotransferāzes koncentrācijas izmaiņas asinīs EP suņiem pirmajā periodā

Rādītāji suņiem, kuri saņēma mitokvinola mezilātu (MQ1) – zilā krāsā, placebo (P1) – sarkanā krāsā. Dati attēloti kā vidējā vērtība $\pm$ standartnovirze. Zaļā līnija norāda ALAT augšējo references robežu suņiem ($0-94 \text{ U L}^{-1}$) (Willard & Twedten, 2012). * $p < 0,05$

Pētījuma **14. dienā** ALAT vidējā vērtība ($54,83 \pm 7,05 \text{ U L}^{-1}$) suņiem no MQ1 grupas bija nedaudz zemāka nekā nultajā dienā. Suņiem no P1 grupas ($60,27 \pm 40,31 \text{ U L}^{-1}$) šis rādītājs arī būtiski neatšķīrās no 0. dienas vērtībām, bet bija nedaudz augstāks nekā suņiem no MQ1 grupas (skat. 3.7. attēlu).

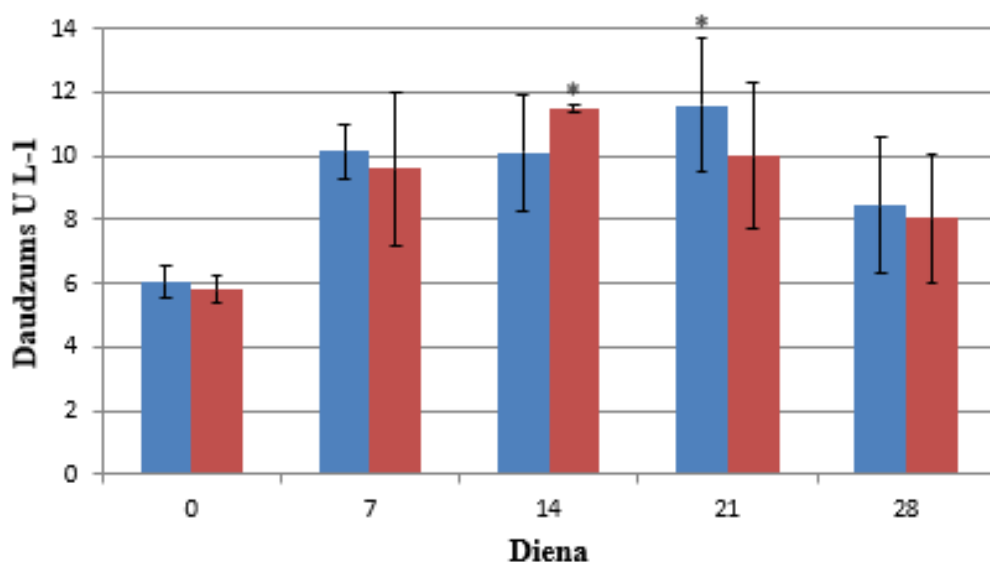
Pētījuma **21. dienā** suņiem no MQ1 grupas ALAT vidējā vērtība bija $59,60 \pm 18,77 \text{ U L}^{-1}$, savukārt suņiem no P1 grupas ALAT vidējā vērtība ($47,27 \pm 13,82 \text{ U L}^{-1}$) bija nebūtiski zemāka par 0. dienas vērtību un zemāka nekā suņiem no MQ1 grupas (skat. 3.6. attēlu).

Pētījuma **28. dienā** suņiem no MQ1 grupas ALAT vidējā vērtība ($39,40 \pm 9,85 \text{ U L}^{-1}$) bija zemāka nekā nultajā dienā, līdzīgi notika suņiem no P1 grupas ($33,40 \pm 5,84 \text{ U L}^{-1}$) (skat. 3.7. attēlu).

Visā pirmā perioda laikā abu grupu dzīvniekiem netika konstatētas statistiski būtiskas ($p > 0,05$) ALAT aktivitātes izmaiņas ne starp mērījumu dienām, ne starp grupām.

Gammaglutamiltransferāze. Septītajā dienā pēc pirmā aktīvā perioda sākuma MQ1 grupas suņiem GGT aktivitāte sasniedza $10,15 \pm 0,43 \text{ U L}^{-1}$ un bija augstāka nekā 0. dienā ($6,05 \pm 0,26 \text{ U L}^{-1}$). P1 grupas dzīvniekiem šajā laikā GGT aktivitāte arī bija $9,60 \pm 1,39 \text{ U L}^{-1}$ un arī augstāka nekā sākumā ($5,80 \pm 0,25 \text{ U L}^{-1}$). Abās grupās šīs izmaiņas nebija statistiski nozīmīgas ($p > 0,05$) (skat. 3.8. attēlu).

MQ1 grupas dzīvniekiem **14. dienā** GGT aktivitāte bija $10,10 \pm 0,90 \text{ U L}^{-1}$ un augstāka nekā 0. dienā. P1 grupā šajā laikā GGT aktivitāte sasniedza $11,50 \pm 0,06 \text{ U L}^{-1}$ un bija statistiski būtiski augstāka ($p < 0,05$) nekā sākotnējā vērtība (skat. 3.8. attēlu).



3.8. att. Gammaglutamiltransferāzes koncentrācijas izmaiņas asinīs EP suņiem pirmajā periodā

Rādītāji suņiem, kuri saņēma mitokvinola mezilātu (MQ1) – zilā krāsā, placebo (P1) – sarkanā krāsā. Dati attēloti kā vidējā vērtība $\pm$ standartnovirze. Zaļā līnija norāda GGT augšējo references robežu suņiem ($0-6 \text{ U L}^{-1}$) (Willard & Twedten, 2012). * $p < 0,05$

Pētījuma **21. dienā** MQ1 grupas dzīvniekiem GGT aktivitāte paaugstinājās līdz $11,60 \pm 1,04 \text{ U L}^{-1}$ un statistiski būtiski virs sākuma līmeņa ($p < 0,05$). P1 grupā šajā laikā tika novērota samazināšanās tendence – GGT aktivitāte bija $10,00 \pm 1,32 \text{ U L}^{-1}$ jeb 1,7 reizes augstāka nekā 0. dienā. Izmaiņas P1 grupā nebija statistiski nozīmīgas ($p > 0,05$) (skat. 3.8. attēlu).

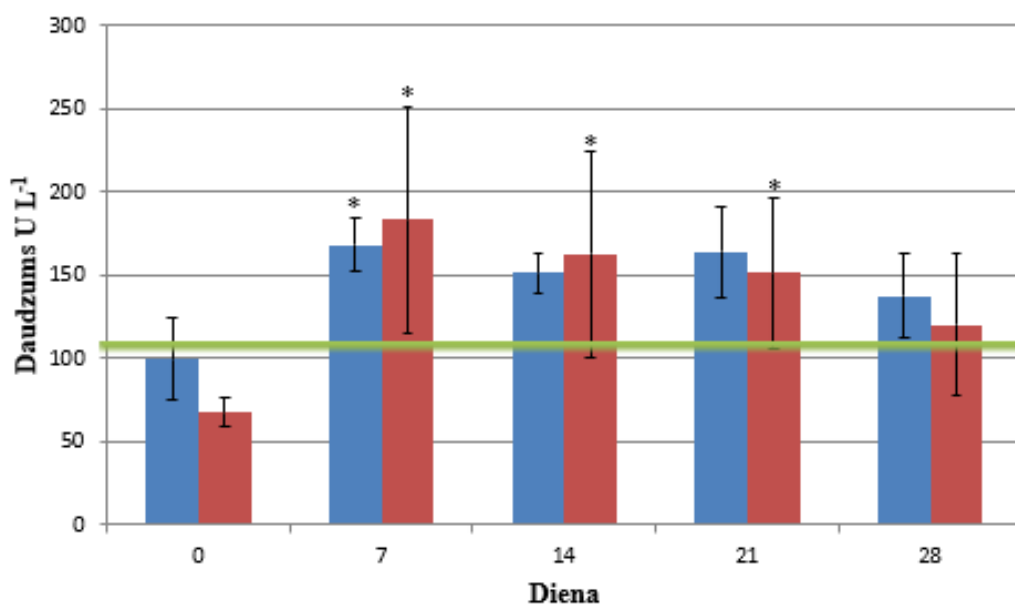
Pētījuma noslēgumā, **28. dienā**, MQ1 grupas dzīvniekiem GGT aktivitāte samazinājās līdz $8,45 \pm 1,06 \text{ U L}^{-1}$, taču vēl neatgriezās sākotnējā līmenī. P1 grupas dzīvniekiem šajā dienā GGT aktivitāte bija $8,07 \pm 1,17 \text{ U L}^{-1}$. Abās grupās GGT aktivitāte šajā laikā vairs nebija statistiski būtiski atšķirīga no sākuma vērtībām (skat. 3.8. attēlu).

Visā pirmā perioda laikā abu grupu dzīvniekiem netika konstatētas statistiski būtiskas ($p > 0,05$) izmaiņas starp grupām.

Sārmainā fosfatāze. MQ1 grupas suņiem **7. dienā** pēc eksperimenta sākuma AP aktivitāte asins serumā bija $167,85 \pm 16,08 \text{ U L}^{-1}$, un augstāka nekā pētījuma sākumā ($99,60 \pm 25,09 \text{ U L}^{-1}$). P1 grupā šis rādītājs sasniedza $183,23 \pm 67,70 \text{ U L}^{-1}$ un bija augstāks, nekā 0. dienā ($67,40 \pm 8,81 \text{ U L}^{-1}$), atšķirība abās grupās pret 0. dienu bija statistiski būtiska ($p < 0,05$) (skat. 3.9. attēlu).

AP aktivitāte **14. dienā** MQ1 grupā bija $151,18 \pm 12,47 \text{ U L}^{-1}$ un vairs būtiski neatšķīrās no 0. dienas ($p > 0,05$), P1 grupā šajā pašā laikā AP aktivitāte bija $162,73 \pm 61,69 \text{ U L}^{-1}$, statistiski būtiski augstāka, salīdzinot ar 0. dienu ($p < 0,05$) (skat. 3.9. attēlu).

Divdesmit pirmajā dienā MQ1 grupas dzīvniekiem AP aktivitāte sasniedza $163,93 \pm 26,88 \text{ U L}^{-1}$. P1 grupā attiecīgais rādītājs bija $151,20 \pm 44,81 \text{ U L}^{-1}$ un augstāks par sākuma līmeni; atšķirība P1 grupā, salīdzinot ar 0. dienu, bija statistiski būtiska ($p < 0,05$) (skat. 3.9. attēlu).



3.9. att. Sārmainās fosfatāzes koncentrācijas izmaiņas asinīs

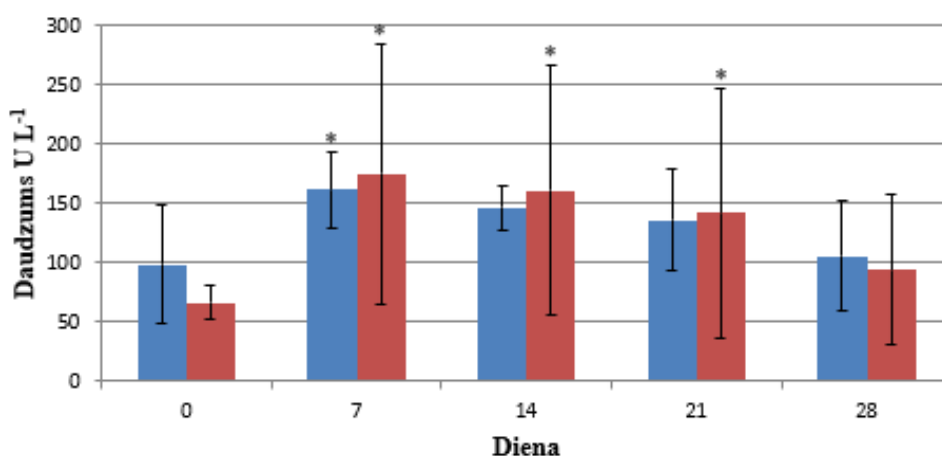
EP suņiem pirmajā periodā

Rādītāji suņiem, kuri saņēma mitokvinola mezilātu (MQ1) – zilā krāsā, placebo (P1) – sarkanā krāsā. Dati attēloti kā vidējā vērtība ± standartnovirze. Zaļā līnija norāda AP augšējo references robežu suņiem (0-102 U L⁻¹) (Willard & Twedten, 2012). * p < 0,05

Eksperimenta noslēgumā, **28. dienā**, MQ1 grupas suņiem AP aktivitāte bija $137,70 \pm 25,27$ U L⁻¹. P1 grupā šajā dienā aktivitāte sasniedza $119,87 \pm 42,57$ U L⁻¹ un bija nedaudz augstāka nekā sākumā. Abās grupās rādītāji neatšķīrās statistiski būtiski no 0. dienas (skat. 3.9. attēlu).

Visā pirmā perioda laikā abu grupu dzīvniekiem netika konstatētas statistiski būtiskas (p > 0,05) izmaiņas starp grupām.

Kortikosteroīdu inducēta sārmainā fosfatāze. MQ1 grupas suņiem **7. dienā** no eksperimenta sākuma kAP aktivitāte sasniedza $161,95 \pm 16,00$ U L⁻¹ un bija statistiski būtiski augstāka, nekā 0. dienā ($98,43 \pm 24,87$ U L⁻¹). P1 grupā šajā pašā laikā kAP aktivitāte bija $174,90 \pm 63,22$ U L⁻¹ un augstāka nekā sākumā. Šīs izmaiņas abās grupās bija statistiski būtiskas (p < 0,05) (skat. 3.10. attēlu).



3.10. att. Kortikosteroīdu inducētās sārmainās fosfatāzes koncentrācijas izmaiņas asinīs

EP suņiem pirmajā periodā

Rādītāji suņiem, kuri saņēma mitokvinola mezilātu (MQ1) – zilā krāsā, placebo (P1) – sarkanā krāsā. Dati attēloti kā vidējā vērtība ± standartnovirze. kAP references intervāls nav piemērojams. * p < 0,05

MQ1 grupā **14. dienā** kAP aktivitāte sāka samazināties un bija $146,38 \pm 9,44 \text{ U L}^{-1}$, būtiski neatšķīroties no 0. dienas. Līdzīga tendence novērota arī P1 grupā, kur rādītājs sasniedza $161,03 \pm 61,96 \text{ U L}^{-1}$, taču saglabājās statistiski būtiski augstāks ($p < 0,05$) nekā 0. dienā (skat. 3.10. attēlu).

Divdesmit pirmajā dienā MQ1 grupas suņiem kAP aktivitāte bija $135,75 \pm 21,34 \text{ U L}^{-1}$, taču šī starpība nebija statistiski nozīmīga. Savukārt P1 grupas dzīvniekiem kAP aktivitāte šajā dienā sasniedza $142,40 \pm 60,84 \text{ U L}^{-1}$ un joprojām bija statistiski būtiski augstāka ($p < 0,05$) nekā sākotnēji (skat. 3.10. attēlu).

Pētījuma noslēgumā, **28. dienā**, MQ1 grupas dzīvniekiem kAP aktivitāte turpināja samazināties līdz $105,35 \pm 23,26 \text{ U L}^{-1}$ un būtiski neatšķīrās no sākotnējām vērtībām. P1 grupā šajā laikā kAP aktivitāte bija $93,93 \pm 36,54 \text{ U L}^{-1}$, jeb 1,4 reizes augstāka nekā 0. dienā, izmaiņas nebija statistiski nozīmīgas (skat. 3.10. attēlu).

Visā pirmā perioda laikā abu grupu dzīvniekiem netika konstatētas statistiski būtiskas ($p > 0,05$) izmaiņas starp grupām.

3.9.tabula

Aknu enzīmu aktivitātes palielinājums (reizes) salīdzinājumā ar sākuma vērtībām EP MQ1 grupai

Ferments	D0	D7	D14	D21	D28
ALAT	1,0	1,2	1,0	1,1	0,7
GGT	1,0	1,7	1,7	1,9*	1,4
AP	1,0	1,7	1,5	1,6	1,4
kAP	1,0	1,6	1,5	1,4	1,1

* $p < 0,05$ salīdzinājumā ar 0. dienu.

3.9. tabulā ir parādīts aknu enzīmu aktivitātes pieaugums attiecībā pret 0. dienu MQ1 grupai, suņiem, kuriem lietoja hepatoprotektantu mitokvinola mezilātu. ALAT saglabājās tuvu sākuma līmenim (palielinājums 1,0-1,2 reizes) un 28. dienā pat samazinājās (0,7 reizes). GGT pieauga 1,7 reizē jau 7.-14. dienā un sasniedza maksimumu 21. dienā (palielinājums 1,9 reizes), kas bija vienīgā statistiski nozīmīgā izmaiņa ($p < 0,05$), pēc tam, 28. dienā, samazinājās 1,4 reizes. AP un kAP pieaugums bija neliels līdz mērens (AP 1,4-1,7 reizes; kAP 1,1-1,6 reizes) ar tendenci pakāpeniski mazināties perioda beigās.

3.10. tabula

Aknu enzīmu aktivitātes palielinājums (reizes) salīdzinājumā ar sākuma vērtībām EP P1 grupai

Ferments	D0	D7	D14	D21	D28
ALAT	1,0	1,2	1,2	1,0	0,7
GGT	1,0	1,7	2,0*	1,7	1,4
AP	1,0	2,7*	2,4*	2,2*	1,8
kAP	1,0	2,6*	2,4*	2,1*	1,4

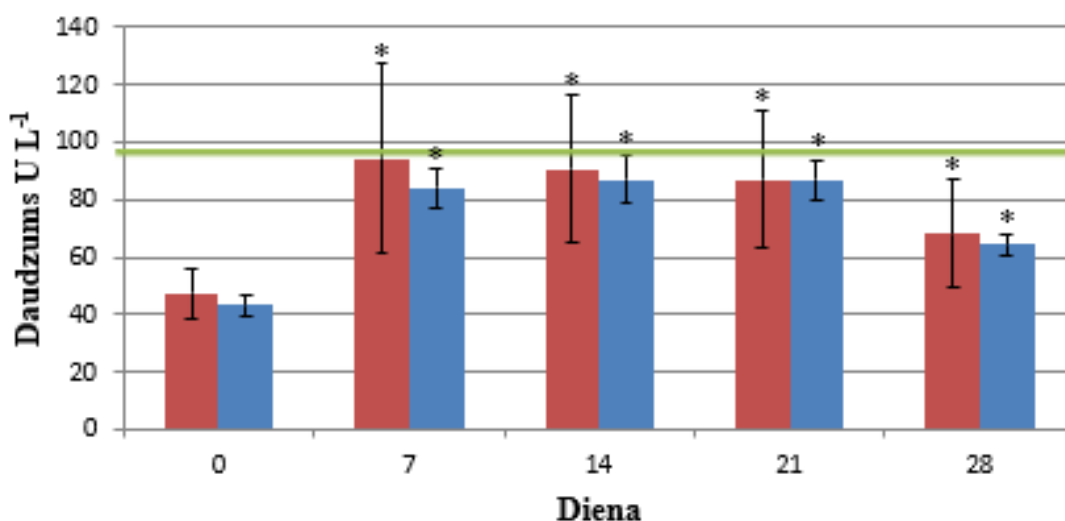
* $p < 0,05$ salīdzinājumā ar 0. dienu.

3.10. tabulā atspoguļojas izteiktāks enzīmu aktivitātes palielinājums P1 grupā, īpaši AP un kAP. ALAT dinamika bija līdzīga MQ1 grupai (palielinājums 1,0-1,2 reizes) ar

samazinājumu līdz 0,7 reizēm 28. dienā. GGT pieauga 2,0 reizes 14. dienā, un šis pieaugums ir bijis statistiski nozīmīgs ($p < 0,05$); vēlāk aktivitāte samazinājās 1,7 un 1,4 reizes, attiecīgi. Vislielākās izmaiņas bija novērotas AP un kAP: AP sasniedza maksimumu 7. dienā (2,7 reizes; $p < 0,05$) un saglabājās statistiski nozīmīgi paaugstināts arī 14.-21. dienā (2,4 un 2,2 reizes, attiecīgi; $p < 0,05$), bet 28. dienā joprojām pārsniedza sākuma līmeni (1,8 reizes). Līdzīga aina bija kAP – maksimālā aktivitāte 7. dienā (2,6 reizes; $p < 0,05$) ar statistiski nozīmīgu paaugstinājumu arī 14.-21. dienā (2,4 un 2,1 reizes, attiecīgi; $p < 0,05$), un samazinājumu (palielinājums 1,4 reizes) 28. dienā.

Otrais aktīvais periods (MQ2 un P2)

Otrā perioda grafikos krāsu apzīmējumi ir apzināti mainīti vietām saskaņā ar pētījuma krusteniskā pētījuma dizainu, kad ārstēšanas secība starp grupām tiek mainīta. Šī vizuālā korekcija veikta ar nolūku uzlabot abu periodu tiešo salīdzināmību un izvairīties no datu pārklāšanās uztveres.



3.11. att. Alanīnaminotransferāzes koncentrācijas izmaiņas asinīs EP suņiem otrajā aktīvajā periodā

Rādītāji suņiem, kuri saņēma mitokvinola mezilātu (MQ2) – sarkanā krāsā, placebo (P2) – zilā krāsā. Dati attēloti kā vidējā vērtība ± standartnovirze. Zaļā līnija norāda ALAT augšējo references robežu suņiem ($0-94 \text{ U L}^{-1}$) (Willard & Twedten, 2012). * $p < 0,05$

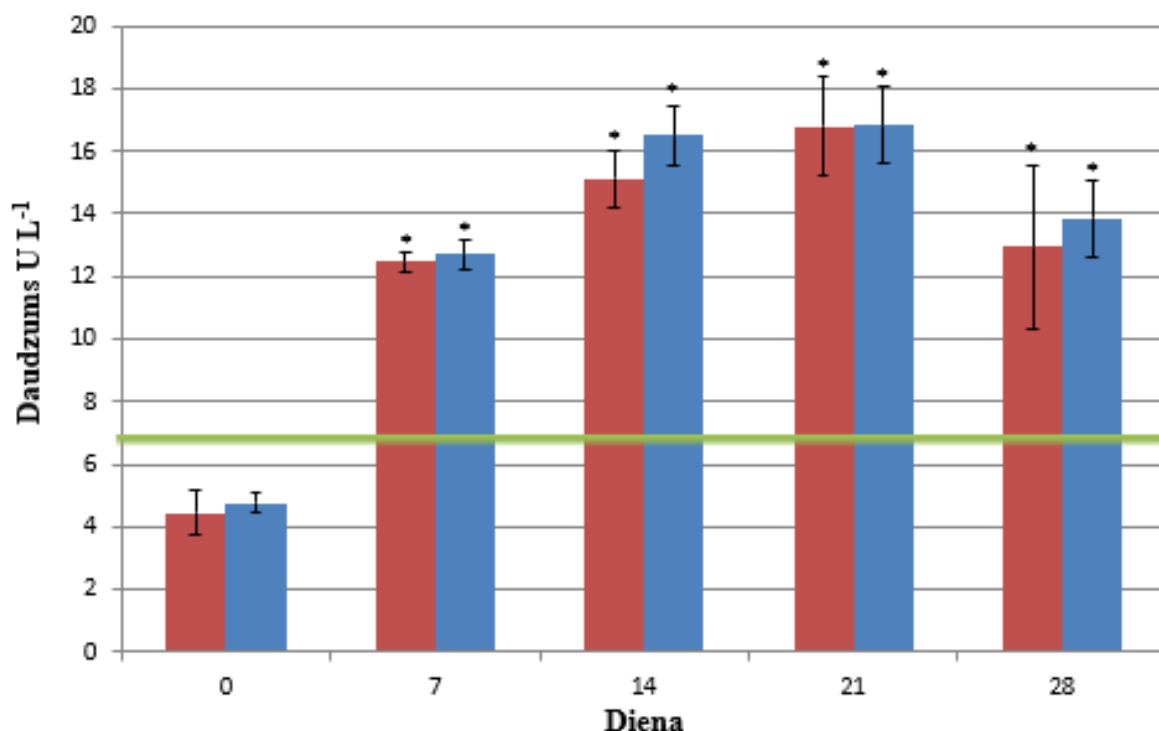
Alanīnaminotransferāze. MQ2 grupas suņiem otrā perioda **7. dienā** ALAT vidējā vērtība ($94,37 \pm 32,79 \text{ U L}^{-1}$) bija statistiski būtiski ($p < 0,05$) augstāka nekā otrā perioda nultajā dienā ($47,47 \pm 8,57 \text{ U L}^{-1}$). Suņiem no P2 grupas ALAT vidējā vērtība ($84,23 \pm 6,83 \text{ U L}^{-1}$) bija aptuveni divas reizes lielāka nekā nultajā dienā ($43,28 \pm 3,73 \text{ U L}^{-1}$, $p < 0,05$) un statistiski būtiski ($p < 0,05$) augstāka, salīdzinot ar tiem pašiem dzīvniekiem pirmajā aktīvajā periodā (MQ1 grupa) (skat. 3.11. attēlu).

MQ2 grupas suņiem **14. dienā** ALAT vidējā vērtība bija $90,80 \pm 25,34 \text{ U L}^{-1}$, savukārt P2 grupas dzīvniekiem šis rādītājs turpināja pieaugt ($86,93 \pm 8,36 \text{ U L}^{-1}$). Abi rādītāji bija būtiski augstāki par 0. dienas rādītājiem ($p < 0,05$). Kā arī ALAT līmenis P2 grupā bija statistiski būtiski ($p < 0,05$) augstāks, salīdzinot ar tiem pašiem dzīvniekiem pirmajā aktīvajā periodā ($54,83 \pm 7,05 \text{ U L}^{-1}$; MQ1 grupa) (skat. 3.11. attēlu).

Ekaperimentālā pētījuma **otrā perioda 21. dienā** MQ2 grupas dzīvniekiem ALAT vidējā vērtība ($87,03 \pm 23,81 \text{ U L}^{-1}$) bija būtiski ($p < 0,05$) augstāka nekā otrā perioda nultajā dienā, tāpat kā P2 grupas suņiem ($86,83 \pm 6,60 \text{ U L}^{-1}$, $p < 0,05$) (skat. 3.11. attēlu).

Otrā perioda **28. dienā** MQ2 grupas suņiem ALAT vidējā vērtība ($68,30 \pm 19,17 \text{ U L}^{-1}$) samazinājās. P2 grupas dzīvniekiem ALAT vidējā vērtība šajā dienā ($64,38 \pm 3,68 \text{ U L}^{-1}$) arī pazeminājās, tomēr abi rādītāji bija būtiski augstāki par 0. dienu ($p < 0,05$) (skat. 3.11. attēlu).

Starp grupām statistiski nozīmīgas atšķirības konkrētajos laika punktos nebija ($p > 0,05$).



3.12. att. Gammaglutamiltransferāzes koncentrācijas izmaiņas asinīs otrajā periodā

Rādītāji suņiem, kuri saņēma mitokvinola mezilātu (MQ2) – sarkanā krāsā, placebo (P2) – zilā krāsā. Dati attēloti kā vidējā vērtība $\pm$ standartnovirze. Zaļā līnija norāda AP augšējo references robežu suņiem ($0-6 \text{ U L}^{-1}$) (Willard & Tvedten, 2012). * $p < 0,05$

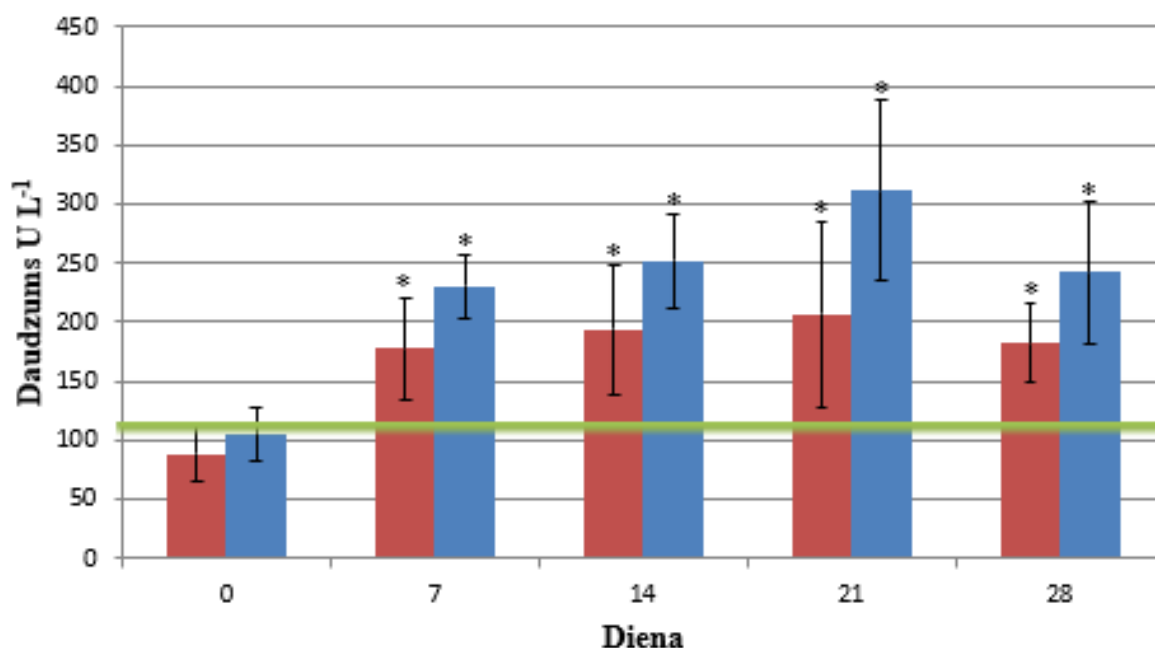
Gammaglutamiltransferāze. Otrā aktīvā perioda **7. dienā** MQ2 grupas suņiem GGT aktivitāte sasniedza $12,47 \pm 0,34 \text{ U L}^{-1}$ un bija būtiski augstāka nekā 0. dienā ($4,43 \pm 0,71 \text{ U L}^{-1}$; $p < 0,05$). P2 grupas dzīvniekiem šajā laikā GGT aktivitāte bija $12,70 \pm 0,49 \text{ U L}^{-1}$, 2,7 reizes augstāka nekā 2. perioda 0. dienā ($4,75 \pm 0,32 \text{ U L}^{-1}$; $p < 0,05$) (skat. 3.12. attēlu).

