

Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitāte
Latvia University of Life Sciences and Technologies

Veterinārmedicīnas fakultāte
Faculty of Veterinary Medicine



Jevgēnija Kondratjeva

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

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

Promocijas darba KOPSAVILKUMS
zinātnes doktora grāda (Ph.D.) iegūšanai

*SUMMARY
of the Doctoral thesis for the Doctoral degree of Science
(Ph.D.)*

Jelgava 2026

Promocijas darbs izstrādāts:

- Latvijas Biozinātņu un tehnoloģiju universitātes (LBTU) Veterinārmedicīnas fakultātes (VMF) Preklīniskā institūta Morfofunkcionālajā laboratorijā;
- LBTU VMF Salīdzinošās patoloģijas laboratorijā;
- LBTU Veterinārās klīnikas laboratorijā;
- LBTU Biotehnoloģiju Zinātniskajā laboratorijā Viedo Tehnoloģiju nodaļā.

Research has been carried out at the:

- *Latvia University of Life Sciences and Technologies (LBTU) Faculty of Veterinary Medicine (VMF) Preclinical Institute Morphofunctional Laboratory;*
- *LBTU VMF Laboratory of Comparative Pathology;*
- *LBTU Veterinary Clinic Laboratory;*
- *LBTU Research Laboratory of Biotechnology, Division of Smart Technologies.*

Promocijas darba zinātniskās vadītājas/*Scientific supervisors:*

Profesore Dr. med.vet./*professor Dr.med.vet.* **Aija Ilgaža**

Profesore Dr.habil.biol./*professor Dr.habil.biol.*

Edīte Birģele

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

This research was supported by project “Strengthening the Institutional Capacity of LBTU for Excellence in Studies and Research”, funded by The Recovery and Resilience Facility.

Oficiālie recenzenti: *Official reviewers:*

Dr.med.vet., Latvijas Zinātnes padomes korespondētājlocekle, LBTU profesore (*Corresponding Member of the Latvian Council of Science, LBTU Professor*) **Anda Valdovska**

Dr.med.vet., LBTU profesore (*LBTU Professor*) **Dace Keidāne**

Dr.med.vet., Lietuvas Veselības Zinātņu universitātes profesors (*Lithuanian University of Health Sciences Professor*) **Alius Pockevičius**

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2026. gada 24. augustā, plkst. 9:00 LBTU Veterinārmedicīnas fakultātē, Jelgavā Kr. Helmaņa ielā 8, A300 auditorijā.

The defense of this theses will take place at Latvia University of Life Sciences and Technologies Faculty of Veterinary Medicine, Jelgava, Kr. Helmana Street 8, auditorium No A300 on 24th of August 2026, at 9 a.m.

Ar promocijas darbu var iepazīties LBTU Fundamentālajā bibliotēkā, Jelgavā,
Lielā iela 2 un <http://llufb.llu.lv/lv>

The thesis is available at the Fundamental Library of the Latvia Univeristy of
Life Sciences and Technologies, Lielā street 2, Jelgava and <http://llufb.llu.lv/en>

SATURA RĀDĪTĀJS

IEVADS	8
Promocijas darba mērķis un hipotēze	9
Promocijas darba uzdevumi	9
Darba zinātniskā novitāte	9
Autores personīgais ieguldījums	10
Darba aprobācija un rezultātu realizācija	11
1. MATERIĀLS UN METODES	14
1.1. Pētījuma laiks, vieta un materiāla raksturojums	14
1.2. Pētījuma kopējā shēma	15
1.3. Dzīvnieku klīniskā izmeklēšana un veselības stāvokļa novērtēšana	17
1.4. Asins paraugu iegūšana	17
1.5. Aknu audu paraugu iegūšana	17
1.6. Asins paraugu bioķīmiskā izmeklēšana	17
1.7. Aknu audu materiāla sagatavošana un krāsošana	18
1.8. Paraugu mikroskopiskā analīze	18
1.9. Datu statistiskā analīze	20
2. PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA	21
2.1. Klīniskās izmeklēšanas rezultāti	21
2.2. Aknu funkcionālā un morfoloģiskā stāvokļa izmaiņas suņiem pēc MPA ievadīšanas	21
2.2.1. Aknu funkcionālā stāvokļa izmaiņas KP suņiem pēc MPA ievadīšanas	21
2.2.2. Aknu funkcionālā stāvokļa izmaiņas EP suņiem pēc MPA ievadīšanas	23
2.2.3. Aknu funkcionālā stāvokļa salīdzinājums KP un EP suņiem pēc MPA ievadīšanas	25
2.2.4. Aknu šūnu morfoloģiskās izmaiņas EP suņiem pēc MPA ievadīšanas	26
2.3. Hepatoprotektīvās terapijas ietekme uz aknu morfofunkcionālo stāvokli suņiem pēc MPA ievadīšanas	29

2.3.1. Hepatoprotektīvās terapijas ietekme uz aknu funkcionālo stāvokli KP suņiem pēc MPA ievadīšanas.....	29
2.3.2. Hepatoprotektīvās terapijas ietekme uz aknu funkcionālo stāvokli EP suņiem pēc MPA ievadīšanas	33
2.3.3. Antioksidanta mitokvinola mezilāta ietekme uz aknu audu morfoloģisko stāvokli EP suņiem pēc MPA ievadīšanas	37
2.4. Metilprednizolona acetāta un mitokvinola mezilāta ietekme uz hepatocītu ultrastruktūru morfoloģiju EP suņiem	40
2.4.1. Metilprednizolona acetāta un mitokvinola mezilāta ietekme uz hepatocītu kodolu morfoloģiju EP suņiem.....	40
2.4.2. Metilprednizolona acetāta un mitokvinola mezilāta ietekme uz hepatocītu mitohondriju morfoloģiju EP suņiem	42
SECINĀJUMI.....	46
PRIEKŠLIKUMI	48

CONTENT

INTRODUCTION.....	49
Aim and Hypothesis of the Doctoral Thesis.....	50
Objectives of the Doctoral Thesis.....	50
Scientific Novelty of the Study	51
Author's Personal Contribution	51
1. MATERIALS AND METHODS	52
1.1. Study Period, Location, and Description of the Material.....	52
1.2. Overall Study Design.....	53
1.3. Clinical Examination and Health Assessment of Animals	54
1.4. Blood Sample Collection	54
1.5. Liver Tissue Sampling.....	54
1.6. Biochemical Analysis of Blood Samples	55
1.7. Preparation and Staining of Liver Tissue Samples	55
1.8. Microscopic Analysis of Samples	55
1.9. Statistical Analysis of Data	58
2. RESULTS AND DISCUSSION	59
2.1. Results of Clinical Examination	59
2.2. Changes in the Functional and Morphological State of the Liver in Dogs Following MPA Administration.....	59
2.2.1. Changes in Liver Functional Status in CS Dogs Following MPA Administration.....	59
2.2.2. Changes in Liver Functional Status in ES Dogs Following MPA Administration.....	61
2.2.3. Comparison of Liver Functional Status Between CS and ES Dogs Following MPA Administration.....	62
2.2.4. Morphological Changes in Liver Cells in ES Dogs Following MPA Administration.....	63
2.3. Effect of Hepatoprotective Therapy on the Morphofunctional State of the Liver in Dogs Following MPA Administration	65
2.3.1. Effect of Hepatoprotective Therapy on Liver Functional Status in CS Dogs Following MPA Administration.....	65

2.3.2. Effect of Hepatoprotective Therapy on Liver Functional Status in ES Dogs Following MPA Administration	68
2.3.3. Effect of the Antioxidant Mitoquinol Mesylate on Liver Tissue Morphology in ES Dogs Following MPA Administration	70
2.4. Effect of Methylprednisolone Acetate and Mitoquinol Mesylate on Hepatocyte Ultrastructural Morphology in ES Dogs	72
2.4.1. Effect of Methylprednisolone Acetate and Mitoquinol Mesylate on Hepatocyte Nuclear Morphology in ES Dogs.....	72
2.4.2. Effect of Methylprednisolone Acetate and Mitoquinol Mesylate on Hepatocyte Mitochondrial Morphology in ES Dogs.....	73
CONCLUSIONS.....	76
RECOMMENDATIONS	78

IEVADS

Veterinārmedicīnā kortikosteroīdi tiek plaši izmantoti, jo tie nodrošina spēcīgu pretiekaisuma un imūnsupresīvu iedarbību, kas ir būtiska dažādu iekaisuma, autoimūnu un alerģisku slimību ārstēšanā. Neraugoties uz to terapeitisko efektivitāti, kortikosteroīdu lietošana ir saistīta ar virkni potenciālu komplikāciju, tostarp pankreatītu, cukura diabētu, hipertensiju, kataraktu veidošanos un jātrogēnu 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 centrilobulārājās 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). 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). A. Kusaba (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 adenožīna 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.

Promocijas darba mērķis un hipotēze

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.

Promocijas darba uzdevumi

1. Izpētīt aknu funkcionālā un/vai morfoloģiskā stāvokļa izmaiņas klīniski veseliem 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 veterinārmedicīnā 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 patoģisko izmaiņu reversijas procesu steroīdās hepatopātijas gadījumā.

Autores personīgais ieguldījums

Promocijas darba autore patstāvīgi izstrādāja pētījuma koncepciju un eksperimentālajā daļā krusteniskā (*crossover*) dizaina pētījuma plānu, nodrošināja pētījuma īstenošanu un datu iegūšanu visos pētījuma posmos. Autore veica klīniskajā pētījumā iekļauto dzīvnieku atlasī, organizēja medikamentu ievadīšanas protokolus, kā arī nodrošināja bioloģisko paraugu ievākšanu noteiktajos laika punktos. Autore sagatavoja, apstrādāja un analizēja asins paraugus, kā arī veica iegūto laboratorisko rezultātu apkopošanu un interpretāciju.

Eksperimentālajā daļā autore patstāvīgi veica aknu biopsiju paraugu iegūšanu un apstrādi, nodrošinot paraugu fiksāciju, piegriešanu un ievietošanu kasetēs, kā arī koordinēja histoloģisko preparātu sagatavošanu. Autore veica aknu audu histoloģisko izmeklēšanu, kā arī PAS reakcijas preparātu izvērtēšanu glikogēna akumulācijas noteikšanai. Autore veica imūnhistoķīmisko izmeklējumu plānošanu un rezultātu interpretāciju, hepatocītu ultrastrukturālas izmaiņu analīzi imūnfluorescences izmeklējumos. Autore veica visu iegūto datu statistisko apstrādi, rezultātu grafisko un tabulāro noformēšanu, interpretāciju un salīdzinājumu ar zinātnisko literatūru.

Autore nodrošināja pētījuma rezultātu prezentēšanu zinātniskās konferencēs un to izmantošanu publikāciju sagatavošanā.

Darba aprobācija un rezultātu realizācija

Approbation of the research work and implementation of results

Publikācijas, kas indeksētas **SCOPUS** un/vai **Web of SCIENCE** datu bāzēs
/ Publications indexed in SCOPUS and/or Web of Science databases:

- 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.

Publikācijas citos žurnālos/ Publications in other journals:

- 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 / Abstracts in conference proceedings:

- 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/Presentations at scientific conferences:

- 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 – 28 th 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.

1. MATERIĀLS UN METODES

1.1. Pētījuma laiks, vieta un materiāla raksturojums

Paraugu iegūšana un izmeklēšana tika veikta divās daļās: klīniskajā pētījumā (KP) un eksperimentālajā pētījumā (EP).

Klīniskais pētījums (KP). KP objektus atlasījām pēc šādiem kritērijiem:

1. dzīvniekiem iepriekš bija uzstādīta diagnoze, kuras ārstēšanā tika izmantots ilgstošas darbības kortikosteroīds metilprednizolona acetāts (MPA) devā 2 mg kg⁻¹;
2. anamnēzē un klīniskajā izmeklēšanā nebija datu, kas liecinātu par aknu patoloģiju;
3. asins analīzēs nebija izmaiņu, kas norādītu uz aknu darbības traucējumiem pirms terapijas.

KP tika izmantoti asins seruma paraugi, kas laika posmā no 2013. gada janvāra līdz 2014. gada janvārim tika paņemti diagnostiskos nolūkos vairākās Rīgas veterinārajās klīnikās. Paraugu izmantošana tika saskaņota ar klīniku vadību un dzīvnieku īpašniekiem. Tā kā asins paraugi tika iegūti klīniskās aprūpes ietvaros, pētījuma dēļ netika veiktas papildu manipulācijas un līdz ar to netika radītas papildu sāpes vai diskomforts. Pēc atlasē pētījumā tika iekļauti 28 pieauguši atšķirīga vecuma, dzimuma un šķirņu suņi. No katra dzīvnieka tika analizēti četri asins paraugi, kopā apstrādājot 112 paraugus.

Eksperimentālais pētījums (EP). EP tika iekļauti septiņi klīniski veseli, divus gadus veci, sieviešu dzimuma nekastrēti bīglu šķirnes suņi (PVD atļauja Nr. 70). Dzīvnieki tika iepirkti ES sertificētā eksperimentālo dzīvnieku audzētavā Francijā. EP norise notika Latvijas Lauksaimniecības universitātes Veterinārmedicīnas fakultātes Preklīniskajā institūtā laika posmā no 2015. gada 10. aprīļa līdz 2015. gada 31. jūlijam.

Pirms un EP laikā dzīvnieki tika turēti LLU VMF Eksperimentālo dzīvnieku novietnē, ievērojot labturības prasības, veicot regulāru telpu uzkopšanu, vides bagātināšanu, ikdienas kontaktu ar cilvēku un pieeju āra voljeram. Dzīvnieki saņēma rūpnieciski ražotu pilnvērtīgu barību; dzeramais ūdens bija pieejams *ad libitum*. Dzīvnieki tika vakcinēti un regulāri apstrādāti pret ekto- un endoparazītiem.

Eksperimenta laikā no katra dzīvnieka noteiktajos laika punktos tika iegūti asins un aknu audu paraugi: kopā 70 asins paraugi un 42 aknu paraugi.

1.2. Pētījuma kopējā shēma

Klīniskais pētījums. Dzīvnieki nosacīti tika iedalīti divās grupās:

- grupa 1: saņēma tikai kortikosteroīdu;
- grupa 2: pēc kortikosteroīda injekcijas papildus saņēma hepatoprotektantu.

Kā kortikosteroīds tika izmantots ilgstošas darbības metilprednizolona acetāts (*Depo-Medrol* 40 mg ml⁻¹), ko ievadīja intramuskulāri vienu reizi pētījuma pirmajā dienā devā 2 mg kg⁻¹. Klīniskajā pētījumā tika lietotos hepatoprotektīvs preparāts *GlutaMax*, kura sastāvā kā galvenās sastāvdaļas bija iekļauti mārdadža (*Silybum marianum*), kurkumas (*Curcuma longa*), artišoka (*Cynara scolymus*) ekstrakti. To ievadīja *per os* vienu reizi dienā 45 dienas, sākot no pētījuma 0. dienas. Devu aprēķināja saskaņā ar preparāta lietošanas shēmu (1 tablete uz 15 kg). Lai novērtētu hepatoprotektanta iespējamo ietekmi uz kortikosteroīda inducētām aknu izmaiņām, asins serumā noteica šādus rādītājus: alanīnaminotransferāzi (ALAT), gammaglutamīltransferāzi (GGT), sārmaino fosfatāzi (AP) un kortikosteroīdu inducēto termostabilo sārmaino fosfatāzi (kAP). Asins paraugi tika iegūti 0., 14., 30. un 45. dienā, skaitot no kortikosteroīda ievadīšanas dienas.

Eksperimentālais pētījums. Kā kortikosteroīdu preparātu izmantoja metilprednizolona acetātu (*Depo-Medrol* 40 mg ml⁻¹), ko ievadīja intramuskulāri vienreiz pētījuma pirmajā dienā devā 2 mg kg⁻¹.

Kā hepatoprotektantu izvēlējamies mitokvinola mezilātu (*MitoQ*), kas ievadīts *per os* 20 mg dienā. Kontroles vajadzībām tika sagatavotas identiskas kapsulas ar tapiokas pulveri (placebo) bez aktīvās vielas, lai izvērtētu tieši aktīvās vielas, nevis palīgvielu ietekmi.

Eksperimenta plānojumā tika izmantots divu preparātu un divu periodu krusteniskais (*crossover*) dizains, kurā katrs dzīvnieks dažādos posmos kalpo gan kā eksperimentālā, gan kā kontroles vienība (Grizzle, 1965; Jones & Kenward, 2003).

Šis dizains tika izvēlēts, lai:

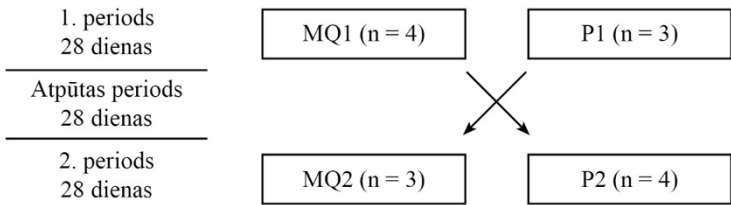
1. ievērotu 3R principu, samazinot pētījumā iekļauto dzīvnieku skaitu, vienlaikus saglabājot pietiekamu datu apjomu;
2. iegūtu informāciju par iespējamu *carryover* jeb vēlīnu ietekmi, kas var izpausties atkārtotas ekspozīcijas laikā (Mills et al., 2009; Wellek & Blettner, 2012).

Pētījuma laiks tika sadalīts trīs posmos (skat. 1.1. attēlu):

- 1. periods: 0.-28. diena;
- atpūtas periods: 28.-56. diena (bez manipulācijām);
- 2. periods: 56.-84. diena.

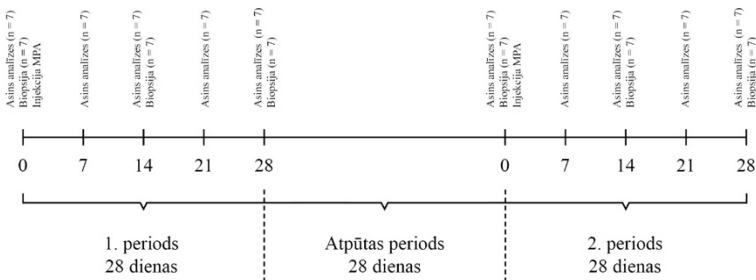
Dzīvnieki pēc nejaušības principa tika sadalīti divās grupās (4 un 3 dzīvnieki). Pirmajā periodā grupas apzīmētas kā MQ1 (MPA + MitoQ) un P1 (MPA +

placebo). Otrā perioda sākumā grupas tika mainītas atbilstoši pārējas principam: bijusi P1 kļuva par MQ2, bet MQ1 – par P2 (skat. 1.1. attēlu).



1.1. att. Krusteniskā pētījuma dizaina shematisks attēlojums/ Schematic representation of the crossover study design
 „MQ1” un/and „MQ2” – dzīvnieku grupas, kuras saņēma mitokvinola mezilātu/ *animal groups receiving mitoquinol mesylate*;
 „P1” un/and „P2” – dzīvnieku grupas, kuras saņēma placebo – tapiokas pulveri/ *animal groups receiving placebo – tapioca powder*.

Asins paraugi tika iegūti ik pēc septiņām dienām piecas reizes katrā periodā: 0., 7., 14., 21. un 28. dienā. Aknu biopsijas tika veiktas 0., 14. un 28. dienā (skat. 1.2. attēlu).