MQ2 grupā **14. dienā** GGT aktivitāte bija $15,13 \pm 0,91 \text{ U L}^{-1}$ un augstāka nekā 0. dienā, kā arī būtiski ($p < 0,05$) augstāka nekā tiem pašiem dzīvniekiem pirmajā aktīvajā periodā ($11,50 \pm 0,06 \text{ U L}^{-1}$; P1 grupa). P2 grupā GGT aktivitāte sasniedza $16,50 \pm 0,97 \text{ U L}^{-1}$ un bija augstāka ($p < 0,05$) nekā 0. dienā (skat. 3.12. attēlu).

Divdesmit pirmajā dienā MQ2 grupas dzīvniekiem GGT aktivitāte paaugstinājās līdz $16,80 \pm 1,59 \text{ U L}^{-1}$, kas bija 3,8 reizes augstāka ($p < 0,05$) nekā 0. dienā, un būtiski ($p < 0,05$) lielāka nekā tiem pašiem dzīvniekiem pirmajā aktīvajā periodā ($10,00 \pm 1,32 \text{ U L}^{-1}$; P1 grupa). P2 grupā šajā laikā GGT aktivitāte bija $16,83 \pm 1,23 \text{ U L}^{-1}$ un augstāka ($p < 0,05$) nekā otrā perioda 0. dienā (skat. 3.12. attēlu).

Pētījuma noslēgumā, **28. dienā**, MQ2 grupā GGT aktivitāte samazinājās līdz $12,93 \pm 2,63 \text{ U L}^{-1}$, bet joprojām būtiski augstāka ($p < 0,05$) nekā 0. dienas vērtība. P2 grupas dzīvniekiem šajā dienā GGT aktivitāte bija $13,85 \pm 1,21 \text{ U L}^{-1}$ un arī būtiski augstāka ($p < 0,05$) nekā otrā perioda 0. dienā (skat. 3.12. attēlu).

Visos mērījumu punktos (7., 14., 21. un 28. dienā) P2 grupas GGT aktivitāte bija statistiski būtiski augstāka ($p < 0,05$) nekā tiem pašiem dzīvniekiem pirmajā aktīvajā periodā (MQ1 grupā). Starp grupām statistiski nozīmīgas atšķirības konkrētajos laika punktos nebija.



3.13. att. Sārmainās fosfatāzes koncentrācijas izmaiņas otrajā periodā

Rādītāji suņiem, kuri saņēma mitokvinola mezilātu (MQ2) – sarkanā krāsā, placebo (P2) – zilā krāsā. Dati attēloti kā vidējā vērtība ± standartnovirze. Zaļā līnija norāda AP augšējo references robežu suņiem (0-102 U L⁻¹) (Willard & Twedten, 2012). * p < 0,05

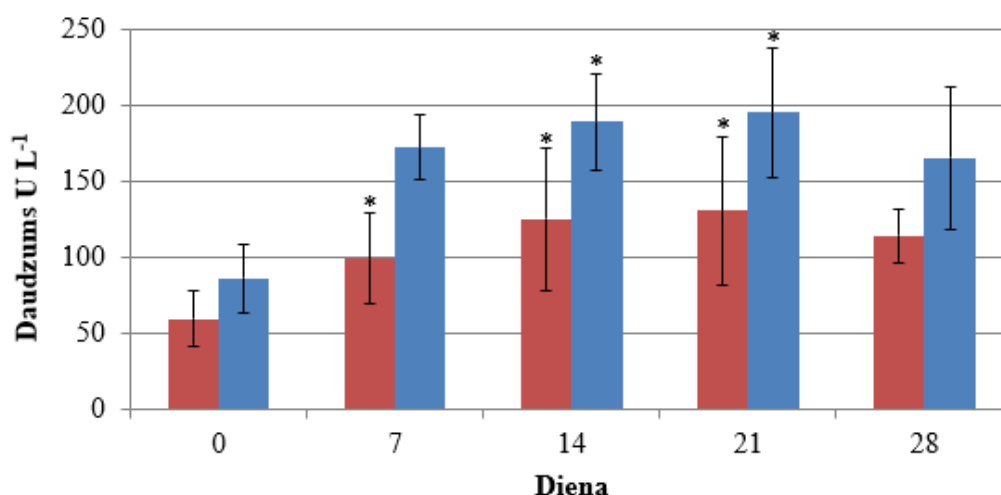
Sārmainā fosfatāze. MQ2 grupas suņiem **7. dienā** no otrā aktīvā perioda sākuma AP aktivitāte bija $177,73 \pm 43,60$ U L⁻¹, kas statistiski būtiski ($p < 0,05$) pārsniedza 0. dienas līmeni ($88,30 \pm 23,37$ U L⁻¹). Šī vērtība bija nedaudz zemāka nekā tiem pašiem dzīvniekiem pirmajā aktīvajā periodā, kad mitokvinola mezilāts netika lietots ($183,23 \pm 67,70$ U L⁻¹; P1 grupa). P2 grupas dzīvniekiem AP aktivitāte šajā pašā laikā sasniedza $230,35 \pm 26,45$ U L⁻¹, kas arī bija statistiski būtiski ($p < 0,05$) augstāka nekā sākotnējā ($101,78 \pm 22,62$ U L⁻¹) (skat. 3.13. attēlu).

MQ2 grupas suņiem **14. dienā** AP aktivitāte bija $194,00 \pm 54,72$ U L⁻¹ un būtiski augstāka ($p < 0,05$) nekā otrā perioda 0. dienā. P2 grupā šajā laikā rādītājs sasniedza $251,53 \pm 39,54$ U L⁻¹ un bija statistiski būtiski ($p < 0,05$) augstāks nekā 0. dienā un tiem pašiem dzīvniekiem pirmajā aktīvajā periodā ($151,18 \pm 12,47$ U L⁻¹; MQ1 grupa) (skat. 3.13. attēlu).

Divdesmit pirmajā dienā MQ2 grupā AP aktivitāte turpināja pieaugt, sasniedzot $206,47 \pm 78,62$ U L⁻¹. P2 grupas dzīvniekiem šajā laikā AP aktivitāte bija vēl augstāka – $311,80 \pm 75,66$ U L⁻¹, trīs reizes augstāka nekā 0. dienā. Abās grupās konstatētās izmaiņas bija statistiski nozīmīgas ($p < 0,05$) (skat. 3.13. attēlu).

Otrā perioda noslēgumā, **28. dienā**, MQ2 grupas dzīvniekiem AP aktivitāte sāka samazināties un bija $182,57 \pm 33,76$ U L⁻¹, tomēr augstāka nekā tiem pašiem suņiem pirmajā aktīvajā periodā ($119,87 \pm 42,57$ U L⁻¹; P1). P2 grupas suņiem šajā dienā AP aktivitāte samazinājās līdz $242,15 \pm 60,69$ U L⁻¹, bet joprojām bija augstāka nekā 0. dienā un pārsniedza vērtības, kas tika konstatētas šiem pašiem dzīvniekiem pirmajā periodā ($137,70 \pm 25,27$ U L⁻¹; MQ1). Abās grupās izmaiņas saglabājās statistiski būtiskas ($p < 0,05$), salīdzinot ar 0. dienu, visa perioda garumā (skat. 3.13. attēlu).

Starp grupām statistiski nozīmīgas atšķirības konkrētajos laika punktos nebija ($p > 0,05$).



3.14. att. **Kortikosteroīdu inducētās sārmainās fosfatāzes koncentrācijas izmaiņas asinīs EP suņiem otrajā periodā**

Rādītāji suņiem, kuri saņēma mitokvinola mezilātu (MQ2) – sarkanā krāsā, placebo (P2) – zilā krāsā. Dati attēloti kā vidējā vērtība ± standartnovirze. kAP references intervāls nav piemērojams. * $p < 0,05$

Kortikosteroīdu inducēta sārmainā fosfatāze. MQ2 grupas suņiem **7. dienā** no otrā aktīvā perioda sākuma kAP aktivitāte sasniedza $99,00 \pm 29,90 \text{ U L}^{-1}$ un bija augstāka nekā 0. dienā ($59,60 \pm 17,80 \text{ U L}^{-1}$). P2 grupas dzīvniekiem kAP aktivitāte sasniedza $172,55 \pm 21,13 \text{ U L}^{-1}$ un bija statistiski būtiski augstāka ($p < 0,05$) nekā sākotnēji ($86,05 \pm 22,69 \text{ U L}^{-1}$), taču zemāka nekā tiem pašiem suņiem pirmajā aktīvajā periodā ($161,95 \pm 61,96 \text{ U L}^{-1}$; MQ1 grupa), kad tika lietots antioksidants (skat. 3.14. attēlu).

MQ2 grupas dzīvniekiem **14. dienā** kAP aktivitāte sasniedza $125,00 \pm 46,71 \text{ U L}^{-1}$ un bija statistiski būtiski augstāka ($p < 0,05$) nekā 0. dienā. P2 grupā šajā laikā rādītājs sasniedza $189,55 \pm 31,74 \text{ U L}^{-1}$, kas arī bija būtiski augstāks ($p < 0,05$) nekā sākumā un turpināja pieaugt (skat. 3.14. attēlu), pretēji pirmajam aktīvajam periodam, kur abās grupās tika novērota samazināšanās tendence.

Divdesmit pirmajā dienā MQ2 grupā kAP aktivitāte bija $130,63 \pm 48,52 \text{ U L}^{-1}$ un bija būtiski ($p < 0,05$) augstāka nekā otrā perioda sākumā. P2 grupas dzīvniekiem kAP aktivitāte sasniedza $195,23 \pm 42,64 \text{ U L}^{-1}$ jeb 2,3 reizes vairāk nekā 0. dienā ($p < 0,05$) (skat. 3.14. attēlu).

Otrā perioda beigās, **28. dienā**, MQ2 grupā kAP aktivitāte samazinājās līdz $114,13 \pm 17,87 \text{ U L}^{-1}$, bet bija augstāka arī nekā tiem pašiem dzīvniekiem pirmajā periodā ($93,93 \pm 36,54 \text{ U L}^{-1}$; P1 grupa), kad mitokvinola mezilāts netika lietots. P2 grupas suņiem kAP aktivitāte 28. dienā sasniedza $165,40 \pm 46,83 \text{ U L}^{-1}$. Šajā mērījumā izmaiņas abās grupās vairs nebija statistiski nozīmīgas ($p > 0,05$) (skat. 3.14. attēlu).

Starp grupām statistiski nozīmīgas atšķirības konkrētajos laika punktos nebija ($p > 0,05$).

3.11. tabula

Aknu enzīmu aktivitātes palielinājums (reizes) salīdzinājumā ar sākuma vērtībām EP MQ2 grupai

Ferments	D0	D7	D14	D21	D28
ALAT	1,0	2,0*	1,9*	1,8*	1,4*
GGT	1,0	2,8*	3,4*	3,8*	2,9*
AP	1,0	2,0*	2,2*	2,3*	2,1*
kAP	1,0	1,7*	2,1*	2,2*	1,9

* $p < 0,05$ salīdzinājumā ar 0. dienu.

3.11. tabulā MQ2 grupai var novērot izteiktu un lielākoties statistiski nozīmīgu visu enzīmu aktivitātes palielinājumu salīdzinājumā ar 0. dienu. ALAT pieaugums bija straujš jau 7. dienā (palielinājums 2,0 reizes; $p < 0,05$) un pakāpeniski mazinājās līdz 28. dienai, tomēr saglabājās paaugstināts (1,4 reizes; $p < 0,05$). GGT bija visizteiktāk paaugstinātais rādītājs: no 2,8 reizēm (7. dienā) līdz maksimumam 3,8 reizes (21. dienā), un 28. dienā saglabājās 2,9 reizes augstāks; visos laika punktos pieaugums bija statistiski nozīmīgs ($p < 0,05$). AP pieaugums bija stabils (aptuveni 2,0-2,3 reizes) ar nozīmīgumu visos laika punktos ($p < 0,05$). kAP palielinājās 2,2 reizes 21. dienā ($p < 0,05$), bet 28. dienā – 1,9 reizes bez atzīmētas statistiskas nozīmības.

3.12. tabula

Aknu enzīmu aktivitātes palielinājums (reizes) salīdzinājumā ar sākuma vērtībām EP P2 grupai

Ferments	D0	D7	D14	D21	D28
ALAT	1,0	1,9*	2,0*	2,0*	1,5*
GGT	1,0	2,7*	3,5*	3,5*	2,9*
AP	1,0	2,2*	2,4*	2,9*	2,3*
kAP	1,0	2,0*	2,2*	2,3*	1,9

* $p < 0,05$ salīdzinājumā ar 0. dienu.

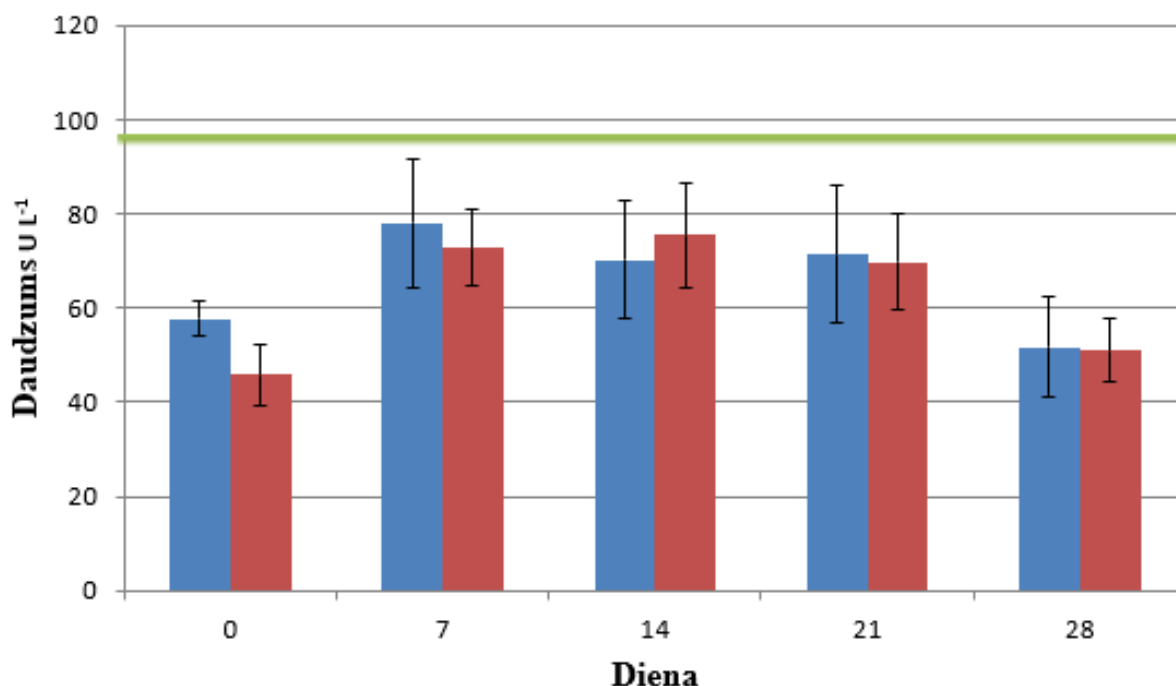
3.12. tabulā P2 grupai ir aprakstīts plašs un statistiski nozīmīgs enzīmu aktivitātes kāpums visos laika punktos. ALAT pieauga 2,0 reizes 14. un 21. dienā ($p < 0,05$), 28. dienā saglabājās paaugstināts (1,5 reizes; $p < 0,05$). GGT strauji pieauga 2,7 reizes 7. dienā, sasniedza palielinājumu 3,5 reizes 14.-21. dienā un 28. dienā saglabājās 2,9 reizes augstāks, salīdzinot ar 0. dienu; visos laika punktos pieaugums bija statistiski nozīmīgs ($p < 0,05$). AP pieaugums bija izteiktāks nekā MQ2 grupā, sasniedzot maksimumu 21. dienā (2,9 reizes; $p < 0,05$), un 28. dienā joprojām bija 2,3 reizes augstāks ($p < 0,05$). kAP pieauga 2,3 reizes 21. dienā ($p < 0,05$), bet 28. dienā bija 1,9 reizes augstāks bez atzīmētas statistiskas nozīmības.

Krusteniskā pētījuma kopējie rezultāti EP suņiem (MQK un PK)

Krusteniskajā pētījumā tika apkopoti dati no MQ1+MQ2 (MQK) un P1+P2 (PK) grupām, izmantojot katru dzīvnieku kā savu kontroles vienību. ALAT gadījumā nevienā no laika punktiem netika konstatētas statistiski būtiskas atšķirības ne pret 0. dienu, ne starp grupām ($p > 0,05$). Savukārt GGT, AP un kAP kopējā apkopojumā uzrādīja statistiski būtisku paaugstināšanos pret 0. dienu ($p < 0,05$), īpaši pirmajās 2-3 nedēļās.

Alanīnaminotransferāze. MQK grupa **7. dienā** suņiem, kuri saņēma antioksidantu mitokvinola mezilātu, ALAT aktivitāte asins serumā bija $78,13 \pm 13,67 \text{ U L}^{-1}$, nebūtiski augstāka, nekā pētījuma sākumā ($52,71 \pm 3,79 \text{ U L}^{-1}$). Placebo grupai (PK grupa), šī fermenta aktivitāte sasniedza $72,83 \pm 7,99 \text{ U L}^{-1}$ un arī bija nebūtiski augstāka, nekā nultajā dienā ($45,83 \pm 6,52 \text{ U L}^{-1}$) (skat. 3.15. attēlu).

ALAT līmenis **14. dienā** MQK grupā bija $70,24 \pm 12,60 \text{ U L}^{-1}$, kas pārsniedza sākotnējo vērtību, bet tomēr bija zemāks nekā septītajā dienā. PK grupā šajā laikā ALAT aktivitāte turpināja pieaugt, sasniedzot $75,54 \pm 11,23 \text{ U L}^{-1}$ (skat. 3.15. attēlu).



3.15. att. Alanīnaminotransferāzes koncentrācijas izmaiņas asinīs EP suņiem pēc krusteniskā pētījuma dizaina analīzes

Rādītāji suņiem, kuri saņēma mitokvinola mezilātu (MQK) – zilā krāsā, placebo (PK) – sarkanā krāsā. Dati attēloti kā vidējā vērtība ± standartnovirze. Zaļā līnija norāda ALAT augšējo references robežu suņiem ($0-94 \text{ U L}^{-1}$) (Willard & Twedten, 2012). * $p < 0,05$

Divdesmit pirmajā dienā MQK grupas dzīvniekiem fermenta aktivitāte bija $71,36 \pm 16,57 \text{ U L}^{-1}$, savukārt PK grupā – $69,87 \pm 10,18 \text{ U L}^{-1}$ (skat. 3.15. attēlu).

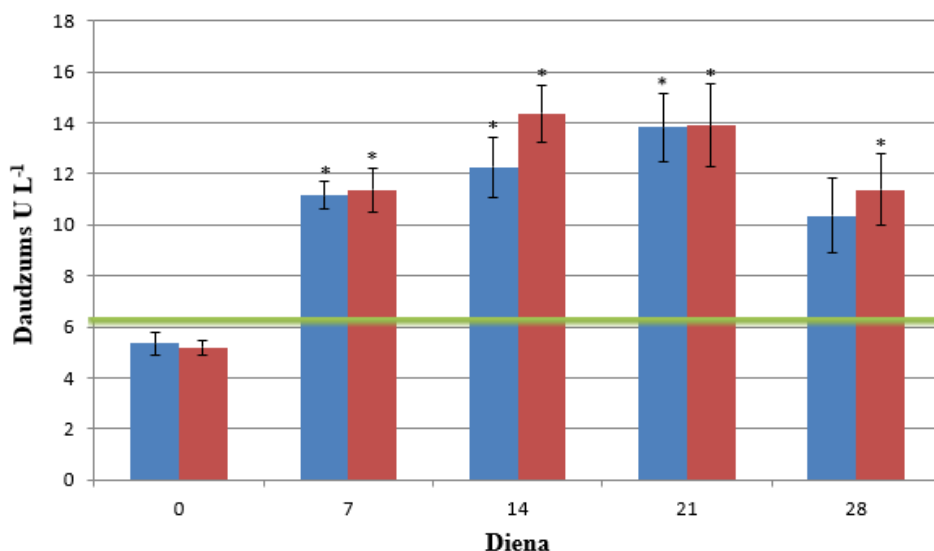
Pētījuma pēdējā – **28. dienā** – MQK grupas suņiem ALAT rādītāji samazinājās līdz gandrīz izejas līmenim ($51,79 \pm 10,69 \text{ U L}^{-1}$). Līdzīga tendence bija vērojama arī PK grupā, kur fermenta aktivitāte sasniedza $51,10 \pm 6,92 \text{ U L}^{-1}$, gandrīz pielīdzinoties sākotnējai vērtībai (skat. 3.15. attēlu).

Nevienā no pētījuma laika punktiem starp grupām vai grupu ietvaros netika konstatētas statistiski būtiskas izmaiņas ($p > 0,05$).

Gammaglutamiltransferāze. MQK grupas suņiem **7. dienā** GGT aktivitāte sasniedza $11,14 \pm 0,54 \text{ U L}^{-1}$ un bija divas reizes augstāka nekā 0. dienā ($5,36 \pm 0,44 \text{ U L}^{-1}$; $p < 0,05$). PK grupas dzīvniekiem šajā laikā GGT aktivitāte bija $11,87 \pm 0,86 \text{ U L}^{-1}$ jeb 2,2 reizes augstāka nekā sākotnēji ($5,20 \pm 0,29 \text{ U L}^{-1}$; $p < 0,05$) (skat. 3.16. attēlu).

MQK grupas dzīvniekiem **14. dienā** GGT aktivitāte paaugstinājās līdz $12,26 \pm 1,18 \text{ U L}^{-1}$ ($p < 0,05$, salīdzinot ar 0. dienu). PK grupā šajā laikā GGT aktivitāte sasniedza $14,36 \pm 1,14 \text{ U L}^{-1}$, kas bija 2,8 reizes augstāka ($p < 0,05$) nekā 0. dienā (skat. 3.16. attēlu).

Divdesmit pirmajā dienā MQK grupā GGT aktivitāte bija $13,83 \pm 1,33 \text{ U L}^{-1}$ un būtiski augstāka nekā sākumā ($p < 0,05$). PK grupas dzīvniekiem šajā laikā GGT aktivitāte sasniedza $13,90 \pm 1,61 \text{ U L}^{-1}$ un arī bija būtiski augstāka ($p < 0,05$) nekā 0. dienā (skat. 3.16. attēlu).



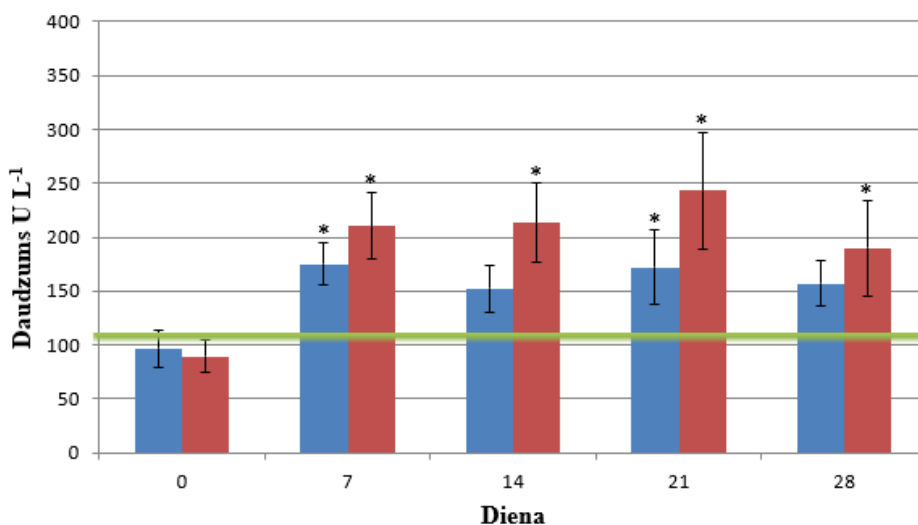
3.16. att. **Gammaglutamiltransferāzes koncentrācijas izmaiņas asinīs EP suņiem pēc krusteniskā pētījuma dizaina analīzes**

Rādītāji suņiem, kuri saņēma mitokvinola mezilātu (MQK) – zilā krāsā, placebo (PK) – sarkanā krāsā. Dati attēloti kā vidējā vērtība $\pm$ standartnovirze. Zaļā līnija norāda GGT augšējo references robežu suņiem ($0-6 \text{ U L}^{-1}$) (Willard & Twedten, 2012). * $p < 0,05$

Pētījuma noslēgumā, **28. dienā**, MQK grupā GGT aktivitāte samazinājās līdz $10,37 \pm 1,46 \text{ U L}^{-1}$, taču šīs izmaiņas nebija statistiski nozīmīgas ($p > 0,05$). PK grupas dzīvniekiem šajā dienā GGT aktivitāte bija $11,37 \pm 1,41 \text{ U L}^{-1}$ un 2,2 reizes augstāka ($p < 0,05$) nekā 0. dienā (skat. 3.16. attēlu).

Starp grupām statistiski nozīmīgas atšķirības konkrētajos laika punktos nebija ($p > 0,05$).

Sārmainā fosfatāze. MQK grupas suņiem **7. dienā** no pētījuma sākuma AP aktivitāte asins serumā bija $174,94 \pm 19,56 \text{ U L}^{-1}$ un augstāka nekā 0. dienā ($96,47 \pm 16,63 \text{ U L}^{-1}$). PK grupas dzīvniekiem šajā pašā laikā AP aktivitāte sasniedza $210,16 \pm 30,74 \text{ U L}^{-1}$ un bija augstāka nekā sākotnēji ($89,33 \pm 14,17 \text{ U L}^{-1}$). Šīs izmaiņas bija statistiski būtiskas ($p < 0,05$) (skat. 3.17. attēlu).



3.17. att. **Sārmainās fosfatāzes koncentrācijas izmaiņas asinīs EP suņiem pēc krusteniskā pētījuma dizaina analīzes**

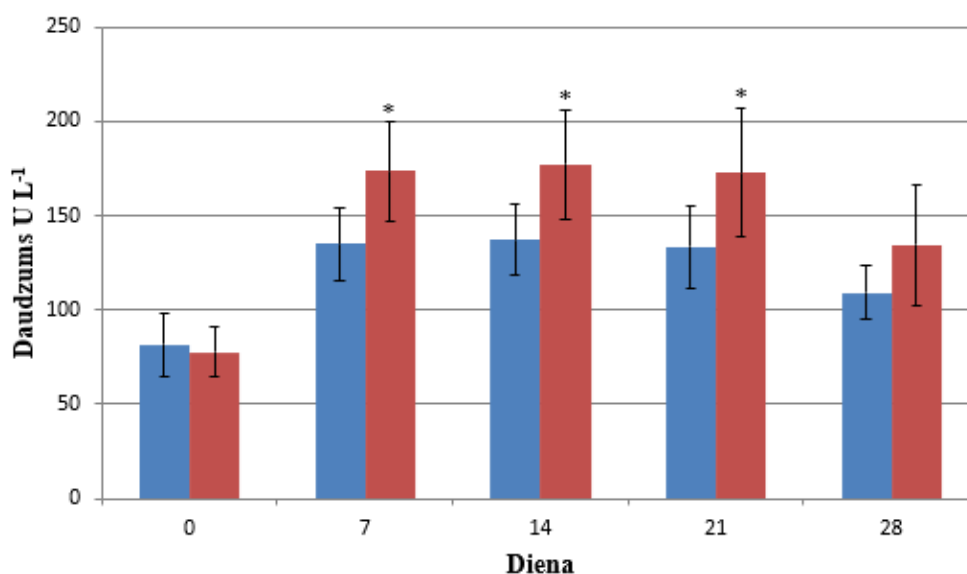
Rādītāji suņiem, kuri saņēma mitokvinola mezilātu (MQK) – zilā krāsā, placebo (PK) – sarkanā krāsā. Dati attēloti kā vidējā vērtība $\pm$ standartnovirze. Zaļā līnija norāda AP augšējo references robežu suņiem ($0-102 \text{ U L}^{-1}$) (Willard & Twedten, 2012). * $p < 0,05$

MQK grupā **14. dienā** AP aktivitāte sasniedza $172,39 \pm 21,74 \text{ U L}^{-1}$, bet PK grupā – $213,47 \pm 36,29 \text{ U L}^{-1}$, atšķirības PK grupā bija statistiski nozīmīgas ($p < 0,05$) (skat. 3.17. attēlu).

Divdesmit pirmajā dienā MQK grupā AP aktivitāte bija $182,16 \pm 34,11 \text{ U L}^{-1}$, savukārt PK grupā tā turpināja pieaugt līdz $242,97 \pm 54,54 \text{ U L}^{-1}$. Šīs izmaiņas bija statistiski būtiskas abās grupās ($p < 0,05$) (skat. 3.17. attēlu).

Pētījuma noslēgumā, **28. dienā**, MQK grupas dzīvniekiem AP aktivitāte samazinājās līdz $156,93 \pm 20,67 \text{ U L}^{-1}$ ($p > 0,05$, salīdzinot ar 0. dienu), PK grupā šajā laikā AP aktivitāte samazinājās līdz $189,74 \pm 43,84 \text{ U L}^{-1}$ ($p < 0,05$, salīdzinot ar 0. dienu). Abās grupās rādītāji neatgriezās sākotnējā līmenī (skat. 3.17. attēlu).

Starp grupām statistiski nozīmīgas atšķirības konkrētajos laika punktos nebija ($p > 0,05$).



3.18. att. Kortikosteroīdu inducēta sārmainā fosfatāze koncentrācijas izmaiņas asinīs EP suņiem krusteniskā pētījuma dizaina analīzes

Rādītāji suņiem, kuri saņēma mitokvinola mezilātu (MQK) – zilā krāsā, placebo (PK) – sarkanā krāsā. Dati attēloti kā vidējā vērtība $\pm$ standartnovirze. kAP references intervāls nav piemērojams. * $p < 0,05$

Kortikosteroīdu inducēta sārmainā fosfatāze. MQK grupas suņiem **7. dienā** kAP aktivitāte sasniedza $134,97 \pm 19,04 \text{ U L}^{-1}$, un bija nebūtiski augstāka nekā 0. dienā ($81,79 \pm 16,84 \text{ U L}^{-1}$). PK grupā šajā pašā laikā kAP aktivitāte bija $173,56 \pm 26,43 \text{ U L}^{-1}$, šīs izmaiņas bija statistiski būtiskas ($p < 0,05$) (skat. 3.18. attēlu).

Četrpadsmitajā dienā MQK grupā kAP aktivitāte bija $137,21 \pm 18,86 \text{ U L}^{-1}$, PK grupā šajā laikā tā sasniedza $177,33 \pm 29,14 \text{ U L}^{-1}$ un bija statistiski būtiski lielāka ($p < 0,05$) nekā 0. dienā (skat. 3.18. attēlu).

Divdesmit pirmajā dienā MQK grupā kAP aktivitāte samazinājās līdz $133,56 \pm 21,62 \text{ U L}^{-1}$, savukārt PK grupā – līdz $173,56 \pm 34,09 \text{ U L}^{-1}$ ($p < 0,05$, salīdzinot ar 0. dienu) (skat. 3.18. attēlu).

Pētījuma noslēgumā, **28. dienā**, MQK grupas dzīvniekiem kAP aktivitāte bija $109,11 \pm 14,26 \text{ U L}^{-1}$, PK grupā šajā laikā rādītājs sasniedza $134,77 \pm 32,03 \text{ U L}^{-1}$. Šajā posmā abu grupu izmaiņas vairs nebija statistiski nozīmīgas ($p > 0,05$) (skat. 3.18. attēlu).

Starp grupām statistiski nozīmīgas atšķirības konkrētajos laika punktos nebija ($p > 0,05$).

Aknu enzīmu aktivitātes palielinājums (reizes) salīdzinājumā ar sākuma vērtībām EP MQK grupai

Ferments	D0	D7	D14	D21	D28
ALAT	1,0	1,5	1,3	1,4	1,0
GGT	1,0	2,1*	2,3*	2,6*	2,0
AP	1,0	1,8*	1,8	1,9*	1,6
kAP	1,0	1,7	1,7	1,6	1,3

* $p < 0,05$ salīdzinājumā ar 0. dienu

3.13. tabulā MQK grupai ir norādīti mēreni enzīmu aktivitātes pieaugumi, kas visizteiktāk skar GGT un AP. ALAT palielinājās 7.-21. dienā (1,3-1,5 reizes), bet 28. dienā praktiski atgriezās sākuma līmenī. GGT pieaugums bija statistiski nozīmīgs 7., 14. un 21. dienā (attiecīgi 2,1; 2,3; 2,6; $p < 0,05$), savukārt 28. dienā saglabājās paaugstināts (2,0 reizes) bez atzīmētas nozīmības. AP bija statistiski nozīmīgi paaugstināts 7. un 21. dienā (1,8 un 1,9 reizes, attiecīgi; $p < 0,05$), bet 14. un 28. dienā pieaugums bija mērenāks (attiecīgi 1,8 un 1,6 reizes) bez atzīmētas statistiskas nozīmības. kAP palielinājās robežās no 1,3 līdz 1,7 reizēm, rādītāju atšķirība nevienā laika punktā nesasniedza statistisku nozīmību.

Aknu enzīmu aktivitātes palielinājums (reizes) salīdzinājumā ar sākuma vērtībām EP PK grupai

Ferments	D0	D7	D14	D21	D28
ALAT	1,0	1,6	1,7	1,5	1,1
GGT	1,0	2,2*	2,8*	2,7*	2,2*
AP	1,0	2,4*	2,4*	2,7*	2,1
kAP	1,0	2,2*	2,3*	2,2*	1,7

* $p < 0,05$ salīdzinājumā ar 0. dienu

3.14. tabulā PK grupai tiek raksturs kopumā izteiktāks un noturīgāks pieaugums, īpaši GGT, AP un kAP. ALAT palielinājās 1,5-1,7 reizes 7.-21. dienā un 28. dienā saglabājās nedaudz virs sākuma (1,1 reize). GGT pieaugums bija statistiski nozīmīgs visos laika punktos (2,2-2,8 reizes; $p < 0,05$), saglabājoties paaugstināts arī 28. dienā (2,2 reizes; $p < 0,05$). AP pieaugums bija statistiski nozīmīgs 7.-21. dienā (2,4-2,7 reizes; $p < 0,05$), bet 28. dienā saglabājās paaugstināts (2,1 reize) bez atzīmētas nozīmības. kAP bija statistiski nozīmīgi paaugstināts 7.-21. dienā (2,2-2,3; $p < 0,05$) un 28. dienā saglabājās paaugstināts (1,7 reizes) bez atzīmētas statistiskas nozīmības.

3.3.3. Antioksidanta mitokvinola mezilāta ietekme uz aknu audu morfoloģisko stāvokli EP suņiem pēc MPA ievadīšanas

Histoloģiski tika analizēti visi no eksperimentālajiem dzīvniekiem iegūtie aknu bioptāti ($n = 42$), nodrošinot pilnīgu materiāla izvērtējumu katram dzīvniekam un katrā eksperimenta posmā. Šāda pieeja ļāva visaptveroši novērtēt aknu audu reakciju uz antioksidanta mitokvinola

mezilāta ievadīšanu un noteikt iespējamo izmaiņu raksturu. Katram no septiņiem suņiem tika analizēti seši paraugi.

Papildus rutīnas histoloģiskajai un imūnhistoķīmiskajai analīzei, kurā noteikta aknu stellāta šūnu aktivitāte, tika veikta arī mērķtiecīga mitohondriju strukturālā izpēte, izmantojot iepriekš aprakstītu imuno fluorescences protokolu. Šis papildinājums nodrošināja iespēju izvērtēt šūnu bojājumu dziļākā līmenī un noteikt ultrastruktūru iesaisti kortikosteroīdu inducētajā aknu reakcijā. Kopā šie izmeklējumi ļāva iegūt daudzpusīgu skatījumu uz aknu morfoloģiskajām un ultrastrukturālajām izmaiņām, kas rodas ilgstošas kortikosteroīdu iedarbības rezultātā.

Histoloģiskās pārmaiņas H&E eksperimentālā pētījuma suņiem. Pirmā perioda 0. dienā visiem dzīvniekiem aknu parenhīmā netika konstatētas histoloģiskas pārmaiņas. Hepatocīti bija ar viendabīgu citoplazmu, saglabātu arhitektūru un bez redzamām vakuolām. Segmentkodolainie neitrofīlie leukocīti apskatītajos redzes laukos netika novēroti, un stellāta šūnu skaits uz 100 hepatocītiem bija vidēji 1,57 (skat. 3.15. tabulu).

Abās grupās **14. dienā** novērotas izteiktas hepatocītu morfoloģiskas pārmaiņas – šūnu palielināšanās, citoplazmas vakuolizācija. Daļai hepatocītu kodoli bija pārvietoti uz šūnas perifēriju, kas norāda uz intracelulārā satura pārdali un šūnas pietūkumu. Izmaiņu raksturs un smaguma pakāpe bija līdzīga gan MQ1 grupas dzīvniekiem, gan P1 grupas dzīvniekiem. Trīs no četriem MQ1 grupas dzīvniekiem pārmaiņas tika vērtētas kā smagas, vienam – kā vidēji smagas, savukārt P1 grupā visiem dzīvniekiem konstatētas smagas hepatocītu izmaiņas (skat. 3.15. tabulu).

Pirmā perioda **28. dienā** abās grupās konstatētas vidēji smagas hepatocītu pārmaiņas, kas liecina par strukturālo izmaiņu daļēju mazināšanos salīdzinājumā ar iepriekšējo laika punktu. Šajā posmā hepatocītiem joprojām saglabājās citoplazmas vakuolizācija, taču šūnu robežas bija izteiktākas un audu arhitektūra – vienmērīgāka (skat. 3.15. tabulu).

Segmentkodolaino neitrofilo leukocītu skaits pakāpeniski palielinājās līdz 28. dienai, sasniedzot vidēji $3,0 \pm 0,96$ šūnas vienā redzes laukā MQ1 grupā un $3,0 \pm 0,38$ šūnas P1 grupā. Neitrofīlie leukocīti galvenokārt lokalizējās aknu sinusoīdos un netika novēroti aknu parenhīmā. To sadalījums bija vienmērīgs, bez perēkļveida uzkrājumiem un bez nekrozes pazīmēm (skat. 3.15. tabulu; vizuālos attēlus var atrast 53. lpp., 3.1. attēls).

Starp grupām netika konstatētas statistiski nozīmīgas atšķirības hepatocītu pārmaiņu pakāpē un segmentkodolaino neitrofilo leukocītu skaitā.

3.15. tabula

Histoloģiskās pārmaiņas dzīvniekiem MQ1 un P1 grupās

Dzīvnieku grupa	Izmaiņas hepatocītos			Neitrofilo leukocītu skaits*		
	D0	D14	D28	D0	D14	D28
MQ1	0	2,8	2,0	0	$2,0 \pm 0,50$	$3,0 \pm 0,96$
P1	0	3,0	2,0	0	$1,0 \pm 0,58$	$3,0 \pm 1,15$

MQ1 – pirmā aktīvā perioda grupa, kurai pielietoja hepatoprotektantu mitokvinola mezilātu;

P1 – pirmā aktīvā perioda grupa, kurai pielietoja placebo;

* Vidējais skaits 10 redzes laukos.

Otrā aktīvā perioda **0. dienā** abās grupās aknu parenhīmā tika konstatētas hepatocītu morfoloģiskas pārmaiņas. MQ2 grupā diviem no trijiem dzīvniekiem pārmaiņas tika vērtētas kā vidēji smagas, savukārt vienam – kā smagas; P2 grupā trijiem no četriem dzīvniekiem konstatētas vidēji smagas pārmaiņas, bet vienam – smagas. Segmentkodolaino neitrofilo

leikocītu skaits vienā redzes laukā MQ2 grupā bija vidēji $4,0 \pm 1,53$, savukārt P2 grupā – $3,0 \pm 1,73$ (skat. 3.16. tabulu).

Abās grupās **14. dienā** pēc atkārtotas medikamenta ievadīšanas novērotas izteiktas hepatocītu pārmaiņas. MQ2 grupā visiem dzīvniekiem konstatētas smagas hepatocītu izmaiņas, kuras raksturoja šūnu palielināšanās, citoplazmas vakuolizācija un kodolu pārvietojums uz šūnas perifēriju; savukārt P2 grupā trijiem no četriem dzīvniekiem pārmaiņas tika vērtētas kā vidēji smagas, bet vienam – kā smagas. Segmentkodolaino neitrofilo leikocītu skaits vienā redzes laukā MQ2 grupā bija vidēji $3,0 \pm 1,00$, savukārt P2 grupā – $2,0 \pm 0,96$ (skat. 3.16. tabulu).

Otrā perioda **28. dienā** abās grupās novērota pārmaiņu mazināšanās, tomēr saglabājās izteikta individuālā variabilitāte. MQ2 grupā diviem dzīvniekiem hepatocītu izmaiņas tika vērtētas kā vidēji smagas, vienam – kā smagas; savukārt P2 grupā diviem dzīvniekiem konstatētas vieglas pārmaiņas, vienam – vidēji smagas un vienam – smagas.

Segmentkodolaino neitrofilo leikocītu skaits samazinājās līdz vidēji $2,0 \pm 1,00$ šūnām vienā redzes laukā MQ2 grupā un $2,0 \pm 0,50$ šūnām P2 grupā. (skat. 3.16. tabulu; vizuālos attēlus var atrast 53. lpp., 3.1. attēls).

Starp grupām netika konstatētas statistiski nozīmīgas atšķirības hepatocītu pārmaiņu pakāpē, segmentkodolaino neitrofilo leikocītu skaitā.

3.16. tabula

Histoloģiskās pārmaiņas dzīvniekiem MQ2 un P2 grupās

Dzīvnieku grupa	Izmaiņas hepatocītos			Neitrofilo leikocītu skaits*		
	D0	D14	D28	D0	D14	D28
MQ2	2,3	3,0	2,3	$4,0 \pm 1,53$	$3,0 \pm 1,00$	$2,0 \pm 1,00$
P2	2,3	2,3	1,8	$3,0 \pm 1,73$	$2,0 \pm 0,96$	$2,0 \pm 0,50$

MQ2 – otrā aktīvā perioda grupa, kurai pielietoja hepatoprotektantu mitokvinola mezilāts;

P2 – otrā aktīvā perioda grupa, kurai pielietoja tapiokas pulveri;

*Vidējais skaits 10 redzes laukos.

Krusteniskā pētījuma datu tieša salīdzināšana histoloģiskajos izmeklējumos iegūtajiem rezultātiem nav iespējama, jo aknu šūnas nebija atgriezušās sākotnējā morfoloģiskajā stāvoklī līdz otrā perioda sākumam. Ilgstošas darbības metilprednizolona acetāts izraisa noturīgas strukturālas un vielmaiņas pārmaiņas, kuru pilnīga regresija nenotiek 8 nedēļu laikā pēc preparāta ievadīšanas.

Glikogēna uzkrāšanās hepatocītos eksperimentālā pētījuma suņiem. Izmeklējot aknu histoloģiskos paraugus, kas krāsoti ar perjodskābes-Šifa (PAS) reakciju, tika vērtēta glikogēna akumulācija hepatocītos, lai novērtētu kortikosteroīdu ietekmi uz ogļhidrātu metabolismu aknās. PAS reakcija atklāja dažāda intensitātes pakāpes pozitīvu reakciju hepatocītu citoplazmā, liecinot par glikogēna uzkrāšanos. Kopumā visos biopsiju paraugos novērota viegla līdz vidēji smaga glikogēna akumulācija hepatocītos, izņemot pirmā perioda 0. dienas paraugus, kuros hepatocītu citoplazma bija viendabīga un konstatēts tikai minimāls glikogēna daudzums, kas atbilst fizioloģiskai normai (skat. 3.17. tabulu).

Pirmajā aktīvajā periodā MQ1 un P1 grupās **14. dienā** novērota viegla līdz vidēji smaga glikogēna uzkrāšanās hepatocītos, un reakcijas intensitāte bija līdzīga abu grupu dzīvniekiem. Glikogēna uzkrāšanās pakāpe **28. dienā** saglabājās līdzīga, tomēr nedaudz izteiktāka P1 grupai; granulas hepatocītos bija redzamas lielākajā daļā paraugu. Granulas bija neliela izmēra, nevienmērīgi izkliedētas hepatocītu citoplazmā, bet dažviet aizņēma plašākas intracelulāras

zonas, īpaši periportālajās zonās, kur šāda lokalizācija ir raksturīga kortikosteroīdu inducētai iedarbībai (skat. 3.17. tabulu; vizuālos attēlus var atrast 54. lpp., 3.2. attēls).

3.17. tabula

Glikogēna uzkrāšanās hepatocītos EP suņiem

Dzīvnieku grupa	Glikogēna akumulācija hepatocītos		
	D0	D14	D28
MQ1	0	1,3	1,3
P1	0	1,3	1,7
MQ2	0,7	2,0	1,7
P2	0,5	1,3	1,5

MQ1 – pirmā aktīvā perioda grupa, kurai pielietoja mitokvinolu;

P1 – pirmā aktīvā perioda grupa, kurai pielietoja tapiokas pulveri;

MQ2 – otrā aktīvā perioda grupa, kurai pielietoja mitokvinolu;

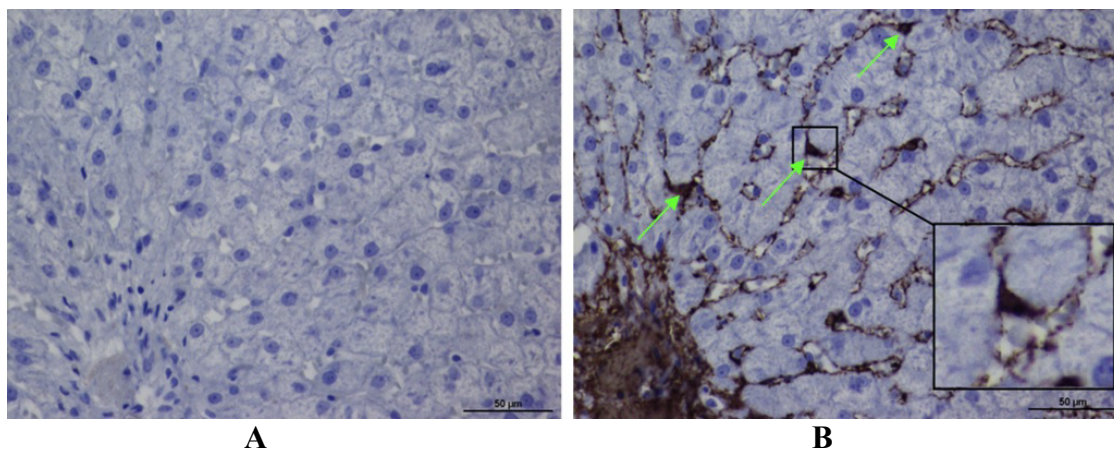
P2 – otrā aktīvā perioda grupa, kurai pielietoja tapiokas pulveri.

Otrajā aktīvajā periodā MQ2 un P2 grupās hepatocītos jau **0. dienā** tika novērota viegla glikogēna akumulācija vairumam dzīvnieku, kas liecina, ka aknas nebija pilnībā atgriezušās sākotnējā morfoloģiskajā stāvoklī pēc pirmā perioda. Glikogēna uzkrāšanās **14. dienā** kļuva izteiktāka, atsevišķos gadījumos sasniedzot smagas pakāpes reakciju, īpaši dzīvniekiem MQ2 grupā. Daļai dzīvnieku **28. dienā** novērota viegla regresija, tomēr glikogēna granulas saglabājās vairumā hepatocītu, īpaši periportālajās zonās (skat. 3.17. tabulu; vizuālos attēlus var atrast 54. lpp., 3.2. attēls).

Salīdzinot pirmā un otrā perioda rezultātus, redzams, ka glikogēna akumulācijas pakāpe MQ2 un P2 grupās bija noturīgāka un sākotnēji izteiktāka nekā MQ1 un P1 grupās, kas norāda uz atlikušās iedarbības efektu, raksturīgu ilgstošas darbības metilprednizolona acetātam.

Statistiski būtiskas atšķirības starp grupām netika konstatētas, tomēr vispārējā tendence liecina par mērenu, noturīgu hepatocītu pārsātinājumu ar glikogēnu visos pētījuma posmos.

Imūnhistoķīmiskā reakcija aknu parenhīmā ar α -SMA antivielu EP suņiem. Imūnhistoķīmiskajā izmeklēšanas shēmā ar gludās muskulatūras α -aktīna antivielu tika salīdzināti paraugi ar negatīvi krāsotu kontroli, lai novērtētu stellāta šūnu aktivācijas pakāpi un lokalizāciju (skat. 3.19. attēlu).



3.19. att. α -SMA imūnhistoķīmiskā reakcija: negatīvā kontrole (A) un pozitīvi krāsotas stellāta šūnas (B)

„→” – stellāta šūnas, IHK, α -aktīns, 400x

Stellāta šūnu skaita dinamika EP suņiem aknu parenhīmā

Dzīvnieku grupa	Stellāta šūnas (n/100 hepatocīti)		
	D0	D14	D28
MQ1	1,6 ± 0,82	5,8 ± 0,82	6,2 ± 0,82
P1	1,7 ± 0,82	4,0 ± 1,00	5,0 ± 0,58
MQ2	6,0 ± 1,15	7,5 ± 1,15	5,0 ± 1,53
P2	5,0 ± 2,63	5,0 ± 1,45	3,0 ± 1,59

MQ1 – pirmā aktīvā perioda grupa, kurai pielietoja mitokvinolu;

P1 – pirmā aktīvā perioda grupa, kurai pielietoja tapiokas pulveri;

MQ2 – otrā aktīvā perioda grupa, kurai pielietoja mitokvinolu;

P2 – otrā aktīvā perioda grupa, kurai pielietoja tapiokas pulveri.

Tabulā atspoguļots stellāta šūnu skaits uz 100 hepatocītiem dažādos laika punktos abos pētījuma periodos. Pirmā perioda **0. dienā** MQ1 un P1 grupās stellāta šūnu skaits bija zems un līdzīgs (attiecīgi 1,6 un 1,7), kas atbilst fizioloģiskai normai. Līdz **14. un 28. dienai** abās grupās novērots pakāpenisks stellāta šūnu skaita pieaugums.

Otrā aktīvā perioda sākumā MQ2 un P2 grupās stellāta šūnu skaits bija augstāks nekā pirmā perioda sākumā. Turpmākajos laika punktos (D14 un D28) statistiski būtiskas izmaiņas netika konstatētas, bet tika novērota neliela samazināšanās.

3.4. Metilprednizolona acetāta un mitokvinola mezilāta ietekme uz hepatocītu ultrastruktūru morfoloģiju EP suņiem

3.4.1. Metilprednizolona acetāta un mitokvinola mezilāta ietekme uz hepatocītu kodolu morfoloģiju EP suņiem

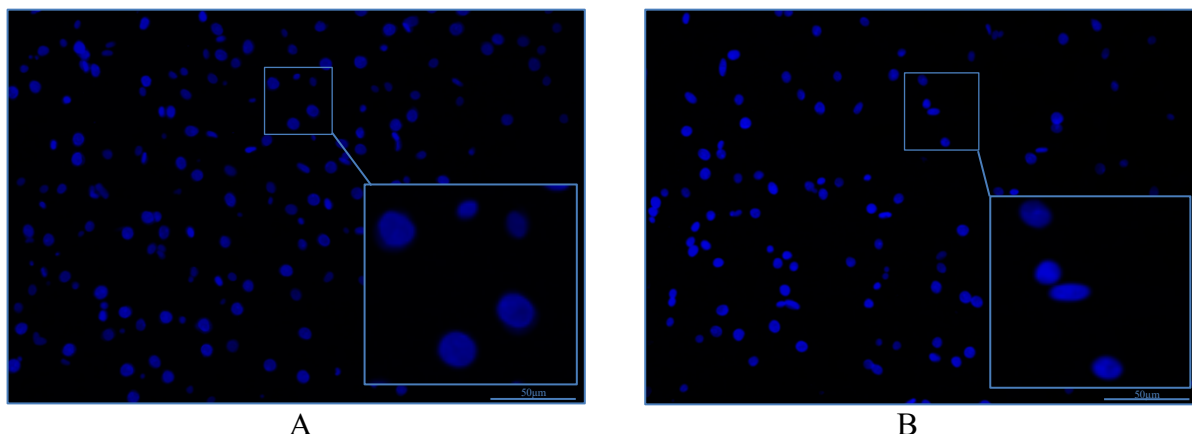
Metilprednizolona acetāta (MPA) ietekme uz hepatocītu kodolu morfoloģiju tika izvērtēta, analizējot DAPI fluorescences signālu un kvantitatīvos morfometriskos parametrus – kodola variācijas koeficientu un *Feret* diametru dažādos laika punktos (skat. 3.19. tabulu).

Hepatocītu kodolu morfoloģisko parametru dinamika EP suņiem 1. periodā pēc MPA ievadīšanas ar un bez mitokvinola lietošanas

Rādītājs	Grupa	D0	D14	D28
Kodola variācijas koeficients	MQ1	0,18 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,29 ± 0,01
	P1	0,19 ± 0,01	0,33 ± 0,03	0,27 ± 0,02
Kodola (<i>Feret</i>) diametrs, μm	MQ1	9,88 ± 0,30	11,25 ± 0,21	12,43 ± 0,17
	P1	9,90 ± 0,20	12,63 ± 0,25	12,47 ± 0,31

Pirmā perioda **0. dienā** abās grupās (MQ1 un P1) hepatocītu kodoli bija regulāras, apaļas formas ar vienmērīgu DAPI signāla intensitāti un līdzīgu morfometrisko profilu (skat. 3.19A attēlu). Kodola variācijas koeficients un *Feret* diametrs abās grupās bija vienāds, kas raksturo homogēnu kodolu populāciju bez izteiktas strukturālās heterogenitātes (skat. tabulu 3.19 un attēlu 3.20A).

Abās grupās **14. dienā** pēc MPA ievadīšanas tika novērotas izteiktas kodolu morfoloģijas izmaiņas. DAPI signāls kļuva heterogēnāks ar atsevišķiem hiperintensīviem kodoliem un nevienmērīgu hromatīna sadalījumu (skat. 3.20B attēlu). Kvantitatīvi tas atspoguļojās kā kodola variācijas koeficienta palielināšanās – P1 grupā $0,33 \pm 0,03$ un MQ1 grupā $0,23 \pm 0,01$. Vienlaikus palielinājās arī kodola *Feret* diametrs – MQ1 grupā līdz $11,25 \pm 0,25 \mu\text{m}$, bet P1 grupā līdz $12,63 \pm 0,25 \mu\text{m}$ (skat. tabulu 3.19).



3.20. att. Hepatocītu kodolu DAPI krāsojums suņiem: A – hepatocītu kodoli ar saglabātu regulāru formu un vienmērīgāku fluorescences sadalījumu; B – hepatocītu kodoli ar izteiktāku signāla heterogenitāti un neregulārām kodolu kontūrām, (405 nm kanāls, 400x)

Divdesmit astotajā dienā abās grupās saglabājās izteiktas kodolu variācijas koeficienta un *Feret* diametra pārmaiņas. MQ1 grupā kodola variācijas koeficients bija $0,29 \pm 0,01$, bet kodola diametrs – $12,43 \pm 0,17 \mu\text{m}$. P1 grupā kodola variācijas koeficients bija $0,27 \pm 0,02$, savukārt kodola diametrs – $12,47 \pm 0,31 \mu\text{m}$. Abās grupās kodolu diametrs bija līdzīgs, bet kodolu variabilitāte nedaudz lielāka MQ1 grupā. (skat. tabulu 3.19).