1.2 att. Eksperimentālā pētījuma norises laikā veikto manipulāciju shematisks attēlojums/ Schematic representation of procedures performed during the experimental study

1.3. Dzīvnieku klīniskā izmeklēšana un veselības stāvokļa novērtēšana

Dzīvnieku klīniskā izmeklēšana tika veikta pēc vispārpieņemtas veterinārās klīniskās izmeklēšanas shēmas (Jemeljanovs et al., 2007). Vispārējā izmeklēšana ietvēra inspekciju un palpāciju, dzīvnieku uzvedības/temperamenta novērtējumu, kondīcijas izvērtēšanu, ādas un apmatojuma stāvokli, virspusējo limfmezglu palpāciju, gļotādu stāvokļa novērtēšanu un rektālās temperatūras mērījumu. Speciālās izmeklēšanas laikā izvērtēta asinsrites un elpošanas sistēma (pulss, sirds auskultācija, elpošanas biežums, plaušu auskultācija).

1.4. Asins paraugu iegūšana

Asins paraugi iegūti no v. *cephalica*, ievērojot aseptikas principus, izmantojot intravenozu katetru. Paraugi tika savākti seruma vakutaineros bioķīmiskajai analīzei. Seruma atdalīšanai asinis centrifugēja, un bioķīmiskā analīze tika veikta ar automātisko analizatoru. kAP aktivitāte noteikta pēc termostabilā izofermenta principa, veicot seruma inkubāciju paaugstinātā temperatūrā pirms enzīma aktivitātes mērījuma (Teske, 1999).

1.5. Aknu audu paraugu iegūšana

Aknu biopsijas veiktas ultrasonogrāfijas kontrolē saskaņā ar WSAVA vadlīnijām (Rothuizen et al., 2006). Sedācijai izmantots propofols, un papildus veikta lokāla anestēzija ar lidokaīnu. Dzīvnieki procedūras laikā novietoti labajā laterālajā gulā; biopsija veikta, izmantojot *TrueCut* adatu ar biopsijas aparātu. Pēc parauga iegūšanas tika veikta pēcaprūpes ultrasonogrāfiska kontrole, lai mazinātu asiņošanas risku.

1.6. 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 termostabilais izoferments. Pēc apstrādes fermenta aktivitāte tika noteikta ar iepriekš minēto analizatoru.

1.7. 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.

Iegūtie aknu audu paraugi tika sagatavoti pēc vispārpieņemtas histoloģiskās metodikas: fiksēti formalīnā, rutīni apstrādāti autoprocēsorā, ieguldīti parafīnā un sagatavoti parafīna bloki. No blokiem tika sagatavoti griezumī histoloģiskai, imūnhistoķīmiskajai un imūnfluorescentajai analīzei.

Aknu audu griezumī tika krāsoti ar hematoksilīna-eozīna (H&E) metodi aknu parenhīmas morfoloģiskā stāvokļa novērtēšanai un ar perjodskābes-Šifa (PAS) metodi glikogēna noteikšanai. Imūnhistoķīmiskā krāsošana tika veikta, izmantojot Dako EnVision HRP sistēmu ar antivielu pret α -gludo muskuļu aktīnu (α -SMA), lai izvērtētu aktivēto stellāta šūnu daudzumu. Hepatocītu kodolu un mitohondriju morfoloģijas analīzei tika veikta imūnfluorescentā krāsošana, mitohondriju iezīmēšanai izmantojot anti-TOMM20 antivielu, bet kodolu iezīmēšanai – DAPI; preparāti tika analizēti ar konfokālo lāzera skenējošo mikroskopiju.

1.8. 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 (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:

1. hepatocīti nav izmainīti – nav pārmaiņu;
2. līdz 1/3 redzes laukā izmainītu hepatocītu, redzams tīklojums, maz vakuolu vai to nav, kodoli centrā – vieglas pārmaiņas;
3. līdz 2/3 redzes laukā izmainītu hepatocītu, redzams tīklojums un vakuolas, lielākajai daļai kodolu novietojums perifērijā – vidēji smagas pārmaiņas;
4. gandrīz visi hepatocīti izmainīti, redzams izteikts tīklojums, dažāda izmēra vakuolas, kodoli šūnu perifērijā – smagas pārmaiņas.

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

Segmentkodolaino neitrofilo leukocītu infiltrāciju aknu parenhīmā un asinsvados novērtējām, nosakot vidējo šūnu skaitu $\pm$ standartkļūda vienā mikroskopa redzes laukā (Szarek et al., 2014).

Novērotās pārmaiņas tika nosacīti iedalītas četrās grupās.

1. Leukocītu nav – negatīvs;
2. 1-10 leukocīti vienā redzes laukā – mazs leukocītu daudzums;
3. 10-20 leukocīti vienā redzes laukā – vidēji daudz leukocītu;
4. 20-40 leukocīti vienā redzes laukā – daudz leukocītu.

Perjodskābes-Šifa (PAS) krāsoto paraugu mikroskopiskā analīze. PAS krāsojuma katrā paraugā desmit mikroskopa redzes laukos tika noteikta glikogēna uzkrāšanās (Young et al., 2011; 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 kategorijās pēc Szarek et al. (2014).

1. Glikogēna nav – negatīvs;
2. Glikogēns konstatēts mazāk nekā 1/3 šūnu – vieglas pārmaiņas;
3. Glikogēns konstatēts līdz 2/3 šūnu – vidēji smagas pārmaiņas;
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 kodolu skaitu $\pm$ standartkļūda 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 diapazonu, un pirms mērījumiem tika veikta kanālu atdalīšana. DAPI fluorescences signāls tika analizēts 405 nm (DAPI) kanālā, savukārt TOMM20 imunofluorescences 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).

1.9. Datu statistiskā analīze

Visi KP un EP dati apkopoti un analizēti ar aprakstošās statistikas metodēm. Ekstrēmi novērojumi pārbaudīti ar Grubsa testu un vizuālo novērtējumu (*box-plot*). Normalitāte pārbaudīta ar Šapiro-Vilka testu.

Asins bioķīmiskajiem rādītājiem (ALAT, GGT, AP, kAP) aprēķināts vidējais $\pm$ SEM. Morfometriskajiem un fluorescences rādītājiem aprēķināts vidējais $\pm$ SD. Divu neatkarīgu grupu salīdzināšanai izmantots *Mann-Whitney U* tests, bet dinamiskai analīzei vienas grupas ietvaros dažādos laika punktos – *Wilcoxon Signed-Rank* tests. Semikvantitatīvie dati (0-3) analizēti ar neparametriskām metodēm atbilstoši ordinālai skalai. Atšķirības uzskatītas par statistiski ticamām pie $p < 0,05$; papildus vērtētas tendences ($0,05 < p < 0,1$). Datu apstrāde un vizualizācija veikta *IBM SPSS Statistics 23* un *Microsoft Excel*.

2. PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA

2.1. Klīniskās izmeklēšanas rezultāti

Klīniskā izmeklēšana tika veikta, lai sistemātiski novērtētu un kontrolētu dzīvnieku vispārējo veselības stāvokli visā pētījuma laikā, kā arī savlaicīgi konstatētu potenciālas ar kortikosteroīdu lietošanu saistītas blaknes. Klīniskajā pētījumā (KP) klīniskā novērtēšana bija cieši saistīta ar suņu pamatdiagnozēm un klīnisku terapijas nepieciešamību, jo tajā tika iekļauti dzīvnieki ar dažādām patoloģijām, kuru ārstēšanā pamatoti tika lietots metilprednizolona acetāts. Līdz ar to KP daļā klīniskie rādītāji netika iekļauti statistiskajā analīzē, jo tos potenciāli ietekmēja gan pamatslimība, gan vienlaicīgā terapija.

Eksperimentālajā pētījumā (EP) visiem dzīvniekiem tika veikta regulāra klīniskā izmeklēšana paredzētajos laika punktos un papildus pēc nepieciešamības, fokusējoties uz vispārējās pašsajūtas izmaiņām, ķermeņa masas dinamiku, apetīti, slāpju intensitāti, uzvedību, gļotādu krāsu, hidratācijas statusu, kā arī uz iespējamām gastrointestinālām, respiratorām vai ādas izmaiņām. Visa EP laikā netika konstatētas klīniski nozīmīgas izmaiņas suņu veselības stāvoklī. Tādēļ turpmākajās rezultātu sadaļās klīniskie novērtējumi atsevišķi netika analizēti.

Šis atradums ir būtisks, jo tas atspoguļo tipisku klīnisko situāciju: pat pie izteiktām bioķīmiskām un histoloģiskām izmaiņām, kas raksturīgas steroīdu hepatopātijai, klīniskās pazīmes suņiem var nebūt redzamas vai var būt minimālas. Tas nozīmē, ka klīniskā izmeklēšana nav pietiekama, lai agrīni identificētu aknu morfofunkcionālo atbildi uz ilgstošas darbības kortikosteroīdu lietošanu, un nepieciešama mērķtiecīga laboratoriskā un, ja nepieciešams, morfoloģiskā monitorēšana.

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

2.2.1. Aknu funkcionālā stāvokļa izmaiņas KP suņiem pēc MPA ievadīšanas

Klīniskajā pētījuma daļā aknu funkcionālais stāvoklis tika novērtēts suņiem ar patoloģijām ($n = 14$), kuri saņēma ilgstošas darbības metilprednizolona acetātu (MPA; 2 mg kg^{-1}) un papildus nesaņēma hepatoprotektantu (grupa Nr. 1). Asins paraugi tika iegūti 0., 14., 30. un 45. dienā (kopā $n = 56$), nosakot ALAT, GGT, AP un kAP aktivitāti serumā. Kopējā dinamika norādīja uz izteiktu enzīmu aktivitātes pieaugumu ar maksimumu 14. dienā un pakāpenisku samazināšanos turpmākajos laika punktos, tomēr atsevišķiem rādītājiem saglabājoties paaugstinātiem arī 45. dienā.

Pēc MPA ievadīšanas ALAT aktivitāte 14. dienā statistiski būtiski ($p < 0,05$) pieauga līdz $206,4 \pm 28,8 \text{ U L}^{-1}$, kas atbilda 3,0 reizu palielinājumam salīdzinājumā ar 0. dienu ($69,2 \pm 8,0 \text{ U L}^{-1}$). 30. dienā ALAT joprojām bija statistiski būtiski paaugstināts ($177,6 \pm 19,5 \text{ U L}^{-1}$; 2,6 reizes pret 0. dienu). 45. dienā novērota lejupslīde līdz $113,5 \pm 48,8 \text{ U L}^{-1}$ (1,6 reizes pret 0. dienu), un šajā laika punktā atšķirība vairs nebija statistiski nozīmīga ($p > 0,05$) (skat. 2.1. tabulu).

GGT raksturoja straujš pieaugums 14. dienā: aktivitāte statistiski būtiski ($p < 0,05$) palielinājās līdz $19,6 \pm 4,4 \text{ U L}^{-1}$ (3,9 reizes pret 0. dienu: $5,0 \pm 0,7 \text{ U L}^{-1}$). GGT saglabājās virs sākotnējā līmeņa arī 30. dienā ($17,8 \pm 3,5 \text{ U L}^{-1}$; 3,6 reizes), bet atšķirība vairs nebija statistiski nozīmīga ($p > 0,05$). 45. dienā vērtība samazinājās līdz $9,8 \pm 6,2 \text{ U L}^{-1}$ (2,0 reizes pret 0. dienu; $p > 0,05$) (skat. 2.1. tabulu).

AP aktivitāte pēc MPA ievadīšanas pieauga īpaši izteikti: 14. dienā tā statistiski būtiski ($p < 0,05$) paaugstinājās $412,8 \pm 75,3 \text{ U L}^{-1}$, kas atbilda apmēram 7,0 reizu pieaugumam salīdzinājumā ar 0. dienu ($59,2 \pm 5,5 \text{ U L}^{-1}$). 30. dienā aktivitāte saglabājās statistiski būtiski paaugstināta ($329,2 \pm 46,7 \text{ U L}^{-1}$; 5,6 reizes). 45. dienā AP samazinājās līdz $157,2 \pm 86,4 \text{ U L}^{-1}$ (2,7 reizes), tomēr joprojām statistiski būtiski pārsniedza 0. dienas līmeni ($p < 0,05$) (skat. 2.1. tabulu).

kAP uzrādīja visizteiktāko un noturīgāko dinamiku: 14. dienā aktivitāte statistiski būtiski ($p < 0,05$) pieauga līdz $265,1 \pm 41,4 \text{ U L}^{-1}$, kas bija aptuveni 21,2 reizes virs 0. dienas ($12,5 \pm 2,2 \text{ U L}^{-1}$). 30. dienā kAP saglabājās statistiski būtiski paaugstināts ($210,4 \pm 36,6 \text{ U L}^{-1}$; 16,8 reizes). 45. dienā vērojama samazināšanās līdz $79,4 \pm 26,8 \text{ U L}^{-1}$ (6,4 reizes), tomēr aktivitāte joprojām bija statistiski būtiski augstāka nekā sākotnēji ($p < 0,05$). Relatīvās izmaiņas (reizes pret 0. dienu) apkopotas 3.1. tabulā, kur redzams, ka maksimums lielākajai daļai rādītāju bija 14. dienā, bet AP un īpaši kAP saglabāja nozīmīgu pārsniegumu arī 45. dienā (skat. 2.1. tabulu).

2.1. tabula/ Table 2.1.

Aknu enzīmu aktivitātes palielinājums (reizes) salīdzinājumā ar sākuma vērtībām KP suņiem pēc MPA ievadīšanas/ Increase in liver enzyme activity (fold change) compared to baseline values in CS dogs after MPA administration

Ferments/Enzyme	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/ compared to day 0

KP iegūtie dati ir ļoti raksturīgi ilgstošas darbības kortikosteroīdu farmakodinamikai: pēc vienreizējas MPA injekcijas veidojas ilgstoša sistēmiska bioloģiskā iedarbība, kas klīniski var izpausties ar ilgstošu metabolu adaptāciju aknās. Šajā kontekstā ir svarīgi uzsvērt divus aspektus. Pirmkārt, ALAT KP grupā reaģēja ar strauju pieaugumu un saglabāja statistisku nozīmību arī 30. dienā. Tā kā ALAT suņiem ir relatīvi jutīgs hepatocelulāru bojājumu rādītājs, šāds profils var norādīt uz hepatocītu metabolu pārslodzi kortikosteroīdu ietekmē. Tomēr ALAT kritums 45. dienā, zaudējot pirms tam konstatēto statistisko būtiskumu, var norādīt uz to, ka notiek adaptācija un/vai daļēja reversija, nevis progresējošs bojājums. Praktiskajā veterinārmedicīnā tas nozīmē, ka ALAT var būt labs agrīns MPA iedarbības rādītājs, bet tas ne vienmēr korelē ar klīnisko ainu un var normalizēties ātrāk nekā citas steroīdu inducētas izmaiņas.

Otrkārt, AP un kAP veterinārmedicīnā ir uzskatāmi par galvenajiem kortikosteroīdu izraisītiem bioķīmiskajiem rādītājiem, un KP grupas dati to apstiprina gan pēc pieauguma apjoma (AP – apmēram 7 reizes, kAP – apmēram 21 reizi), gan pēc noturības, jo statistiski nozīmīgs paaugstinājums saglabājās arī 45. pētījuma dienā. Šie rādītāji ir īpaši nozīmīgi suņiem, jo kAP izoforma ir suņiem specifiska un atspoguļo tieši kortikosteroīdu inducētu aktivitātes pieaugumu šai sugai. Līdz ar to izteikts un ilgstošs kAP paaugstinājums var kalpot kā praktisks signāls par turpinošu kortikosteroīdu ietekmi uz aknu enzīmu profilu arī tad, ja citi rādītāji (piemēram, ALAT) jau sāk normalizēties.

Papildus jāņem vērā, ka KP dzīvniekiem bija pamatslimības. Tieši tāpēc turpmākā salīdzināšana ar EP (sākotnēji klīniski veselīem dzīvniekiem) ir būtiska, lai nošķirtu kortikosteroīdu farmakoloģisku efektu no situācijām, kur sistēmiskā slodze, iekaisums vai hroniskas problēmas pastiprina aknu reakciju uz MPA.

2.2.2. Aknu funkcionālā stāvokļa izmaiņas EP suņiem pēc MPA ievadīšanas

Eksperimentālajā pētījumā aknu funkcionālais stāvoklis tika novērtēts klīniski veselīem suņiem ($n = 7$) pēc MPA ievadīšanas (2 mg kg^{-1}). Lai analizētu pēc iespējas izolētu kortikosteroīda ietekmi uz bioķīmiskajiem rādītājiem, šajā apakšnodaļā izvērtēti dzīvnieki, kas saņēma MPA un placebo (tapiokas pulveri) – P grupa. Asins paraugi tika iegūti 0., 7., 14., 21. un 28. dienā (kopā $n = 35$), nosakot ALAT, GGT, AP un kAP aktivitāti serumā.

ALAT aktivitāte pieauga mēreni: 7. dienā līdz $72,83 \pm 7,99 \text{ U L}^{-1}$ (1,6 reizes virs 0. dienas $45,83 \pm 6,52 \text{ U L}^{-1}$), 14. dienā līdz $75,54 \pm 11,23 \text{ U L}^{-1}$, 21. dienā līdz $69,87 \pm 10,18 \text{ U L}^{-1}$ (1,5 reizes), bet 28. dienā samazinājās līdz $51,10 \pm 6,92 \text{ U L}^{-1}$, tuvojoties sākuma līmenim. Statistiski būtiskas izmaiņas ALAT netika konstatētas ($p > 0,05$) (skat. 2.2. tabulu).

GGT aktivitāte pieauga agrīni un saglabājās statistiski nozīmīga visos pēc 0. dienas mērījumos: 7. dienā līdz $11,37 \pm 0,86 \text{ U L}^{-1}$ (2,2 reizes; $p < 0,05$), 14. dienā līdz $14,36 \pm 1,14 \text{ U L}^{-1}$ (2,8 reizes; $p < 0,05$), 21. dienā $13,90 \pm 1,61 \text{ U L}^{-1}$ (2,7 reizes; $p < 0,05$) un 28. dienā $11,37 \pm 1,41 \text{ U L}^{-1}$ (2,2 reizes; $p < 0,05$) (skat. 2.2. tabulu).

AP aktivitāte 7. dienā statistiski būtiski pieauga līdz $210,16 \pm 30,74 \text{ U L}^{-1}$ (2,4 reizes; $p < 0,05$), 14. dienā saglabājās līdzīgā līmenī $213,47 \pm 36,29 \text{ U L}^{-1}$ (2,4 reizes; $p < 0,05$), 21. dienā sasniedza augstāko vidējo vērtību $242,97 \pm 54,54 \text{ U L}^{-1}$ (2,7 reizes; $p < 0,05$). 28. dienā aktivitāte samazinājās līdz $189,74 \pm 43,84 \text{ U L}^{-1}$ (2,1 reizes) un šajā laika punktā atšķirība vairs nebija statistiski nozīmīga ($p > 0,05$) (skat. 2.2. tabulu).

Septītajā dienā kAP aktivitāte statistiski būtiski palielinājās līdz $173,56 \pm 26,43 \text{ U L}^{-1}$ (2,2 reizes; $p < 0,05$), 14. dienā – līdz $177,33 \pm 29,14 \text{ U L}^{-1}$ (2,3 reizes; $p < 0,05$), 21. dienā saglabājās paaugstināta – $173,56 \pm 34,09 \text{ U L}^{-1}$ (2,2 reizes; $p < 0,05$), bet 28. dienā samazinājās līdz $134,77 \pm 32,03 \text{ U L}^{-1}$ (1,7 reizes; $p > 0,05$). Relatīvās izmaiņas apkopotas 3.2. tabulā: izteiktākās un statistiski nozīmīgākās izmaiņas skāra GGT, AP un kAP pirmajās 1–3 nedēļās, kamēr ALAT palielinājums bija mērenāks un statistiski nebūtisks (skat. 2.2. tabulu).

2.2. tabula/ Table 2.2.