3.20. tabula

Hepatocītu kodolu morfoloģisko parametru dinamika EP suņiem 2. periodā pēc MPA ievadīšanas ar un bez mitokvinola lietošanas

Rādītājs	Grupa	D0	D14	D28
Kodola variācijas koeficients	MQ2	$0,24 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,01$
	P2	$0,21 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,02$
Kodola (<i>Feret</i>) diametrs, μm	MQ2	$10,93 \pm 0,15$	$11,53 \pm 0,15$	$10,90 \pm 0,10$
	P2	$10,53 \pm 0,34$	$10,95 \pm 0,46$	$10,48 \pm 0,33$

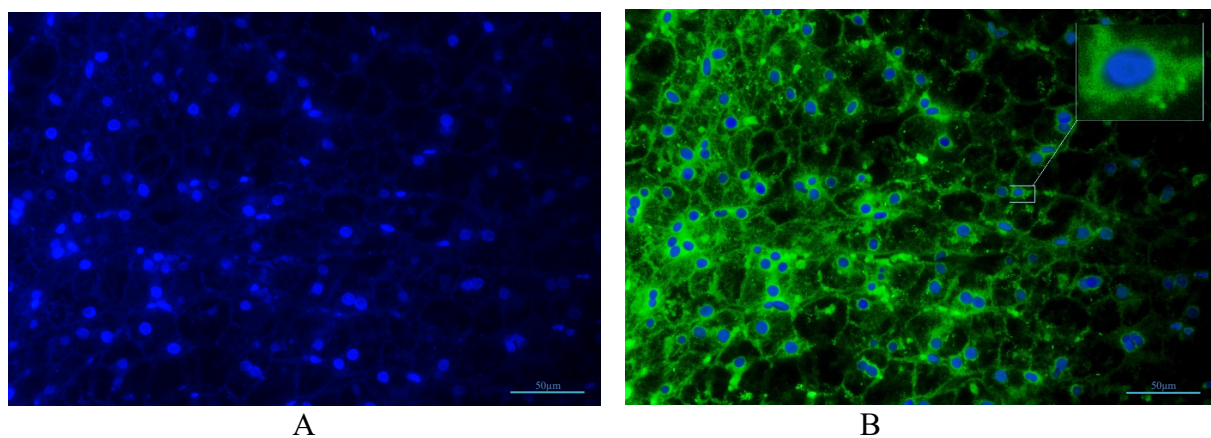
Otrā perioda **0. dienā** (MQ2 un P2) kodolu morfoloģiskie rādītāji jau bija augstāki nekā pirmā perioda sākumā. Kodola variācijas koeficients MQ2 grupā bija $0,24 \pm 0,01$, bet P2 grupā – $0,21 \pm 0,03$. Kodola (*Feret*) diametrs MQ2 grupā sasniedza $10,93 \pm 0,15 \mu\text{m}$, savukārt P2 grupā – $10,53 \pm 0,34 \mu\text{m}$ (skat. 3.20. tabulu). DAPI signāls bija nevienmērīgāks nekā pirmajā periodā, ar atsevišķiem neregulāras formas vai iegarenas konfigurācijas kodoliem, kas norāda uz nepilnīgu strukturālo atjaunošanos pēc pirmā aktīvā perioda (skat. 3.19B attēlu).

Otrā perioda **14. dienā** kodolu variācijas koeficients saglabājās paaugstināts (MQ2 – $0,28 \pm 0,01$; P2 – $0,25 \pm 0,02$), un *Feret* diametrs MQ2 grupā palielinājās līdz $11,53 \pm 0,15 \mu\text{m}$, kamēr P2 grupā saglabājās $10,95 \pm 0,46 \mu\text{m}$ (skat. 3.20. tabulu). DAPI signāls abās grupās bija heterogēns, ar izteiktām intensitātes svārstībām starp atsevišķiem hepatocītiem.

Divdesmit astotajā dienā otrajā periodā MQ2 grupā variācijas koeficients samazinājās līdz $0,25 \pm 0,01$ un *Feret* diametrs atgriezās pie $10,90 \pm 0,10 \mu\text{m}$, savukārt P2 grupā variācijas koeficients saglabājās relatīvi augsts ($0,27 \pm 0,02$), *Feret* diametra samazinājās ($10,48 \pm 0,33$). (skat. 3.20. tabulu). Abās grupās saglabājās vieglas līdz vidēji smagas kodolu strukturālās izmaiņas.

3.4.2. Metilprednizolona acetāta un mitokvinola mezilāta ietekme uz hepatocītu mitohondriju morfoloģiju EP suņiem

Metilprednizolona acetāta (MPA) un mitokvinola mezilāta ietekme uz hepatocītu mitohondriju morfoloģiju tika izvērtēta, analizējot TOMM20 imūnfluorescences signālu (skat. 3.21. attēlu) un kvantitatīvos morfometriskos parametrus – mitohondriju apaļīguma koeficientu, iegarenuma koeficientu un TOMM20 fluorescences vidējo intensitāti (AU) dažādos laika punktos.



3.21. att. Aknu audu imūnfluorescences krāsojums: **A** – negatīvā kontrole TOMM20 marķējumam; specifisks zaļš fluorescences signāls nav novērojams; **B** – hepatocītu mitohondriji – zaļie fluorescējošie objekti citoplazmā (Alexa Fluor 488), kodoli – zilā krāsā (DAPI). 488 un 405 nm kanāli, 400x.

Pirmā perioda **0. dienā** abās grupās (MQ1 un P1) TOMM20 signāls bija vienmērīgs. Kvantitatīvi mitohondriju apaļīguma koeficients bija $0,57 \pm 0,01$ MQ1 grupā un $0,59 \pm 0,01$ P1 grupā, savukārt iegarenuma koeficients bija līdzīgs abās grupās ($2,20 \pm 0,08$ un $2,20 \pm 0,10$). TOMM20 fluorescences vidējā intensitāte bija 1230 ± 18 AU MQ1 grupā un 1237 ± 20 AU P1 grupā (skat. 3.21. tabulu).

Abās grupās **14. dienā** pēc MPA ievadīšanas novērotas izteiktas izmaiņas hepatocītu mitohondriju morfometriskajos parametros. TOMM20 signāls kļuva nevienmērīgāks (skat. 3.21B attēlu). Kvantitatīvi tas atspoguļojās kā mitohondriju apaļīguma koeficienta palielināšanās līdz $0,75 \pm 0,03$ MQ1 grupā un $0,80 \pm 0,02$ P1 grupā, kā arī iegarenuma koeficienta samazināšanās līdz $1,60 \pm 0,08$ un $1,30 \pm 0,10$ attiecīgi. Vienlaikus pieauga arī

TOMM20 fluorescences vidējā intensitāte – līdz 1488 ± 30 AU MQ1 grupā un līdz 1780 ± 70 AU P1 grupā (skat. 3.21. tabulu).

3.21. tabula

Hepatocītu mitohondriju morfoloģisko parametru dinamika EP suņiem 1. periodā pēc MPA ievadīšanas ar un bez mitokvinola lietošanas

Rādītājs	Grupa	D0	D14	D28
Mitohondriju apaļīguma koeficients (Detmer & Chan, 2007)	MQ1	$0,57 \pm 0,01$	$0,75 \pm 0,03$	$0,64 \pm 0,01$
	P1	$0,59 \pm 0,01$	$0,80 \pm 0,02$	$0,71 \pm 0,02$
Iegarenuma koeficients (Detmer & Chan, 2007)	MQ1	$2,20 \pm 0,08$	$1,60 \pm 0,08$	$1,90 \pm 0,08$
	P1	$2,20 \pm 0,10$	$1,30 \pm 0,10$	$1,50 \pm 0,10$
Vidējā TOMM20 fluorescences intensitāte (AU) (Harwig, 2018; Rickard et al., 2023)	MQ1	1230 ± 18	1488 ± 30	1330 ± 18
	P1	1237 ± 20	1780 ± 70	1590 ± 55

Divdesmit astotajā dienā abās grupās novērota daļēja parametru normalizācija, tomēr izmaiņas hepatocītu mitohondriju morfometriskajos parametros saglabājās. MQ1 grupā apaļīguma koeficients samazinājās līdz $0,64 \pm 0,01$, iegarenuma koeficients palielinājās līdz $1,90 \pm 0,08$ un TOMM20 fluorescences vidējā intensitāte samazinājās līdz 1330 ± 18 AU. Savukārt P1 grupā saglabājās paaugstināts apaļīguma koeficients ($0,71 \pm 0,02$), zemāks iegarenuma koeficients ($1,50 \pm 0,10$) un augstāka TOMM20 fluorescences vidējā intensitāte (1590 ± 55 AU), kas norāda uz noturīgākām izmaiņām hepatocītu mitohondriju morfometriskajos parametros (skat. 3.21. tabulu).

Otrā perioda **0. dienā** (MQ2 un P2) mitohondriju morfoloģiskie rādītāji jau atšķīrās no pirmā perioda sākuma. MQ2 grupā apaļīguma koeficients bija $0,66 \pm 0,02$, bet P2 grupā – $0,61 \pm 0,02$. Iegarenuma koeficients bija $1,90 \pm 0,10$ MQ2 grupā un $2,00 \pm 0,16$ P2 grupā, kas liecina par saglabātām struktūru izmaiņām. TOMM20 fluorescences intensitāte bija 1400 ± 20 AU MQ2 grupā un 1335 ± 38 AU P2 grupā (skat. 3.22. tabulu).

3.22. tabula

Hepatocītu mitohondriju morfoloģisko parametru dinamika EP suņiem 2. periodā pēc MPA ievadīšanas ar un bez mitokvinola lietošanas

Rādītājs	Grupa	D0	D14	D28
Mitohondriju apaļīguma koeficients (Detmer & Chan, 2007)	MQ1	$0,66 \pm 0,02$	$0,63 \pm 0,04$	$0,61 \pm 0,02$
	P1	$0,61 \pm 0,02$	$0,65 \pm 0,03$	$0,64 \pm 0,03$
Iegarenuma koeficients (Detmer & Chan, 2007)	MQ1	$1,90 \pm 0,10$	$1,70 \pm 0,10$	$1,80 \pm 0,10$
	P1	$2,00 \pm 0,16$	$1,90 \pm 0,08$	$1,78 \pm 0,14$
Vidējā TOMM20 fluorescences intensitāte (AU) (Harwig, 2018; Rickard et al., 2023)	MQ1	1400 ± 20	1650 ± 30	1500 ± 20
	P1	1335 ± 38	1365 ± 46	1383 ± 60

Otrā perioda **14. dienā** abās grupās TOMM20 signāls kļuva izteiktāks un nevienmērīgāks, tomēr kvantitatīvo izmaiņu amplitūda bija mērenāka nekā pirmajā periodā. MQ2 grupā apaļīguma koeficients bija $0,63 \pm 0,04$, bet P2 grupā – $0,65 \pm 0,03$. Iegarenuma koeficients samazinājās līdz $1,70 \pm 0,10$ MQ2 grupā un līdz $1,90 \pm 0,08$ P2 grupā. Fluorescences intensitāte palielinājās līdz 1650 ± 30 AU MQ2 grupā un līdz 1365 ± 46 AU P2 grupā (skat. 3.22. tabulu).

Otrā perioda **28. dienā** MQ2 grupā apaļīguma koeficients bija $0,61 \pm 0,02$, bet P2 grupā – $0,64 \pm 0,03$, savukārt iegarenuma koeficients bija attiecīgi $1,80 \pm 0,10$ un $1,78 \pm 0,14$, attiecīgi. TOMM20 fluorescences intensitāte MQ2 grupā samazinājās līdz 1500 ± 20 AU, bet P2 grupā saglabājās līdzīgā līmenī – 1383 ± 60 AU. Abās grupās saglabājās vieglas līdz vidēji smagas mitohondriju strukturālās izmaiņas (skat. 3.22. tabulu).

3.5. Pētījuma rezultātu kopsavilkums

Pētījumā tika izvērtēta ilgstošas darbības metilprednizolona acetāta (MPA) ietekme uz aknu funkcionālo un morfoloģisko stāvokli suņiem, kā arī antioksidanta mitokvinola mezilāta potenciālā hepatoprotektīvā iedarbība. Analīze ietvēra klīnisko populāciju ar patoloģijām un eksperimentālus, klīniski veselus dzīvniekus krusteniskā pētījuma dizainā.

Aknu funkcionālais stāvoklis. Klīniskajā grupā pēc MPA ievadīšanas visizteiktākais aknu enzīmu aktivitātes pieaugums tika novērots 14. dienā. ALAT palielinājās 3,0 reizes, GGT – 3,9 reizes, AP – 7,0 reizes, bet kAP – 21,2 reizes virs sākuma līmeņa ($p < 0,05$). 30. dienā enzīmu aktivitāte saglabājās paaugstināta, īpaši AP un kAP gadījumā, bet 45. dienā vērojama lejupslīde. Tomēr AP un kAP arī šajā laika punktā bieži saglabājās statistiski būtiski augstāki par sākuma vērtībām, kas liecina par noturīgu steroīdu inducētu enzīmu aktivāciju.

Eksperimentālajā placebo grupā enzīmu aktivitātes pieaugums bija mērenāks nekā klīniskajā populācijā, tomēr GGT, AP un kAP būtiski palielinājās jau pirmajās divās nedēļās (2,8 reizes virs sākuma līmeņa; $p < 0,05$). Salīdzinot abas pētījuma daļas, visizteiktākās un statistiski nozīmīgās starpgrupu atšķirības attiecās uz AP un īpaši kAP, kas klīniskajā grupā sasniedza daudz augstākas relatīvās vērtības.

Hepatoprotektīvās terapijas ietekme. Suņu grupā, kurai papildus MPA tika lietots hepatoprotektants, enzīmu aktivitātes pieaugums bija mazāk izteikts un normalizācija – straujāka. ALAT un GGT aktivitāte 30. – 45. dienā biežāk tuvojās sākuma līmenim, savukārt AP un kAP saglabājās paaugstināti ilgāk. Starp grupām statistiski nozīmīgas atšķirības tika konstatētas atsevišķos laika punktos (īpaši GGT un AP 14. – 30. dienā), tomēr kopumā hepatoprotektanta ietekme bija mērena.

Eksperimentālajā krusteniskajā pētījumā antioksidanta lietošana bija saistīta ar nedaudz zemāku un īslaicīgāku GGT, AP un kAP pieaugumu, tomēr konsekventas statistiski nozīmīgas starpgrupu atšķirības netika konstatētas. Tas norāda, ka mitokvinola mezilāta hepatoprotektīvā ietekme funkcionālajos parametros bija ierobežota.

Histoloģiskās izmaiņas. Pirmajā aktīvajā periodā 14. dienā visiem dzīvniekiem tika konstatētas smagas steroīdai hepatopātijai raksturīgas pārmaiņas: hepatocītu palielināšanās, citoplazmas vakuolizācija, granularitātes zudums un perifēri novietoti kodoli. 28. dienā izmaiņas mazinājās līdz vidēji smagai pakāpei. Neitrofilā infiltrācija bija viegla un difūza, bez nekrozes pazīmēm. Stellāta šūnu skaits pakāpeniski palielinājās, kas liecina par vieglu aktivācijas fonu.

PAS reakcijā glikogēna akumulācija hepatocītos bija izteikta jau 14. dienā un saglabājās arī 28. dienā, īpaši periportālajās zonās. Otrajā aktīvajā periodā glikogēna depoziācija tika konstatēta jau nulles dienā, norādot uz nepilnīgu aknu metaboliski–morfoloģisko atjaunošanos pēc pirmā perioda.

Ultrastrukturālās pārmaiņas. Imūnfluorescences izmeklējumos pēc MPA ievadīšanas tika konstatēta hepatocītu kodolu DAPI signāla heterogenitātes palielināšanās, kā arī izmaiņas hepatocītu mitohondriju morfometriskajos parametros, analizējot TOMM20 imūnfluorescences signālu, mitohondriju apaļīguma koeficientu, iegarenuma koeficientu un TOMM20 fluorescences vidējo intensitāti. Mitokvinola mezilāta lietošana bija saistīta ar nedaudz mērenāku šo rādītāju izmaiņu izteiktību un vienmērīgāku TOMM20 signāla sadalījumu, tomēr atšķirības starp grupām nebija vienādi izteiktas visos laika punktos un visos parametros.

Kopumā pētījuma rezultāti parāda, ka metilprednizolona acetāts izraisa izteiktas, daudzlīmeņu aknu izmaiņas – funkcionālas, histoloģiskas un ultrastrukturālas, ar īpaši noturīgu kAP aktivāciju un glikogēna akumulāciju hepatocītos. Antioksidanta mitokvinola mezilāta lietošana bija saistīta ar mērenu aizsargājošu efektu, tomēr pilnīgu steroīdu inducēto izmaiņu novēršanu nenodrošināja.

DISKUSIJA

Šajā darbā iegūtie rezultāti papildina esošās zināšanas par aknu morfofunkcionālajām izmaiņām pēc ilgstošas darbības kortikosteroīda metilprednizolona acetāta lietošanas suņiem. Pētījumā tika novērtētas strukturālās un funkcionālās pārmaiņas gan klīniski veselīgiem dzīvniekiem, gan suņiem, kuriem kortikosteroīdu terapija bija nozīmēta ārstnieciskos nolūkos. Šie dati ļauj labāk izprast to izraisītās aknu izmaiņas un to iespējamo reversiju, kā arī sniedz praktisku pienesumu veterinārmedicīnas klīniskajā praksē, kur šādas blakusparādības novērojamas bieži.

Neskatoties uz to, ka kortikosteroīdi veterinārmedicīnā ir plaši lietoti un nereti klīniski neaizvietojami, īpaši alerģisku un autoimūnu slimību ārstēšanā, to ietekme uz aknu morfofunkcionālo stāvokli joprojām nav pilnībā izprasta. Ilgstošas darbības preparāti, piemēram, metilprednizolona acetāts, tiek izmantoti to ērtās pielietošanas dēļ, taču šie preparāti var izraisīt noturīgas funkcionālas un strukturālas pārmaiņas hepatocītos, kas saglabājas pēc klīniskās darbības beigām. Šī darba rezultāti sniedz jaunu skatījumu uz procesiem, kas norisinās aknās pēc kortikosteroīdu lietošanas, un piedāvā salīdzinājumu starp dzīvniekiem ar un bez hepatoprotektantiem. Turklāt iegūtie dati ļāvuši izveidot autoru pētījumā apstiprinātu viedokli par vairākiem līdz šim diskutabliem jautājumiem saistībā ar kortikosteroīdu inducēto aknu izmaiņu attīstību un to reversijas iespējamību. Līdz šim līdzīgi dati veterinārmedicīnas literatūrā maz aprakstīti, tādēļ šis pētījums ir būtisks ieguldījums šīs tēmas tālākā izpētē.

Pirmais pētījuma uzdevums bija noskaidrot aknu funkcionālā un/vai morfoloģiskā stāvokļa izmaiņas suņiem pēc ilgstošas darbības kortikosteroīda lietošanas. Šim nolūkam par modeli tika izvēlēts metilprednizolona acetāts, jo tas ir viens no visbiežāk klīniskajā praksē izmantotajiem ilgstošas darbības kortikosteroīdiem, kura lietošanas devas un ievadīšanas biežums joprojām tiek diskutēts un nav viennozīmīgi standartizēts. Aknu funkcionālais stāvoklis tika novērtēts, izmantojot vispārpieņemtu, netiešu pieeju – aknu enzīmu aktivitātes izmaiņu analīzi asins serumā. Tika noteikta alanīnaminotransferāzes (ALAT), gammaglutamiltransferāzes (GGT), sārmainās fosfatāzes (AP) un kortikosteroīdu inducētās sārmainās fosfatāzes (kAP) aktivitāte (Oikonomidis & Milne, 2023). Pētījumā tika iekļauti gan dzīvnieki, kuriem kortikosteroīdi tika nozīmēti veterinārajās klīnikās diagnosticētu slimību ārstēšanai, gan klīniski veseli suņi, kuriem metilprednizolona acetāts tika ievadīts eksperimentālos nolūkos, jo tādējādi bija iespējams salīdzināt spontāni slimu un veselu dzīvnieku aknu reakciju uz identisku preparātu, kas ļāva precīzāk raksturot kortikosteroīdu izraisīto nevēlamo aknu morfofunkcionālo atbildi.

Iegūtie rezultāti apliecina būtisku atšķirību starp klīniski veselo un slimo dzīvnieku reakciju uz ilgstošas darbības kortikosteroīdu ievadīšanu. Slimajiem dzīvniekiem aknu enzīmu aktivitātes pieaugums bija izteiktāks, īpaši ALAT un AP gadījumā, un tas saglabājās ilgākā laika periodā pēc metilprednizolona acetāta ievadīšanas, nekā klīniski veselīgiem dzīvniekiem. Šāds enzīmu aktivitātes profils norāda uz to, ka jau iepriekš slimības procesā ietekmētais hepatocītu metabolisms reaģē ar pastiprinātu šūnu adaptācijas un stresa reakciju, kas atspoguļo funkcionālo rezervju samazināšanos un kompensācijas mehānismu aktivizēšanos. Iepriekšējos pētījumos konstatēts, ka kortikosteroīdu terapija suņiem izraisa nozīmīgas aknu enzīmu aktivitātes svārstības, īpaši palielinot AP un ALAT līmeni (Elkholly et al., 2020; Oikonomidis & Milne, 2023). Šīs izmaiņas saistītas ar steroīdu inducētu enzīmu izoformu aktivāciju hepatocītos un mikrosomu enzīmu sistēmu inducēšanu (Center, 2007; Willard & Tvedten, 2012). Dzīvniekiem ar iepriekš pastāvošām hroniskām vai iekaisuma slimībām kortikosteroīdu iedarbība izraisa izteiktāku oksidatīvā stresa pastiprināšanos, endoplazmatiskā tīkla dilatāciju un glikogēna uzkrāšanos hepatocītos, kas veicina enzīmu izdalīšanos asinsritē un norāda uz funkcionālās adaptācijas robežām (Kusaba et al., 2024).

Alanīnaminotransferāze (ALAT) ir viens no jutīgākajiem hepatocītu bojājuma bioķīmiskajiem rādītājiem suņiem, kas atspoguļo šūnas citoplazmas integritāti un fermentatīvās

aktivitātes izmaiņas (Willard & Twedten, 2012; Center, 2007). Šī enzīma normas robežas tiek uzskatītas par $10\text{--}94\text{ U L}^{-1}$ (Willard & Twedten, 2012). Klīniskajā pētījumā, kurā dzīvniekiem tika veikta vienreizēja ilgstošas darbības kortikosteroīda metilprednizolona acetāta injekcija, ALAT aktivitāte 14. dienā sasniedza $206,4 \pm 28,8\text{ U L}^{-1}$, bet 30. dienā – $177,6 \pm 19,5\text{ U L}^{-1}$, būtiski pārsniedzot fizioloģisko normu. Savukārt klīniski veselām eksperimentālajām dzīvniekiem 14. un 28. dienā tika noteiktas vērtības $60,37 \pm 23,27\text{ U L}^{-1}$ un $33,40 \pm 5,84\text{ U L}^{-1}$, kas nepārsniedza normas robežas. Šīs izmaiņas skaidrojamas ar steroīdu metabolisma stimulāciju un glikogēna uzkrāšanos aknu parenhīmā, kas palielina šūnas enzīmu noplūdi asinsritē (Elkholly et al., 2020). Dzīvniekiem ar iepriekš diagnosticētām slimībām ALAT aktivitātes pieaugums bija straujāks un noturīgāks, kas varētu būt saistīts ar aknu funkcionālo rezervju samazinājumu un augstāku uzņēmību pret oksidatīvo stresu (Guicciardi & Gores, 2010; Feldman & Nelson, 2004). Savukārt veselām dzīvniekiem izmaiņas bija mērenas un īslaicīgas, kas atbilst fizioloģiskai adaptīvajai reakcijai uz steroīdu inducētu metabolo slodzi, neizraisot strukturālu bojājumu.

Analizējot AP aktivitāti, kas ir viens no visbiežāk paaugstinātajiem rādītājiem kortikosteroīdu terapijas laikā, novērots būtisks aktivitātes pieaugums abās dzīvnieku grupās. Šī fermenta aktivitātes pieaugums saistīts ar kortikosteroīdu inducētas izoformas (kAP) sintēzi hepatocītos (Gaskill et al., 2005), kas tiek uzskatīta par specifisku reakciju suņiem, jo citām sugām šāda izoforma nav konstatēta (Willard & Twedten, 2012). Līdzīgas izmaiņas aprakstītas arī agrākos eksperimentālos modeļos (Dillon et al., 1980; Syakalima et al., 1998), kuros AP aktivitāte ievērojami pieauga jau pirmajās nedēļās pēc terapijas sākuma. Saskaņā ar Willard & Twedten (2012) datiem, AP koncentrācijas normas robežas asins serumā ir $0\text{--}90\text{ U L}^{-1}$. Klīniskajā pētījumā šī fermenta aktivitāte 14. dienā pēc metilprednizolona acetāta ievadīšanas bija $412,8 \pm 75,3\text{ U L}^{-1}$, bet 30. dienā – $329,2 \pm 46,7\text{ U L}^{-1}$. Savukārt klīniski veselām dzīvniekiem 14. un 28. dienā tika konstatētas vērtības $162,73 \pm 61,69\text{ U L}^{-1}$ un $119,87 \pm 42,57\text{ U L}^{-1}$. Abās grupās vērtības pārsniedza fizioloģisko normu, taču palielinājuma pakāpe būtiski atšķīrās – slimajiem dzīvniekiem tā sasniedza aptuveni septiņkārtu pieaugumu, savukārt veselām – tikai 2,4 reizes. Šo atšķirību iespējams skaidrot ar atšķirīgu aknu funkcionālo rezervju līmeni un kortikosteroīdu inducētās mikrosomu enzīmu aktivitātes pakāpi. Dzīvniekiem ar patoloģiju ilgstošas darbības kortikosteroīdu ievadīšana izraisa izteiktāku hepatocītu metabolo slodzi un oksidatīvā stresa pastiprināšanos, kas veicina kAP ekspresiju un fermenta izdalīšanos asinsritē (Elkholly et al., 2020; Oikonomidis & Milne, 2023). Klīniski veselām dzīvniekiem AP aktivitāte normalizējās līdz 28. dienai, savukārt dzīvniekiem ar patoloģiju tā saglabājās vairāk nekā trīskārt augstāka par normas robežām, kas norāda uz ilgstošāku metabolo reakciju un hronisku izmaiņu stabilizēšanos.

Kopumā iegūtie rezultāti apstiprina, ka reakcija uz ilgstošas darbības kortikosteroīdu ievadīšanu suņiem ir cieši saistīta ar sākotnējo veselības stāvokli. Dzīvniekiem ar esošu patoloģiju, kaut tā nav aknu, novērojama izteiktāka enzīmu aktivitātes dinamika, kas atspoguļo izmainītu morfofunkcionālo līdzsvaru un samazinātu kompensācijas spēju, savukārt klīniski veselām dzīvniekiem izmaiņas visdrīzāk raksturo atgriezenisku adaptīvu reakciju, nevis bojājumu.

Zinātniskajā literatūrā ir analizētas asins bioķīmisko analīžu rezultātu izmaiņas pēc kortikosteroīdu lietošanas. Jāatzīmē, ka mums neizdevās atrast informāciju par ilgstošas darbības kortikosteroīdu ietekmi uz organismu un asins seruma bioķīmiskajām izmaiņām. Ir pētījums par prednizona (kas ir īsās darbības kortikosteroīds) eksperimentāli izsauktu steroīdo hepatopātiju, kurā suņiem šo medikamentu lietoja 10 dienas pēc kārtas devā 4 mg kg^{-1} dienā. Autori novēroja statistiski būtisku AP koncentrācijas pieaugumu sākot no 3. eksperimenta dienas, turklāt tieši uz aknu enzīma izoformas rēķina. Kortikosteroīdu inducētas termostabīlas AP koncentrācijas būtisku pieaugumu šajā pašā eksperimentā novēroja tikai 7. dienā (Wiedmeyer et al., 2002). Kortikosteroīdi ietekmē sārmainās fosfatāzes aktivitāti gēnu transkripcijas un pēctranskripcijas līmenī, atkarībā no ietekmējamā orgāna un sārmainās

fosfatāzes izoformas. Pēc autoru domām šīs aiztures pamatojumam ir nepieciešami papildus izmeklējumi šūnu genoma līmenī, kas netika veikti šajā pētījumā.