Aknu enzīmu aktivitātes palielinājums (reizes) salīdzinājumā ar sākuma vērtībām EP suņiem pēc MPA ievadīšanas/ Increase in liver enzyme activity (fold change) compared to baseline values in ES dogs after MPA administration

Ferments/Enzyme	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/ compared to day 0

EP placebo grupā ir redzama MPA ietekme uz sākotnēji klīniski veseliem dzīvniekiem, un tā vairākos būtiskos aspektos atšķiras no KP grupas.

ALAT pieaugums EP grupā nav statistiski nozīmīgs, lai gan skaitliski vērojams neliels palielinājums (aptuveni 1,5 reizes). Tas var liecināt, ka klīniski veselie suņi hepatocītu funkcionālā rezerve ļauj kompensēt steroīdu izraisīto metabolisko slodzi bez izteikta hepatocelulāra enzīma pieauguma serumā. Līdz ar to ALAT EP apstākļos var nebūt pietiekami jutīgs rādītājs agrīnām steroīdai hepatopātijai raksturīgām pārmaiņām, pat ja aknu audos jau veidojas histoloģiskas izmaiņas.

Savukārt GGT, AP un kAP EP grupā pieaug statistiski nozīmīgi, tomēr pieauguma apjoms ir mērenāks nekā KP. Tas norāda, ka MPA arī klīniski

veseliem dzīvniekiem izraisa bioloģiski jūtam un laboratoriski izmērāmu ietekmi uz aknu enzīmu aktivitāti.

Salīdzinot EP un KP, AP aktivitātes pieauguma augstākais līmenis tika novērots atšķirīgos laika punktos: EP – 21. dienā, bet KP – 14. dienā. Šo atšķirību var saistīt ar farmakodinamiskās atbildes variāciju starp veseliem dzīvniekiem un dzīvniekiem ar patoloģijām, ko ietekmē atšķirīgs organisma stāvoklis (endogēnais hormonālais līdzsvars, iekaisuma mediatoru aktivitāte, metaboliskais stāvoklis). Klīniski tas ir nozīmīgi, jo norāda, ka vienāda MPA deva var radīt atšķirīgas enzīmu izmaiņas.

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

Lai tieši salīdzinātu aknu funkcionālā stāvokļa izmaiņas KP un EP pēc MPA ievadīšanas, analizētas enzīmu aktivitātes relatīvās izmaiņas (reizes pret 0. dienu) KP grupai bez hepatoprotektanta (grupa 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 2.3. tabulā.

2.3. tabula/ Table 2.3.

Aknu enzīmu aktivitātes salīdzinājums (reizes) KP un EP suņiem pēc MPA ievadīšanas/ Comparison of liver enzyme activity (fold change) between CS and ES dogs after MPA administration

Ferments / Enzyme	2 nedēļas/ 2 weeks		Attiecība starp grupām/ Ratio between groups	1 mēnesis/1 month		Attiecība starp grupām/ Ratio between groups
	KP/ CS	EP/ ES		KP/ CS	EP/ ES	
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

Kopumā viziteiktākās un statistiski apstiprinātās starpgrupu atšķirības attiecās uz AP un īpaši kAP, kas KP grupā bija daudzkārt augstāks un noturīgāks.

Šis salīdzinājums ir viens no vērtīgiem darba punktiem, jo tas parāda, ka slimība (pat ja tā nav primāra aknu slimība) būtiski pastiprina un pagarina aknu enzīmu paaugstinājumu pēc MPA lietošanas.

Īpaši svarīgs ir kAP rezultāts: KP tas ir vairāk nekā 9 reizes lielāks nekā EP abos mērījumu punktos. Tas norāda uz izteiktu steroīdu inducētu enzīmu aktivāciju KP suņiem. Iespējamie mehānismi var ietvert jau esošu sistemisku iekaisumu/stresu (palielināta hormonālā un citokīnu ietekme uz hepatocītu enzīmu izdali); atšķirības steroīdu farmakokinētikā (uzsūkšanās, saistīšanās, metabolizācijas ātrums), kas pie slimības var variēt vairāk.

Svarīgi uzsvērt, ka šie rādītāji nenozīmē obligāti lielāku klīnisku risku katram pacientam, lietojot kortikosteroīdus, bet nozīmē monitorēšanas nepieciešmību līdz 1,5 mēnesim vai ilgāk, pat pēc vienas MPA devas.

2.2.4. Aknu šūnu morfoloģiskās izmaiņas EP suņiem pēc MPA ievadīšanas

Histoloģiski tika analizēti EP placebo grupu (P) aknu bioptāti pēc MPA ievadīšanas, atsevišķi vērtējot pirmo aktīvo periodu (P1) un otro aktīvo periodu (P2) pēc atpūtas perioda. P1 grupā kopumā izvērtēti 9 bioptāti (0., 14. un 28. diena; katram dzīvniekam 3 paraugi), otrajā periodā P2 grupā – 12 bioptāti (0., 14. un 28. diena; katram dzīvniekam 3 paraugi).

Pirmais aktīvais periods (P1). Histoloģiskas pārmaiņas aknu parenhīmā 0. dienā P1 grupā netika konstatētas: hepatocīti ar viendabīgu citoplazmu, saglabātu lobulāro arhitektūru un bez izteiktām vakuolām (skat. 2.4. tabulu).

2.4. tabula/ Table 2.4.

Aknu histoloģisko izmaiņu kvantitatīvs raksturojums EP placebo grupu (P) suņiem pēc MPA ievadīšanas dažādos pētījuma laika punktos/
Quantitative characterization of liver histological changes in ES placebo group (P) dogs after MPA administration at different study time points

Dzīvnieku grupa/ Group	Izmaiņas hepatocītos/ Changes in hepatocytes			Neitrofilo leukocītu skaits*/ Number of neutrophilic leukocytes*		
	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/ *first active period group receiving placebo*;

P2 – otrā aktīvā perioda grupa, kurai pielietoja placebo/ *second active period group receiving placebo*;

* vidējais skaits 10 redzes laukos/ *mean count per 10 fields of view*.

Vēlāk, 14. dienā pēc MPA ievadišanas, P1 grupā tika novērotas steroīdai hepatopātijai raksturīgas smagas hepatocītu morfoloģiskās pārmaiņas: šūnu palielināšanās, izteikta citoplazmas vakuolizācija un lielai daļai hepatocītu perifēri novietoti kodoli. Pārmaiņas mazinājās 28. dienā līdz vidēji smagai pakāpei: vakuolizācija saglabājās, bet audu arhitektūra bija vienmērīgāka, kas norādīja uz daļēju reversiju (skat. 2.4. tabulu).

Segmentkodolaini neitrofīlie leukocīti 0. pētījuma dienā apskatītajos redzes laukos tika konstatēti ļoti reti (vidēji viens – redzes laukā, skat. 2.4. tabulu). Savukārt 14. dienā iezīmējās viegla iekaisuma komponentes aktivācija – neitrofīlo leukocītu skaits palielinājās līdz vidēji $1,86 \pm 0,26$ šūnām redzes laukā (vidējais skaits 10 redzes laukos), bet 28. dienā sasniedza $3,00 \pm 0,38$ šūnas redzes laukā. Infiltrācija saglabājās viegla un difūza, ar vienmērīgu šūnu izkliedi parenhīmā, bez perēklveida uzkrājumiem, bez strukturāli destruktīvām izmaiņām un bez nekrozes pazīmēm. Kopumā novērotā aina raksturojama kā lēni pieaugoša, zemas intensitātes neitrofīla reakcija, kas atspoguļo vieglu iekaisuma fonu.

Glikogēna akumulācija (PAS) P1 grupā 0. dienā netika novērota (negatīva reakcija). Tomēr 14. dienā glikogēna uzkrāšanās tika konstatēta visiem dzīvniekiem (pārsvarā viegla, atsevišķos paraugos vidēji smaga). 28. dienā tā saglabājās, turklāt relatīvi biežāk novērota vidēji smaga uzkrāšanās un izteiktāka lokalizācija periportālajās zonās (skat. 2.5. tabulu).

2.5. tabula/ Table 2.5.

Glikogēna akumulācijas un stellāta šūnu izmaiņu dinamika EP placebo grupu (P) suņiem pēc MPA ievadišanas dažādos pētījuma laika punktos/
Dynamics of glycogen accumulation and stellate cell changes in ES placebo group (P) dogs after MPA administration at different study time points

Dzīvnieku grupa/ Group	Glikogēna akumulācija (PAS) / Glycogen accumulation (PAS)			Stellāta šūnas/ Stellate cells (n/100 hepatocīti/ hepatocytes)		
	D0	D14	D28	D0	D14	D28
P1	Negatīva (0) / Negative	Vieglā (1) / Mild	Vidēji smaga (2) / Moderate	$1,6 \pm 0,38$	$4,57 \pm 0,37$	$5,4 \pm 1,58$
P2	Vieglā (1) / Mild	Vieglā (1) / Mild	Vidēji smaga (2) / Moderate	$5,00 \pm 0,76$	$4,71 \pm 0,47$	$3,86 \pm 0,74$

P1 – pirmā aktīvā perioda grupa, kurai pielietoja placebo/ *first active period group receiving placebo*;

P2 – otrā aktīvā perioda grupa, kurai pielietoja placebo/ *second active period group receiving placebo*.

Stellāta šūnu aktivācija (α -SMA) 0. dienā bija nenožīmīga ($1,6 \pm 0,38$ uz 100 hepatocītiem, mazs aktivēto stellāta šūnu daudzums). 14. dienā skaits palielinājās līdz $4,57 \pm 0,37$ (mazs aktivēto stellāta šūnu daudzums), bet 28. dienā – līdz $5,4 \pm 1,58$ uz 100 hepatocītiem (mazs aktivēto stellāta šūnu daudzums).

Otrais aktīvais periods (P2). Hepatocītu morfoloģiskās pārmaiņas 2. perioda sākumā (0. dienā) pilnībā nebija regresējušas, P2 grupā tās kopumā vērtētas kā vidēji smagas. Izmaiņas 14. dienā pēc MPA ievadīšanas saglabājās vidēji smagas, bez skaidras regresijas. 28. dienā daļai dzīvnieku vērojama daļēja mazināšanās, tomēr atsevišķos gadījumos izmaiņas saglabājās smagas, norādot uz nepilnīgu aknu struktūras atjaunošanos. Izmaiņas 28. dienā vidēji vērtētas, kā vidēji smagas (skat. 2.4. tabulu).

Neitrofilo leikocītu skaits saglabājās vieglas difūzas infiltrācijas robežās un būtiski neprogresēja: 0. dienā $3,00 \pm 0,62$; 14. dienā $2,29 \pm 0,42$; 28. dienā $2,14 \pm 0,26$ (skat. 2.4. tabulu).

Glikogēna akumulācija, atšķirībā no pirmā perioda, jau bija klātesoša vairumam dzīvnieku. 14. dienā uzkrāšanās kļuva izteiktāka, bet 28. dienā novērota tikai neliela regresija, saglabājoties PAS pozitīvām granulām lielākajā daļā hepatocītu (skat. 2.5. tabulu).

Stellāta šūnu aktivācija otrajā periodā persistēja: 0. dienā $5,00 \pm 0,76$; 14. dienā $4,71 \pm 0,47$; 28. dienā $3,86 \pm 0,74$ uz 100 hepatocītiem, kas norāda uz pakāpenisku mazināšanos, tomēr bez pilnīgas normalizācijas (skat. 2.5. tabulu).

Histoloģiskie rezultāti parāda to, ka MPA izraisa izteiktu, tipisku steroīdās hepatopātijas ainu ar hepatocītu vakuolizāciju un glikogēna akumulāciju bez izteiktās nekrozes un fibrozes.

Visiem suņiem no P1 grupas jau 14. dienā bija smagas hepatocītu izmaiņas. Hepatocītos aktivizējas glikogēna uzkrāšanās un citoplazmas pārbūve, kas histoloģiski izskatās kā hepatocītu vakuolizācija, palielinājums izmēros, kodolu pārvietošanās. Neitrofilo leikocītu skaita pieaugums P1 grupā bija lēns, difūzs un bez nekrozes. Tas vairāk atbilst zemas intensitātes iekaisuma fonam vai sinusoidu šūnu dinamikai kortikosteroīdu ietekmē, nevis primāram iekaisīgam hepatītam. α -SMA pozitīvo stellāta šūnu pieaugums P1 grupā no $1,6$ līdz $5,4$ uz 100 hepatocītiem rāda, ka fibroze neattīstās pēc vienas MPA devas, tomēr šūnu skaids noturīgi pieaug.

Hepatocītu morfoloģiskās izmaiņas P2 grupā 0. dienā (t.i. 56 dienas pēc MPA pirmās ievadīšanas) saglabājas vidēji smagas, konstatējama glikogēna akumulācija un paaugstināts stellāta šūnu skaits. Šis atradums ir īpaši nozīmīgs, jo tas parāda, ka vienreizēja ilgstošas darbības MPA klasiskā deva (2 mg kg^{-1}) var radīt ilgstošas morfoloģiskas izmaiņas, kuras saglabājas arī tad, kad bioķīmiskie rādītāji serumā jau ir normas robežās.

Pēc atkārtotas MPA ievadīšanas hepatocītu pārmaiņas 14. dienā P2 grupā saglabājas vidēji smagas. Šie rezultāti atšķiras no P1 grupas 14. dienas

rezultātiem, kur dominēja smagas pārmaiņas, un tas var norādīt uz zināmu šūnu adaptācijas mehānismu aktivizāciju pēc pirmās ekspozīcijas. 28. dienā P2 grupā daļai dzīvnieku novērota pakāpeniska regresija, tomēr glikogēna depoziācija un stellāta šūnu aktivācijas fons pilnībā neizzuda.

Īpaši svarīgi ir tas, ka visā histoloģiskajā analīzē netika konstatēta hepatocītu nekroze vai destruktīvas izmaiņas, kas ir raksturīgas akūtam hepatītam. Tādējādi iegūtie rezultāti atbalsta uzskatu, ka MPA izraisītās pārmaiņas galvenokārt ir metabolas un adaptīvas, nevis primāri citotoksiskas. Šis aspekts ir būtisks klīniskajā interpretācijā, jo tas nozīmē, ka laboratoriskās un histoloģiskās izmaiņas ne vienmēr korelē ar neatgriezenisku aknu bojājumu.

Interesanti ir tas, ka otrajā periodā pēc atkārtotas MPA ievadīšanas P2 grupas rezultāti nevienā mērījuma punktā būtiski neatšķiras no 0. dienas rezultātiem, kaut gan būtu sagaidama rezultātu pasliktināšanās.

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

2.3.1. 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 ilgstošas iedarbības MPA ievadīšanas hepatoprotektantu nesaņēma (grupa Nr. 1; $n = 14$), un suņiem, kuri papildus MPA saņēma hepatoprotektantu (grupa Nr. 2; $n = 14$). Statistiskā ticamība norādīta katrā grupā salīdzinājumā ar 0. dienas vērtību un starp grupām konkrētajās dienās ($p < 0,05$).

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. Savukārt, grupā Nr. 1, kurai hepatoprotektants netika lietots, 14. dienā ALAT sasniedza $206,4 \pm 28,8 \text{ U L}^{-1}$, kas bija 3,0 reizes virs sākuma līmeņa ($p < 0,05$). Pētījuma 30. 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 ($p > 0,05$). Tikmēr suņu grupā Nr. 1, ALAT saglabājās statistiski būtiski paaugstināts – $177,6 \pm 19,5 \text{ U L}^{-1}$ (2,6 reizu pieaugums; $p < 0,05$). Enzīma 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; $p > 0,05$).

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

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. 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 ($p < 0,05$). 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 ($p > 0,05$). Tikmēr 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; $p < 0,05$). 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; $p > 0,05$).

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

Suņu grupā Nr. 2, kurai lietoja hepatoprotektantu, pēc metilprednizolona acetāta ievadīšanas AP aktivitāte strauji pieauga un 14. pētījuma dienā sasniedza $274,0 \pm 20,5 \text{ U L}^{-1}$, 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 – $412,8 \pm 75,3 \text{ U L}^{-1}$ jeb 7,0 reizes virs 0. dienas līmeņa ($p < 0,05$). 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 $221,2 \pm 18,1 \text{ U L}^{-1}$ (3,7 reizes virs sākuma līmeņa), bet suņu grupā Nr. 1, kurai hepatoprotektants netika lietots – $329,2 \pm 46,7 \text{ U L}^{-1}$ (5,6 reizes virs sākuma līmeņa). Dinamika starp grupām 45. pētījuma dienā 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; $p < 0,05$).

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 atšķirība starp grupām netika konstatēta ($p > 0,05$).

Kortikosteroīdu inducētā sārmainā fosfatāzes 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 reizu pieaugumam salīdzinājumā ar 0. dienu. 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 ($p < 0,05$). 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). 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; $p < 0,05$).

Neraugoties uz atšķirīgo pieauguma apjomu un noturību kAP, starp rādītājiem abās suņu grupās 14., 30. un 45. pētījuma dienā statistiski būtiska atšķirība netika konstatēta ($p > 0,05$).

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 2.6. tabulā.

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 ($p < 0,05$), salīdzinot ar 0. dienu (skat. 2.6. tabulu).

Pētījuma 30. dienā daļa rādītāju saglabājās izteiktāki paaugstināta: 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 statistiski nozīmīgi atšķirīgas ($p > 0,05$), kas liecina par šo parametru dinamisku stabilizēšanos (skat. 2.6. tabulu).

2.6. tabula/ Table 2.6.

Aknu enzīmu aktivitātes palielinājums (reizes) salīdzinājumā ar sākuma vērtībām KP suņiem pēc MPA ievadīšanas, lietojot hepatoprotektantu/
Increase in liver enzyme activity (fold change) compared to baseline values in CS dogs after MPA administration with hepatoprotective therapy

Ferments/ Enzyme	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*

* $p < 0,05$

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. 2.6. tabulu).

Lai objektīvāk novērtētu hepatoprotektanta ietekmi uz enzīmu aktivitātes dinamiku, tika veikts arī starpgrupu relatīvais salīdzinājums, aprēķinot 1. un 2. grupas enzīmu aktivitātes attiecību (reizes) katrā pētījuma laika punktā. Šāda pieeja ļāva kvantitatīvi novērtēt hepatoprotektanta lietošanas iespējamo aizsargājošo efektu, salīdzinot enzīmu pieauguma apjomu grupā bez hepatoprotektanta ar grupu, kurai tas tika lietots (skat. 2.7. tabulu).

ALAT aktivitātes pieaugums pētījuma 14. dienā 1. grupā, kurā nelietoja hepatoprotektantu, bija aptuveni 1,3 reizes lielāks nekā 2. grupā, kurā lietoja hepatoprotektantu, GGT – 1,6 reizes lielāks, AP – 1,5 reizes lielāks, bet kAP – 1,3 reizes lielāks.

Pētījuma 30. dienā saglabājās līdzīga tendence: ALAT aktivitāte 1. grupā bija 1,3 reizes augstāka nekā 2. grupā, GGT – 1,6 reizes, AP – 1,5 reizes, bet kAP – 1,3 reizes.

Pēdējā pētījuma dienā starpgrupu atšķirības saglabājās, īpaši AP un kAP. ALAT aktivitāte 1. grupā bija 1,8 reizes augstāka nekā 2. grupā, GGT – 2,0 reizes, AP – 1,8 reizes, bet kAP – 2,0 reizes (skat. 2.7. tabulu).

2.7. tabula/ Table 2.7.

Aknu enzīmu aktivitātes relatīvais salīdzinājums KP suņiem pēc MPA ievadīšanas, atkarībā no hepatoprotektanta lietošanas / Relative comparison of liver enzyme activity in CS dogs after MPA administration depending on hepatoprotective therapy use

Ferments/ Enzyme	Starpgrupu attiecība / Between-group ratio		
	D14	D30	D45
ALAT	1,3	1,3	1,8
GGT	1,6*	1,6*	2,0
AP	1,5*	1,5*	1,8
kAP	1,3	1,3	2,0

* $p < 0,05$

Kopumā relatīvā starpgrupu analīze parāda lielāku enzīmu aktivitātes pieaugumu suņiem, kuri hepatoprotektantu nesaņēma, kas norāda uz hepatoprotektanta iespējamu mazinājošu ietekmi uz MPA inducēto aknu enzīmu aktivitātes palielināšanos.

Hepatoprotektanta lietošana bija saistīta ar mērenāku enzīmu aktivitātes pieaugumu, tomēr ietekme nebija vienāda visiem rādītājiem. Tas norāda, ka hepatoprotektants var mazināt kopējo hepatocītu funkcionālo slodzi vai stabilizēt

šūnu membrānu procesus, bet mazāk ietekmē steroīdu inducētos regulācijas mehānismus, kas nosaka KAP pieaugumu.

Tas, ka starpgrupu atšķirības ne vienmēr sasniedza statistisko ticamību, visticamāk saistīts ar nelielu izlasi un izteiktu individuālo atbildes mainību klīniskos apstākļos. Tādēļ rezultāti vērtējami kā norāde uz iespējamu hepatoprotektanta labvēlīgu ietekmi atsevišķos aknu funkcijas rādītājos, vienlaikus saglabājot piesardzību, interpretējot to kā pilnīgu aizsardzību pret MPA izraisītām pārmaiņām.

2.3.2. Hepatoprotektīvās terapijas ietekme uz aknu funkcionālo stāvokli EP suņiem pēc MPA ievadīšanas

Eksperimentālajā pētījumā (EP) hepatoprotektanta mitokvinola mezilāta ietekme uz aknu funkcionālo stāvokli tika vērtēta, salīdzinot ALAT, GGT, AP un KAP aktivitātes dinamiku suņiem, kuri saņēma mitokvinola mezilātu (MQ), ar placebo (P) grupu. Rezultāti analizēti atsevišķi pirmajā aktīvajā periodā (MQ1 pret P1), otrajā aktīvajā periodā (MQ2 pret P2) un apkopotajos krusteniskā pētījuma datos (MQK pret PK). Statistiskā ticamība norādīta salīdzinājumā ar 0. dienu katrā grupā, savukārt starpgrupu atšķirības atzīmētas tikai tajos laika punktos, kur tās sasniedza $p < 0,05$.

Pirmajā aktīvajā periodā (MQ1 un P1) ALAT aktivitātes svārstības abās grupās bija nelielas un bez statistiski nozīmīgas dinamikas ($p > 0,05$), turklāt perioda noslēgumā 28. dienā ALAT abās grupās bija zemāks nekā sākumā (MQ1: $39,40 \pm 9,85 \text{ U L}^{-1}$ pret $56,65 \pm 1,21 \text{ U L}^{-1}$; P1: $33,40 \pm 5,84 \text{ U L}^{-1}$ pret $49,23 \pm 16,11 \text{ U L}^{-1}$) (skat. 2.8. un 2.9. tabulu). Tādējādi pirmajā periodā ALAT rādītāji neuzrādīja atšķirības starp MQ1 un P1.

2.8.tabula/ Table 2.8.

Aknu enzīmu aktivitātes palielinājums (reizes) salīdzinājumā ar sākuma vērtībām EP MQ1 grupai / Increase in liver enzyme activity (fold change) compared to baseline values in ES MQ1 group

Ferments / Enzyme	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 / compared to day 0

GGT pirmajā periodā abās grupās pieauga mēreni, tomēr statistiski nozīmīga atšķirība pret 0. dienu bija atsevišķos laika punktos un ļoti līdzīga starp starp grupām: P1 grupā 14. dienā (2,0 reizes; $p < 0,05$), savukārt MQ1 grupā 21. dienā (1,9 reizes; $p < 0,05$). Perioda noslēgumā 28. dienā GGT abās grupās samazinājās līdz līmenim, kas vairs statistiski neatšķīrās no sākuma (MQ1: 1,4; P1: 1,4 reizes; $p > 0,05$) (skat. 2.8. un 2.9. tabulu).

2.9. tabula/ Table 2.9.

Aknu enzīmu aktivitātes palielinājums (reizes) salīdzinājumā ar sākuma vērtībām EP P1 grupai / Increase in liver enzyme activity (fold change) compared to baseline values in ES P1 group

Ferments / Enzyme	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 / compared to day 0

Visizteiktākā atšķirība pirmajā periodā iezīmējās AP un kAP dinamikā. AP aktivitāte pieauga abās grupās, tomēr placebo grupā pieaugums bija izteiktāks un noturīgāks: P1 grupā AP bija statistiski nozīmīgi paaugstināts jau 7. dienā (2,7 reizes; $p < 0,05$) un saglabājās nozīmīgi paaugstināts arī 14. un 21. dienā (2,4 un 2,2 reizes; $p < 0,05$), bet MQ1 grupā AP pieaugums bija mērenāks (1,4-1,7 reizes) un bez statistiski būtiskas atšķirības visos laika punktos ($p > 0,05$), salīdzinot ar 0. dienu (skat. 2.8. un 2.9. tabulu).

Līdzīga aina bija kAP rādītāju dinamikai: P1 grupā kAP bija statistiski nozīmīgi paaugstināts 7.-21. dienā (2,6; 2,4; 2,1 reizes; $p < 0,05$), kamēr MQ1 grupā kAP pieaugums bija neliels (1,1-1,6 reizes) un bez statistiski nozīmīgas atšķirības ($p > 0,05$) (skat. 2.8. un 2.9. tabulu).

Kopumā pirmais aktīvais periods parādīja, ka mitokvinola lietošanas fonā enzīmu pieaugums bija mazāk izteikts, īpaši AP un kAP gadījumā, lai gan starpgrupu atšķirības šajā periodā kopumā netika apstiprinātas kā statistiski nozīmīgas ($p > 0,05$).

Otrajā aktīvajā periodā (MQ2 un P2) enzīmu izmaiņu dinamika bija izteiktāka un vienmērīgāka abās grupās, turklāt lielākajai daļai rādītāju statistiska nozīmība pret 0. dienu saglabājās vairākos mērījumu punktos.

ALAT rādītāji abās grupās pieauga aptuveni 1,9-2,0 reizes un bija statistiski nozīmīgi paaugstināti jau 7. dienā (MQ2: 2,0; P2: 1,9; $p < 0,05$), līdz 28. dienai (MQ2: 1,4; P2: 1,5; $p < 0,05$) (skat. 2.10. un 2.11. tabulu).

2.10. tabula/ Table 2.10.

Aknu enzīmu aktivitātes palielinājums (reizes) salīdzinājumā ar sākuma vērtībām EP MQ2 grupai/ Increase in liver enzyme activity (fold change) compared to baseline values in ES MQ2 group

Ferments / Enzyme	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 / compared to day 0

2.11. tabula/ Table 2.11.

Aknu enzīmu aktivitātes palielinājums (reizes) salīdzinājumā ar sākuma vērtībām EP P2 grupai/ Increase in liver enzyme activity (fold change) compared to baseline values in ES P2 group

Ferments / Enzyme	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 / compared to day 0

GGT aktivitātes pieaugums otrajā periodā bija visvairāk izteikts: MQ2 grupā 2,8-3,8 reizes, P2 grupā 2,7-3,5 reizes ar statistisku nozīmību visos laika punktos ($p < 0,05$), un arī 28. dienā saglabājās 2,9 reizes virs sākuma abās grupās.

AP un kAP rādītāji otrajā periodā abās grupās uzrādīja stabilu, statistiski nozīmīgu paaugstinājumu pret 0. dienu (AP aptuveni 2,0-2,9 reizes; kAP aptuveni 2,0-2,3 reizes līdz 21. dienai; $p < 0,05$), savukārt 28. dienā kAP abās grupās saglabājās 1,9 reizes virs sākuma līmeņa.

Svarīgi, ka, neskatoties uz līdzīgu pieauguma apjomu, starp MQ2 un P2 konkrētajos laika punktos statistiski nozīmīgas atšķirības netika konstatētas ($p > 0,05$).

Krusteniskā pētījuma apkopotajos datos (MQK un PK), kur apvienoti MQ1+MQ2 un P1+P2 rezultāti, vislabāk redzama kopējā tendence un samazinās individuālo svārstību ietekme.

Šajā apkopojumā ALAT rādītāji neuzrādīja statistiski nozīmīgas izmaiņas ne pret 0. dienu, ne starp grupām ($p > 0,05$), un 28. dienā abās grupās praktiski atgriezās sākuma līmenī (MQK: 1,0; PK: 1,1 reizes; skat. 2.12. un 2.13. tabulu).

2.12. tabula/ Table 2.12.

Aknu enzīmu aktivitātes palielinājums (reizes) salīdzinājumā ar sākuma vērtībām EP MQK grupai / Increase in liver enzyme activity (fold change) compared to baseline values in ES MQC group

Ferments / Enzyme	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 / compared to day 0

2.13. tabula/ Table 2.13.

Aknu enzīmu aktivitātes palielinājums (reizes) salīdzinājumā ar sākuma vērtībām EP PK grupai / Increase in liver enzyme activity (fold change) compared to baseline values in ES PC group

Ferments / Enzyme	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 / compared to day 0

Savukārt GGT un AP apkopojumā MQK grupā GGT bija statistiski nozīmīgi paaugstināts 7., 14. un 21. dienā (2,1; 2,3; 2,6 reizes; $p < 0,05$), bet 28. dienā saglabājās 2,0 reizes virs sākuma bez nozīmīgas atšķirības pret 0. dienu; PK grupā GGT bija statistiski nozīmīgs visos laika punktos, tostarp 28. dienā (2,2 reizes; $p < 0,05$) (skat. 2.12. un 2.13. tabulu).

AP rādītāju pieaugums pret 0. dienu MQK grupā sasniedza 1,8-1,9 reizes un bija statistiski nozīmīgs 7. un 21. dienā ($p < 0,05$), bet PK grupā AP pieaugums bija izteiktāks (2,4-2,7 reizes) un statistiski nozīmīgs 7.-21. dienā ($p < 0,05$), 28. dienā saglabājoties 2,1 reizes virs sākuma līmeņa un bija statistiski nenoizīmīgs (skat. 2.12. un 2.13. tabulu).

kAP rādītāji mēreni mazinājās (MQK 1,3-1,7; PK 1,7-2,3 reizes), un PK grupā tie bija statistiski nozīmīgi paaugstināti 7.-21. dienā ($p < 0,05$), kamēr MQK grupā kAP pieaugums kopumā nesasniedza statistisku būtiskumu (skat. 2.12. un 2.13. tabulu).

Vienlaikus arī krusteniskajā apkopojumā starpgrupu atšķirības konkrētajos laika punktos netika apstiprinātas kā statistiski nozīmīgas ($p > 0,05$), kas nozīmē, ka mitokvinola potenciālais pozitīvais efekts bioķīmiskajos rādītājos vairāk neizpaužas.

Kopumā EP grupas rezultāti parāda, ka MPA izraisa laboratoriski izmērāmu ietekmi arī sākotnēji klīniski veselīgiem dzīvniekiem, un visjutīgākie rādītāji šajā pētījuma dizainā bija GGT un AP, bet kAP – atkarībā no perioda. ALAT rādītāji biežāk bija ar nelielām, mazāk izteiktām svārstībām un bez stabilas statistiskas nozīmības apkopotajā analizē. Mitokvinola mezilāta lietošana pirmajā periodā saistījās ar mazāk izteiktu AP un kAP kāpumu, tomēr otrajā periodā un krusteniskajā kopsavilkumā dominēja MPA izraisītā enzīmu reakcija, un starpgrupu atšķirības lielākoties nesasniedza statistisku ticamību. Praktiski tas nozīmē, kā arī EP apstākļos, bez klīniskas slimības fona, pēc MPA ievadīšanas GGT un AP izmaiņas var saglabāties vairākas nedēļas.

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

Histoloģiski tika analizēti EP suņu MQ (MPA + mitokvinola mezilāts) grupu aknu biopātīti, atsevišķi izvērtējot pirmo aktīvo periodu (MQ1) un otro aktīvo periodu (MQ2) un salīdzinot tos ar P grupām.

Pirmais aktīvais periods (MQ1). Aknu parenhīmā histoloģiskas pārmaiņas 0. dienā netika konstatētas. MQ1 grupā 14. dienā pēc MPA ievadīšanas tika novērotas steroīdai hepatopātijai raksturīgas pārmaiņas – hepatocītu palielināšanās un vakuolizācija, tomēr pārmaiņu smagums daļai dzīvnieku bija mazāk izteikts nekā P1 grupā. Trīs no četriem dzīvniekiem izmaiņas tika vērtētas kā smagas, vienam – kā vidēji smagas. Salīdzinot ar P1 grupu, kur smagas izmaiņas dominēja visiem dzīvniekiem, MQ1 profilā bija vērojamas mērenākas morfoloģiskās izmaiņas. Vēlāk, 28. dienā, MQ1 grupā novērota izteiktāka regresija nekā P1 grupā: vairumā gadījumu pārmaiņas tika klasificētas kā vidēji smagas, audu arhitektūra bija vienmērīgāka, vakuolizācija mazāk izteikta (skat. 2.14. tabulu). Tas liecina par iespējamu ātrāku strukturālu stabilizāciju mitokvinola mezilāta lietošanas dēļ.

Histoloģiskās pārmaiņas dzīvniekiem MQ1 un P1 grupās / Histological changes in animals in the MQ1 and P1 groups

Dzīvnieku grupa / Group	Izmaiņas hepatocītos / Changes in hepatocytes			Neitrofilo leukocītu skaits*/ Number of neutrophilic leukocytes*		
	D0	D14	D28	D0	D14	D28
MQ1	0	2,8	2,0	0	2,0 ± 0,50	3,0 ± 0,96
P1	0	3,0	2,0	0	1,0 ± 0,58	3,0 ± 1,15

MQ1 – pirmā aktīvā perioda grupa, kurai pielietoja hepatoprotektantu mitokvinola mezilāts / *first active period group receiving the hepatoprotectant mitoquinol mesylate*;

P1 – pirmā aktīvā perioda grupa, kurai pielietoja tapiokas pulveri / *first active period group receiving tapioca powder (placebo)*;

*vidējais skaits 10 redzes laukos / *mean count per 10 fields of view*.

Neitrofilo leukocītu skaits pieauga līdzīgi kā placebo grupā, saglabājoties vieglai, difūzai infiltrācijai bez nekrozes vai perēklveida bojājumiem. Mitokvinola mezilāta lietošana šo parametru būtiski neietekmēja (skat. 2.14. tabulu).

MQ1 grupā 14. dienā konstatēta viegla līdz vidēji smaga glikogēna uzkrāšanās hepatocītos, līdzīgi kā P1 grupā. PAS pozitīva reakcija 28. dienā saglabājās, tomēr relatīvi mazāk izteikta nekā P1 grupā. Kvantitatīvā analīze neuzrādīja statistiski nozīmīgu atšķirību starp grupām.

Stellāta šūnu skaits pieauga no fizioloģiska līmeņa 0. dienā līdz augstākām vērtībām 14. un 28. dienā, tomēr aktivācija bija līdzīga P1 grupai. Tas norāda, ka mitokvinola mezilāts būtiski neietekmēja agrīnu stellāta šūnu aktivāciju.

Kopumā MQ1 periodā morfoloģiskās izmaiņas bija tipiskas steroīdai hepatopātijai, tomēr ar mērenu smagumu un regresijas pazīmēm.

Otrais aktīvais periods (MQ2). MQ2 grupā tika analizēti dzīvnieki, kuri pirmajā periodā bija saņēmuši placebo, bet otrajā periodā saņēma mitokvinola mezilātu MPA ekspozīcijas laikā.

Otrā perioda sākumā (0. dienā) hepatocītu morfoloģiskās pārmaiņas jau bija klātesošas, kas liecina par nepilnīgu strukturālu atjaunošanos pēc pirmā perioda (56 dienas no MPA ievadīšanas). Tās tika vērtētas kā vidēji smagas un bija salīdzināmas ar P2 grupas stāvokli. 14. dienā pēc atkārtotas MPA ievadīšanas MQ2 grupā visiem dzīvniekiem tika konstatētas smagas hepatocītu pārmaiņas. Šajā posmā morfoloģiskais profils bija līdzīgs P2 grupai (skat. 2.15. tabulu).

Histoloģiskās pārmaiņas dzīvniekiem MQ2 un P2 grupās/ *Histological changes in animals in the MQ2 and P2 groups*

Dzīvnieku grupa / Group	Izmaiņas hepatocītos / <i>Changes in hepatocytes</i>			Neitrofilo leukocītu skaits*/ <i>Number of neutrophilic leukocytes*</i>		
	D0	D14	D28	D0	D14	D28
MQ2	2,3	3,0	2,3	4,0 ± 1,53	3,0 ± 1,00	2,0 ± 1,00
P2	2,3	2,3	1,8	3,0 ± 1,73	2,0 ± 0,96	2,0 ± 0,50

MQ2 – otrā aktīvā perioda grupa, kurai pielietoja hepatoprotektantu mitokvinola mezilāts / *second active period group receiving the hepatoprotectant mitoquinol mesylate*;

P2 – otrā aktīvā perioda grupa, kurai pielietoja tapiokas pulveri / *second active period group receiving tapioca powder (placebo)*;

*vidējais skaits 10 redzes laukos / *mean count per 10 fields of view*.

Segmentkodolaino neitrofilo leukocītu skaits aknu parenhīmā otrajā aktīvajā periodā abās grupās bija līdzīgs un laika gaitā pakāpeniski samazinājās. Otrā perioda 0. dienā MQ2 grupā vidējais neitrofilo leukocītu skaits bija $4,0 \pm 1,53$ šūnas vienā redzes laukā, savukārt P2 grupā – $3,0 \pm 1,73$. Četrpadsmitajā dienā pēc atkārtotas MPA ievadīšanas neitrofilo leukocītu skaits samazinājās līdz $3,0 \pm 1,00$ šūnām MQ2 grupā un $2,0 \pm 0,96$ šūnām P2 grupā. Perioda beigās, 28. dienā, tas abās grupās šūnu skaits turpināja mazināties un sasniedza vidēji $2,0 \pm 1,00$ šūnas MQ2 grupā un $2,0 \pm 0,50$ šūnas P2 grupā. Visā novērojuma periodā starp grupām statistiski nozīmīgas atšķirības segmentkodolaino neitrofilo leukocītu skaitā netika konstatētas (skat. 2.15. tabulu).

Glikogēna uzkrāšanās MQ2 grupā 14. dienā bija izteiktāka nekā MQ1 pirmajā periodā, kas atspoguļo kumulatīvo kortikosteroīdu efektu. 28. dienā novērota daļēja regresija, tomēr PAS pozitīvās granulas saglabājās.

Stellāta šūnu skaits otrajā periodā bija augstāks jau 0. dienā nekā pirmajā periodā, kas norāda uz persistējošu šūnu aktivāciju. Tomēr 28. dienā vērojama tendence uz pakāpenisku mazināšanos abās grupās.

Īpaši nozīmīgs ir novērojums, ka dzīvniekiem, kuri pirmajā periodā saņēma mitokvinola mezilātu (MQ1), otrajā periodā, pat bez aktīvas antioksidanta lietošanas, morfoloģiskās izmaiņas bija mazāk izteiktas nekā P1 grupā un vairākos parametros tuvinājās MQ2 grupai. Šis fenomens norāda uz mitokvinola mezilāta atlikušās iedarbības (*carryover*) efektu, kas kļūva identificējams tieši krusteniskā pētījuma dizaina dēļ.