Citā pētījumā tika aprakstīts, ka klīniski veselīgi suņi, kuriem lietoja prednizolonu (arī īsās darbības kortikosteroīds) devā $4,4 \text{ mg kg}^{-1}$ 30 dienas pēc kārtas, kAP koncentrācija būtiski mainījās tikai 30. eksperimenta dienā, turklāt tikai pusei no visiem dzīvniekiem (Syakalima et al., 1997). Tas, pēc autoru domām, pierāda suņu individuālo jutību pret kortikosteroīdu lietošanu. Mūsu pētījumā arī tika novērota izteikta individuālā jutība pret metilprednizolona acetātu. Vienam no eksperimentālajiem dzīvniekiem sārmains fosfatāzes līmenis serumā 14. dienā pēc preparāta ievadīšanas pieauga īpaši strauji pārsniedzot normas augšējo robežu un sākotnējo vērtību. Visi citi iespējamie ārējie un fizioloģiskie faktori, kas varētu ietekmēt šo rādītāju, tika izslēgti. Arī citos literatūras avotos ir minēts, ka suņiem pastāv būtiskas individuālas atšķirības kortikosteroīdu metabolismā un mikrosomu enzīmu inducēšanā. Šo variabilitāti var noteikt gan ģenētiski faktori, gan atšķirības kortikosteroīdu receptoru ekspresijā un jutībā hepatocītos (Behrend & Kemppainen, 1997; Bartlett et al., 2019; Clarisse et al., 2024). Šie novērojumi saskan ar datiem, ka kortikosteroīdu farmakodinamika nav viendabīga – tā ir atkarīga no dzīvnieka vecuma, veselības stāvokļa un individuālā metabolisma profila, minimālā efektīvā deva var atšķirties vienas un tās pašas patoloģijas ārstēšanai dažādiem indivīdiem (Behrend & Kemppainen, 1997; Lowe, 2010; Tintle et al., 2023). Tādējādi atsevišķu dzīvnieku straujāka bioķīmisko rādītāju dinamika var būt fizioloģiski pamatota individuālās jutības izpausme, kas klīniski jāņem vērā, izvēloties ilgstošas darbības kortikosteroīdu terapiju.

Mūsu pētījumā tika konstatēts, ka pat 45 dienas pēc vienreizējas ilgstošas darbības kortikosteroīda injekcijas nevienam no klīniskajā grupā iekļautajiem dzīvniekiem (suņiem ar iepriekš diagnosticētām, bet aknu funkciju neskarošām patoloģijām) aknu darbību raksturojošie rādītāji nebija atgriezušies normas robežās. Šis ilgstošais efekts norāda uz to, ka metilprednizolona acetāta ietekme saglabājas arī pēc klīniskās darbības beigām, iespējams, saistībā ar kortikosteroīdu depo formas farmakokinētiku un aknu šūnu adaptācijas aizkavētu reversiju. Eksperimentālā pētījuma dzīvniekiem (klīniski veselīgi suņi) saskaņā ar Dzīvnieku aizsardzības un ētikas komisijas atļauju fermentu aktivitātes rādītāji tika noteikti 56. dienā pēc injekcijas, un visi bioķīmiskie parametri šajā laikā jau bija normalizējušies, atgriežoties sākotnējā līmenī. Jau 28. dienā šiem dzīvniekiem AP un ALAT rādītāji nebija būtiski paaugstināti, salīdzinot ar sākuma vērtībām, kas apliecina atgriezenisku metabolo adaptāciju un pietiekamu funkcionālo rezervi. Šie dati atbilst iepriekš publicētajiem novērojumiem, ka kortikosteroīdu inducētās bioķīmiskās izmaiņas parasti ir atgriezeniskas, ja aknu struktūra sākotnēji ir neskarta (Oikonomidis & Milne, 2023), bet var saglabāties ilgāk pacientiem ar iepriekšēju patoloģiju vai samazinātu metabolo kompensāciju (Assawarachan et al., 2020; Loan et al., 2025).

Klīniskajā praksē izšķiroša nozīme ir dzīvnieka vispārējam veselības stāvoklim un pamatslimības klīniskajām izpausmēm. Mūsu pētījuma gaitā, rūpīgi novērojot un klīniski izmeklējot dzīvniekus, īpaša uzmanība tika pievērsta aknu darbības traucējumu pazīmēm. Jāatzīst, ka, neskatoties uz ievērojamām bioķīmiskajām izmaiņām, nevienam no pētījumā iekļautajiem suņiem – ne klīniski veselīgiem, ne ar konstatētām citām patoloģijām – netika novērotas aknu slimības klīniskās pazīmes. Šis novērojums saskan ar agrāk publicētiem datiem, ka kortikosteroīdu inducētās aknu izmaiņas suņiem parasti norit subklīniski un netiek pavadītas ar redzamiem simptomiem (Feldman & Nelson, 2004; Center, 2007). Vienreizēja ilgstošas darbības kortikosteroīda ievadīšana, pat pie lielākajām ieteicamajām – imūnsupresīvām – devām, neizraisa klīniskas steroīdu izraisītas hepatopātijas pazīmes. Tomēr bioķīmiskie rezultāti apstiprina, ka šāda ārstēšana spēj radīt būtiskas funkcionālas izmaiņas hepatocītu metabolismā un fermentu aktivitātē, kas saglabājas vairākas nedēļas pēc preparāta ievadīšanas. Šis apstāklis atspoguļo augsto suņu aknu kompensācijas spēju un vienlaikus norāda, ka bioķīmiskie rādītāji var būt daudz jutīgāks rīks aknu funkcionālā stāvokļa novērtēšanai nekā klīniskās pazīmes. Tas vēlreiz uzsver nepieciešamību rūpīgi izvērtēt šādu preparātu lietošanas

nepieciešamību un ievērot piesardzību, īpaši dzīvniekiem ar iespējami samazinātu aknu rezervi vai citām hroniskām slimībām. Kortikosteroīdu ievadīšanas intervālam jābūt maksimāli garam, lai mazinātu kumulatīvo efektu.

Interesanti, bet sārmainās fosfatāzes (AP) aktivitāte var paaugstināties ne tikai pēc sistēmiskas, bet arī pēc lokālas kortikosteroīdu lietošanas. Ir pierādīts, ka ausu iekaisuma ārstēšanai paredzēti preparāti, kas satur deksametazonu vai betametazonu, var izraisīt ievērojamu AP aktivitātes pieaugumu serumā, kas saglabājas pat divas nedēļas pēc terapijas pārtraukšanas (Abraham et al., 2005). Savukārt dzīvniekiem, kuriem tika lietoti kortikosteroīdu saturoši acu pilieni, šādas izmaiņas netika novērotas (Glaze et al., 1988), kas norāda, ka sistēmiskā absorbcija un zāļu bioaktivitāte ir cieši atkarīga no lietošanas veida un devas. Šī parādība saskan ar mūsdienu pētījumu, kas apliecina, ka arī lokāli lietotie kortikosteroīdi spēj inducēt aknu mikrosomu enzīmu sistēmas un radīt bioķīmiskas pārmaiņas, kas līdzīgas sistēmiskas terapijas ietekmei (Chan & Johnson, 2023).

Aknu morfoloģisko izmaiņu izvērtējums eksperimentālajā pētījumā apstiprināja, ka pēc vienreizējas ilgstošas darbības metilprednizolona acetāta ievadīšanas klīniski veselīgi suņiem attīstās izteiktas, bet daļēji atgriezeniskas strukturālas pārmaiņas hepatocītos. Jau 14. dienā pēc preparāta ievadīšanas visiem P1 grupas dzīvniekiem tika konstatētas smagas steroīdai hepatopātijai raksturīgas izmaiņas – hepatocītu palielināšanās, citoplazmas vakuolizācija, citoplazmas tīklojums un perifēri novietoti kodoli. Šāds histoloģiskais attēls saskan ar literatūrā aprakstītajām steroīdu inducētās hepatopātijas pazīmēm suņiem, kur dominē hepatocītu pietūkums, glikogēna uzkrāšanās un vakuolāras pārmaiņas citoplazmā (Willard & Twedten, 2012; Center, 2007; Kusaba et al., 2024). Līdzīgas izmaiņas aprakstītas arī agrākos eksperimentos ar kortikosteroīdu lietošanu suņiem (Dillon et al., 1980; Twedt et al., 1983; Gaskill et al., 2005), kas ļauj uzskatīt šīs pazīmes par raksturīgu morfoloģisku atbildi uz steroīdu iedarbību aknās.

Īpaši nozīmīgs ir fakts, ka 28. dienā hepatocītu izmaiņas, lai arī mazāk izteiktas nekā 14. dienā, joprojām saglabājās visiem dzīvniekiem vidēji smagā pakāpē. Tas norāda, ka aknu morfoloģiskā atjaunošanās norit lēnāk nekā bioķīmisko rādītāju normalizācija, kas mūsu pētījumā bija novērojama jau agrāk. Šāds atradums saskan ar literatūrā pausto, ka steroīdu inducētās aknu strukturālās izmaiņas var persistēt ilgāk nekā funkcionālie traucējumi, kas atspoguļojas seruma enzīmu aktivitātē (Center, 2007; Oikonomidis & Milne, 2023). Citiem vārdiem, bioķīmiskā normalizācija nenozīmē pilnīgu histoloģisku reversiju. Šis aspekts ir klīniski nozīmīgs, jo var radīt maldīgu priekšstatu par pilnīgu aknu atlabšanu laikā, kad audu līmenī pārmaiņas vēl saglabājas.

Otrajā aktīvajā periodā iegūtie rezultāti vēl vairāk pastiprina šo secinājumu. Jau perioda sākumā, proti, 56. dienā pēc pirmās MPA ievadīšanas, hepatocītu pārmaiņas P2 grupā vēl joprojām tika vērtētas kā vidēji smagas. Tas norāda, ka vienreizēja ilgstošas darbības kortikosteroīda injekcija spēj izraisīt noturīgas histoloģiskas izmaiņas, kas saglabājas vismaz 56 dienas. Pēc atkārtotas MPA ievadīšanas būtiska regresija netika novērota arī 14. dienā, un tikai 28. dienā daļai dzīvnieku bija redzama daļēja reversija. Šie dati atbilst literatūrā aprakstītajam, ka steroīdu inducēta hepatopātijā sākotnēji atspoguļo hepatocītu adaptīvu metabolo reakciju, taču atkārtotas ekspozīcijas gadījumā šīs pārmaiņas var kļūt noturīgākas un strukturāli izteiktākas (Oikonomidis & Milne, 2023; Chen et al., 2025; Berlin et al., 2024).

Mūsu pētījumā netika novērota hepatocītu nekroze, un tas ir būtisks atradums. Tas ļauj secināt, ka metilprednizolona acetāta iedarbība devā 2 mg kg^{-1} galvenokārt izraisa vielmaiņas un struktūras adaptācijas pārmaiņas, nevis neatgriezenisku šūnu bojājumu. Šāds novērojums atbilst klasiskajam steroīdās hepatopātijas modelim, kur dominē vakuolāras un glikogēna uzkrāšanās pārmaiņas bez izteiktas nekrozes (Fittschen & Bellamy, 1984; Abdou et al., 2013). Tajā pašā laikā literatūrā ir aprakstīti arī smagāki bojājumi pēc citu kortikosteroīdu, īpaši deksametazona, lietošanas, tostarp nekrozes attīstība jau pirmajās dienās pēc ievadīšanas (Szarek et al., 2014). Šī atšķirība, visticamāk, saistīta ar dažādu kortikosteroīdu farmakodinamiskajām un farmakokinētiskajām īpašībām, jo deksametazonam piemīt izteiktāka

kataboliskā un receptoru mediētā iedarbība nekā metilprednizolonam (Clarisse et al., 2024; Viviano, 2022; Bartlett et al., 2019).

Perjodskābes–Šifa reakcija mūsu pētījumā apstiprināja glikogēna uzkrāšanos hepatocītos, tomēr tās intensitāte kopumā bija viegla līdz vidēji smaga. P1 grupā glikogēna akumulācija bija konstatējama jau 14. dienā, bet 28. dienā tā kļuva izteiktāka un biežāk tika vērtēta kā vidēji smaga. Otrajā periodā glikogēna uzkrāšanās bija saglabājusies jau perioda sākumā, kas apstiprina, ka hepatocītu metaboliskais stāvoklis līdz otrajai MPA ievadīšanai nebija pilnībā normalizējies. Salīdzinot ar literatūru, mūsu novērotā glikogēna akumulācija bija mazāk izteikta nekā klasiskos steroīdās hepatopātijas aprakstos, kuros PAS pozitīva reakcija bieži tiek raksturota kā izteikta (Fittschen & Bellamy, 1984; O'Brien et al., 1996; Abdou et al., 2013; Szarek et al., 2014). Šo atšķirību var izskaidrot ar lietotā preparāta īpatnībām. Mūsu pētījumā izmantotais metilprednizolona acetāts ir ilgstošas darbības kortikosteroīds, kura farmakokinētika un metaboliskais profils atšķiras no biežāk aprakstītajiem īslaicīgas darbības kortikosteroīdiem, piemēram, prednizolonam vai deksametazonam (Bexfield & Watson, 2006; Boretti et al., 2025; Viviano, 2022; Clarisse et al., 2024). Tādēļ iespējams, ka tieši kortikosteroīda veids un tā iedarbības profils nosaka glikogēna uzkrāšanās pakāpi aknās.

Interesanti, ka daļā paraugu glikogēna depoziācija kļuva telpiski izteiktāka, īpaši periportālajās zonās. Lai gan mūsu pētījumā zonālā izplatība netika analizēta kā primārais parametrs un adata biopsiju dēļ to nevarēja vērtēt pilnīgi precīzi, šī tendence saskan ar dažos eksperimentos aprakstītu nevienmērīgu glikogēna uzkrāšanās raksturu aknu daiviņās (Abdou et al., 2013). Tomēr šo novērojumu jāvērtē piesardzīgi, jo biopsijas materiāls ne vienmēr reprezentē visu aknu lobulāro arhitektūru.

Neitrofilo leukocītu izvērtējums parādīja, ka pēc MPA ievadīšanas to skaits sinusoīdos gan nedaudz palielinājās, tomēr šīs šūnas netika konstatētas aknu parenhīmā, netika novēroti perēkļveida uzkrājumi, nekrozes pazīmes vai strukturāli destruktīvas izmaiņas. Tādēļ mūsu atradumi neatbalsta patiesu iekaisuma infiltrācijas attīstību aknu audos. Drīzāk tie atspoguļo zemas intensitātes cirkulējošu neitrofilo leukocītu klātbūtni sinusoīdos. Tas pilnībā saskan ar iepriekšējiem datiem, ka steroīdu inducētās aknu pārmaiņas suņiem pamatā ir metabolas un strukturālas, nevis iekaisīgas (Center, 2007; Oikonomidis & Milne, 2023). Līdzīgu secinājumu izdarījuši arī Szarek et al. (2014), kuri, lietojot deksametazonu eksperimentālā modelī, nekonstatēja būtisku iekaisuma komponentes aktivāciju aknās. Tādējādi mūsu rezultāti apstiprina, ka hepatocītu vakuolārās pārmaiņas MPA ietekmē nav saistītas ar izteiktu iekaisuma procesu.

Īpašu uzmanību piesaista stellāta šūnu kvantitatīvās izmaiņas. P1 grupā α -SMA pozitīvo šūnu skaits pēc MPA ievadīšanas pakāpeniski palielinājās – no neliela daudzuma 0. dienā līdz augstākām vērtībām 14. un 28. dienā. Otrajā periodā šīs šūnas saglabājās arī perioda sākumā, taču vēlāk bija vērojama neliela samazināšanās. Neskatoties uz šīm kvantitatīvajām izmaiņām, netika konstatētas fibrozes pazīmes. Tas nozīmē, ka mūsu modelī stellāta šūnu skaita pieaugums pats par sevi nebija saistīts ar skaidri izteiktu fibrozi. Šis atradums ir ļoti nozīmīgs, jo tas atšķiras no dažiem literatūrā aprakstītajiem modeļiem, kuros pēc atkārtotas vai intensīvākas kortikosteroīdu iedarbības novērota izteiktāka stellāta šūnu proliferācija un kolagēna depoziācija (Sobczak-Filipiak et al., 2014; Friedman, 2010; Dou et al., 2021). Mūsu dati drīzāk liecina par agrīnu vai vieglu stellāta šūnu aktivāciju, kas šī pētījuma laika posmā vēl nav progresējusi līdz morfoloģiski redzamai fibrozei.

Kopumā iegūtie histoloģiskie dati apliecina, ka vienreizēja ilgstošas darbības metilprednizolona acetāta ievadīšana suņiem izraisa izteiktas, taču daļēji atgriezeniskas hepatocītu strukturālas un metabolas pārmaiņas. Šīs izmaiņas saglabājas ilgāk nekā bioķīmiskie traucējumi un var persistēt vismaz 56 dienas pēc vienreizējas injekcijas. Atkārtotas ekspozīcijas gadījumā morfoloģiskā atjaunošanās kļūst vēl nepilnīgāka, kas norāda uz kumulatīvas iedarbības iespējamību. Vienlaikus izmaiņas galvenokārt aprobežojas ar vakuolāru hepatopātiju un glikogēna uzkrāšanos, nevis nekrozi vai izteiktu fibrozi. Tas ļauj secināt, ka

metilprednizolona acetāta iedarbība uz aknu audiem šajā modelī galvenokārt izpaužas kā ilgstoša, metabolas adaptācijas rakstura steroīdā hepatopātija.

Otrais pētījuma uzdevums bija novērtēt, vai (un kādā mērā) hepatoprotektanti spēj ietekmēt aknu funkcionālā stavokļa izmaiņas, ko izraisa metilprednizolona acetāts. Šim nolūkam tika izmantoti divi dažādi hepatoprotektantu veidi – augu izcelsmes preparāts *GlutaMax* un antioksidants mitokvinola mezilāts, kas humānajā medicīnā tiek plaši lietots aknu fibrozes un oksidatīvā stresa mazināšanai. Dzīvniekiem, kuriem pēc metilprednizolona acetāta ievadīšanas tika lietoti hepatoprotektanti, visu izmeklēto bioķīmisko rādītāju vērtības bija zemākas nekā dzīvniekiem, kas saņēma tikai kortikosteroīdu. Tas norāda, ka hepatoprotektantu lietošana mazināja kortikosteroīda izraisīto ietekmi uz aknu šūnām, kas izpaudās ALAT, GGT, AP un kAP aktivitātes līmeņu samazinājumā asinīs.

Klīniskajā pētījumā dzīvniekiem tika atkārtoti ņemtas analīzes arī 45. dienā pēc kortikosteroīda ievadīšanas. Dzīvniekiem, kuri saņēma hepatoprotektantu *GlutaMax*, vidējais ALAT līmenis 45. dienā bija $59,9 \pm 25,5$ U L⁻¹, tātad tas bija atgriezies normas robežās. Arī GGT un AP vidējās vērtības šajā grupā bija normalizējušās un tuvas sākotnējiem rādītājiem, kas tika noteikti pirms kortikosteroīda ievadīšanas. Savukārt termostabilās sārmainās fosfatāzes (kAP) līmenis 45. dienā šiem dzīvniekiem, lai gan bija salīdzinoši zems, tomēr saglabājās aptuveni trīs reizes augstāks nekā 0. dienā ($39,8 \pm 18,1$ U L⁻¹). Pirmās grupas dzīvniekiem, kuri saņēma tikai metilprednizolona acetātu bez hepatoprotektanta, kAP vērtība tajā pašā periodā bija 7.3 reizes augstāka nekā sākotnēji. Šī atšķirība liecina, ka hepatoprotektantu lietošana efektīvi mazināja kortikosteroīdu inducēto enzīmu aktivitātes paaugstināšanos un veicināja ātrāku aknu šūnu funkcijas atjaunošanos. Mūsu pētījumā izmantotā hepatoprotektanta *GlutaMax* sastāvdaļām – silimarīnam, kurkumīnam un glutaciona prekursoriem – ir plaši dokumentēta labvēlīga ietekme uz aknu šūnu struktūras saglabāšanu, brīvo radikāļu neitralizēšanu un reģenerācijas veicināšanu. Šīs vielas darbojas kā membrānu stabilizatori, uzlabojot hepatocītu enzīmu aktivitāti un samazinot lipidperoksidācijas radītos bojājumus (Abenavoli et al., 2018; Hewlings & Kalman, 2017; Albeltagy, 2023; Giannetto et al., 2022). Lai gan šajā pētījumā hepatoprotektantu lietošana pilnībā neizslēdza bioķīmiskās izmaiņas, tomēr tika konstatēts ievērojams ALAT, AP un kAP līmeņa samazinājums, kas liecina par to aizsargmehānismu efektivitāti kortikosteroīdu inducēta stresa apstākļos.

Mums pieejamajos zinātniskajos pētījumos, kas publicēti starptautiskos recenzējamos žurnālos un datu bāzēs, līdzīgu pētījumu skaits ir ļoti ierobežots. Deniz et al. (2009) aprakstīja butafosfāna un B₁₂ vitamīna lietošanas efektu suņiem pēc deksametazona ievadīšanas imūnsupresīvā devā. Autoru mērķis bija noteikt izmaiņas hematoloģiskajos un seruma bioķīmiskajos rādītājos un salīdzināt grupu, kas saņēma tikai kortikosteroīdu, ar grupu, kurai papildus tika lietoti minētie preparāti. Pētījumā iekļāva 12 klīniski veselus dzīvniekus. Analīzē galvenais uzvars tika likts uz hematoloģisko parametru izmaiņām, ar kuru palīdzību tika pierādīta šo preparātu spēja ātrāk stabilizēt deksametazona izraisītās novirzes. Bioķīmiskajos rādītājos izmaiņas nebija būtiskas, izņemot AP līmeņa paaugstināšanos dzīvniekiem, kas saņēma tikai kortikosteroīdu. No šī pētījuma datiem nevar secināt, vai butafosfānam un B₁₂ vitamīnam piemīt hepatocītus pasargājoša vai reģenerējoša iedarbība. Jāpiemin, ka pētījums tika veikts pēc komerciāla preparāta ražotāja pasūtījuma. Center et al. (2005) veica pētījumu, kurā klīniski veseliem suņiem tika ievadīts prednizolons (4 mg kg^{-1} dienā) kopā ar S-adenozilmethionīnu (SAM) vai placebo 84 dienu garumā. Autori konstatēja, ka SAM labvēlīgi ietekmēja eritrocītu funkcionālo spēju un antioksidatīvo statusu, taču nespēja novērst hepatocītu strukturālās izmaiņas un ar tām saistītos bioķīmisko marķieru pieaugumus.

Mitokvinola mezilāts ir mitohondriju mērķēts antioksidants, kas saistās ar mitohondriju iekšējo membrānu, kur tas efektīvi samazina reaktīvo skābekļa formu daudzumu un kavē oksidatīvā stresa izraisītu lipīdu un olbaltumvielu bojājumu veidošanos (Kelso et al., 2001; Murphy, 2016; Sulaimon et al., 2021). Rehman et al. (2016) pierādīja, ka mitokvinola mezilāts samazina mitohondriju oksidatīvo stresu, mazina hepatocelulāros bojājumus un iekaisuma

reakcijas intensitāti, tādējādi stabilizējot aknu metabolo funkciju. Līdzīgas tendences novērotas arī citos cilvēku medicīnas pētījumos, kuros mitokvinola lietošana samazināja hepatocītu apoptozi, veicināja ATF sintēzes saglabāšanos un samazināja transamināžu aktivitātes pieaugumu serumā (Gane et al., 2010; Smith & Murphy, 2010; Murphy, 2016). Mūsu veiktajā eksperimentālajā pētījumā ALAT vērtības visiem suņiem būtiski neatšķīrās no fizioloģiskajām normām arī pēc atkārtotas metilprednizolona acetāta ievadīšanas. No zinātniski praktiskā viedokļa šie novērojumi atklāj nepieciešamību turpināt ilgtermiņa pētījumus, lai novērtētu preparāta aizsargefekta noturīgumu ilgstošas kortikosteroīdu lietošanas gadījumā. Iespējams, ka pēc vairākām metilprednizolona acetāta injekcijām ALAT vērtības pārsniegtu fizioloģisko normu robežas, atklājot hepatocītu aizsardzības mehānisma robežas un adaptācijas izsīkumu. Šāda turpmāka izpēte būtu īpaši nozīmīga, lai izprastu hepatoprotektīvo līdzekļu lomu klīniskās prakses apstākļos, kur kortikosteroīdu terapija bieži tiek izmantota atkārtoti un ilgstoši.

GGT koncentrācijas vidējās vērtības mūsu pētījumā paaugstinājās virs normas robežām abos periodos un abām suņu grupām, neatkarīgi no hepatoprotektanta lietošanas. Antioksidanta mitokvinola mezilāta pozitīva ietekme šajā gadījumā netika novērota. Lai izskaidrotu šo parādību, ir būtiski analizēt faktorus, kas nosaka GGT aktivitātes pieaugumu asins serumā. GGT ir enzīms, kas saistīts ar šūnu membrānām, īpaši distālajos žultsvados un hepatocītu membrānu virsmā, un tā līmeņa palielināšanās bieži norāda uz žults plūsmas traucējumiem, tauku uzkrāšanos hepatocītos un oksidatīvā stresa izraisītu šūnu bojājumu (Willard & Twedten, 2012). Pieaugusi GGT aktivitāte tiek uzskatīta arī par vienu no jutīgākajiem marķieriem oksidatīvā stresa un mitohondriju disfunkcijas gadījumā aknās (Guicciardi & Gores, 2010). Mitokvinola mezilāts, kā mērķēts mitohondriju antioksidants, teorētiski spēj mazināt oksidatīvā stresa radītos bojājumus, samazinot reaktīvo skābekļa formu (ROS) uzkrāšanos mitohondrijos. Mitokvinola mezilāts spēj mazināt hepatocelulāros bojājumus un iekaisumu, kā arī atjaunot mitohondriju membrānas potenciālu un samazināt šūnu apoptozi (Rehman et al., 2016; Smith & Murphy, 2010). Tomēr mūsu pētījumā šāds efekts netika novērots, iespējams, tādēļ, ka kortikosteroīdu izraisītie procesi aknās vēl nebija kļuvuši hroniski, un līdz ar to antioksidanta iedarbība nespēja pilnībā izpausties. Literatūrā norādīts, ka organisma endogēnā ubihinona (koenzīma Q10) aktivitāte ievērojami samazinās hronisku patoloģiju un ilgstoša oksidatīvā stresa apstākļos, kad dabīgie antioksidanti vairs nespēj efektīvi cīnīties ar pārmērīgo reaktīvo skābekļa formu daudzumu (Acosta et al., 2016). Šādos gadījumos novēro strauju ubihinona līmeņa kritumu, kas veicina šūnu bojājumu uzkrāšanos. Tāpēc hronisku slimību ārstēšanā arvien biežāk tiek izmantoti sintētiski ubihinona atvasinājumi, tai skaitā mitokvinols, kas darbojas kā mērķēts mitohondriju antioksidants (Murphy, 2008; Murphy, 2016). Pieļaujams, ka procesi, kas norisinājās aknās pēc kortikosteroīdu lietošanas mūsu eksperimentā (28 dienu periodā), vēl nebija sasnieguši hroniskuma stadiju, un līdz ar to netika novērota citu autoru aprakstītā mitokvinola labvēlīgā ietekme. Tas ļauj secināt, ka mitokvinols, būdams ubihinona derivāts, efektīvāk darbojas hronisku aknu bojājumu un fibrozes gadījumos, kur oksidatīvais stress un mitohondriju disfunkcija ir noturīga un ilgstoša (Rehman et al., 2016). Tomēr akūtās vai subakūtās situācijās, kādas tika modelētas šajā pētījumā, mitokvinola antioksidatīvā darbība, visticamāk, neizpaužas pilnībā (Rehman et al., 2016; Murphy, 2016; Rossman et al., 2018; Hidalgo-Gutiérrez et al., 2021; Sulaimon et al., 2021).

Citādi novērojām sārmainās fosfatāzes (AP) līmeņa izmaiņas suņiem eksperimentālajā pētījumā. Pirmajā periodā ir grūti viennozīmīgi spriest par mitokvinola mezilāta kā antioksidanta pozitīvo ietekmi uz hepatocītu aizsardzību. AP rādītāji abām suņu grupām pārsniedza normas robežas un līdz perioda beigām neatgriezās izejas stāvoklī. Ierobežojumi, kas saistīti ar dzīvniekiem atļauto manipulāciju skaitu, neļāva pilnvērtīgi novērtēt rādītāju dinamiku atpūtas periodā. Otrā perioda sākumā, kad visi pētītie bioķīmiskie parametri bija atgriezušies fizioloģiskajās robežās, tika veikta atkārtota metilprednizolona acetāta injekcija. Pēc atkārtotās kortikosteroīda ievadīšanas suņiem, kuri saņēma mitokvinolu, AP vērtības bija būtiski zemākas, nekā dzīvniekiem bez antioksidanta lietošanas. Šī tendence norāda uz mitokvinola iespējamo aizsargefektu, kas izpaužas kā hepatocītu jutības samazināšanās pret

kortikosteroīdu inducēto enzīmu ekspresijas aktivāciju, bet ne pilnīga aizsardzība pret sārmainās fosfatāzes aktivitātes pieaugumu (Rehman et al., 2016;). Īpaši nozīmīgs ir fakts, ka visos mērījumos AP līmeņa pieaugums tika konstatēts tieši uz termostabilās frakcijas – kAP – aktivitātes kāpinājuma fona. Līdzīgi kā iepriekš aprakstītajā salīdzinājumā starp veseliem un slimiem dzīvniekiem, šī parādība liecina, ka hepatocītu struktūra saglabāja relatīvu integritāti, tomēr kortikosteroīdu inducētā enzīmu sintēze aknās netika pilnībā kavēta. Šo mehānismu varētu skaidrot ar kortikosteroīdu iedarbību uz aknu mikrosomu enzīmu sistēmu, kur aktivējas kortikosteroīdu inducētā AP izoforma gēna transkripcija (Eckersall & Nash, 1983; Bexfield & Watson, 2006). Tādējādi var secināt, ka mitokvinola mezilāts, neskatoties uz antioksidatīvo īpašību, nespēja samazināt kortikosteroīdu inducētās sārmainās fosfatāzes (īpaši kAP) aktivitātes pieaugumu, taču palīdzēja pasargāt hepatocītus no strukturāliem bojājumiem. Tas atbilst citu autoru atziņām, ka mitohondriju antioksidanti visefektīvāk darbojas ilgstoša oksidatīvā stresa apstākļos, bet to iedarbība akūtās vai subakūtās fāzēs var būt ierobežota (Murphy, 2016; Rehman et al., 2016; Jiang et al., 2020; Mooli et al., 2022). No iepriekš aprakstītā var secināt, ka antioksidantiem kopumā ir pozitīva ietekme uz hepatocītu funkcionālo stāvokli, jo tie samazina oksidatīvā stresa radītos bojājumus un palīdz saglabāt šūnu strukturālo integritāti. Arī mūsu pētījumā izmantotais preparāts vismaz daļēji samazināja kortikosteroīdu izraisītos hepatocelulāros bojājumus suņiem, kas norāda uz tā potenciālo aizsargefektu aknu audos.