Atšķirībā no paralēla dizaina, krusteniskais modelis ļāva novērtēt ne tikai akūtu terapijas ietekmi, bet arī to, vai iepriekšēja mitohondriju aizsardzība var ietekmēt turpmāko aknu atbildi uz kortikosteroīdu ietekmi. Iegūtie dati liecina, ka mitokvinola mezilāts var stabilizēt hepatocītu un īpaši mitohondriju

funkcionālo rezervi tā, ka atkārtotas MPA ievadīšanas un ietekmes laikā strukturālās izmaiņas ir mazāk izteiktas.

Vienlaikus jāuzsver, ka šis efekts nebija absolūts un pilnībā neizslēdza steroidu inducētās pārmaiņas. Tomēr morfoloģiskā dinamika bija labvēlīgāka nekā dzīvniekiem bez iepriekšējas antioksidatīvas aizsardzības.

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

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

Hepatocītu kodolu morfoloģija tika analizēta, izmantojot DAPI fluorescences marķējumu un kvantitatīvus morfometriskos parametrus – kodola variācijas koeficientu un kodola *Feret* diametru. Kodola *Feret* diametrs garākais attālums starp diviem pretējiem punktiem objektā.

Pirmā aktīvā perioda 0. dienā abās grupās hepatocītu kodoli bija regulāras, apaļas formas ar vienmērīgu fluorescences sadalījumu. Variācijas koeficients un *Feret* diametrs atradās literatūrā aprakstītajās fizioloģiskajās robežās, kas liecināja par homogēnu kodolu populāciju (skat. 2.16. tabulu).

2.16. tabula/ Table 2.16.

Hepatocītu kodolu morfoloģisko parametru dinamika EP suņiem pirmajā periodā pēc MPA ievadīšanas ar un bez mitokvinola lietošanas / Dynamics of hepatocyte nuclear morphometric parameters in ES dogs during the first period after MPA administration with and without mitoquinol treatment

Rādītājs / Parameter	Grupa / Group	D0	D14	D28
Kodola variācijas koeficients / Nuclear coefficient of variation	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 / Nuclear (<i>Feret</i>) diameter, 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

14. dienā pēc MPA ievadīšanas abās grupās tika novērota izteikta kodolu morfoloģijas pārstrukturēšanās: DAPI signāls kļuva nevienmērīgs un kodolu

kontūras kļuva neregulāras. Kvantitatīvi tas izpaudās kā variācijas koeficienta palielināšanās un *Feret* diametra pieaugums. Šīs izmaiņas bija izteiktākas P1 grupā nekā MQ1 grupā, kur kodolu heterogenitātes pieaugums bija mērenāks. 14. dienā MQ1 grupā novērota parametru normalizācija – variācijas koeficients un *Feret* diametrs tuvinājās sākotnējām vērtībām (skat. 2.16. tabulu).

Šīs pārmaiņas interpretējamas kā kortikosteroīdu inducēta hepatocītu kodolu reakcija. Kodolu palielināšanās un hromatīna redistribūcija atspoguļo metaboliskas slodzes pieaugumu un nukleārās aktivitātes pastiprināšanos. Mitokvinola mezilāta lietošana šo procesu būtiski ietekmēja.

Otrā aktīvā perioda 0. dienā abās grupās kodolu parametri jau neatbilda literatūrā aprakstītajām fizioloģiskajām robežām un atšķīrās no 1. perioda 0. dienas. MQ2 grupā kodola variācijas koeficients bija $0,24 \pm 0,01$ un kodola *Feret* diametrs bija $10,93 \pm 0,15 \mu\text{m}$, savukārt P2 grupā rādītāji bija $0,33 \pm 0,03$ un $12,63 \pm 0,25$, attiecīgi. 14. dienā pēc MPA atkārtotas ievadīšanas abās grupās pastiprinājās kodolu heterogenitāte, ko atspoguļoja variācijas koeficienta pieaugums (MQ2: $0,28 \pm 0,01$; P2: $0,25 \pm 0,02$) un *Feret* diametra palielināšanās MQ2 grupā ($11,53 \pm 0,15 \mu\text{m}$), kamēr P2 grupā *Feret* diametrs būtiski nemainījās ($10,95 \pm 0,46 \mu\text{m}$). MQ2 grupā 28. dienā bija vērojama daļēja parametru atgriešanās sākotnējā līmenī (variācijas koeficients $0,25 \pm 0,01$; *Feret* diametrs $10,90 \pm 0,10 \mu\text{m}$), bet P2 grupā variācijas koeficients saglabājās paaugstināts ($0,27 \pm 0,02$), bet *Feret* diametrs bija tuvs 0. dienai ($10,48 \pm 0,33 \mu\text{m}$). nevienā no grupām (skat. 2.17. tabulu).

2.17. tabula/ Table 2.17.

Hepatocītu kodolu morfoloģisko parametru dinamika EP suņiem otrajā periodā pēc MPA ievadīšanas ar un bez mitokvinola lietošanas / Dynamics of hepatocyte nuclear morphometric parameters in ES dogs during the second period after MPA administration with and without mitoquinol treatment

Rādītājs / Parameter	Grupa / Group	D0	D14	D28
Kodola variācijas koeficients / Nuclear coefficient of variation	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 / Nuclear (<i>Feret</i>) diameter, μm	MQ2	$10,93 \pm 0,15$	$11,53 \pm 0,15$	$10,90 \pm 0,10$
	P2	$10,53 \pm 0,34$	$10,95 \pm 0,46$	$10,48 \pm 0,33$

Kopumā DAPI analīze apstiprina, ka MPA izraisa stabilas nukleārās arhitektūras izmaiņas, kuras pilnībā neatgriežas normas robežās pat vairāku nedēļu laikā. Mitokvinola mezilāts kodolu izmaiņas būtiski nemazināja.

2.4.2. 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 un kvantitatīvos morfometriskos parametrus – mitohondriju apaļīguma koeficientu, iegarenuma koeficientu un TOMM20 fluorescences vidējo intensitāti (AU) dažādos laika punktos.

Pirmā aktīvā perioda 0. dienā abās grupās mitohondriju morfoloģiskie rādītāji atbilda literatūrā aprakstītajām fizioloģiskajām robežām. MQ1 grupā apaļīguma koeficients bija $0,57 \pm 0,01$, iegarenuma koeficients – $2,20 \pm 0,08$, bet TOMM20 fluorescences vidējā intensitāte – 1230 ± 18 AU. Līdzīgas vērtības tika konstatētas arī P1 grupā (attiecīgi $0,59 \pm 0,01$; $2,20 \pm 0,10$; 1237 ± 20 AU), kas liecina par līdzīgu mitohondriju struktūras organizāciju abās grupās pirms MPA ievadīšanas (skat. 2.18. tabulu).

Abās grupās 14. dienā pēc MPA ievadīšanas tika novērotas izmaiņas mitohondriju morfometriskajos parametros. MQ1 grupā apaļīguma koeficients palielinājās līdz $0,75 \pm 0,03$, savukārt iegarenuma koeficients samazinājās līdz $1,60 \pm 0,08$, bet TOMM20 fluorescences intensitāte pieauga līdz 1488 ± 30 AU. P1 grupā izmaiņas bija izteiktākas: apaļīguma koeficients sasniedza $0,80 \pm 0,02$, iegarenuma koeficients samazinājās līdz $1,30 \pm 0,10$, bet TOMM20 fluorescences intensitāte palielinājās līdz 1780 ± 70 AU (skat. 2.18. tabulu).

MQ1 grupā 28. dienā tika novērota daļēja morfometrisko parametru stabilizācija: apaļīguma koeficients samazinājās līdz $0,64 \pm 0,01$, iegarenuma koeficients palielinājās līdz $1,90 \pm 0,08$, bet TOMM20 fluorescences intensitāte samazinājās līdz 1330 ± 18 AU. P1 grupā šajā laikā apaļīguma koeficients saglabājās relatīvi augstāks ($0,71 \pm 0,02$), iegarenuma koeficients bija $1,50 \pm 0,10$, bet TOMM20 fluorescences intensitāte – 1590 ± 55 AU (skat. 2.18. tabulu).

2.18. tabula/ Table 2.18.

Hepatocītu mitohondriju morfoloģisko parametru dinamika EP suņiem pirmajā periodā pēc MPA ievadīšanas ar un bez mitokvinola lietošanas /
Dynamics of hepatocyte mitochondrial morphometric parameters in ES dogs during the first period after MPA administration, with and without mitoquinol treatment

Rādītājs / Parameter	Grupa / Group	D0	D14	D28
Mitohondriju apaļīguma koeficients/ <i>Mitochondrial roundness coefficient (Detmer & Chan, 2007)</i>	MQ1	0,57 ± 0,01	0,75 ± 0,03	0,64 ± 0,01
	P1	0,59 ± 0,01	0,80 ± 0,02	0,71 ± 0,02
Iegarenuma koeficients/ <i>Elongation coefficient (Detmer & Chan, 2007)</i>	MQ1	2,20 ± 0,08	1,60 ± 0,08	1,90 ± 0,08
	P1	2,20 ± 0,10	1,30 ± 0,10	1,50 ± 0,10
Vidējā TOMM20 fluorescences intensitāte (AU)/ <i>Mean TOMM20 fluorescence intensity (AU)</i> (Harwig, 2018; Rickard et al., 2023)	MQ1	1230 ± 18	1488 ± 30	1330 ± 18
	P1	1237 ± 20	1780 ± 70	1590 ± 55

Kopumā pirmajā aktīvajā periodā MPA ievadīšana bija saistīta ar mitohondriju morfometrisku parametru izmaiņām abās grupās, tomēr MQ1 grupā 28. dienā novērota izteiktāka parametru tuvināšanās sākotnējām vērtībām, savukārt P1 grupā saglabājās lielākas novirzes no sākuma līmeņa.

Otrā aktīvā perioda 0. dienā mitohondriju morfoloģiskie rādītāji abās grupās jau nedaudz atšķīrās no fizioloģiskajām robežām. MQ2 grupā apaļīguma koeficients bija $0,66 \pm 0,02$, iegarenuma koeficients – $1,90 \pm 0,10$, bet TOMM20 fluorescences intensitāte – 1400 ± 20 AU. P2 grupā attiecīgie rādītāji bija $0,61 \pm 0,02$, $2,00 \pm 0,16$ un 1335 ± 38 AU (skat. 2.19. tabulu).

MQ2 grupā 14. dienā pēc atkārtotas MPA ievadišanas apaļīguma koeficients nedaudz samazinājās līdz $0,63 \pm 0,04$, iegarenuma koeficients samazinājās līdz $1,70 \pm 0,10$, bet TOMM20 fluorescences intensitāte palielinājās līdz 1650 ± 30 AU. P2 grupā apaļīguma koeficients palielinājās līdz $0,65 \pm 0,03$, iegarenuma koeficients bija $1,90 \pm 0,08$, bet TOMM20 fluorescences intensitāte – 1365 ± 46 AU (skat. 2.19. tabulu).

Apaļīguma koeficients 28. dienā MQ2 grupā samazinājās līdz $0,61 \pm 0,02$, iegarenuma koeficients palielinājās līdz $1,80 \pm 0,10$, bet TOMM20 fluorescences intensitāte samazinājās līdz 1500 ± 20 AU. P2 grupā šajā laikā apaļīguma koeficients bija $0,64 \pm 0,03$, iegarenuma koeficients – $1,78 \pm 0,14$, bet TOMM20 fluorescences intensitāte – 1383 ± 60 AU (skat. 2.19. tabulu).

2.19. tabula/ Table 2.19.

Hepatocītu mitohondriju morfoloģisko parametru dinamika EP suņiem otrajā periodā pēc MPA ievadišanas ar un bez mitokvinola lietošanas /
Dynamics of hepatocyte mitochondrial morphometric parameters in ES dogs during the second period after MPA administration, with and without mitoquinol treatment

Rādītājs / Parameter	Grupa / Group	D0	D14	D28
Mitohondriju apaļīguma koeficients/ <i>Mitochondrial roundness coefficient</i> (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/ <i>Elongation coefficient</i> (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)/ <i>Mean TOMM20 fluorescence intensity (AU)</i> (Harwig, 2018; Rickard et al., 2023)	MQ1	1400 ± 20	1650 ± 30	1500 ± 20
	P1	1335 ± 38	1365 ± 46	1383 ± 60

Kopumā otrajā aktīvajā periodā mitohondriju morfometrisko parametru izmaiņas abās grupās bija mērenas, un perioda beigās rādītāji tuvinājās sākotnējām vērtībām.

DAPI un TOMM20 analīze kopumā parāda divus atšķirīgus procesus:

1. Kodolu palielināšanās un heterogenitāte – dominējoši kortikosteroīdu farmakodinamiskas ietekmes rezultāts, kas nav ietekmēts ar mitokvinola lietošanu.
2. Mitohondriju fragmentācija un signāla heterogenitāte – strukturāla atbilde, kas ciešāk saistīta ar oksidatīvā stresa ietekmi un kuras dinamika bija pozitīva mitokvinola lietošanas fonā.

Tādējādi ultrastrukturālā analīze paplašina bioķīmisko un histoloģisko datu interpretāciju, parādot, ka pat gadījumos, kad serumā novērojama enzīmu stabilizācija, šūnu līmenī saglabājas noturīgas strukturālas pārmaiņas. Mitokvinola mezilāts var veicināt mitohondriju morfometrisko rādītāju stabilizēšanos (apaļīguma koeficients, iegarenuma koeficients, TOMM20 fluorescences vidējā intensitāte) un mazināt to svārstības pēc atkārtotas MPA ievadīšanas.

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 mezilātu ieteicams apsvērt kā papildterapiju gadījumos, kad konstatētas steroidās hepatopātijas pazīmes; ja laboratoriskie rādītāji pasliktinās vai saglabājas izteikti paaugstināti, jāizvērtē kortikosteroīda devas samazināšana, ievadīšanas intervāla pagarināšana vai terapijas maiņa.
4. Praktiskajā darbā ieteicams dot priekšroku terapijas shēmām ar labāku titrējamību (īsilaicīgas darbības preparāti, alternatīvas pretiekaisuma un imūnmodulējošas pieejas), kā arī ievērot pietiekamu intervālu starp atkārtotām ilgstošas darbības injekcijām.

INTRODUCTION

In veterinary medicine, corticosteroids are widely used due to their potent anti-inflammatory and immunosuppressive effects, which are essential in the treatment of various inflammatory, autoimmune, and allergic diseases. Despite their therapeutic effectiveness, the use of corticosteroids is associated with a range of potential side effects, including pancreatitis, diabetes mellitus, hypertension, cataract formation, and iatrogenic Cushing's syndrome. Nevertheless, despite these adverse effects, corticosteroids remain among the most commonly used pharmacological agents in veterinary medicine (Elkholly et al., 2020).

Corticosteroids affect multiple body systems, including the endocrine and hepatobiliary systems. Their prolonged use induces significant metabolic changes, including stimulation of gluconeogenesis, increased glycogen accumulation in hepatocytes, and disturbances in mitotic activity. Dogs exhibit marked sensitivity to the effects of corticosteroids at the hepatic level, which may lead to the development of corticosteroid-induced hepatopathy. This condition is characterized by hepatocellular vacuolization, peripheral displacement of nuclei, and pronounced glycogen accumulation, most commonly in centrilobular zones (Feldman & Nelson, 2004; Assawarachan et al., 2020; Karić et al., 2024).

An increase in liver enzyme activity, particularly alkaline phosphatase (ALP) and gamma-glutamyltransferase (GGT), is one of the earliest markers of corticosteroid effects. Corticosteroid-induced ALP (cALP) is a dog-specific isoenzyme whose presence reflects induced enzyme synthesis in hepatocytes rather than direct hepatocellular damage (Teske, 1999). Several studies indicate that histological liver changes do not always correlate with biochemical parameters, which complicates diagnosis and necessitates a morphofunctional approach (Oikonomidis & Milne, 2023; Tintle et al., 2023; Jablonski et al., 2024).

These processes are considered reversible; however, the duration of reversal and the dynamics of cellular structural recovery remain poorly documented (Jablonski et al., 2024). In her work, A. Kusaba (2024) emphasized that age and metabolic changes influence corticosteroid-induced enzyme activity, which may affect the regenerative potential of the liver.

The liver is one of the most functionally significant metabolic organs, playing a central role in the detoxification and elimination of various substances, including medications. These processes can alter hepatocellular function and contribute to the development of damage associated with oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and immune responses (Li et al., 2015; Wang, 2024; Borgne-Sanchez & Fromenty, 2025). Mitochondria provide hepatocytes with adenosine triphosphate (ATP) through oxidative phosphorylation. Disruptions in their structure or function, such as decreased efficiency of the respiratory chain, increased production of reactive oxygen species (ROS), or membrane

destabilization, can promote metabolic imbalance and activation of inflammatory pathways (Murphy, 2016; Spinelli & Haigis, 2018; Zhang et al., 2021). The role of oxidative stress in liver injury and its reversal is considered central and has been the focus of several recent review articles (Blanca et al., 2024; Perez-Montero et al., 2024).

These studies highlight the need for further experimental research to better understand the pathogenesis of liver changes, their long-term consequences, and the potential mechanisms of reversal when hepatoprotective agents are used. It has been demonstrated that certain compounds, such as S-adenosylmethionine, phosphorus-containing complexes, and vitamin preparations, can stabilize hepatocyte membranes (Center et al., 2005; Deniz et al., 2009). However, the literature still provides limited information on the effectiveness of these agents in corticosteroid-induced liver changes, particularly in dogs.

Aim and Hypothesis of the Doctoral Thesis

The doctoral thesis “*Corticosteroid-Induced Morphofunctional Changes in the Liver and Their Reversibility in Dogs*” is based on the following hypothesis: faster reversal of the liver’s morphofunctional state in dogs during corticosteroid administration is achievable with the use of hepatoprotective therapy.

The aim of the study is to evaluate the functional, morphological, and ultrastructural changes in the liver of dogs induced by long-acting methylprednisolone acetate, as well as to determine the effect of hepatoprotective therapy on the severity, dynamics, and reversibility of these changes.

Objectives of the Doctoral Thesis

1. To investigate changes in the functional and/or morphological state of the liver in clinically healthy dogs and dogs with pathologies following the administration of methylprednisolone acetate.
2. To determine whether hepatoprotective therapy can reduce changes in liver functional status in dogs during the use of methylprednisolone acetate.
3. To assess whether the use of the antioxidant mitoquinol mesylate influences the reversal process of pathological changes in liver tissue in dogs treated with methylprednisolone acetate.
4. To evaluate the effects of methylprednisolone acetate and the antioxidant mitoquinol mesylate on the ultrastructure of hepatocytes (nuclear and mitochondrial morphology).

Scientific Novelty of the Study

1. For the first time in veterinary medicine in Latvia, a comprehensive study has been conducted on changes in the morphofunctional state of the liver in experimental dogs following the administration of the long-acting corticosteroid methylprednisolone acetate.
2. New, scientifically significant data have been obtained on corticosteroid-induced ultrastructural and functional alterations in hepatocytes, expanding current knowledge of the pathogenetic mechanisms of corticosteroid hepatopathy.
3. For the first time, the effectiveness of various hepatoprotective agents in stabilizing liver functional status and their potential role in mitigating corticosteroid-induced changes in dogs has been systematically evaluated.
4. For the first time, the antioxidant mitoquinol mesylate has been experimentally applied in a canine model, providing new data on its potential influence on the reversal of pathological liver tissue changes in steroid-induced hepatopathy.