Kā trešais, bet ne mazāk nozīmīgs, šī darba uzdevums bija izvērtēt antioksidanta mitokvinola mezilāta ietekmi uz aknu audu patoloģisko izmaiņu reversijas procesu suņiem metilprednizolona acetāta lietošanas fonā. Lai noteiktu šīs izmaiņas, histoloģiski tika izmeklēti biopsijas rezultātā iegūtie aknu audu paraugi. Ētisku apsvērumu dēļ šādi izmeklējumi tika veikti tikai eksperimentālajā pētījumā iekļautajiem dzīvniekiem.

Noteiktas pakāpes pārmaiņas bija novērojamas visiem dzīvniekiem jau otrajā biopātā (pēc 14 dienām), un to smagums variēja no vidēji izteiktām līdz smagām. Hematoksilīna un eozīna krāsojumā tika konstatētas tipiskas steroīdai hepatopātijai raksturīgas pazīmes: hepatocītu palielināšanās izmēros, citoplazmas tīklojums un vakuolizācija, kodolu nobīde šūnas perifērijā (Kusaba et al., 2024; Willard & Twedten, 2012). Šāds morfoloģiskais attēls ir klasiski aprakstīts arī agrākos pētījumos ar suņiem, kuriem lietoti kortikosteroīdi (Dillon et al., 1980; Twedt et al., 1983; Gaskill et al., 2005), un tas tiek uzskatīts par steroīdu inducētas hepatopātijas diagnostisko kritēriju. Histoloģiskā aknu biopātā izmeklēšana liecina, ka antioksidanta lietošana pirmajā periodā būtiski neietekmēja hepatocītu aizsargspējas pret kortikosteroīdu negatīvo ietekmi. Tomēr īpaši nozīmīgas bija otrajā periodā novērotās izmaiņas hepatocītu morfoloģijā. No dzīvniekiem, kuri pirmajā periodā bija saņēmuši mitokvinola mezilātu (MQ1 grupa), 75% gadījumu otrā perioda 14. dienā aknu pārmaiņas tika raksturotas kā vidēji smagas, kamēr tiem pašiem dzīvniekiem pirmajā periodā 14. dienā tika konstatētas smagas pārmaiņas. Otrajā periodā šai dzīvnieku grupai netika lietots antioksidants. Šī atšķirība norāda uz iespējamu hepatocītu adaptācijas mehānismu aktivizēšanos, pateicoties atlikušas darbības efektam (Rehman et al., 2016; Murphy, 2016). Savukārt dzīvniekiem, kuriem pirmajā periodā netika lietots antioksidants (P2 grupa), otrā perioda 14. dienā 100% gadījumu tika novērotas smagas aknu mikroskopiskās struktūras izmaiņas, kas ir raksturīgas steroīdai hepatopātijai (Kusaba et al., 2024; Willard & Twedten, 2012). Šīs izmaiņas liecina par atkārtotas kortikosteroīdu ekspozīcijas kumulatīvo efektu, kad hepatocītu kompensācijas mehānismi vairs nespēj pilnībā aizsargāt šūnu integritāti. Otrā perioda 28. dienā vieglas morfoloģiskas izmaiņas tika novērotas 50% dzīvnieku no P2 grupas, kas var tikt interpretēts kā atgriezeniskas hepatocītu adaptācijas sākuma pazīme. Šāds process ir aprakstīts arī citu autoru darbos, kas norāda, ka kortikosteroīdu izraisītās aknu strukturālās izmaiņas var būt daļēji atgriezeniskas pēc zāļu darbības pārtraukšanas, īpaši gadījumos, kad hepatocītiem saglabājas pietiekama funkcionālā rezerve (Oikonomidis & Milne, 2023; Chen et al., 2025; Berlin et al., 2024).

Iepriekš aprakstītais ļauj secināt, ka antioksidantu ietekme uz aknu šūnām izpaužas vēlīni – tās aizsargefekts kļūst redzams tikai pie ilgstošākas lietošanas, nevis terapijas sākumā. Tas norāda uz iespējamu kumulatīvu mitohondriju aizsardzības mehānismu aktivizēšanos un hepatocītu spēju adaptēties pret atkārtotu oksidatīvo stresu (Rehman et al., 2016; Murphy, 2016).

Neitrofilo leukocītu skaita palielināšanos aknu audos antioksidanta lietošana neietekmēja. Arī divkārtēja kortikosteroīdu ievadīšana neizraisīja šo šūnu skaita palielināšanos virs fizioloģiskās normas. Nevienam no pētījumā iekļautajiem dzīvniekiem nevienā biopātā netika konstatēts vairāk nekā 10 neitrofilo leukocītu uz 100 hepatocītiem, kas liecina par iekaisuma procesa neesamību. Šo novērojumu apstiprina arī Szarek et al. (2014), kuri, ievadot deksametazonu devā 1 mg kg^{-1} četras dienas pēc kārtas, neatrada būtiskas izmaiņas neitrofilo leukocītu skaitā aknās. Arī mūsu pētījumā pirms kortikosteroīdu lietošanas aknu biopātās neitrofilie leukocīti netika konstatēti, un kortikosteroīdu izraisītās pārmaiņas aknās nebija saistītas ar iekaisuma reakcijas aktivizāciju, bet gan ar metabolo adaptāciju un šūnu strukturālām izmaiņām.

Īpašu interesi rada stellāta šūnu uzvedība pēc kortikosteroīdu ievadīšanas. Izmeklējumu rezultāti liecināja, ka nevienam no pētījumā iekļautajiem dzīvniekiem netika konstatēta statistiski būtiski izteiktā α -SMA pozitīva reakcija aktivētajās stellāta šūnās. Tāpat netika novērotas statistiski nozīmīgas atšķirības starp abām eksperimentālajām grupām – suņiem, kuri saņēma mitokvinola mezilātu, un tiem, kuri to nesaņēma, kā arī starp dažādām izmeklējuma dienām. Kopumā α -SMA pozitīvo stellāta šūnu aktivācija saglabājās zema. Kvantitatīvā un semikvantitatīvā analīze apstiprināja, ka divkārtēja ilgstošas darbības metilprednizolona acetāta ievadīšana devā 2 mg kg^{-1} 84 dienu laikā neizraisa fibrotiskas pārmaiņas aknu histoloģiskajā struktūrā.

Vienlaikus šie “vieglie” atradumi klīniski nav jāinterpretē kā pilnīgi nebūtiski: pacientiem, kuri kortikosteroīdus saņem ilgstoši vai atkārtoti, pat zemas devās, bet persistējoša stellāta šūnu aktivācija var kļūt par nozīmīgu fonu progresējošām strukturālām pārmaiņām. Šie rezultāti saskan ar literatūrā aprakstīto, ka steroīdu inducēta hepatopātija suņiem tipiski izpaužas ar glikogēna uzkrāšanos un citoplazmas vakuolizāciju, savukārt fibrozes progresija biežāk tiek novērota ilgstošas vai atkārtotas terapijas apstākļos (Szarek et al., 2014; Kusaba et al., 2024). Tas ļauj secināt, ka šajā pētījuma laika posmā aknu morfofunkcionālās pārmaiņas pārsvarā atspoguļoja adaptīvu reakciju uz kortikosteroīdu iedarbību, taču hroniskas lietošanas gadījumā šādas adaptīvas pārmaiņas var kumulēties un iegūt lielāku klīnisko nozīmi.

Szarek et al. (2014) līdzīgos eksperimentos ar deksametazonu (1 mg kg^{-1} četras dienas pēc kārtas) konstatēja stellāta šūnu proliferācijas pieaugumu un hepatocītu vakuolizāciju, kā arī secināja, ka steroīdās hepatopātijas gadījumā hepatocītu bojājumi ir atgriezeniski, ja preparāta lietošana ir īslaicīga, taču atkārtota vai ilgstoša terapija var izraisīt noturīgas fibrotiskas pārmaiņas. Jaunākie pētījumi papildina šos secinājumus, norādot, ka hepatocītu un stellāta šūnu mijiedarbību būtiski modulē mitohondriju oksidatīvais stāvoklis un šūnu metabolisma atjaunošanās spēja (Cogliati et al., 2023; Li et al., 2024; Habermaass et al., 2025), savukārt kortikosteroīdu inducētās izmaiņas stellāta šūnu aktivācijā un fibrozes uzsākšanā vislabāk raksturotas vecākos, bet mehāniski detalizētos modeļos (Sobczak-Filipiak et al., 2014). Mūsu iegūtie dati liecina, ka antioksidantu lietošana stellāta šūnu aktivāciju kortikosteroīdu preparātu ietekmē nemazināja. Paaugstināts stellāta šūnu skaits uz 100 hepatocītiem tiek uzskatīts par prognostisku faktoru aknu fibrozes attīstībai (Cogliati et al., 2023; Li et al., 2024; Habermaass et al., 2025; Liu et al., 2024). Šis novērojums ir īpaši nozīmīgs pacientiem, kuriem paredzēta ilgstoša vai mūža kortikosteroīdu terapija, jo stellāta šūnu aktivācija var liecināt par fibroģenēzes sākuma stadiju vēl pirms klīnisku simptomu parādīšanās. Mēs pieļaujam, ka, lai pilnībā pierādītu mitokvinola antifibrotisko efektivitāti, gan kortikosteroīdus, gan mitokvinola mezilātu būtu jālieto ievērojami ilgākā laika periodā, nekā tas tika darīts mūsu pētījumā, jo tā aizsargājošā iedarbība, visticamāk, izpaužas vēlīnās aknu bojājuma stadijās, kad dominē mitohondriju disfunkcija un hronisks oksidatīvais stress (Rehman et al., 2016; Murphy, 2016).

Iegūtie rezultāti par stellāta šūnu proliferāciju neatbilst literatūrā aprakstītajam mitokvinola efektam cilvēku medicīnā. Eksperimentālos modeļos un agrīnos klīniskos pētījumos mitohondriju mērķētais antioksidants mitokvinols ir parādījis hepatoprotektīvu un antifibrotisku iedarbību, mazinot steatozi, oksidatīvo stresu un fibrozes progresēšanu, kas ir īpaši nozīmīgi nealkoholiskās taukainās hepatozes un cirozes kontekstā (Fink et al., 2021; Dou et al., 2021; Sulaimon et al., 2021; Turkseven et al., 2023; Tao et al., 2024; Pang et al., 2025). Šī atšķirība varētu būt saistīta ar īsāku lietošanas ilgumu un atšķirīgām farmakokinētiskajām īpašībām suņiem, kā arī ar atšķirīgu aknu stellāta šūnu reakciju uz oksidatīvo stresu dažādās sugās (Papich, 2015; Viviano, 2022; Tintle et al., 2023; Friedman, 2010; Mooli et al., 2022; Liu et al., 2024).

Kopumā iegūtie rezultāti ļauj secināt, ka mitokvinola mezilāts šī pētījuma apstākļos pilnīgi nepasargāja hepatocītus no sākotnējo steroīdai hepatopātijai raksturīgo morfoloģisko pārmaiņu attīstības pēc pirmās metilprednizolona acetāta ievadīšanas, tomēr tas varētu būt veicinājis vēlināku aknu audu adaptāciju un daļēju histoloģisko pārmaiņu mazināšanos pēc atkārtotas kortikosteroīda ekspozīcijas.

Jaunatklājumus aprakstījām darba **ceturtajā uzdevumā**, analizējot hepatocītu ultrastrukturālās pārmaiņas. Kopumā mūsu iegūtie DAPI un TOMM20 marķējuma dati saskan ar mūsdienu priekšstatu par zāļu inducēta šūnu stresa un mitohondriju disfunkcijas mehānismiem aknās, tomēr atšķirības starp grupām kopumā bija mērenas un ne vienmēr konsekventas visos laika punktos un rādītājos.

DAPI signāla heterogenitātes palielināšanās un kodolu formas izmaiņas pēc MPA ievadīšanas tika novērotas abās grupās, kas norāda uz nukleārās arhitektūras pārstrukturēšanos un nevienmērīgu hromatīna kondensāciju steroīdu iedarbības apstākļos. Šādas izmaiņas literatūrā aprakstītas kā agrīni un jutīgi šūnu stresa/bojājuma marķieri hepatocītos, īpaši izmantojot DAPI balstītu kodolu morfoloģijas kvantitatīvu analīzi (Kreutz et al., 2017; Guixé-Muntet et al., 2020). Guixé-Muntet et al. (2020) parādīja, ka kodolu morfoloģijas izmaiņas un signāla nevienmērīgums hronisku aknu slimību kontekstā ir saistīti ar hepatocītu pastāvīgu šūnu stresu un funkcionālu disbalansu, savukārt Kreutz et al. (2017) uzsvēra, ka kodolu intensitātes un morfoloģijas kvantitatīva analīze var kalpot par agrīnu bojājuma indikatoru aknu modeļos.

Īpaši būtiski ir uzsvērt, ka mūsu pētījumā kodolu morfoloģiskās izmaiņas, un jo īpaši kodolu palielināšanās (*Feret* diametra pieaugums), vislabāk atbilst steroīdu inducētai hepatocītu adaptīvai/metaboliskai reakcijai. Kodolu izmēra palielināšanās ir raksturīga glikokortikoīdu iedarbības izpausme aknās un var būt saistīta ar metaboliskās slodzes pieaugumu un nukleārās arhitektūras pārkārtošanos, kā arī ar tiešo kortikosteroīdu farmakodinamiku. Šī dinamika mūsu datus bija redzama gan MQ, gan P grupās, un mitokvinola mezilāta lietošana kodolu palielināšanās tendenci praktiski neietekmēja. Tas norāda, ka antioksidants, visticamāk, neietekmē primāro steroīdu inducēto kodolu hipertrofiju.

Savukārt TOMM20 signāla izmaiņas atspoguļo izmaiņas hepatocītu mitohondriju morfometriskajos parametros un mitohondriju ārējās membrānas proteīnu telpiskajā organizācijā. Šādas pārmaiņas ir raksturīgas oksidatīvā stresa apstākļiem. Šo procesu modulēšanā dzīvnieku modeļos iepriekš pētīts arī mitohondriju mērķētais antioksidants mitokvinola mezilāts: aknu bojājuma un fibrozes modeļos MitoQ lietošana ir saistīta ar oksidatīvā stresa mazināšanos un fibrozes progresēšanas kavēšanu (Rehman et al., 2016; Shan et al., 2022). Tas konceptuāli saskan ar mūsu novērojumiem, ka MQ1 grupā TOMM20 signāls saglabājās vienmērīgāks nekā P1 grupā.

Vienlaikus jāuzsver, ka kopējais efekts starp grupām nebija izteikti liels: atšķirības bija redzamākas pirmajā aktīvajā periodā, un izteiktākās pārmaiņas konsekventi tika konstatētas tieši P1 grupā, t. i., dzīvniekiem, kuri pirms MPA ievadīšanas nebija saņēmuši hepatoprotektīvu/antioksidatīvu atbalstu. Tas ļauj secināt, ka antioksidatīvā aizsardzība var mazināt akūta šūnu stresa izpausmes (īpaši mitohondriju tīkla struktūras līmenī), tomēr pilnībā

neizslēdz steroīdu inducēto pārstrukturēšanos un atkārtotas MPA ievadīšanas gadījumā grupu profili mēdz izlīdzināties.

Otrajā periodā grupu profili kļuva līdzīgāki, un atšķirību izlīdzināšanās varētu būt saistīta ar atkārtotas steroīdu iedarbības kumulatīvo efektu. Tas ir saskaņā ar novērojumu, ka otrā perioda sākumā ultrastrukturālie rādītāji jau bija augstāki nekā pirmajā periodā, kas norāda uz nepilnīgu strukturālo atjaunošanos starp periodiem. Tādējādi mūsu dati kopumā atbalsta modeli, kurā MPA izraisa stabilas nukleārās arhitektūras pārmaiņas (tostarp kodolu palielināšanos), kuras mitokvinola mezilāts būtiski neietekmē, kamēr mitohondriju tīkla dezorganizācijas un TOMM20 signāla heterogenitātes izteiktība pirmajā ekspozīcijā var būt mērenāka dzīvniekiem, kuri saņēma mitohondriju mērķētu antioksidantu.

Īpašu uzmanību pelna novērojums, ka dzīvniekiem, kuri vismaz vienā pētījuma periodā bija saņēmuši mitokvinola mezilātu (MQ1 grupa), otrajā periodā konstatētās izmaiņas bija mazāk izteiktas (P2 grupa) un vairākos parametros līdzīgas MQ2 grupai. Šis novērojums liecina par **atlikušās iedarbības efektu**, kas kļuva redzams tieši krusteniskā pētījuma dizaina rezultātā. Atšķirībā no paralēla dizaina, krusteniskais modelis ļauj novērtēt ne tikai akūtu terapijas iedarbību, bet arī potenciālu atlikušās iedarbības efektu nākamajā periodā.

MQ1 dzīvniekiem, kuri pirmajā periodā saņēma mitokvinola mezilātu, otrajā periodā – pat bez aktīvas antioksidanta lietošanas – morfoloģiskie un ultrastrukturālie rādītāji saglabājās relatīvi stabilāki nekā P1 grupā. Savukārt P1 grupas dzīvniekiem, kuri sākotnēji nebija saņēmuši hepatoprotektīvu atbalstu, pirmajā periodā tika novērotas izteiktākās pārmaiņas, un šīs izmaiņas lielākoties bija smagākas nekā jebkurā citā grupā.

Tas secināt, ka mitokvinola mezilāts, iedarbojoties uz mitohondriju membrānas potenciālu, var ne tikai mazināt akūtu oksidatīvo stresu, bet arī stabilizēt šūnu homeostāzi ilgākā laika periodā. Šāda stabilizācija var samazināt sekojošās steroīdu ekspozīcijas radīto strukturālo dezorganizāciju.

Būtiski uzsvērt, ka atlikušās iedarbības efekts nebija absolūts – tas neizslēdza steroīdu inducētas izmaiņas, taču to intensitāte bija mazāka un dinamika labvēlīgāka nekā dzīvniekiem bez iepriekšējās antioksidatīvas aizsardzības.

Tādējādi krusteniskais pētījuma dizains šajā darbā ne tikai palielināja statistisko jaudu, bet arī ļāva identificēt bioloģiski nozīmīgu atlikušās iedarbības fenomenu, kas citādi paralēlā dizainā varētu palikt nepamanīts. Šis aspekts papildina izpratni par mitokvinola mezilāta iespējamo lomu ne vien kā akūtu aizsarglīdzekli, bet arī kā modulatoru, kas var ietekmēt aknu adaptīvo atbildi uz atkārtotu steroīdu slodzi.

Noslēgumā jāatzīmē, ka šis pētījums sniedz vairākus oriģinālus un praktiski nozīmīgus datus steroīdās hepatopātijas izpētes jomā. Pirmkārt, tas ir pirmais pētījums, kurā salīdzināta ilgstošas darbības kortikosteroīda metilprednizolona acetāta ietekme uz aknu darbību klīniski veselīem un slimīem suņiem, izmantojot gan bioķīmiskos, gan histoloģiskos rādītājus. Rezultāti skaidri parāda būtiskas atšķirības starp šīm dzīvnieku grupām: klīniski veselīem dzīvniekiem fermentu koncentrācijas (ALAT, GGT, AP un kAP) palielinājās robežās, kas nepārsniedza fizioloģisko normu, savukārt dzīvniekiem ar iepriekš diagnosticētām patoloģijām šie paši rādītāji pieauga ievērojami straujāk un pārsniedza normu, liecinot par hepatocītu funkcionālo slodzi un iespējamu adaptīvo kompensācijas mehānismu izsīkumu.

Ne mazāk nozīmīgs šī darba pienesums ir antioksidantu un hepatoprotektantu lietošanas izvērtējums un pamatojums kortikosteroīdu izraisītu aknu izmaiņu profilaksē un mazināšanā. Rezultāti apliecina, ka hepatoprotektantu, it īpaši uz augu bāzes preparātu *GlutaMax* un antioksidanta mitokvinola mezilāta, lietošana spēj mazināt kortikosteroīdu izraisītās bioķīmiskās un histoloģiskās izmaiņas, kaut arī ne pilnībā novērst tās īsā laika periodā. Šie novērojumi saskan ar citu autoru secinājumiem par mitohondriju oksidatīvā stresa nozīmi un antioksidantu potenciālu hepatocītu aizsardzībā (Rehman et al., 2016; Murphy, 2016; Fields et al., 2023; Tao et al., 2024; Sun et al., 2025). Šī darba rezultāti ir nozīmīgs ieguldījums mazo

dzīvnieku praktiskajā veterinārmedicīnā, jo tie ļauj labāk izprast ilgstošas darbības kortikosteroīdu farmakodinamiku, ietekmi uz aknu struktūru un funkciju, kā arī hepatoprotektantu lomu šo izmaiņu mazināšanā. Iegūtie dati var kalpot par pamatu racionālākas kortikosteroīdu terapijas plānošanai, īpaši gadījumos, kad paredzēta ilgstoša vai atkārtota šo preparātu lietošana. Tas padara kortikosteroīdu lietošanu drošāku dzīvniekiem, palīdz samazināt zāļu blakusparādību klīnisko izpausmju biežumu un uzlabo pacientu dzīves kvalitāti, kas ir viens no galvenajiem mērķiem veterinārārsta klīniskajā praksē.

Turpmākajos pētījumos būtu lietderīgi izvērtēt ilgstošas hepatoprotektantu un antioksidantu lietošanas ietekmi uz kortikosteroīdu izraisīto aknu izmaiņu reversiju, kā arī analizēt dažādu preparātu kombināciju efektivitāti aknu funkcionālo rezervju atjaunošanā. Papildus nepieciešami ilgtermiņa novērojumi, kas ļautu noteikt precīzu kortikosteroīdu izraisīto morfoloģisko pārmaiņu atgriezeniskuma laika dinamiku un to klīnisko nozīmi.

Pētījuma rezultātu interpretāciju ietekmē ierobežots aknu biopsiju skaits un fiksēti paraugu ņemšanas laika punkti, kas var neaptvert maksimālo morfoloģisko pārmaiņu pīķi vai pilnīgas reversijas brīdi. Klīniskā grupa bija heterogēna (atšķirīgas pamatslimības un individuāla jutība pret kortikosteroīdiem), turklāt daļai dzīvnieku vienlaikus lietotie medikamenti varēja darboties kā blakusfaktori, ietekmējot aknu enzīmu dinamiku. Darbā tika pārbaudīts tikai viens metilprednizolona acetāta dozēšanas režīms, kas ierobežo secinājumus par devas-atbildes attiecību un rezultātu vispārināmību uz citiem kortikosteroīdu protokoliem.

SECINĀJUMI

1. Ilgstošas darbības metilprednizolona acetāta (MPA) lietošana devā 2 mg kg⁻¹ suņiem izraisīja aknu enzīmu, īpaši sārmainās fosfatāzes (AP) un kortikosteroīdu inducētās sārmainās fosfatāzes (kAP) aktivitātes pieaugumu, kas norāda uz aknu funkcionālā stāvokļa izmaiņām. Enzīmu aktivitātes pieaugums bija būtisks 7. un 14. dienā pēc MPA ievadīšanas un saglabājās paaugstināts līdz pat pētījuma beigām. Steroīdai hepatopātijai raksturīgās histoloģiskās pārmaiņas – pietūkumu, citoplazmas vakuolizāciju, glikogēna akumulāciju u.c. hepatocītos novērojām jau pēc vienreizējas MPA ievadīšanas. Lai gan 56 dienu laikā šīs izmaiņas daļēji regresēja, pilnīga aknu audu morfoloģiskā atjaunošanās netika novērota.
2. Hepatoprotektīvā terapija pēc MPA ievadīšanas veicināja ātrāku aknu funkcionālo rādītāju reversiju suņiem, tomēr pilnīgu enzīmu aktivitātes paaugstinājumu nenovērsa. Klīniskajā pētījumā lietotais hepatoprotektīvais preparāts, kura sastāvā bija iekļauti galvenokārt mārdadža (*Silybum marianum*), kurkumas (*Curcuma longa*), artišoka (*Cynara scolymus*) ekstrakti, mazināja MPA izraisītu aknu enzīmu aktivitātes pieaugumu, īpaši GGT un AP. Eksperimentālajā pētījumā lietotais mitokvinola mezilāts arī mazināja aknu enzīmu aktivitāti, īpaši AP un kAP.
3. Antioksidanta mitokvinola mezilāta lietošana steroīdās hepatopātijas gadījumos suņiem neuzrādīja statistiski nozīmīgu ietekmi uz aknu audu patoloģisko izmaiņu reversijas procesu, jo hepatocītu morfoloģisko pārmaiņu smaguma pakāpe un glikogēna akumulācija kopumā bija līdzīga mitokvinola mezilāta un placebo grupās. Atsevišķos novērošanas laika punktos suņiem, kuri saņēma mitokvinola mezilātu, tika konstatētas mazāk izteiktas hepatocītu strukturālās izmaiņas. Kopumā abās grupās aknu audu pārmaiņu regresija bija tikai daļēja, un pilnīga morfoloģiskā atjaunošanās netika panākta.
4. Hepatocītu ultrastrukturālā analīze pēc MPA iedarbības atklāja izmaiņas šūnu kodolu morfoloģijā, kas izpaudās kā palielināts kodolu variācijas koeficients un *Feret* diametrs, kā arī nevienmērīgāks DAPI fluorescences signāls, kas norāda uz kodolu morfoloģiskās heterogenitātes pieaugumu. Mitokvinola mezilāta lietošana būtiski neietekmēja kodolu morfoloģiskos parametrus. Savukārt hepatocītu mitohondriju morfoloģijā tika konstatēts mitohondriju apaļīguma koeficienta pieaugums, iegarena koeficienta samazināšanās un TOMM20 fluorescences signāla izmaiņas. Mitokvinola mezilāta lietošana bija saistīta ar mazāk izteiktām mitohondriju strukturālajām pārmaiņām, kas liecina par tā aizsargājošu ietekmi uz hepatocītu mitohondriju ultrastruktūru.
5. Izmantotais krusteniskā pētījuma dizains atklāja antioksidanta mitokvinola mezilāta atlikušās iedarbības efektu, kas izpaudās kā hepatocītu funkciju un struktūru stabilizācija arī pēc antioksidanta lietošanas pārtraukšanas. Otrajā perioda placebo grupā (dzīvnieki, kuri pirmajā periodā saņēma mitokvinola mezilātu) mitohondriju morfometrijas rādītāji saglabājās līdzīgi vai atsevišķos novērošanas punktos pat labāki nekā MQ2 grupā (dzīvnieki, kuri mitokvinola mezilātu saņēma otrajā periodā). Histoloģiski hepatocītu pārmaiņu smaguma pakāpe kopumā bija zemāka P2 grupā nekā MQ2 grupā.

PRIEKŠLIKUMI

1. Pirms ilgstošas darbības kortikosteroīda ievadīšanas ieteicams izvērtēt pacienta aknu funkcionālo stāvokli un riska faktorus (iepriekšēji aknu bojājumi, hroniska medikamentu lietošana u. c.), kā arī ieplānot pēckontroles vizītes ar laboratorisku uzraudzību.
2. Terapijas laikā ieteicams regulāri kontrolēt aknu enzīmus (ALAT, AP, GGT, pēc iespējas kAP) un izvērtēt to dinamiku; pacientiem ar riska faktoriem ieteicams uzsākt hepatoprotektīvu atbalstu jau vienlaikus ar kortikosteroīdu terapiju un turpināt līdz rādītāju stabilai normalizācijai.
3. Mitokvinola mezilāts ir perspektīvs mitohondriju mērķēts antioksidants ar potenciālu hepatoprotektīvu iedarbību suņu hepatoloģijā. Tomēr, lai pamatotu tā klīnisku pielietošanu, nepieciešami plašāki un metodoloģiski stingri pētījumi.
4. Veterinārajā praksē ieteicams dot priekšroku kortikosteroīdu terapijas shēmām ar labāku titrējamību – īslaicīgas darbības preparātiem, vai vismaz ievērot pietiekamu intervālu starp atkārtotām ilgstošas darbības kortikosteroīdu injekcijām.

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Abdou O. A., Kelany W. M., Torad F. A., Yehia G. S. (2013) Ultrasonographic, Morphologic and Biochemical Alterations in Experimentally Induced Steroid Hepatopathy in Dog. *Global Veterinaria* 11(2):123-130.
2. Abenavoli, L., Izzo, A. A., Milic, N., Cicala, C., Santini, A., & Capasso, R. (2018). Milk thistle (*Silybum marianum*): A comprehensive review on its pharmacological, biochemical and therapeutic properties. *Phytotherapy Research*, 32(11), 2202–2213.
3. Aberberga-Augškalne, L., & Koroļova, O. (2007). *Fizioloģija ārstiem* (lpp. 262–298). Rīga: Medicīnas apgāds.
4. Abraham G, Gottschalk J, Ungemach RF (2005) Evidence for Ototopical Glucocorticoid-Induced Decrease in Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Response and Liver Function. *Endocrinology* 146(7):3163–3171.
5. Acosta M. J., Vazquez Fonseca L., Desbats M. A., Cerqua C., Zordan R., Trevisson E., Salviati L. (2016) Coenzyme Q biosynthesis in health and disease. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1857(8):1079-1085.
6. Albeltagy, R. S. (2023). Antioxidant capacity of N-acetylcysteine against cadmium-induced hepatic tissue cytotoxicity and gene expression of apoptosis in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 30, 23823
7. Albillos, A., de Gottardi, A., & Rescigno, M. (2020). The gut-liver axis in liver disease. *Gut*, 69(7), 1355–1364.
8. Allameh, A., Niayesh-Mehr, R., Aliarab, A., Sebastiani, G., & Pantopoulos, K. (2023). Oxidative stress in liver pathophysiology and disease. *Antioxidants*, 12(9), 1653.
9. Alves, J. C., Santos, A., Jorge, P., Lavrador, C., Carreira, L. M. (2021). The intra-articular administration of triamcinolone hexacetonide in the treatment of osteoarthritis: Its effects in a naturally occurring canine osteoarthritis model. *PLoS ONE*, 16(1), e0245553.
10. Anstee, Q. M., & Day, C. P. (2012). S-adenosylmethionine (SAdMe) and the one-carbon cycle in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 55(2), 653–656.
11. Assawarachan, S. N., Chuchalernporn, P., Maneesaay, P., & Thengchaisri, N. (2021). Changes in serum lipid profiles among canine patients suffering from chronic hepatitis. *Veterinary Sciences*, 8(10), 221.
12. Assawarachan, S. N., Maneesaay, P., & Thengchaisri, N. (2020). A descriptive study of the histopathologic and biochemical liver test abnormalities in dogs with liver disease in Thailand. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 84(3), 217–224.
13. Assawarachan, S. N., Ongvisespaibool, T., Hakhen, B., Chuchalernporn, P., Maneesaay, P., & Thengchaisri, N. (2023). Predictive factors for two-year survival in dogs with hepatobiliary diseases: Importance of clinical and laboratory monitoring. *Animals*, 13(16), 2677.
14. Baden, K. E. R., McClain, H., Craig, E., Gibson, N., Draime, J. A., & Chen, A. M. H. (2024). S-adenosylmethionine (SAdMe) for liver health: A systematic review. *Nutrients*, 16(21), 3668.
15. Badylak S.F., Van Vleet J.R. (1981) Sequential morphologic and clinicopathologic alterations in dogs with experimentally induced glucocorticoid hepatopathy. *American Journal of Veterinary Research*, 42:1310-1318.
16. Banerjee, P., Gaddam, N., Chandler, V., & Chakraborty, S. (2023). Oxidative stress–induced liver damage and remodeling of the liver vasculature. *The American Journal of Pathology*, 193(10), 1400–1414.
17. Barchilon, M., Reiner, C. R. (2023). Breathe easy: Inhalational therapy for feline inflammatory airway disease. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 25(9), 1098612X231193054.
18. Bartlett, A. A., Lapp, H. E., & Hunter, R. G. (2019). Epigenetic mechanisms of the glucocorticoid receptor. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 30(11), 807–818.

19. Behrend E. N., Kemppainen R. J. (1997) Glucocorticoid therapy. Pharmacology, indications, and complications. *Veterinary clinics of North America. Small Animal Practice*, 27(2):187-213.
20. Bellanti, F., Mirizzi, A., Montezano, A. C., et al. (2023). Redox biology and liver fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(1), 410.
21. Ben Salem, M., Ben Abdallah Kolsi, R., Dhouibi, R., Ksouda, K., Charfi, S., Yaich, M., Hammami, S., Sahnoun, Z., Zeghal, K. M., Jamoussi, K., & Affes, H. (2017). Protective effects of *Cynara scolymus* leaves extract on metabolic disorders and oxidative stress in alloxan-diabetic rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 328
22. Berlin, D., Jaffey, J. A., Bolch, C., Zhou, T., Rayhel, L. H., & Hanzlicek, A. S. (2024). Serial evaluation of liver enzyme activities in dogs with pulmonary coccidioidomycosis administered per os fluconazole. *Frontiers in Veterinary Science*, 11, 1402572.
23. Bexfield N, Watson P (2009) Treatment of canine liver disease. *In practice* 31:130-135.
24. Bhatti, J. S., Bhatti, G. K., & Reddy, P. H. (2017). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders: A step towards mitochondria-based therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease*, 1863(5), 1066–1077
25. Bijak, M. (2017). Silybin, a major bioactive component of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaernt.) – Chemistry, bioavailability, and metabolism. *Molecules*, 22(11), 1942.
26. Blanca, P.-M., Fermin-Rodriguez, M. L., Miró, G., & Cruz-Lopez, F. (2024). Oxidative stress in canine diseases: A comprehensive review. *Antioxidants*, 13(11), 1396.
27. Boretti, F. S., Harburger, L., Riond, B., Neubert, E., Hofmann-Lehmann, R., Unterer, S., Dennler, M., & Sieber-Ruckstuhl, N. S. (2025). Effects of long-term high-dose prednisolone in Beagle dogs on structural and functional responses of the HPA axis. *BMC Veterinary Research*, 21, 480.
28. Borgne-Sanchez, A., & Fromenty, B. (2025). Mitochondrial dysfunction in drug-induced hepatic steatosis: Recent findings and current concept. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 49(3), 102529.
29. Brilhante-Simões, P., Lopes, R., Delgado, L., Machado, A., Silva, A., Martins, Â., Marcos, R., Queiroga, F., & Prada, J. (2025). What comes from cytology diagnosis: A comprehensive epidemiological retrospective analysis of 3068 feline cases. *Veterinary Sciences*, 12(7), 671.
30. Brūveris, Z. (2007). *Mājdzīvnieku anatomija* (pp. 364–367). Rīga: Medicīnas apgāds.
31. Brūveris, Z. (2015). *Veterinārās histoloģijas pamati* (pp. 289–295). Rīga: Medicīnas apgāds.
32. Burti, S., Zotti, A., Rubini, G., Orlandi, R., Bargellini, P., Bonsembiante, F., & Banzato, T. (2020). Contrast-enhanced ultrasound features of malignant focal liver masses in dogs. *Scientific Reports*, 10(1), 6076.
33. Butler, T., & Bexfield, N. (2024). Update on the diagnosis of canine liver disease. *In Practice*, 46(9), 460–472.
34. Buttgereit F., Burmester G.-R., Lipworth B.J. (2005) Optimised glucocorticoid therapy: the sharpening of an old spear. *Lancet*, 365:801-803.
35. Cain, D. W., Cidlowski, J. A. (2017). Immune regulation by glucocorticoids. *Nature Reviews Immunology*, 17(4), 233–247.
36. Cao, S., Wang, X., Li, Y., Zhang, Y., & Chen, H. (2024). Effects of saponins on lipid metabolism: The gut–liver axis. *Nutrients*, 16(4), 815.
37. Catley M. C. (2007) Dissociated Steroids. *The Scientific World Journal*, 7:421–430.
38. Cavašin, J. P. (2025) Hepatic histopathology: What a clinician should know. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 55(4S), e1–e11.
39. Center, S. A., Warner, K. L., McCabe, J., Foureman, P., Hoffmann, W. E., & Erb, H. N. (2005). Evaluation of the influence of S-adenosylmethionine on systemic and hepatic effects of prednisolone in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 66(2), 330–341.
40. Cha, J., Kim, J., Ko, J., Kim, J., & Eom, K. (2022). Effects of confounding factors on liver stiffness in two-dimensional shear wave elastography in Beagle dogs. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 827599.

41. Chan A. W. H., Quaglia A., Haugk B., Burt A. (2014) Atlas of Liver Pathology. *Springer Science + Business Media*, New York, pp12-48.
42. Chan, J. C., Johnson, L. R. (2023). Prospective evaluation of the efficacy of inhaled steroids administered via the AeroDawg spacing chamber in management of dogs with chronic cough. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 37(2), 660–669.
43. Chang, T., Cheng, W., Chen, W., Chu, W., & Pan, C. (2022). Optimal dietary intake composition of choline and betaine in relation to fatty liver development in high-fat-diet-induced obese mice. *Nutrients*, 14(2), 261.
44. Chen, G. (2023). Vitamin A: too good to be bad? *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1186336
45. Chen, H., Liu, Y., Deng, X., Lin, Y., Liu, H., Zhu, S., Kastelic, J. P., Zhou, X., & Han, B. (2025). Canine Cushing syndrome elevates oxidative stress that is attenuated by trilostane. *American Journal of Veterinary Research*.
46. Cichoż-Lach, H., & Michalak, A. (2014). Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 20(25), 8082–8091.
47. Clarisse, D., Van Moortel, L., Van Leene, C., Gevaert, K., & De Bosscher, K. (2024). Glucocorticoid receptor signaling: intricacies and therapeutic opportunities. *Trends in Biochemical Sciences*, 49(5), 431–444.
48. Clayton, S. A., Jones, S. W., Kurowska-Stolarska, M., & Clark, A. R. (2018). The role of microRNAs in glucocorticoid action. *Journal of Biological Chemistry*, 293(6), 1865–1874.
49. Cogliati, B., Yashaswini, C. N., Wang, S., Sia, D., & Friedman, S. L. (2023). Friend or foe? The elusive role of hepatic stellate cells in liver cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 20(10), 647–661.
50. Cohen M. (2008) Traditional Chinese Medicine and Hepatitis C. Chinese Medicine, chapter II. *Hepatitis C Choices 4th Edition*, Caring Ambassadors Program, USA, Oregon.
51. Cohn L. A. (1991) The influence of Corticosteroids on host defense mechanisms. *Journal of veterinary internal medicine*, 5:94-104.
52. Colak, E., Ustuner, M. C., Tekin, N., Colak, E., Burukoglu, D., Degirmenci, I., & Gunes, H. V. (2016). The hepatocurative effects of *Cynara scolymus* L. leaf extract on carbon tetrachloride-induced oxidative stress and hepatic injury in rats. *SpringerPlus*, 5, 216.
53. Corbin, K. D., & Zeisel, S. H. (2012). Choline metabolism provides novel insights into non-alcoholic fatty liver disease and its progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1822(8), 985–993.
54. Courtman, N., & Quilez, E. (2025). Cytologic evaluation of the liver. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 55(4), 539–558.
55. Cunningham, R. P., & Porat-Shliom, N. (2021). *Liver zonation – Revisiting old questions with new technologies*. *Frontiers in Physiology*, 12, 732929.
56. Dālmane, A. (2004). *Histoloģija* (pp. 240–246). Rīga: LU Akadēmiskais apgāds.
57. Davé, S., Weir, J., & McCulloch, E. (2022). Microvascular anatomy of the canine liver. *Journal of Veterinary Anatomy*, 15(2), 55–67.
58. DeLeve, L. D. (2015). Liver sinusoidal endothelial cells and liver regeneration. *Journal of Clinical Investigation*, 125(5), 1861–1866.
59. Demirel-Yalciner, T., Cirik, K., Al, S., & Yilmaz, A. (2021). Alpha-tocopherol supplementation reduces inflammation and inhibits apoptosis and fibrosis development in high cholesterol diet-induced liver injury in rats. *BioFactors*, 47(5), 660-672.
60. Deng, Y., Dong, Y., Zhang, S., & Feng, Y. (2024). Targeting mitochondrial homeostasis in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: A review. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1463187.
61. Deniz, A., Spiecker-Hauser, U., & Rehagen, M. (2009). Efficacy of a butafosfan and vitamin B12 combination (Catosal) on biochemical and hematological blood parameters in dogs treated with dexamethasone. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 7(3), 116–129.

62. Detmer, S. A., & Chan, D. C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8, 870–879.
63. Dillon A.R., Spano J.S., Powers R.D. (1980) Prednisolone induced haematological, biochemical and histological changes in the dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 16:831-837.
64. Dou, S. D., Zhang, J. N., Xie, X. L., Liu, T., Hu, J. L., Jiang, X. Y., Wang, M. M., & Jiang, H. D. (2021). MitoQ inhibits hepatic stellate cell activation and liver fibrosis by enhancing PINK1/parkin-mediated mitophagy. *Open Medicine*, 16(1), 1718–1727.
65. Du, K., Ramachandran, A., Weemhoff, J. L., Woolbright, B. L., Jaeschke, A. H., Chao, X., Ding, W.-X., & Jaeschke, H. (2018). Mito-Tempo protects against acute liver injury but induces limited secondary apoptosis during the late phase of acetaminophen hepatotoxicity. *Archives of Toxicology*, 93(1), 163–178.
66. Dyce, K. M., Sack, W. O., Wensing, C. J. G. (2017). *Textbook of veterinary anatomy* (5th ed.). Elsevier.
67. Eckersall P. D., Nash A. S. (1983) Isoenzymes of canine plasma alkaline phosphatase: an investigation using isoelectric focusing and related to diagnosis. *Res Vet Sci*, 34:310–314.
68. Elhosiny, N., Mahmoud, A. R. M., Selim, H. M., & Gouda, H. (2024). Assessment the efficacy of some herbs in the prevention of steroid induced hepatopathy in dog. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 14(3), 521-525.
69. Elkholly, D. A., Brodbelt, D. C., Church, D. B., Pelligand, L., Mwacalimba, K., Wright, A. K., & O'Neill, D. G. (2020). Side effects to systemic glucocorticoid therapy in dogs under primary veterinary care in the UK. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 515.
70. Ernster L., Dallner G. (1995) Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1271:195-204.
71. Federico, A., Dallio, M., & Loguercio, C. (2017). Silymarin/Silybin and chronic liver disease: A marriage of many years. *Molecules*, 22(2), 191.
72. Feldman, E. C., & Nelson, R. W. (2014). *Canine and feline endocrinology and reproduction* (4rd ed.). Saunders.
73. Fernández-Ramos, D., Lopitz-Otsoa, F., Varela-Rey, M., & Martínez-Chantar, M. L. (2022). SAME and methylation in liver disease: Molecular mechanisms and clinical perspectives. *Journal of Hepatology*, 76(1), 110–123.
74. Fields M., et al. (2023). *Mitochondria-Targeted Antioxidants, an Innovative Class of Antioxidant Drugs*. International Journal of Molecular Sciences, 24(4):3739.
75. Fink B. D., O'Malley Y., Dake B. L., Ross N. C., Prisinzano T. E., Sivitz W. I. (2009) Mitochondrial Targeted Coenzyme Q, Superoxide, and Fuel Selectivity in Endothelial Cells. *PLOS ONE*, 4(1): e4250.
76. Fink, B. D., Yu, L., Coppey, L., Obrosova, A., Shevalye, H., Kerns, R. J., Yorek, M. A., & Sivitz, W. I. (2021). Effect of mitoquinone on liver metabolism and steatosis in obese and diabetic rats. *Pharmacology Research & Perspectives*, 9(1), e00701.
77. Fleming, K. L., Howells, E. J., Villiers, E. J., & Maddox, T. W. (2019). A randomised controlled comparison of aspiration and non-aspiration fine-needle techniques for obtaining ultrasound-guided cytological samples from canine livers. *The Veterinary Journal*, 252, 105372.
78. Frączek, J., Sowa, A., Agopsowicz, P., Migacz, M., Dylńska-Kala, K., & Holecki, M. (2025). Non-invasive tests as a replacement for liver biopsy in the assessment of MASLD. *Medicina*, 61(4), 736.
79. Frank, A. K., Chung, B. K., Larraz Lopez De Novales, M., Engesæter, L. K., Hoyle, H. W., Øgaard, J., Heslop, J., Karlsen, T. H., Tysoe, O., Brevini, T., Tchorz, J. S., Vallier, L., Mohorianu, I., Sampaziotis, F., Melum, E. (2024). Single-cell transcriptomic profiling of cholangiocyte organoids derived from bile ducts of primary sclerosing cholangitis patients. *Digestive Diseases and Sciences*, 69(10), 3810–3823.

80. Frei B. (1994) Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *American Journal of Medicine*, 97(3A):5S-13S.
81. Friedman, S. L. (2008). Hepatic stellate cells: Protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological Reviews*, 88(1), 125–172.
82. Friedman, S. L. (2010). Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 7(8), 425–436.
83. Fromenty, B., & Roden, M. (2023). Mitochondrial alterations in fatty liver diseases. *Journal of Hepatology*, 78(2), 415–429.
84. Fu, Y., & Chung, F.-L. (2018). Oxidative stress and hepatocarcinogenesis. *Hepatoma Research*, 4, 39.
85. Fuchs, C. D., Simbrunner, B., Baumgartner, M., Campbell, C., Reiberger, T., Trauner, M. (2025). Bile acid metabolism and signalling in liver disease. *Journal of Hepatology*, 82(1), 134–153.
86. Furusato, S., Kondo, E., Mitsui, I., & Tsuyama, Y. (2025). A case of canine hepatitis with hepatocellular attack by non-neoplastic perforin-laden lymphocytes. *Veterinary Sciences*, 12(3), 211.
87. Gandini, M., Giunti, M., & D'Annunzio, M. (2021). Radiographic evaluation of the liver in dogs and cats: Current recommendations. *Journal of Small Animal Practice*, 62(7), 542–550.
88. Gaskill C. L., Miller L. M., Mattoon J. S., , Hoffmann W. E., Burton S. A., Gelens H. C. J., Ihle S. L., Miller J. B., Shaw D. H., Cribb A. E. (2005) Liver Histopathology and Liver and Serum Alanine Aminotransferase and Alkaline Phosphatase Activities in Epileptic Dogs Receiving Phenobarbital. *Veterinary Pathology*, 42(2):147-160.
89. Gerami, H., Aghayan, M., Davari, M., Roozbeh, M., & Karimi, F. (2025). Effects of nano-curcumin supplementation on liver enzymes and fibrosis indices: A randomized clinical trial. *Scientific Reports*, 15, 21862.
90. Ghanem, C. I., Manautou, J. E. (2022). Role and regulation of hepatobiliary ATP-binding cassette transporters during chemical-induced liver injury. *Drug Metabolism and Disposition*, 50(10), 1376–1388.
91. Giannetto, C., Arfuso, F., Giudice, E., Rizzo, M., Piccione, G., Mhalhel, K., & Levanti, M. (2022). Antioxidant and hepatoprotective effect of a nutritional supplement with silymarin phytosome, choline chloride, l-cystine, artichoke, and vitamin E in dogs. *Antioxidants*, 11, 2339.
92. Glaze M. B., Crawford M. A., Nachreiner R. F., Casey H. W., Nafe L. A., Kearney M. T. (1988). Ophthalmic corticosteroid therapy: systemic effects in the dog. *J Am Vet Med Assoc*, 192:73–75.
93. Glyn J. (1998). The discovery and early use of cortisone. *Journal of the royal society of medicine*, 91:513-517.
94. Grizzle, J. E. (1965). The two-period change-over design and its use in clinical trials. *Biometrics*, 21, 467–480
95. Guicciardi M. E., Gores G. J. (2010). Apoptosis as a Mechanism for Liver Disease Progression. *Seminars in Liver Disease*, 30(4), 402–410.
96. Guilliams, M., Scott, C. L. (2022). Liver macrophages in health and disease. *Immunity*, 55(9), 1515–1529.
97. Guo, T., Chang, L., Xiao, Y., & Liu, Q. (2015). S-adenosyl-L-methionine for the treatment of chronic liver disease: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 10(9), e013754.
98. Habermaass, V., Bartoli, F., Gori, E., Dini, R., Cogozzo, A., Puccinelli, C., Pierini, A., & Marchetti, V. (2024). Fecal bile acids in canine chronic liver disease: Results from 46 dogs. *Animals*, 14(21), 3051.
99. Habermaass, V., Takami, Y., Izawa, T., Abramo, F., Biolatti, C., & Marchetti, V. (2025). Lipid dysmetabolism in canine chronic liver disease: Relationship between clinical, histological and immunohistochemical features. *Veterinary Sciences*, 12(3), 220.

100. Harwig, M. C., Viana, M. P., Egner, J. M., Harwig, J. J., Widlansky, M. E., Rafelski, S. M., & Hill, R. B. (2018). Methods for imaging mammalian mitochondrial morphology. *Methods in Cell Biology*, 155, 127–152.
101. He, Z., Li, X., Yang, H., Wu, P., Wang, S., Cao, D., Guo, X., Xu, Z., Gao, J. & Zhang, W. (2021). Effects of Oral Vitamin C Supplementation on Liver Health and Associated Parameters in Patients With Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Frontiers in Nutrition*, 8, 745609.
102. Hensel, P., Santoro, D., Favrot, C., Hill, P., Griffin, C. (2015). Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and treatment. *Veterinary Dermatology*, 26(1), 1–9.
103. Hewlings, S. J., & Kalman, D. S. (2017). Curcumin: A review of its effects on human health. *Foods*, 6(10), 92.
104. Hidalgo-Gutiérrez, A., Pineda-Urbina, L., & Navas, P. (2021). Metabolic targets of coenzyme Q10 in mitochondria. *Free Radical Biology & Medicine*, 168, 143-149.
105. Huang, B.-H., Wu, Y.-L., Chen, J.-F., Lin, S.-C., & Kao, C.-W. (2024). The hepatoprotective effects of curcumin in experimental liver fibrosis: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1396834.
106. Huang, J., Bai, Y., Xie, W., Wang, R., Qiu, W., Zhou, S., Tang, Z., Liao, J., & Su, R. (2023). Lycium barbarum polysaccharides ameliorate canine acute liver injury by reducing oxidative stress, protecting mitochondrial function, and regulating metabolic pathways. *Journal of Zhejiang University Science B*, 24(2), 157–171.
107. Hurtado-Carneiro, V., Dongil, P., Pérez-García, A., Álvarez, E., & Sanz, C. (2021). Preventing oxidative stress in the liver: An opportunity for GLP-1 and/or PASK. *Antioxidants*, 10(12), 2028.
108. Ijzer J., Roskams T., Molenbeek R. F., Ultee T., Penning L. C., Rothuizen J., van den Ingh T. (2005) Morphological characterisation of portal myofibroblasts and hepatic stellate cells in the normal dog liver. *Comparative Hepatology*, 5:7-16.
109. Jablonski, S. A., Chen, Y. X. P., Williams, J. E., Kendzierski, J. A., & Smedley, R. C. (2024). Concurrent hepatopathy in dogs with gallbladder mucocele: Prevalence, predictors, and impact on long-term outcome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 38(1), 176–186.
110. Jaffey, J. A. (2022). Canine hepatobiliary anatomy, physiology and congenital disorders. *Journal of Small Animal Practice*, 63(2), 95–103.
111. Jemeljanovs, Ļ., Manevičs, Z., & Dūrītis, I. (2007). Dzīvnieku iekšējīgo slimību klīniskā diagnostika. Jelgava: LLU.
112. Jiang Q., Yin J., Chen J., Ma X., Wu M., Liu G., Yao K., Tan B., Yulong Y. (2020). *Mitochondria-Targeted Antioxidants: A Step towards Disease Treatment*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020:8837893.
113. Jomova, K., Aaseth, J., & Valko, M. (2023). Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and human disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 80, 588.
114. Kalogerakou, T., & Antoniadou, M. (2024). The role of dietary antioxidants, food supplements and functional foods for energy enhancement in healthcare professionals. *Antioxidants*, 13(12), 1508.
115. Karić, L., Janjić, F., Spariosu, K., Davitkov, D., Krstić, V., Kovačević Filipović, M., & Radaković, M. (2024). (Un)Tying the knot: Oxidative stress, inflammatory markers, and lipid status in dogs with hypercortisolism. *Animals*, 14(23), 3476.
116. Kelso G. F., Porteous C. M., Coulter C. V., Hughes G., Porteous W. K., Ledgerwood E. C., Smith R. A., Murphy M. P. (2001) Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties. *The Journal of Biological chemistry*, 276(7):4588-96.
117. Kemp, S. D., Panciera, D. L., Larson, M. M., Saunders, G. K., & Werre, S. R. (2013). A comparison of hepatic sonographic features and histopathologic diagnosis in 138 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27, 806–813.

118. Khalphallah, A., Mousa, S. A., Almuhan, A. H., Hassan, D., Al-Shuraym, L. A., Alkeridis, L. A., Abdel-lah, E. S., Shukry, M., Abdelhafez, E. A., & Elmeligy, E. (2025). ORNIPURAL® as conventional therapy versus mixture of *Curcuma longa* extract and pomegranate peel extract as homeotherapy in dogs with dexamethasone-induced hepatopathy: Clinicolaboratory, ultrasonographic, and histopathological monitoring. *Frontiers in Veterinary Science*, 12, 1564648.
119. Kim, H., Yonezawa, T., Maeda, S., Tamahara, S., & Matsuki, N. (2022). Increases in serum carbonylated protein levels of dogs with hypercortisolism. *Endocrine Journal*, 69(12), 1331–1338.
120. Klein, B. G. (2019). *Cunningham's textbook of veterinary physiology* (6th ed.). St. Louis, MO: Elsevier.
121. König, H. E., Liebich, H. G. (2020). *Veterinary anatomy of domestic mammals: Textbook and colour atlas* (7th ed.). Thieme.
122. Kostadinova, R., Ströbel, S., Chen, L., Fiaschetti-Egli, K., Gadiant, J., Pawlowska, A., Petitjean, L., Bieri, M., Thoma, E., & Petitjean, M. (2024). Digital pathology with artificial intelligence analysis provides insight to the efficacy of anti-fibrotic compounds in human 3D MASH model. *Scientific Reports*, 14, Article 5885.
123. Kusaba, A., Tago, E., Kusaba, H., & Kawasumi, K. (2024). Study of age-related changes in plasma metabolites and enzyme activity of healthy small dogs that underwent medical checkups. *Frontiers in Veterinary Science*, 11, 1437805.
124. Lawrence Y., Steiner J. (2015) Canine Chronic Hepatitis: Diagnosis & Treatment. *Today's veterinary practice* 4(2): 26-33.
125. Leal, K. M., Rocha, M. B., Varela, F. V., Rodrigues, L., Furtado, P. V., Costa, F. V. A., Pöpl, Á. G. (2022). Is methylprednisolone acetate-related insulin resistance preventable in cats? *Topics in Companion Animal Medicine*, 49, 100648.
126. Lee, J., Park, J., Lee, S.-J., & Hyun, C. (2025). *Evaluation of hepatoprotectants in the management of subclinical gallbladder mucocele in dogs*. *Animals*, 15(20), 3002.
127. LeFort, K. R., Rungratanawanich, W., & Song, B.-J. (2024). Contributing roles of mitochondrial dysfunction and hepatocyte apoptosis in liver diseases through oxidative stress, post-translational modifications, inflammation, and intestinal barrier dysfunction. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 81, 34.
128. Leow, W. Q., Chan, H. L., Tan, D. M., Goh, G.-B., & Wong, G. L. (2022). Non-alcoholic fatty liver disease: the pathologist's perspective. *Clinical and Molecular Hepatology*, 28(4), 488–500.
129. Li, N., & Zhao, H. (2021). Role of carnitine in non-alcoholic fatty liver disease and other related diseases: An update. *Frontiers in Medicine*, 8, 689042.
130. Li, S., Tan, H.-Y., Wang, N., Zhang, Z.-J., Lao, L., Wong, C.-W., & Feng, Y. (2015). The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26087–26124.
131. Li, X., Wang, Y., Han, L., & Liu, J. (2020). One-carbon metabolism and S-adenosylmethionine in liver health and disease. *Nutrients*, 12(3), 702.
132. Li, X., Yang, Y., Chen, H., & Wang, Z. (2023). Advances in the study of acetaminophen-induced liver injury. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1239395.
133. Liu, A., Cai, Y., Yuan, Y., Liu, M., Zhang, Z., Xu, Y., & Jiao, P. (2023). Efficacy and safety of carnitine supplementation on NAFLD: A systematic review and meta-analysis. *Systematic Reviews*, 12, 74.
134. Liu, T., Zhou, Y., Peng, J., et al. (2024). Hepatic stellate cells in liver fibrosis and regeneration. *Frontiers in Physiology*, 15, 1395521.
135. Loan, N. V. T. H., Chao, N. V., & Nhung, T. T. (2025). Clinical features and hematological and biochemical blood parameters of dogs with hepatobiliary disorders. *Veterinary World*, 18(4), 986–993.