Author's Personal Contribution

The author of the doctoral thesis independently developed the research concept and designed the experimental part, including the crossover study design, ensured the implementation of the study, and carried out data collection at all stages of the research. The author performed the selection of animals included in the clinical study, organized medication administration protocols, and ensured the collection of biological samples at predefined time points. The author prepared, processed, and analyzed blood samples, as well as compiled and interpreted the obtained laboratory results.

In the experimental part, the author independently performed the collection and processing of liver biopsy samples, including fixation, trimming, and embedding in cassettes, and coordinated the preparation of histological slides. The author conducted histological examination of liver tissue and evaluated PAS-stained samples to determine glycogen accumulation. The author planned immunohistochemical investigations and interpreted their results, as well as analyzed ultrastructural changes in hepatocytes using immunofluorescence techniques. The author performed statistical analysis of all obtained data, prepared graphical and tabular representations of the results, and interpreted and compared them with the scientific literature.

The author ensured the presentation of the study results at scientific conferences and their use in the preparation of scientific publications.

1. MATERIALS AND METHODS

1.1. Study Period, Location, and Description of the Material

Sample collection and analysis were carried out in two parts: a clinical study (CS) and an experimental study (ES).

Clinical study (CS). The study subjects were selected based on the following criteria:

1. animals had a previously established diagnosis for which the long-acting corticosteroid methylprednisolone acetate (MPA) was used at a dose of 2 mg kg⁻¹;

2. there were no data in the medical history or clinical examination indicating liver pathology;

3. blood tests showed no abnormalities suggestive of liver dysfunction prior to therapy.

In the CS, blood serum samples were collected for diagnostic purposes in several veterinary clinics in Riga between January 2013 and January 2014. The use of samples was approved by clinic management and animal owners. As the samples were obtained as a part of routine clinical care, no additional procedures were performed for research purposes, and therefore no additional pain or discomfort was caused.

After selection, 28 adult dogs of different ages, sexes, and breeds were included in the study. Four blood samples from each animal were analyzed, resulting in a total of 112 samples processed.

Experimental study (ES). Seven clinically healthy, two-year-old, intact female Beagle dogs were included in the ES (permit No. 70 issued by the Latvia Food and Veterinary Service). The animals were purchased from an EU-certified experimental animal breeding facility in France. The experimental study was conducted at the Preclinical Institute of the Faculty of Veterinary Medicine, Latvia University of Life Sciences and Technologies, from April 10, 2015 to July 31, 2015.

Before and during the ES, the animals were housed in the Experimental Animal Facility of the Faculty of Veterinary Medicine, in compliance with animal welfare requirements, including regular cleaning of the premises, environmental enrichment, daily human interaction, and access to an outdoor enclosure. The animals were fed commercially produced complete diets, and drinking water was available *ad libitum*. They were vaccinated and regularly treated against ecto- and endoparasites.

During the experiment, blood and liver tissue samples were collected from each animal at predefined time points, resulting in a total of 70 blood samples and 42 liver samples.

1.2. Overall Study Design

Clinical study. The animals were conditionally divided into two groups:

- Group 1: received only the corticosteroid.
- Group 2: received a hepatoprotective agent in addition to the corticosteroid injection.

The corticosteroid used was long-acting methylprednisolone acetate (Depo-Medrol 40 mg mL⁻¹), administered intramuscularly once on day 1 of the study at a dose of 2 mg kg⁻¹. In the clinical study, the hepatoprotective preparation GlutaMax was used, containing extracts of milk thistle (*Silybum marianum*), turmeric (*Curcuma longa*), and artichoke (*Cynara scolymus*) as its main components. It was administered orally once daily for 45 days, starting from day 0 of the study. The dose was calculated according to the manufacturer's recommendations (1 tablet per 15 kg body weight).

To evaluate the potential effect of the hepatoprotective agent on corticosteroid-induced liver changes, the following serum parameters were measured: alanine aminotransferase (ALT), gamma-glutamyltransferase (GGT), alkaline phosphatase (ALP), and corticosteroid-induced thermostable alkaline phosphatase (cALP). Blood samples were collected on days 0, 14, 30, and 45, counting from the day of corticosteroid administration.

Experimental study. Methylprednisolone acetate (Depo-Medrol 40 mg mL⁻¹) was used as the corticosteroid and administered intramuscularly once on the first day of the study at a dose of 2 mg kg⁻¹.

As a hepatoprotective agent, mitoquinol mesylate (MitoQ) was selected and administered orally at a dose of 20 mg per day. For control purposes, identical capsules containing tapioca powder (placebo) without the active substance were prepared to assess the specific effect of the active compound rather than excipients.

A two-treatment, two-period crossover design was used in the experimental setup, in which each animal served as both an experimental and a control subject at different stages (Grizzle, 1965; Jones & Kenward, 2003). This design was chosen to:

1. adhere to the 3R principle by reducing the number of animals included in the study while maintaining sufficient data volume;
2. obtain information on potential carryover effects that may manifest during repeated exposure (Mills et al., 2009; Wellek & Blettner, 2012).

The study period was divided into three phases (see Fig. 1.1):

- Period 1: days 0–28.
- Washout period: days 28–56 (no interventions).
- Period 2: days 56–84.

The animals were randomly divided into two groups (4 and 3 animals). In the first period, the groups were designated as MQ1 (MPA + MitoQ) and P1 (MPA

+ placebo). At the beginning of the second period, the groups were switched according to the crossover design: the former P1 group became MQ2, and MQ1 became P2 (see Fig. 1.1).

Blood samples were collected every seven days, five times in each period: on days 0, 7, 14, 21, and 28. Liver biopsies were performed on days 0, 14, and 28 (see Fig. 1.2).

1.3. Clinical Examination and Health Assessment of Animals

Clinical examination of the animals was performed according to a standard veterinary clinical examination protocol (Jemeljanovs et al., 2007). The general examination included inspection and palpation, assessment of behavior/temperament, evaluation of body condition, examination of skin and coat, palpation of superficial lymph nodes, assessment of mucous membranes, and measurement of rectal temperature.

During the specific examination, the cardiovascular and respiratory systems were evaluated (pulse, cardiac auscultation, respiratory rate, and lung auscultation).

1.4. Blood Sample Collection

Blood samples were collected from the cephalic vein (*v. cephalica*) under aseptic conditions using an intravenous catheter. Samples were collected into serum vacutainer tubes for biochemical analysis. To obtain serum, blood samples were centrifuged, and biochemical analysis was performed using an automated analyzer.

cALP activity was determined based on the thermostable isoenzyme principle, involving serum incubation at an elevated temperature prior to enzyme activity measurement (Teske, 1999).

1.5. Liver Tissue Sampling

Liver biopsies were performed under ultrasonographic guidance in accordance with WSAVA guidelines (Rothuizen et al., 2006). Sedation was achieved using propofol, and local anesthesia with lidocaine was additionally applied. During the procedure, the animals were placed in right lateral recumbency, and biopsies were obtained using a TrueCut needle with a biopsy device. After sample collection, post-procedural ultrasonographic monitoring was performed to minimize the risk of bleeding.

1.6. Biochemical Analysis of Blood Samples

To obtain serum, blood samples were centrifuged for 10 minutes at 1300 rpm (Gulbis, 2011). Serum analysis was performed no later than 15 minutes after separation. Biochemical parameters of the serum were determined using an automated analyzer Mindray BS-120 (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co. Ltd., China).

The activity of corticosteroid-induced thermostable alkaline phosphatase (cALP) was determined according to the method described by E. Teske (Teske, 1999). Blood serum was incubated at 60 °C for 15 minutes, resulting in the preservation of only the thermostable isoenzyme. After this treatment, enzyme activity was measured using the aforementioned analyzer.

1.7. Preparation and Staining of Liver Tissue Samples

A total of 42 liver tissue samples (n = 42) were obtained from all animals (n = 7) during the experiment. Each sample was examined using routine histological and immunohistochemical methods.

The collected liver tissue samples were prepared according to standard histological procedures: fixed in formalin, routinely processed in an autoproccessor, embedded in paraffin, and paraffin blocks were prepared. Sections were cut from the blocks for histological, immunohistochemical, and immunofluorescence analyses.

Liver tissue sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) to assess the morphological state of the liver parenchyma and with periodic acid-Schiff (PAS) staining to detect glycogen accumulation. Immunohistochemical staining was performed using the Dako EnVision HRP system with an antibody against α -smooth muscle actin (α -SMA) to evaluate the number of activated stellate cells.

For analysis of hepatocyte nuclear and mitochondrial morphology, immunofluorescence staining was performed: anti-TOMM20 antibody was used to label mitochondria, and DAPI was used for nuclear staining. The samples were analyzed using confocal laser scanning microscopy.

1.8. Microscopic Analysis of Samples

Microscopic analysis of hematoxylin-eosin (H&E) stained samples. In liver histological sections stained with H&E, microscopic changes in hepatocytes were evaluated in ten microscopic fields per sample using a generally accepted morphological assessment method (Young et al., 2011; Abdou et al., 2013; Szarek et al., 2014).

Histological sections at different magnifications were examined using a Leica DM5000B light microscope (Leica Microsystems, Germany) at the laboratory of the Preclinical Institute, Faculty of Veterinary Medicine.

Based on the obtained results, hepatocellular morphological changes were conditionally classified into four categories according to the principle described by Szarek et al. (2014):

1. no changes in hepatocytes – no alterations;
2. up to 1/3 of hepatocytes in the field affected, visible reticular pattern, few or no vacuoles, nuclei centrally located – mild changes;
3. up to 2/3 of hepatocytes in the field affected, visible reticular pattern and vacuoles, nuclei mostly displaced peripherally – moderate changes;
4. almost all hepatocytes affected, pronounced reticular pattern, vacuoles of varying size, nuclei located at the cell periphery – severe changes.

The degree of morphological change was coded numerically (0 – 3), where 0 corresponded to no changes, 1 to mild, 2 to moderate, and 3 to severe changes.

Segmented neutrophilic leukocyte infiltration in the liver parenchyma and blood vessels was evaluated by determining the mean number of cells $\pm$ standard error per microscopic field (Szarek et al., 2014).

Observed changes were conditionally classified into four groups:

1. no leukocytes – negative;
2. 1-10 leukocytes per field – low leukocyte count;
3. 10-20 leukocytes per field – moderate leukocyte count;
4. 20-40 leukocytes per field – high leukocyte count.

Microscopic analysis of periodic acid-Schiff (PAS) stained samples. In PAS-stained sections, glycogen accumulation was assessed in ten microscopic fields per sample (Young et al., 2011; Szarek et al., 2014). The sections were examined at different magnifications using a Leica DM5000B light microscope (Leica Microsystems, Germany) at the laboratory of the Preclinical Institute, Faculty of Veterinary Medicine.

Observed changes were conditionally classified into four categories according to Szarek et al. (2014):

1. no glycogen detected – negative;
2. glycogen present in less than 1/3 of cells – mild changes;
3. glycogen present in up to 2/3 of cells – moderate changes;
4. glycogen present in almost all cells – severe changes.

The degree of morphological change was coded numerically (0 – 3), where 0 corresponded to no changes, 1 to mild, 2 to moderate, and 3 to severe changes.

Microscopic analysis of immunohistochemical samples. The number of stellate cells was assessed by determining the mean number of cell nuclei $\pm$ standard error per 100 hepatocytes (Szarek et al., 2014). The sections were examined at different magnifications using a Leica DM5000B light microscope

(Leica Microsystems, Germany) at the laboratory of the Preclinical Institute, Faculty of Veterinary Medicine.

Observed changes were conditionally classified into four groups according to Szarek et al. (2014):

1. 0 cells/100 hepatocytes – negative (no stellate cell activation detected);
2. 1-5 cells/100 hepatocytes – low number of activated stellate cells;
3. 6-15 cells/100 hepatocytes – moderate number of activated stellate cells;
4. 15 cells/100 hepatocytes – high number of activated stellate cells.

Microscopic analysis of immunofluorescent samples. Confocal laser scanning microscopy was performed at the Division of Smart Technologies, Latvia University of Life Sciences and Technologies, using a Nikon Eclipse Ti2 confocal microscope (Nikon Corporation, Japan). Sequential scanning was used to prevent signal overlap.

The acquired images were viewed using Leica Application Suite X software (Leica Microsystems, Germany). Immunofluorescence image analysis was performed using Fiji (ImageJ, version 2.14.0, USA), which enables quantitative assessment of nuclear and mitochondrial morphology.

Before analysis, images were imported in 16-bit format to preserve the full intensity range, and channel separation was performed prior to measurements. The DAPI fluorescence signal was analyzed in the 405 nm (DAPI) channel, while the TOMM20 immunofluorescence signal was analyzed in the 488 nm (Alexa Fluor 488) channel. For further quantitative analysis, signal segmentation in each channel was performed using automatic thresholding.

For mitochondrial analysis, three randomly selected fields of view were analyzed per sample, with 20 – 30 hepatocytes evaluated in each field. Mitochondrial morphometry was performed using the *Analyze Particles* function, obtaining the following parameters: elongation coefficient (length-to-width ratio) and roundness coefficient (0 = highly elongated, 1 = perfect circle). Quantitative assessment of mitochondrial signal was performed using the ROI function covering the hepatocyte cytoplasmic area, and mean fluorescence intensity (AU) was determined (Ramatchandirin et al., 2024).

For nuclear morphometry, the *Analyze Particles* function was used in the DAPI channel to obtain the Feret diameter. In addition, fluorescence analysis was performed to characterize nuclear intensity variations using ROI covering individual nuclei; the coefficient of variation (CV) within each nucleus was calculated from each ROI (Kreutz et al., 2017; Liu et al., 2021; Guixé-Muntet et al., 2020).

1.9. Statistical Analysis of Data

All data from the clinical study (CS) and experimental study (ES) were compiled and analyzed using descriptive statistical methods. Outliers were assessed using the Grubbs' test and visual evaluation (box plots). Normality was tested using the Shapiro-Wilk test.

For blood biochemical parameters (ALT, GGT, ALP, cALP), results were expressed as mean $\pm$ SEM. For morphometric and fluorescence parameters, results were expressed as mean $\pm$ SD. The Mann-Whitney U test was used to compare two independent groups, while the Wilcoxon signed-rank test was applied for dynamic analysis within a single group at different time points.

Semiquantitative data (0 – 3) were analyzed using nonparametric methods appropriate for ordinal scales. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$; trends were additionally evaluated at $0.05 < p < 0.1$. Data processing and visualization were performed using IBM SPSS Statistics 23 and Microsoft Excel.

2. RESULTS AND DISCUSSION

2.1. Results of Clinical Examination

Clinical examination was performed to systematically assess and monitor the general health status of the animals throughout the study, as well as to detect potential adverse effects associated with corticosteroid use in a timely manner.

In the clinical study (CS), clinical evaluation was closely related to the primary diagnoses and therapeutic needs of the dogs, as animals with various pathologies were included, for which methylprednisolone acetate was appropriately used as part of treatment. Therefore, clinical parameters in the CS were not included in the statistical analysis, as they could be influenced both by the underlying disease and by concurrent therapy.

In the experimental study (ES), all animals underwent regular clinical examinations at predefined time points and additionally as needed, focusing on changes in general condition, body weight dynamics, appetite, thirst, behavior, mucous membrane color, hydration status, as well as potential gastrointestinal, respiratory, or dermatological changes. No clinically significant changes in the health status of the dogs were observed throughout the ES. Therefore, clinical findings were not analyzed separately in the subsequent results sections.

This finding is important, as it reflects a typical clinical scenario: even in the presence of pronounced biochemical and histological changes characteristic of steroid hepatopathy, clinical signs in dogs may be absent or minimal. This indicates that clinical examination alone is insufficient for early identification of the liver's morphofunctional response to long-acting corticosteroid administration, and targeted laboratory and, when necessary, morphological monitoring is required.

2.2. Changes in the Functional and Morphological State of the Liver in Dogs Following MPA Administration

2.2.1. Changes in Liver Functional Status in CS Dogs Following MPA Administration

In the clinical part of the study, liver functional status was evaluated in dogs with underlying pathologies ($n = 14$) that received long-acting methylprednisolone acetate (MPA; 2 mg kg^{-1}) and did not receive hepatoprotective therapy (Group 1). Blood samples were collected on days 0, 14, 30, and 45 (total $n = 56$), and serum activities of ALT, GGT, ALP, and cALP were determined. The overall dynamics indicated a marked increase in enzyme activity, with a peak on day 14 and a gradual decline at subsequent time points, although some parameters remained elevated even on day 45.

Following MPA administration, ALT activity increased significantly ($p < 0.05$) on day 14 to $206.4 \pm 28.8 \text{ U L}^{-1}$, corresponding to a 3.0-fold increase compared to day 0 ($69.2 \pm 8.0 \text{ U L}^{-1}$). On day 30, ALT remained significantly elevated ($177.6 \pm 19.5 \text{ U L}^{-1}$; 2.6-fold vs. day 0). By day 45, a decrease to $113.5 \pm 48.8 \text{ U L}^{-1}$ (1.6-fold vs. day 0) was observed, and the difference was no longer statistically significant ($p > 0.05$) (see Table 2.1).

GGT showed a rapid increase on day 14, with activity rising significantly ($p < 0.05$) to $19.6 \pm 4.4 \text{ U L}^{-1}$ (3.9-fold vs. day 0: $5.0 \pm 0.7 \text{ U L}^{-1}$). GGT remained above baseline on day 30 ($17.8 \pm 3.5 \text{ U L}^{-1}$; 3.6-fold), although the difference was no longer statistically significant ($p > 0.05$). By day 45, the value decreased to $9.8 \pm 6.2 \text{ U L}^{-1}$ (2.0-fold vs. day 0; $p > 0.05$) (see Table 2.1).

ALP activity increased particularly markedly after MPA administration. On day 14, it rose significantly ($p < 0.05$) to $412.8 \pm 75.3 \text{ U L}^{-1}$, corresponding to approximately a 7.0-fold increase compared to day 0 ($59.2 \pm 5.5 \text{ U L}^{-1}$). On day 30, activity remained significantly elevated ($329.2 \pm 46.7 \text{ U L}^{-1}$; 5.6-fold). By day 45, ALP decreased to $157.2 \pm 86.4 \text{ U L}^{-1}$ (2.7-fold), but still remained significantly higher than baseline ($p < 0.05$) (see Table 2.1).

cALP showed the most pronounced and persistent dynamics. On day 14, activity increased significantly ($p < 0.05$) to $265.1 \pm 41.4 \text{ U L}^{-1}$, approximately 21.2-fold higher than on day 0 ($12.5 \pm 2.2 \text{ U L}^{-1}$). On day 30, cALP remained significantly elevated ($210.4 \pm 36.6 \text{ U L}^{-1}$; 16.8-fold). By day 45, a decrease to $79.4 \pm 26.8 \text{ U L}^{-1}$ (6.4-fold) was observed; however, activity still remained significantly higher than baseline ($p < 0.05$). Relative changes (fold vs. day 0) are summarized in Table 3.1, showing that most parameters peaked on day 14, while ALP and especially cALP remained markedly elevated even on day 45 (see Table 2.1).

The data obtained in the CS are highly characteristic of the pharmacodynamics of long-acting corticosteroids: following a single MPA injection, a prolonged systemic biological effect develops, which may clinically manifest as sustained metabolic adaptation in the liver. In this context, two aspects should be emphasized.

First, ALT in the CS group showed a rapid increase and remained statistically significant even on day 30. As ALT is a relatively sensitive indicator of hepatocellular injury in dogs, such a profile may reflect metabolic overload of hepatocytes under the influence of corticosteroids. However, the decline in ALT by day 45, with loss of statistical significance, may indicate adaptation and/or partial reversal rather than progressive damage. In practical veterinary medicine, this suggests that ALT may serve as a useful early indicator of MPA effects, but it does not always correlate with the clinical picture and may normalize faster than other steroid-induced changes.

Second, ALP and cALP are considered the main biochemical markers of corticosteroid effects in veterinary medicine, and the CS data confirm this both in terms of magnitude of increase (ALP approximately 7-fold, cALP

approximately 21-fold) and persistence, as statistically significant elevations were still present on day 45 of the study. These parameters are particularly important in dogs, as the cALP isoform is species-specific and directly reflects corticosteroid-induced enzyme activity. Therefore, a marked and sustained increase in cALP may serve as a practical indicator of ongoing corticosteroid effects on hepatic enzyme profiles, even when other parameters (such as ALT) begin to normalize.

It should also be considered that CS animals had underlying diseases. Therefore, further comparison with the ES (initially clinically healthy animals) is essential to distinguish the pharmacological effects of corticosteroids from situations where systemic burden, inflammation, or chronic conditions may amplify the hepatic response to MPA.

2.2.2. Changes in Liver Functional Status in ES Dogs Following MPA Administration

In the experimental study, liver functional status was evaluated in clinically healthy dogs ($n = 7$) after administration of MPA (2 mg kg^{-1}). To assess the isolated effect of corticosteroids on biochemical parameters, this subsection includes animals that received MPA and placebo (tapioca powder) – Group P. Blood samples were collected on days 0, 7, 14, 21, and 28 (total $n = 35$), and serum activities of ALT, GGT, ALP, and cALP were determined.

ALT activity showed a moderate increase: on day 7 to $72.83 \pm 7.99 \text{ U L}^{-1}$ (1.6-fold compared to day 0: $45.83 \pm 6.52 \text{ U L}^{-1}$), on day 14 to $75.54 \pm 11.23 \text{ U L}^{-1}$, on day 21 to $69.87 \pm 10.18 \text{ U L}^{-1}$ (1.5-fold), and decreased on day 28 to $51.10 \pm 6.92 \text{ U L}^{-1}$, approaching baseline levels. No statistically significant changes in ALT were observed ($p > 0.05$) (see Table 2.2).

GGT activity increased early and remained statistically significant at all time points after day 0: on day 7 to $11.37 \pm 0.86 \text{ U L}^{-1}$ (2.2-fold; $p < 0.05$), on day 14 to $14.36 \pm 1.14 \text{ U L}^{-1}$ (2.8-fold; $p < 0.05$), on day 21 to $13.90 \pm 1.61 \text{ U L}^{-1}$ (2.7-fold; $p < 0.05$), and on day 28 to $11.37 \pm 1.41 \text{ U L}^{-1}$ (2.2-fold; $p < 0.05$) (see Table 2.2).

ALP activity increased significantly on day 7 to $210.16 \pm 30.74 \text{ U L}^{-1}$ (2.4-fold; $p < 0.05$), remained at a similar level on day 14 ($213.47 \pm 36.29 \text{ U L}^{-1}$; 2.4-fold; $p < 0.05$), and reached the highest mean value on day 21 ($242.97 \pm 54.54 \text{ U L}^{-1}$; 2.7-fold; $p < 0.05$). By day 28, activity decreased to $189.74 \pm 43.84 \text{ U L}^{-1}$ (2.1-fold), and the difference was no longer statistically significant ($p > 0.05$) (see Table 2.2).

On day 7, cALP activity increased significantly to $173.56 \pm 26.43 \text{ U L}^{-1}$ (2.2-fold; $p < 0.05$), on day 14 to $177.33 \pm 29.14 \text{ U L}^{-1}$ (2.3-fold; $p < 0.05$), and remained elevated on day 21 ($173.56 \pm 34.09 \text{ U L}^{-1}$; 2.2-fold; $p < 0.05$), while on day 28 it decreased to $134.77 \pm 32.03 \text{ U L}^{-1}$ (1.7-fold; $p > 0.05$). Relative changes

are summarized in Table 3.2, showing that the most pronounced and statistically significant changes affected GGT, ALP, and cALP during the first 1 – 3 weeks, whereas ALT increases were more moderate and not statistically significant (see Table 2.2).

In the ES placebo group, the effect of MPA on initially clinically healthy animals is evident and differs from the CS group in several important aspects.

The increase in ALT in the ES group was not statistically significant, although a slight numerical rise (approximately 1.5-fold) was observed. This may indicate that in clinically healthy dogs, the functional reserve of hepatocytes allows compensation for corticosteroid-induced metabolic load without a marked increase in hepatocellular enzyme levels in serum. Therefore, under EP conditions, ALT may not be a sufficiently sensitive indicator of early steroid hepatopathy, even when histological changes are already developing in liver tissue.

In contrast, GGT, ALP, and cALP in the ES group showed statistically significant increases, although the magnitude of increase was more moderate compared to the CS group. This suggests that MPA induces a biologically relevant and laboratory-detectable effect on liver enzyme activity even in clinically healthy animals.

When comparing ES and CS, the peak increase in ALP activity occurred at different time points: day 21 in the ES group and day 14 in the CS group. This difference may reflect variation in pharmacodynamic response between healthy animals and those with underlying diseases, influenced by differences in physiological status (endogenous hormonal balance, inflammatory mediator activity, metabolic state). Clinically, this is important, as it indicates that the same dose of MPA may result in different enzymatic responses.

2.2.3. Comparison of Liver Functional Status Between CS and ES Dogs Following MPA Administration

To directly compare changes in liver functional status between the CS and ES after MPA administration, relative changes in enzyme activity (fold change relative to day 0) were analyzed for the CS group without hepatoprotective therapy (Group 1; n = 14) and the ES placebo (P) group (n = 7).

Given the differences in measurement schedules between the two study parts, enzyme activities were normalized by expressing them as a ratio relative to baseline (day 0 values). The comparison of relative changes is summarized in Table 2.3.

Overall, the most pronounced and statistically confirmed between-group differences were observed for ALP and especially cALP, which were markedly higher and more persistent in the CS group.

This comparison represents one of the key strengths of the study, as it demonstrates that the presence of disease (even when not a primary liver disorder) significantly amplifies and prolongs the elevation of liver enzymes following MPA administration.

The cALP result is particularly important: in the CS group, it was more than 9 times higher than in the ES group at both measurement time points. This indicates a pronounced steroid-induced enzyme activation in CS dogs. Possible mechanisms may include pre-existing systemic inflammation or stress (leading to increased hormonal and cytokine influence on hepatocellular enzyme expression), as well as differences in corticosteroid pharmacokinetics (absorption, binding, and metabolic rate), which may vary more in diseased animals.

It is important to emphasize that these findings do not necessarily indicate a higher clinical risk for every patient receiving corticosteroids, but rather highlight the need for monitoring for up to 1.5 months or longer, even after a single dose of MPA.

2.2.4. Morphological Changes in Liver Cells in ES Dogs Following MPA Administration

Histological analysis was performed on liver biopsy samples from the ES placebo group (P) after MPA administration, with separate evaluation of the first active period (P1) and the second active period (P2) following the washout period. In total, 9 biopsy samples were assessed in the P1 group (days 0, 14, and 28; 3 samples per animal), and 12 biopsy samples in the P2 group (days 0, 14, and 28; 3 samples per animal).

First active period (P1). No histological changes in liver parenchyma were observed on day 0 in the P1 group: hepatocytes exhibited homogeneous cytoplasm, preserved lobular architecture, and no evident vacuolization. By day 14 following MPA administration, severe hepatocellular morphological changes characteristic of steroid hepatopathy were observed in the P1 group, including cellular enlargement, marked cytoplasmic vacuolization, and peripheral displacement of nuclei in a large proportion of hepatocytes. These changes decreased to a moderate degree by day 28: vacuolization persisted, but tissue architecture appeared more uniform, indicating partial reversal (see Table 2.4).

Segmented neutrophilic leukocytes were rarely observed in the examined fields on day 0 (on average one cell per field; see Table 2.4). By day 14, a mild activation of the inflammatory component became evident, with the number of neutrophils increasing to an average of 1.86 ± 0.26 cells per field (mean across 10 fields), and reaching 3.00 ± 0.38 cells per field by day 28. The infiltration remained mild and diffuse, with an even distribution of cells in the parenchyma,

without focal accumulation, structural destruction, or signs of necrosis. Overall, the observed pattern can be characterized as a slowly increasing, low-intensity neutrophilic response, reflecting a mild inflammatory background.

Glycogen accumulation (PAS) in the P1 group was not observed on day 0 (negative reaction). However, by day 14, glycogen deposition was detected in all animals (predominantly mild, with some samples showing moderate accumulation). By day 28, glycogen accumulation persisted, with a relatively higher frequency of moderate changes and more pronounced localization in periportal zones (see Table 2.5).

Stellate cell activation (α -SMA) was minimal on day 0 (1.6 ± 0.38 per 100 hepatocytes; low number of activated stellate cells). On day 14, the count increased to 4.57 ± 0.37 (low number of activated stellate cells), and by day 28 to 5.4 ± 1.58 per 100 hepatocytes (low number of activated stellate cells).

Second active period (P2). At the beginning of the second period (day 0), hepatocellular morphological changes had not fully regressed; in the P2 group, they were overall assessed as moderate. On day 14 after MPA administration, the changes remained moderate, without clear signs of regression. By day 28, partial improvement was observed in some animals; however, in certain cases, severe changes persisted, indicating incomplete restoration of liver structure. Overall, the changes on day 28 were still assessed as moderate (see Table 2.4).

The number of neutrophilic leukocytes remained within the range of mild diffuse infiltration and did not show marked progression: 3.00 ± 0.62 on day 0, 2.29 ± 0.42 on day 14, and 2.14 ± 0.26 on day 28 (see Table 2.4).

Unlike in the first period, glycogen accumulation was already present in most animals at baseline. It became more pronounced on day 14, while only slight regression was observed by day 28, with PAS-positive granules persisting in the majority of hepatocytes (see Table 2.5).

Stellate cell activation persisted during the second period: 5.00 ± 0.76 on day 0, 4.71 ± 0.47 on day 14, and 3.86 ± 0.74 per 100 hepatocytes on day 28, indicating gradual reduction but without complete normalization (see Table 2.5).

Histological findings demonstrate that MPA induces a pronounced, typical pattern of steroid hepatopathy, characterized by hepatocellular vacuolization and glycogen accumulation, without evidence of marked necrosis or fibrosis.

In all dogs from the P1 group, severe hepatocellular changes were already present by day 14. Glycogen accumulation and cytoplasmic remodeling were evident, histologically appearing as hepatocyte vacuolization, enlargement, and nuclear displacement. The increase in neutrophilic leukocytes in the P1 group was slow, diffuse, and not associated with necrosis, suggesting a low-grade inflammatory background or sinusoidal cell dynamics under corticosteroid influence rather than primary inflammatory hepatitis. The increase in α -SMA-positive stellate cells from 1.6 to 5.4 per 100 hepatocytes indicates that fibrosis

does not develop after a single MPA dose, although the number of activated cells increases persistently.

In the P2 group, hepatocellular morphological changes on day 0 (i.e., 56 days after the first MPA administration) remained moderate, with detectable glycogen accumulation and increased stellate cell numbers. This finding is particularly important, as it demonstrates that a single standard dose of long-acting MPA (2 mg kg⁻¹) can induce prolonged morphological changes that persist even when serum biochemical parameters have already returned to normal ranges.

Following repeated MPA administration, hepatocellular changes on day 14 in the P2 group remained moderate. These results differ from those of the P1 group at day 14, where severe changes predominated, and may indicate activation of cellular adaptation mechanisms after the initial exposure. By day 28, gradual regression was observed in some animals; however, glycogen deposition and stellate cell activation did not completely resolve.

Importantly, no hepatocellular necrosis or destructive changes characteristic of acute hepatitis were observed throughout the histological analysis. Thus, the findings support the view that MPA-induced changes are primarily metabolic and adaptive rather than cytotoxic. This aspect is clinically significant, as it indicates that laboratory and histological changes do not necessarily correlate with irreversible liver damage.

Interestingly, during the second period, following repeated MPA administration, the results in the P2 group did not differ significantly from baseline values at any time point, despite an expected worsening of changes.

2.3. Effect of Hepatoprotective Therapy on the Morphofunctional State of the Liver in Dogs Following MPA Administration

2.3.1. Effect of Hepatoprotective Therapy on Liver Functional Status in CS Dogs Following MPA Administration

In the clinical study (CS), the potential effect of hepatoprotective therapy was evaluated by comparing the dynamics of liver enzyme activities (ALT, GGT, ALP, and cALP) between dogs that did not receive hepatoprotective treatment after administration of long-acting MPA (Group 1; n = 14) and dogs that received hepatoprotective therapy in addition to MPA (Group 2; n = 14). Statistical significance was assessed within each group relative to day 0 and between groups at specific time points ($p < 0.05$).

In Group 2, which received the hepatoprotective agent GlutaMax, ALT activity increased significantly ($p < 0.05$) on day 14 to 160.1 ± 7.0 U L⁻¹, corresponding to a 2.3-fold increase compared to day 0. In contrast, in Group 1 (without hepatoprotection), ALT reached 206.4 ± 28.8 U L⁻¹ on day 14, representing a 3.0-fold increase ($p < 0.05$). By day 30, ALT in Group 2 decreased

to $141.3 \pm 8.6 \text{ U L}^{-1}$ (approximately 2.0-fold above baseline), and the difference was no longer statistically significant ($p > 0.05$), whereas in Group 1 ALT remained significantly elevated at $177.6 \pm 19.5 \text{ U L}^{-1}$ (2.6-fold increase; $p < 0.05$). By day 45, ALT in Group 2 further decreased to $59.9 \pm 25.5 \text{ U L}^{-1}$ (approximately 0.9-fold vs. baseline; $p > 0.05$), while in Group 1 it was $113.5 \pm 48.8 \text{ U L}^{-1}$ (1.6-fold above baseline; $p > 0.05$). No statistically significant differences between the groups were observed on days 14, 30, and 45 ($p > 0.05$).

For GGT, in Group 2, activity increased significantly ($p < 0.05$) on day 14 to $12.3 \pm 1.7 \text{ U L}^{-1}$ (2.5-fold increase compared to day 0). In Group 1, GGT reached $19.6 \pm 4.4 \text{ U L}^{-1}$ at the same time point (3.9-fold increase; $p < 0.05$). By day 30, GGT in Group 2 decreased to $11.0 \pm 1.3 \text{ U L}^{-1}$ (approximately 2.2-fold above baseline), and the difference was no longer statistically significant ($p > 0.05$), whereas in Group 1 GGT remained significantly elevated at $17.8 \pm 3.5 \text{ U L}^{-1}$ (3.6-fold increase; $p < 0.05$). By day 45, GGT activity continued to decline in both groups: in Group 2 to $4.9 \pm 2.0 \text{ U L}^{-1}$ (similar to baseline; $p > 0.05$), and in Group 1 to $9.8 \pm 6.2 \text{ U L}^{-1}$ (2.0-fold above baseline; $p > 0.05$).

A statistically significant difference between the groups was observed on days 14 and 30 ($p < 0.05$), while no significant difference was found on day 45 ($p > 0.05$).

In Group 2, which received hepatoprotective therapy, ALP activity increased rapidly after methylprednisolone acetate administration and reached $274.0 \pm 20.5 \text{ U L}^{-1}$ on day 14, corresponding to a 4.6-fold increase compared to baseline; this increase was statistically significant ($p < 0.05$). At the same time point, in Group 1 (without hepatoprotection), the increase was more pronounced, reaching $412.8 \pm 75.3 \text{ U L}^{-1}$ (7.0-fold vs. baseline; $p < 0.05$). On day 30, ALP activity remained significantly elevated in both groups ($p < 0.05$), but differences in magnitude persisted: $221.2 \pm 18.1 \text{ U L}^{-1}$ (3.7-fold) in Group 2 and $329.2 \pm 46.7 \text{ U L}^{-1}$ (5.6-fold) in Group 1. By day 45, group dynamics diverged: in Group 2, ALP decreased to $89.3 \pm 33.9 \text{ U L}^{-1}$ (approximately 1.5-fold vs. baseline; $p > 0.05$), whereas in Group 1 it remained significantly elevated at $157.2 \pm 86.4 \text{ U L}^{-1}$ (2.7-fold vs. baseline; $p < 0.05$).

ALP activity was significantly lower ($p < 0.05$) in Group 2 compared to Group 1 on days 14 and 30, while no significant difference was observed on day 45 ($p > 0.05$).

The dynamics of corticosteroid-induced alkaline phosphatase (cALP) were characteristic of steroid effects, with a rapid increase and prolonged persistence. In Group 2, cALP increased significantly ($p < 0.05$) on day 14 to $205.2 \pm 22.5 \text{ U L}^{-1}$ (16.4-fold vs. baseline). In Group 1, cALP reached $265.1 \pm 41.4 \text{ U L}^{-1}$ at the same time point (21.2-fold vs. baseline; $p < 0.05$). On day 30, cALP remained significantly elevated in both groups ($p < 0.05$): $158.4 \pm 17.1 \text{ U L}^{-1}$ (12.7-fold) in Group 2 and $210.4 \pm 36.6 \text{ U L}^{-1}$ (16.8-fold) in Group 1. Although a marked decrease in cALP activity was observed in both groups by day 45, complete normalization was not achieved equally. In Group 1, cALP remained

significantly elevated ($79.4 \pm 26.8 \text{ U L}^{-1}$; 6.4-fold vs. baseline; $p < 0.05$), whereas in Group 2 it decreased to $39.8 \pm 18.1 \text{ U L}^{-1}$ (approximately 3.2-fold vs. baseline; $p < 0.05$).

Despite differences in magnitude and persistence, no statistically significant differences in cALP activity between the groups were observed on days 14, 30, and 45 ($p > 0.05$).

To further characterize the effect of hepatoprotective therapy on liver enzyme dynamics in CS dogs following MPA administration, relative changes in ALT, GGT, ALP, and cALP were analyzed across different time points. Enzyme activities were normalized and expressed as fold changes relative to day 0 values. A summary of relative changes and statistical significance compared to baseline is presented in Table 2.6.

The most pronounced changes were observed on day 14, when all analyzed enzymes increased significantly: ALT – 2.3-fold, GGT – 2.5-fold, ALP – 4.6-fold, and cALP – 16.4-fold ($p < 0.05$) compared to day 0 (see Table 2.6).

By day 30, some parameters remained markedly elevated: statistically significant increases compared to baseline were observed for ALP (3.7-fold; $p < 0.05$) and particularly cALP (12.7-fold; $p < 0.05$). In contrast, although ALT and GGT values remained above baseline, they were no longer significantly different ($p > 0.05$), indicating stabilization of these parameters (see Table 2.6).

Enzyme activity continued to decrease by day 45 of the study, reflecting a trend toward normalization under hepatoprotective therapy. However, complete return to baseline was not uniform across all parameters: cALP remained elevated 3.2-fold and was still considered statistically significantly higher compared to day 0 ($p < 0.05$) (see Table 2.6).

To more objectively assess the effect of hepatoprotective therapy on enzyme activity dynamics, an intergroup relative comparison was also performed by calculating the ratio of enzyme activities between Groups 1 and 2 at each time point. This approach allowed quantitative evaluation of the potential protective effect of hepatoprotection by comparing the magnitude of enzyme increase in the group without hepatoprotection versus the group receiving it (see Table 2.7).

On day 14, the increase in ALT activity in Group 1 (without hepatoprotection) was approximately 1.3-fold higher than in Group 2, GGT was 1.6-fold higher, ALP 1.5-fold higher, and cALP 1.3-fold higher.

A similar trend persisted on day 30: ALT activity in Group 1 was 1.3-fold higher than in Group 2, GGT 1.6-fold higher, ALP 1.5-fold higher, and cALP 1.3-fold higher.