136. Loguercio, C., Festi, D. (2011). Silybin in liver diseases: Past, present, future. *World Journal of Gastroenterology*, 17(18), 2288–2301.
137. Lowe A. (2010). Glucocorticoid use in cats. *Veterinary Medicine*. 105:56-62.
138. Loyd M. (2002) Philip Showalter Hench, 1896-1965. *Rheumatology*, 41(5):582–584.
139. Lucena R., Ginel P.J., Novales M., Molleda J.M. (1999) Effects of dexamethasone administration on serum trypsin-like immunoreactivity in healthy dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 60:1357-1359.
140. Luís, M., Freitas, J., Costa, F., Buttgereit, F., Boers, M., Da Silva JAP, & Santiago, T. (2019). An updated review of glucocorticoid-related adverse events in patients with rheumatoid arthritis. *Expert Opinion on Drug Safety*, 18(7), 581–590.
141. Machado, I. F., Silva, G. R., Cardoso, S., et al. (2023). Targeting oxidative stress with polyphenols to fight liver injury. *Antioxidants*, 12(6), 1212.
142. Mason, S. A., Thomas, H. E., Dick, J. L., van der Merwe, J., Gallo, L. A., & Wadley, G. D. (2022). Effect of mitochondrial-targeted antioxidants on glycaemic control, vascular function and oxidative stress: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 24(12), 2443–2455.
143. Mata-Greenwood, E., Chow, W. L., Anti, N. A. O., Sands, L. D., Adeoye, O., Ford, S. P., & Nathanielsz, P. W. (2024). Dysregulation of glucocorticoid receptor homeostasis and glucocorticoid-associated genes in umbilical cord endothelial cells of diet-induced obese pregnant sheep. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(4), 2311.
144. Miccadei S., Di Venere D., Cardinali A., Romano F., Durazzo A., Foddai M. S., Fraioli R., Mobarhan S., Maiani G. (2008) Antioxidative and apoptotic properties of polyphenolic extracts from edible part of artichoke (*Cynara scolymus* L.) on cultured rat hepatocytes and on human hepatoma cells. *Nutrition and cancer*, 60(2):276-83.
145. Mishra N, Yadav NP, Rai VK, Sinha P, Yadav KS, Jain S, Arora S. (2013) Efficient hepatic delivery of drugs: novel strategies and their significance. *Biomed Res Int*. 2013: 382184
146. Mooli, R. G. R., Mukhi, D., & Ramakrishnan, S. K. (2022). Oxidative stress and redox signaling in the pathophysiology of liver diseases. *Comprehensive Physiology*, 12(2), 3167–3192.
147. Morris, D. J., Ridlon, J. M. (2017). Glucocorticoids and gut bacteria: “The GALF hypothesis” in the metagenomic era. *Steroids*, 125, 1–13.
148. Murphy M. P. (2008) Targeting lipophilic cations to mitochondria. *Biochim Biophys Acta (BBA) – Bioenerg.*, 1777: 1028–31.
149. Murphy M. P. (2016) Understanding and preventing mitochondrial oxidative damage. *Biochemical Society Transaction*, 44(5):1219-1226.
150. Negasee, K. A. (2021). Hepatic diseases in canine and feline: A review. *Veterinary Medicine – Open Journal*, 6(1), 22–31.
151. Nelson D. A. (1993) Intraspinal therapy using methylprednisolone acetate. Twenty-three years of clinical controversy. *Spine*, 18(2):278-86.
152. Newton R. (2000) Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax*, 55:603–613.
153. O'Neill, D., Hendricks, A., Summers, J., Brodbelt, D. (2012). Primary care veterinary usage of systemic glucocorticoids in cats and dogs in three UK practices. *Journal of Small Animal Practice*, 53(4), 217–222.
154. Ogunleye, O. D., Afolabi, O., & Iwalewa, O. (2025). Possible role of vitamins C and E co-administration in cadmium induced oxidative liver injury in rats. *Frontiers in Nutrition*, 12, 1660240.
155. Oh, S., & Jeong, W. I. (2023). Hepatic microcirculation and sinusoidal structure. *Frontiers in Physiology*, 14, 1122339.
156. Oikonomidis, I. L., & Milne, E. (2023). Clinical enzymology of the dog and cat. *Australian Veterinary Journal*, 101(12), 465–478.

157. Olivry, T., DeBoer, D. J., Favrot, C., Jackson, H. A., Mueller, R. S., Nuttall, T., Prélaud, P. (2015). Treatment of canine atopic dermatitis: 2015 updated guidelines from the International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA). *BMC Veterinary Research*, 11, 210.
158. Onoiu, A.-I., Parada Domínguez, D., & Joven, J. (2025). Digital pathology tailored for assessment of liver biopsies. *Biomedicines*, 13(4), 846.
159. Ott, M., Amunts, A., & Brown, A. (2016). Organization and regulation of mitochondrial protein synthesis. *Annual Review of Biochemistry*, 85, 77–101.
160. Oyewole A. O., Birch-Machin M. A. (2015). *Mitochondria-targeted antioxidants*. FASEB Journal, 29(12): 4766-4773.
161. Panahi, Y., Kianpour, P., Mohtashami, R., Jafari, R., Simental-Mendía, L. E., Sahebkar, A. (2018). Efficacy and safety of *Cynara scolymus* (artichoke) leaf extract in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A randomized controlled trial. *Phytotherapy Research*, 32(7), 1382–1387.
162. Panday, R., Monckton, C. P., & Khetani, S. R. (2022). *The role of liver zonation in physiology, regeneration, and disease*. *Seminars in Liver Disease*, 42(1), 1–16.
163. Pang, M., Wang, S., Shi, T., & Chen, J. (2025). Overview of MitoQ on prevention and management of cardiometabolic diseases: A scoping review. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 12, 1506460.
164. Papich (2011) Saunders Handbook of Veterinary Drugs 3rd Edition, Small and Large Animal. Elsevier Limited, Philadelphia, USA, pp 498-499.
165. Papich M.G. (2015) Handbook of Veterinary Pain Management Third Edition: Chapter 13 – Glucocorticoids. Elsevier Inc., Philadelphia, USA, pp 266-279.
166. Peng, J., Zhang, W., Pan, M., Yu, Y., & Chen, X. (2025). Association between vitamin B6 status and liver fibrosis: Evidence from NHANES 2005-2010. *Frontiers in Nutrition*, 12, 1564257.
167. Perez-Montero B., Fermín-Rodríguez M.L., Miró G. and Cruz-Lopez F. (2024) Oxidative stress in canine diseases: A comprehensive review, *Antioxidants (Basel)*, 13(11): 1396.
168. Peyron, C., Lecoindre, P., Chevallier, M., Guerret, S., & others. (2015). Vacuolar hepatopathy in 43 French Scottish Terriers: A morphological study. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 166(7–8), 176–184.
169. Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., & Bitto, A. (2017). Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 8416763.
170. Poisson, J., Lemoine, S., Boulanger, C., Durand, F., Moreau, R., Valla, D., & Rautou, P.-E. (2017). Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *Journal of Hepatology*, 66(1), 212–227.
171. Porro, C., Benameur, T., Cianciulli, A., Vacca, M., Chiarini, M., De Angelis, M., & Panaro, M. A. (2024). Functional and therapeutic potential of *Cynara scolymus* in health benefits. *Nutrients*, 16(6), 872.
172. Pratt W. B., Morishima Y., Murphy M., Harrell M. (2006) Chaperoning of glucocorticoid receptors. In *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer. pp. 111–138.
173. Puche J. E., Saiman Y., Friedman S. L. (2013) Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Comprehensive Physiology*, 3(4):1473-92.
174. Purcell, B., Wiethoelter, A., Dandrieux, J. (2023). Prednisolone prescribing practices for dogs in Australia. *PLoS One*, 18(2), e0282440.
175. Quesada-Vázquez, S., Arboleda-Sánchez, J., Rodríguez-Guerrero, E., & Rufián-Henares, J. A. (2024). Polyphenols and metabolism: From present knowledge to future directions. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 80(1), 45–63.
176. Ramamoorthy S., Cidlowski J. A. (2016) Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease, *Rheumatic Disease Clinics* , 42(1):15 – 31.

177. Rickard, B. P., Conrad, J. A., & Hirschey, M. D. (2023). Methods to evaluate changes in mitochondrial structure and function. *Biochemical Journal*, 480(8), 589–608.
178. Reda, D., Abd El-Hakim, Y. M., El-Shishtawy, M. M., El-Kholy, W. B., & El-Bakly, W. M. (2023). Vitamin D₃ alleviates non-alcoholic fatty liver disease in rats by reducing oxidative stress, generation of inflammatory factors, and hepatic fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1164512.
179. Reece, W. O., Erickson, H. H., Goff, J. P., & Uemura, E. E. (Eds.). (2015). *Dukes' physiology of domestic animals* (13th ed.). Ames, IA: Wiley-Blackwell.
180. Rehman, H., Liu, Q., Krishnasamy, Y., Shi, Z., Ramshesh, V. K., Haque, K., Schnellmann, R. G., Murphy, M. P., Lemasters, J. J., Rockey, D. C., & Zhong, Z. (2016). The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ attenuates liver fibrosis in mice. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology*, 8(1), 14–27.
181. Richards, S., Gunn-Moore, D. A., Adamantos, S., Belshaw, Z., Dean, R. (2022). ISFM/AAFP Feline Chronic Respiratory Disease Guidelines. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 24(11), 1137–1165.
182. Rockey D. C., Boyles J. K., Gabbiani G., Friedman S. L. (1992) Rat hepatic lipocytes express smooth muscle actin upon activation in vivo and in culture. *Journal of Submicroscopic cytology an pathology*, 24(2):193-203.
183. Rossman, M. J., Santos-Parker, J. R., Steward, C. A. C., Bispham, N. Z., Cuevas, L. M., Rosenberg, H. L., Chonchol, M., & Seals, D. R. (2018). Chronic supplementation with a mitochondrial antioxidant (MitoQ) improves vascular function in healthy older adults. *Hypertension*, 71(6), 1056–1063.
184. Rothuizen J, Bunch S, Charles J, Cullen J, Desmet V, Szatmari V, Twedt D, van den Ingh T, van Winkle T, Washabau R (2006) WSAVA Standards for Clinical and Histological Diagnosis of Canine and Feline Liver Diseases 1st Edition. *Elsevier Limited*, Philadelphia, USA, pp 1-14.
185. Rutgers, H. C., Batt, R. M., Vaillant, C., & Riley, J. E. (1995). Subcellular pathologic features of glucocorticoid-induced hepatopathy in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 56(7), 898–907.
186. Saklatvala J. (2002) Glucocorticoids: do we know how they work? *Arthritis research*, 4(3):146-150.
187. Saran, N., Lee, J., Soroka, C. J. (2023). Hepatobiliary transporters in health and disease: Recent advances. *Hepatology Research*, 53(4), 345–359.
188. Savic, D., Hodson, L., Neubauer, S., & Pavlides, M. (2020). The importance of the fatty acid transporter L-carnitine in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Nutrients*, 12(8), 2178.
189. Schacke H., Docke W. D., Asadullah K. (2002) Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther*, 96:23–43.
190. Sherif I. O., Al-Gayyar M. M. (2013) Antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotective effects of silymarin on hepatic dysfunction induced by sodium nitrite. *European Cytokine Network*, 24(3):114-21.
191. Shi, S., Wang, L., van der Laan, L. J. W., Pan, Q., & Versteegen, M. M. A. (2021). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in liver transplantation and underlying diseases: New insights and therapeutics. *Transplantation*, 105(11), 2362–2373.
192. Sieber-Ruckstuhl, N. S., Burla, B., Spoerel, S., Schmid, F., Venzin, C., Cazenave-Gassiot, A., Bendt, A. K., Torta, F., Wenk, M. R., & Boretti, F. S. (2019). Changes in the canine plasma lipidome after glucocorticoid exposure. *Scientific Reports*, 9, 6015.
193. Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(7), 363–383.
194. Slominski, A. T., & Zmijewski, M. A. (2017). Glucocorticoids inhibit wound healing: Novel mechanism of action. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(5), 1012–1014.

195. Sobczak-Filipiak M., Szarek J., Czopowicz M., Mieczkowska J., Lechowski R. (2014) Hepatic stellate cells in the liver of dogs with steroid-induced hepatopathy. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 58: 273-276.
196. Solanki, S., & Shah, Y. M. (2024). Hypoxia-induced signaling in gut and liver pathobiology. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 19, 395–417.
197. Spinelli, J. B., & Haigis, M. C. (2018). The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nature Cell Biology*, 20(7), 745–754
198. Sri-Jayantha, L. S., Doornink, M. T., Urie, B. K. (2022). Increased risk of select glucocorticoid adverse events in dogs of higher body weight. *Canadian Veterinary Journal*, 63(1), 32–38.
199. Steagall, P. V., Pelligand, L., Page, S. W., Bourgeois, M., Weese, S., Manigot, G., Dublin, D., Ferreira, J. P., Guardabassi, L. (2020). The World Small Animal Veterinary Association (WSAVA) list of essential medicines for cats and dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 61(9), E162–E176.
200. Sulaimon, L. A., Adisa, R. A., Samuel, T. A., Abdulkareem, F. B., & Ayankojo, A. G. (2021). Mitoquinol mesylate alleviates oxidative damage in cirrhotic and advanced hepatocellular carcinogenic rats through mitochondrial protection and antioxidative effects. *Advances in Redox Research*, 3, 100014.
201. Sun, H., Liu, T., Wang, Z., Shen, W., Yuan, X., Xie, J., & Zhang, Y. (2025). Role of curcumin in chronic liver diseases: A comprehensive review. *Drug Design, Development and Therapy*, 19, 1123–1147.
202. Surai, P. F. (2015). Silymarin as a natural antioxidant: An overview of the current evidence and perspectives. *Antioxidants*, 4(1), 204–247.
203. Swann, J. W., Garden, O. A., Fellman, C. L., Glanemann, B., Goggs, R., LeVine, D. N., Mackin, A. J., & Whitley, N. T. (2019). ACVIM consensus statement on the treatment of immune-mediated hemolytic anemia in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(3), 1141–1172.
204. Syakalima, M., Takiguchi, M., Yasuda, J., Hashimoto, A. (1997) The age dependent levels of serum ALP isoenzymes and the diagnostic significance of corticosteroid-induced ALP during long-term glucocorticoid treatment. *J Vet Med Sci*, 59:905–909.
205. Syakalima, M., Takiguchi, M., Yasuda, J., Hashimoto, A. (1998) The canine alkaline phosphatases: a review of the isoenzymes in serum, analytical methods and their diagnostic application. *Jpn J Vet Res*, 46:3–11.
206. Takahashi, Y., Dungubat, E., Kusano, H., & Fukusato, T. (2023). Artificial intelligence and deep learning: New tools for histopathological diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 21, 2495–2501.
207. Talari, H. R., Molaqanbari, M. R., Mokfi, M., Taghizadeh, M., Bahmani, F., Tabatabaei, S. M., & Sharifi, N. (2022). The effects of vitamin B12 supplementation on metabolic profile of patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized controlled trial. *Scientific Reports*, 12, 14047.
208. Talavera-López, J., Sáez-Mengual, O., Fernández-Del-Palacio, M.-J. (2023). Comparative study of inhaled fluticasone versus oral prednisone in 30 dogs with cough and tracheal collapse. *Veterinary Sciences*, 10(9), 548.
209. Tao, L., Xue, Y.-F., Sun, F.-F., He, X., Wang, H.-Q., Tong, C.-C., Zhang, C., Xu, D.-X., & Chen, X. (2024). MitoQ protects against carbon tetrachloride-induced hepatocyte ferroptosis and acute liver injury by suppressing mtROS-mediated ACSL4 upregulation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 486, 116914.
210. Tao, S., Zhang, H., Zhao, Q., Bu, H., Wang, H., & Guo, H. (2020). Correlation of vitamin D with inflammatory factors, oxidative stress and T cell subsets in patients with autoimmune hepatitis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 19, 3419-3424.

211. Teske, E. (1999) Corticosteroid-induced *alkaline phosphatase* isoenzyme in the diagnosis of canine hypercorticism. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 215:323-327.
212. Tilg, H., Adolph, T. E., & Trauner, M. (2022). Gut-liver axis: Pathophysiological concepts and clinical implications. *Cell Metabolism*, 34(11), 1700-1718.
213. Tinted, N., Pongcharoenwanit, S., Ongvisespaibool, T., Wachirodom, V., Jumnansilp, T., Buckland, N., Chuchalernporn, P., Soontarak, S., Pairor, S., Steiner, J. M., Thengchaisri, N., & Nantasanti Assawarachan, S. (2023). Serum bile acids concentrations and liver enzyme activities after low-dose trilostane in dogs with hyperadrenocorticism. *Animals*, 13(20), 3244.
214. Tintle, L. M., White, S. D., & Outerbridge, C. (2023). Long-term safety of glucocorticoids in canine dermatology: Current perspectives. *Veterinary Dermatology*, 34(3), 215–228.
215. Trefts, E., Gannon, M., Wasserman, D. H. (2017). The liver. *Current Biology*, 27(21), R1147–R1151
216. Turkseven, S., Bolognesi, M., Brocca, A., Pesce, P., Angeli, P., & Di Pascoli, M. (2023). Low-dose acetylsalicylic acid and mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone attenuate non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Antioxidants*, 12(4), 971.
217. van de Lagemaat, E. E., de Groot, L. C. P. G. M., & van den Heuvel, E. G. H. M. (2019). Vitamin B12 in relation to oxidative stress: A systematic review. *Nutrients*, 11(2), 482.
218. Viviano, K. R. (2022). Glucocorticoids, cyclosporine, azathioprine, chlorambucil, and mycophenolate in dogs and cats: Clinical uses, pharmacology, and side effects. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 52(3), 797–817.
219. Vogli, S., Naska, A., Marinos, G., Kasdagli, M.-I., & Orfanos, P. (2023). The effect of vitamin E supplementation on serum aminotransferases in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A systematic review and meta-analysis. *Nutrients*, 15(17), 3733.
220. Walton, R. (2016). The WSAVA essential medicines list for dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice*, 57(E2), 1–38.
221. Wang, W., Karamanlidis, G., Tian, R. (2016) Novel targets for mitochondrial medicine. *Sci Trans Med*, 8(326):326rv3.
222. Wang, K. (2014). Molecular mechanisms of hepatic apoptosis. *Cell Death & Disease*, 5(1), e996.
223. Wang, Y., Sun, M., Wang, Y., Li, S. (2024). Mechanisms of cholestatic liver injury: Oxidative stress, inflammation, and fibrosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 169, 115937.
224. Watson, B. R., Paul, B., Ur Rahman, R., Amir-Zilberstein, L., Segerstolpe, Å., Epstein, E. T., Murphy, S., Geistlinger, L., Lee, T., Shih, A., Deguine, J., Xavier, R. J., Moffitt, J. R., & Mullen, A. C. (2025). Spatial transcriptomics of healthy and fibrotic human liver at single-cell resolution. *Nature Communications*, 16, Article 319.
225. Webster, C. R. L., & Cooper, J. (2020). Diagnostic approach to hepatobiliary diseases in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 50(2), 293–311.
226. Webster, C. R. L.; Center, S. A.; Cullen, J. M.; Penninck, D. G.; Richter, K. P.; Twedt, D. C.; Watson, P. J. (2019). *ACVIM consensus statement on the diagnosis and treatment of chronic hepatitis in dogs*. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 33(3), 1173-1200.
227. Westra I. M., Oosterhuiss D., Groothuis G. M., Olinga P. (2014) Precision-cut liver slices as a model for the early onset of liver fibrosis to test antifibrotic drugs. *Toxicol Appl Pharmacol*, 274(2):328-38.
228. Wiedmeyer C. E., Solter P. F., Hoffmann W. E. (2002) Kinetics of mRNA expression of alkaline phosphatase isoenzymes in hepatic tissues from glucocorticoid-treated dogs. *Am J Vet Res*, 8:1089–1095.
229. Willard, M. D., & Tvedten, H. (2012). *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods* (5th ed.). St. Louis, MO: Elsevier/Saunders.

230. Wimberly J.E., Martin C.E., Foster J.H. (1969) Temporary hepatic inflow occlusion in dogs treated with methylprednisolone and antibiotics. *The American Journal of Surgery*, 35(4):271-274.
231. Xin, J., Yang, T., Wu, X., Wu, Y., Liu, Y., Liu, X., Jiang, M., & Gao, W. (2023). Spatial transcriptomics analysis of zone-dependent hepatic ischemia-reperfusion injury murine model. *Communications Biology*, 6, Article 194
232. Xiong, X., Sun, D., Li, Z., et al. (2023). Hepatocyte injury and adaptive responses in liver disease. *Hepatology*, 78(2), 456–470.
233. Xu, Y., Chu, C., Shi, Z., & Zhang, J. (2023). The role of hepatocyte mitochondrial DNA in liver injury. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 168, 115692.
234. Xuan, W., Song, D., Yan, Y., Yang, M., & Sun, Y. (2020). A potential role for mitochondrial DNA in the activation of oxidative stress and inflammation in liver disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 5835910.
235. Yamazaki, Y., Kikuchi, K., Yamada, Y., Neo, S., Nitta, S., Igarashi, H., Kamiya, A., & Hisasue, M. (2024). Reprogramming canine cryopreserved hepatocytes to hepatic progenitor cells using small molecule compounds. *Regenerative Therapy*, 26, 1078–1086.
236. Yiannakou, I., Papandreou, D., Andreou, E., Georgaki, E., Ioannidou, M., Savva, C., Spanakis, M., & Kouis, P. (2025). Eggs, dietary choline and non-alcoholic fatty liver disease: Evidence from the Cyprus epidemiological study. *Journal of Hepatology*, 82, 338–348.
237. Young, B., Lowe, J.S., Stevens, A., Heath, J.W. (2011) Wheather's Functional Histology: A Text and Colour Atlas Fifth Edition. *Elsevier Science, Saunders*, USA.
238. Yuan, H.-Y., Tong, X.-F., Ren, Y.-Y., Li, Y.-Y., Wang, X.-L., Chen, L.-L., Zheng, M.-H. (2024). AI-based digital pathology provides newer insights into lifestyle intervention-induced fibrosis regression in MASLD: An exploratory study. *Liver International*, 44(10), 2572-2582.
239. Zeng, H., Dou, S., Zhao, J., Li, H., Fu, R. (2023). Targeting FXR and TGR5 in liver diseases: Mechanisms and therapeutic perspectives. *Frontiers in Pharmacology*, 14, 1194532.
240. Zhang, H., Yan, Q., Wang, X., Chen, X., Chen, Y., Du, J., & Chen, L. (2021). The role of mitochondria in liver ischemia–reperfusion injury: From aspects of mitochondrial oxidative stress, mitochondrial fission, mitochondrial membrane permeable transport pore formation, mitophagy, and mitochondria-related protective measures. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 6670579.
241. Zhang, I. W., López-Vicario, C., Duran-Güell, M., & Clària, J. (2021). Mitochondrial dysfunction in advanced liver disease: Emerging concepts. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 772174.
242. Zheng, H., Xu, Y., Liehn, E. A., & Rusu, M. (2024). Vitamin C as scavenger of reactive oxygen species during healing after myocardial infarction. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(6), 3114.
243. Zhou, X., Fu, Y., Liu, W., Mu, Y., Zhang, H., Chen, J., & Liu, P. (2022). Ferroptosis in chronic liver diseases: Opportunities and challenges. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 928321.
244. Zhou, Y., Qiu, T., Wang, T., Yu, B., Xia, K., Guo, J., Liu, Y., Ma, X., Zhang, L., Zou, J., Chen, Z., & Zhou, J. (2024). Research progress on the role of mitochondria in the process of hepatic ischemia–reperfusion injury. *Gastroenterology Report*, 12, goae066.

PIELIKUMI

DZĪVNIEKA ĪPAŠNIEKA PIEKRIŠANA
klīnisko asins paraugu un datu izmantošanai zinātniskā pētījumā

Pētījuma nosaukums: KORTIKOSTEROĪDU IZRAISĪTĀS IZMAIŅAS AKNĀS UN TO REVERSIJAS IESPĒJAS SUŅIEM

Doktorante: Jevgenija Kondratjeva

Institūcija: LLU Veterinārmedicīnas fakultāte

Kontakti: tālrunis/e-pasts: 26890403, jkondratjeva@inbox.lv

1. Piekrišanas būtība

Es, zemāk parakstījusies/-ies, apliecinu, ka esmu informēta/-s un piekrītu, ka mana dzīvnieka klīniskās aprūpes laikā diagnostiskos nolūkos paņemto asins paraugi un ar tiem saistītie anonimizētie klīniskie dati var tikt izmantoti zinātniskā pētījumā.

Pētījuma dēļ dzīvniekam netiks veiktas papildu manipulācijas, netiks ņemtas papildu asinis, un netiks radīts papildu diskomforts. Pētījumā tiks izmantoti tikai anonimizēti dati; dzīvnieka un īpašnieka identitāte publikācijās netiks atklāta. Pētījuma materiāli tiks apstrādāti, ievērojot konfidencialitāti un normatīvos aktus par personas datu aizsardzību.

Piekrišana ir brīvprātīga. Es varu to atsaukt jebkurā laikā, informējot pētnieci vai klīniku. Atsauksana neietekmēs mana dzīvnieka ārstēšanu. (Piezīme: atsauksana var nebūt iespējama, ja paraugs jau ir anonimizēts un iekļauts kopējā datu kopā.)

Dzīvnieka dati (aizpilda īpašnieks vai klīnika)

Dzīvnieka suga: suns

Vārds / ID klīnikā: _____

Šķirne: _____ Dzimums: _____ Vecums: _____

Īpašnieka vārds, uzvārds: _____

Tālrunis / e-pasts: _____

Datums: ____ / ____ /20 ____

Īpašnieka paraksts: _____

SASKAŅOJUMS
par klīnisko paraugu izmantošanu zinātniskā pētījumā

Klīnika: _____

Reģ. Nr.: _____ Adrese: _____

Klīnikas vadība apliecina, ka:

Asins paraugi, kas tiks izmantoti pētījumā, ir iegūti klīniskās diagnostikas ietvaros un nav ņemti pētījuma nolūkos. Pētījuma vajadzībām var tikt nodoti tikai paraugu atlikumi (ja tādi ir pieejami) un/vai laboratorijas rezultāti anonimizētā veidā.

Dzīvnieku īpašnieku informētā piekrišana par paraugu/datu izmantošanu pētījumā ir saņemta (pievienota šai veidlapai vai glabājas klīnikā).

Pētījumā nodotā informācija tiks sniegta tādā apjomā, kas nepieciešams zinātniskajai analīzei, ievērojot konfidencialitāti.

Atbildīgā persona klīnikā (vārds, amats): _____

Paraksts: _____ Zīmogs (ja ir): _____

Datums: ____ / ____ /20 ____

Doktorante: Jevgēnija Kondratjeva

Paraksts: _____ Datums: ____ / ____ /20 ____



Pārtikas un veterinārais dienests

IZMĒĢINĀJUMA PROJEKTA ATĻAUJA Nr. 70 DZĪVNIEKA IZMANTOŠANAI PROCEDŪRĀ

Atļaujas saņēmējs
Latvijas Lauksaimniecības universitātes Veterinārmedicīnas fakultāte,
Nr. 025564

Izmēģinājuma dzīvnieku lietotājs (nosaukums, PVD reģistra Nr.)

Izmēģinājuma projekta/procedūras nosaukums
**Jauns intracelulārais hepatoprotektants suņu steroidās hepatopātijas
mazināšanai**

Jevgēnija Kondratjeva

Par visa izmēģinājuma projekta īstenošanu atbildīgā persona

Aija Ilgaža, atļauja Nr. 16

Par izmēģinājuma projekta atbildīgā persona, PVD atļaujas Nr.

Izmēģinājuma projekta norises vieta
Kristapa Helmaņa iela 8, Jelgava, LV-3004

faktiskā adrese

Īpašie nosacījumi:

**Retrospektīvi izvērtēt izmēģinājuma projektu un retrospektīvo izvērtējumu iesniegt
PVD trīsdesmit dienu laikā pēc izmēģinājuma projekta beigām. Par jebkurām
procedūrās ieviestām izmaiņām nekavējoties ziņot PVD!**

Retrospektīvā izvērtēšana u.c.

Atļaujas darbības laiks no 10.04.2015. līdz 31.07.2015.



Pārtikas un veterinārā
dienesta ģenerāldirektors

M. Balodis

AA 090004