On the final day of the study, intergroup differences remained, particularly for ALP and cALP. ALT activity in Group 1 was 1.8-fold higher than in Group 2, GGT 2.0-fold higher, ALP 1.8-fold higher, and cALP 2.0-fold higher (see Table 2.7).

Overall, the relative intergroup analysis demonstrates a greater increase in enzyme activity in dogs that did not receive hepatoprotective therapy, suggesting

a potential mitigating effect of the hepatoprotectant on MPA-induced elevations in liver enzyme activity.

The use of hepatoprotective therapy was associated with a more moderate increase in enzyme activity; however, the effect was not uniform across all parameters. This indicates that the hepatoprotectant may reduce overall hepatocellular functional burden or stabilize cellular membrane processes, but has less influence on steroid-induced regulatory mechanisms responsible for cALP elevation.

The fact that intergroup differences did not consistently reach statistical significance is most likely related to the small sample size and considerable individual variability in clinical responses. Therefore, the results should be interpreted as indicative of a potential beneficial effect of hepatoprotective therapy on certain liver function parameters, while exercising caution in considering it as providing complete protection against MPA-induced changes.

2.3.2. Effect of Hepatoprotective Therapy on Liver Functional Status in ES Dogs Following MPA Administration

In the experimental study (ES), the effect of the hepatoprotective agent mitoquinol mesylate on liver functional status was evaluated by comparing the dynamics of ALT, GGT, ALP, and cALP activities in dogs receiving mitoquinol mesylate (MQ) with those in the placebo (P) group.

Results were analyzed separately for the first active period (MQ1 vs. P1), the second active period (MQ2 vs. P2), and for the combined crossover dataset (MQK vs. PK). Statistical significance was assessed relative to day 0 within each group, while between-group differences were reported only at time points where $p < 0.05$ was reached.

In the first active period (MQ1 and P1), fluctuations in ALT activity were minimal in both groups and showed no statistically significant dynamics ($p > 0.05$). By the end of the period (day 28), ALT levels in both groups were lower than at baseline (MQ1: $39.40 \pm 9.85 \text{ U L}^{-1}$ vs. $56.65 \pm 1.21 \text{ U L}^{-1}$; P1: $33.40 \pm 5.84 \text{ U L}^{-1}$ vs. $49.23 \pm 16.11 \text{ U L}^{-1}$) (see Tables 2.8 and 2.9b). Thus, during the first period, ALT values did not differ between MQ1 and P1.

GGT showed a moderate increase in both groups during the first period; however, statistically significant differences compared to day 0 were observed only at certain time points and were similar between groups: in the P1 group on day 14 (2.0-fold; $p < 0.05$), and in the MQ1 group on day 21 (1.9-fold; $p < 0.05$). By the end of the period (day 28), GGT decreased in both groups to levels that were no longer significantly different from baseline (MQ1: 1.4-fold; P1: 1.4-fold; $p > 0.05$) (see Tables 2.8 and 2.9).

The most pronounced differences in the first period were observed in the dynamics of ALP and cALP. ALP activity increased in both groups; however,

the increase was more marked and persistent in the placebo group. In the P1 group, ALP was significantly elevated as early as day 7 (2.7-fold; $p < 0.05$) and remained significantly increased on days 14 and 21 (2.4- and 2.2-fold; $p < 0.05$). In contrast, in the MQ1 group, the increase in ALP was more moderate (1.4–1.7-fold) and did not reach statistical significance at any time point ($p > 0.05$) compared to day 0 (see Tables 2.8 and 2.9).

A similar pattern was observed for cALP dynamics: in the P1 group, cALP was significantly elevated on days 7–21 (2.6-, 2.4-, and 2.1-fold; $p < 0.05$), whereas in the MQ1 group, the increase was modest (1.1–1.6-fold) and not statistically significant ($p > 0.05$) (see Tables 2.8 and 2.9).

Overall, the first active period demonstrated that under mitoquinol treatment, the increase in enzyme activity was less pronounced, particularly for ALP and cALP, although between-group differences during this period were not statistically significant ($p > 0.05$).

In the second active period (MQ2 and P2), the dynamics of enzyme changes were more pronounced and consistent in both groups, with most parameters showing statistically significant differences compared to day 0 at multiple time points.

ALT values increased approximately 1.9–2.0-fold in both groups and were already significantly elevated on day 7 (MQ2: 2.0-fold; P2: 1.9-fold; $p < 0.05$), remaining elevated until day 28 (MQ2: 1.4-fold; P2: 1.5-fold; $p < 0.05$) (see Tables 2.10 and 2.11).

The increase in GGT activity during the second period was the most pronounced: 2.8–3.8-fold in the MQ2 group and 2.7–3.5-fold in the P2 group, with statistical significance at all time points ($p < 0.05$). Even on day 28, GGT remained elevated at approximately 2.9-fold above baseline in both groups.

ALP and cALP in the second period showed a stable and statistically significant increase compared to day 0 in both groups (ALP approximately 2.0–2.9-fold; cALP approximately 2.0–2.3-fold up to day 21; $p < 0.05$). By day 28, cALP remained approximately 1.9-fold above baseline in both groups.

Importantly, despite similar magnitudes of increase, no statistically significant differences between MQ2 and P2 were observed at specific time points ($p > 0.05$).

In the combined crossover dataset (MQK and PK), where results from MQ1+MQ2 and P1+P2 were pooled, the overall trend becomes clearer and the influence of individual variability is reduced.

In this combined analysis, ALT values did not show statistically significant changes either compared to day 0 or between groups ($p > 0.05$), and by day 28 they had essentially returned to baseline levels in both groups (MQK: 1.0-fold; PK: 1.1-fold; see Tables 2.12 and 2.13).

In contrast, in the combined analysis of GGT and ALP, GGT in the MQK group was significantly elevated on days 7, 14, and 21 (2.1-, 2.3-, and 2.6-fold; $p < 0.05$), while on day 28 it remained 2.0-fold above baseline but was no longer significantly different from day 0. In the PK group, GGT remained statistically significant at all time points, including day 28 (2.2-fold; $p < 0.05$) (see Tables 2.12 and 2.13).

ALP activity in the MQK group increased 1.8-1.9-fold compared to baseline and was statistically significant on days 7 and 21 ($p < 0.05$). In the PK group, the increase was more pronounced (2.4-2.7-fold) and statistically significant from days 7 to 21 ($p < 0.05$), while on day 28 it remained 2.1-fold above baseline without statistical significance (see Tables 2.12 and 2.13).

cALP values showed a moderate decrease over time (MQK 1.3-1.7-fold; PK 1.7-2.3-fold). In the PK group, cALP remained significantly elevated on days 7-21 ($p < 0.05$), whereas in the MQK group, the increase did not reach statistical significance overall (see Tables 2.12 and 2.13).

At the same time, even in the combined crossover analysis, no statistically significant differences between groups were confirmed at specific time points ($p > 0.05$), suggesting that the potential beneficial effect of mitoquinol on biochemical parameters was not strongly expressed.

Overall, the ES results demonstrate that MPA induces measurable biochemical effects even in initially clinically healthy animals. The most sensitive parameters in this study design were GGT and ALP, while cALP varied depending on the study period. ALT showed smaller, less pronounced fluctuations and did not consistently reach statistical significance in the combined analysis. The use of mitoquinol mesylate in the first period was associated with a less pronounced increase in ALP and cALP; however, in the second period and in the combined analysis, the enzyme response was predominantly driven by MPA, and intergroup differences generally did not reach statistical significance.

From a practical perspective, this indicates that even in the absence of clinical disease, GGT and ALP changes may persist for several weeks following MPA administration.

2.3.3. Effect of the Antioxidant Mitoquinol Mesylate on Liver Tissue Morphology in ES Dogs Following MPA Administration

Histological analysis was performed on liver biopsy samples from ES dogs in the MQ group (MPA + mitoquinol mesylate), with separate evaluation of the first active period (MQ1) and the second active period (MQ2), and comparison with the corresponding placebo (P) groups.

First active period (MQ1). No histological changes in liver parenchyma were observed on day 0. In the MQ1 group, by day 14 after MPA administration, changes characteristic of steroid hepatopathy were observed, including hepatocyte enlargement and vacuolization; however, in some animals, the severity of changes was less pronounced than in the P1 group. In three out of four animals, the changes were classified as severe, while in one animal they were moderate. Compared to the P1 group, where severe changes predominated in all animals, the MQ1 profile showed more moderate morphological alterations.

By day 28, a more pronounced regression was observed in the MQ1 group compared to the P1 group: in most cases, changes were classified as moderate, tissue architecture appeared more uniform, and vacuolization was less pronounced (see Table 2.14). This suggests a potentially faster structural stabilization associated with the use of mitoquinol mesylate.

The number of neutrophilic leukocytes increased similarly to the placebo group, remaining within the range of mild, diffuse infiltration without necrosis or focal lesions. The use of mitoquinol mesylate did not significantly influence this parameter (see Table 2.14).

In the MQ1 group, mild to moderate glycogen accumulation in hepatocytes was observed on day 14, similar to the P1 group. PAS-positive staining persisted on day 28 but was relatively less pronounced than in the P1 group. Quantitative analysis did not reveal statistically significant differences between the groups.

The number of stellate cells increased from physiological levels on day 0 to higher values on days 14 and 28; however, the degree of activation was similar to that observed in the P1 group. This indicates that mitoquinol mesylate did not significantly affect early stellate cell activation.

Overall, during the MQ1 period, morphological changes were typical of steroid hepatopathy but of moderate severity, with signs of regression.

Second active period (MQ2). The MQ2 group included animals that had received placebo during the first period and mitoquinol mesylate during the second period under MPA exposure.

At the beginning of the second period (day 0), hepatocellular morphological changes were already present, indicating incomplete structural recovery following the first period (56 days after MPA administration). These changes were assessed as moderate and were comparable to those observed in the P2 group. By day 14 after repeated MPA administration, severe hepatocellular alterations were observed in all animals in the MQ2 group. At this stage, the morphological profile was similar to that of the P2 group (see Table 2.15).

The number of segmented neutrophilic leukocytes in the liver parenchyma during the second active period was similar in both groups and gradually decreased over time. On day 0 of the second period, the mean number of neutrophils was 4.0 ± 1.53 cells per field in the MQ2 group and 3.0 ± 1.73 in the P2 group. By day 14 after repeated MPA administration, the number decreased

to 3.0 ± 1.00 cells in the MQ2 group and 2.0 ± 0.96 in the P2 group. By the end of the period (day 28), the number continued to decline in both groups, reaching 2.0 ± 1.00 cells in the MQ2 group and 2.0 ± 0.50 in the P2 group. No statistically significant differences between groups in neutrophil counts were observed throughout the observation period (see Table 2.15).

Glycogen accumulation in the MQ2 group on day 14 was more pronounced than in the MQ1 group during the first period, reflecting a cumulative corticosteroid effect. By day 28, partial regression was observed; however, PAS-positive granules persisted.

The number of stellate cells in the second period was already higher at baseline (day 0) than in the first period, indicating persistent cellular activation. Nevertheless, by day 28, a trend toward gradual reduction was observed in both groups.

A particularly important observation is that animals which received mitoquinol mesylate in the first period (MQ1) showed less pronounced morphological changes in the second period, even without active antioxidant treatment, compared to the P1 group, and in several parameters approached the MQ2 profile. This phenomenon indicates a carryover effect of mitoquinol mesylate, which became identifiable due to the crossover study design.

Unlike a parallel design, the crossover model allowed assessment not only of the acute effect of therapy but also whether prior mitochondrial protection could influence subsequent hepatic response to corticosteroid exposure. The findings suggest that mitoquinol mesylate may stabilize hepatocyte, and particularly mitochondrial, functional reserve, resulting in less pronounced structural changes upon repeated MPA exposure.

At the same time, it should be emphasized that this effect was not absolute and did not fully prevent steroid-induced changes. However, the morphological dynamics were more favorable compared to animals without prior antioxidant protection.

2.4. Effect of Methylprednisolone Acetate and Mitoquinol Mesylate on Hepatocyte Ultrastructural Morphology in ES Dogs

2.4.1. Effect of Methylprednisolone Acetate and Mitoquinol Mesylate on Hepatocyte Nuclear Morphology in ES Dogs

Hepatocyte nuclear morphology was analyzed using DAPI fluorescence labeling and quantitative morphometric parameters: the coefficient of variation (CV) of the nucleus and the nuclear Feret diameter. The Feret diameter represents the longest distance between two opposite points of an object.

On day 0 of the first active period, hepatocyte nuclei in both groups exhibited regular, round shapes with uniform fluorescence distribution. The coefficient of

variation and Feret diameter were within physiological ranges described in the literature, indicating a homogeneous nuclear population.

By day 14 after MPA administration, pronounced nuclear morphological remodeling was observed in both groups: the DAPI signal became heterogeneous, and nuclear contours appeared irregular. Quantitatively, this was reflected by an increase in the coefficient of variation and enlargement of the Feret diameter. These changes were more pronounced in the P1 group than in the MQ1 group, where the increase in nuclear heterogeneity was more moderate.

By day 14, partial normalization of parameters was observed in the MQ1 group, the coefficient of variation and Feret diameter approached baseline values (see Table 2.16).

These changes can be interpreted as a corticosteroid-induced nuclear response in hepatocytes. Nuclear enlargement and chromatin redistribution reflect increased metabolic load and enhanced nuclear activity. The use of mitoquinol mesylate had a noticeable influence on this process.

At day 0 of the second active period, nuclear parameters in both groups no longer corresponded to physiological ranges described in the literature and differed from those observed at day 0 of the first period. In the MQ2 group, the coefficient of variation was 0.24 ± 0.01 and the Feret diameter was $10.93 \pm 0.15 \mu\text{m}$, whereas in the P2 group the values were 0.33 ± 0.03 and $12.63 \pm 0.25 \mu\text{m}$, respectively.

By day 14 after repeated MPA administration, nuclear heterogeneity increased in both groups, reflected by an increase in the coefficient of variation (MQ2: 0.28 ± 0.01 ; P2: 0.25 ± 0.02) and an increase in Feret diameter in the MQ2 group ($11.53 \pm 0.15 \mu\text{m}$), while in the P2 group the Feret diameter remained relatively unchanged ($10.95 \pm 0.46 \mu\text{m}$).

By day 28, partial normalization of parameters was observed in the MQ2 group (coefficient of variation 0.25 ± 0.01 ; Feret diameter $10.90 \pm 0.10 \mu\text{m}$), whereas in the P2 group the coefficient of variation remained elevated (0.27 ± 0.02), while the Feret diameter was close to baseline ($10.48 \pm 0.33 \mu\text{m}$) (see Table 2.17).

Overall, DAPI analysis confirms that MPA induces persistent alterations in nuclear architecture that do not fully return to normal ranges even after several weeks. Mitoquinol mesylate did not significantly reduce these nuclear changes.

2.4.2. Effect of Methylprednisolone Acetate and Mitoquinol Mesylate on Hepatocyte Mitochondrial Morphology in ES Dogs

The effect of methylprednisolone acetate (MPA) and mitoquinol mesylate on hepatocyte mitochondrial morphology was evaluated by analyzing TOMM20 immunofluorescence signal and quantitative morphometric parameters:

mitochondrial roundness, elongation (aspect ratio), and mean TOMM20 fluorescence intensity (AU) at different time points.

On day 0 of the first active period, mitochondrial morphometric parameters in both groups were within physiological ranges described in the literature. In the MQ1 group, the roundness coefficient was 0.57 ± 0.01 , the elongation coefficient was 2.20 ± 0.08 , and the mean TOMM20 fluorescence intensity was 1230 ± 18 AU. Similar values were observed in the P1 group (0.59 ± 0.01 ; 2.20 ± 0.10 ; 1237 ± 20 AU, respectively), indicating comparable mitochondrial structural organization in both groups prior to MPA administration (see Table 2.18).

By day 14 after MPA administration, changes in mitochondrial morphometric parameters were observed in both groups. In the MQ1 group, the roundness coefficient increased to 0.75 ± 0.03 , the elongation coefficient decreased to 1.60 ± 0.08 , and TOMM20 fluorescence intensity increased to 1488 ± 30 AU. In the P1 group, these changes were more pronounced: the roundness coefficient reached 0.80 ± 0.02 , the elongation coefficient decreased to 1.30 ± 0.10 , and TOMM20 fluorescence intensity increased to 1780 ± 70 AU (see Table 2.18).

By day 28, partial stabilization of morphometric parameters was observed in the MQ1 group: the roundness coefficient decreased to 0.64 ± 0.01 , the elongation coefficient increased to 1.90 ± 0.08 , and TOMM20 fluorescence intensity decreased to 1330 ± 18 AU. In contrast, in the P1 group, the roundness coefficient remained relatively higher (0.71 ± 0.02), the elongation coefficient was 1.50 ± 0.10 , and TOMM20 fluorescence intensity remained elevated at 1590 ± 55 AU (see Table 2.18).

Overall, during the first active period, MPA administration was associated with changes in mitochondrial morphometric parameters in both groups; however, in the MQ1 group, a more pronounced return of parameters toward baseline values was observed by day 28, whereas in the P1 group, greater deviations from baseline persisted.

At day 0 of the second active period, mitochondrial morphological parameters in both groups already slightly deviated from physiological ranges. In the MQ2 group, the roundness coefficient was 0.66 ± 0.02 , the elongation coefficient was 1.90 ± 0.10 , and the TOMM20 fluorescence intensity was 1400 ± 20 AU. In the P2 group, the corresponding values were 0.61 ± 0.02 , 2.00 ± 0.16 , and 1335 ± 38 AU, respectively (see Table 2.19).

By day 14 after repeated MPA administration, in the MQ2 group the roundness coefficient slightly decreased to 0.63 ± 0.04 , the elongation coefficient decreased to 1.70 ± 0.10 , and the TOMM20 fluorescence intensity increased to 1650 ± 30 AU. In the P2 group, the roundness coefficient increased to 0.65 ± 0.03 , the elongation coefficient was 1.90 ± 0.08 , and the TOMM20 fluorescence intensity was 1365 ± 46 AU (see Table 2.19).

By day 28, in the MQ2 group the roundness coefficient decreased to 0.61 ± 0.02 , the elongation coefficient increased to 1.80 ± 0.10 , and the TOMM20 fluorescence intensity decreased to 1500 ± 20 AU. In the P2 group, at the same

time point, the roundness coefficient was 0.64 ± 0.03 , the elongation coefficient was 1.78 ± 0.14 , and the TOMM20 fluorescence intensity was 1383 ± 60 AU (see Table 2.19).

Overall, during the second active period, changes in mitochondrial morphometric parameters in both groups were moderate, and by the end of the period the values tended to return toward baseline.

Combined DAPI and TOMM20 analysis highlights two distinct processes:

1. **Nuclear enlargement and heterogeneity** – predominantly a result of corticosteroid pharmacodynamic effects, not significantly influenced by mitoquinol administration.
2. **Mitochondrial fragmentation and signal heterogeneity** – a structural response more closely associated with oxidative stress, with a more favorable dynamic observed under mitoquinol treatment.

Thus, ultrastructural analysis expands the interpretation of biochemical and histological findings, demonstrating that even when serum enzyme levels show stabilization, persistent structural alterations remain at the cellular level. Mitoquinol mesylate may contribute to stabilization of mitochondrial morphometric parameters (roundness coefficient, elongation coefficient, and mean TOMM20 fluorescence intensity) and reduce their variability following repeated MPA administration.

CONCLUSIONS

1. The use of long-acting methylprednisolone acetate (MPA) at a dose of 2 mg/kg in dogs resulted in an increase in liver enzyme activity, particularly alkaline phosphatase (ALP) and corticosteroid-induced alkaline phosphatase (cALP), indicating alterations in liver functional status. The increase in enzyme activity was significant on days 7 and 14 after MPA administration and remained elevated until the end of the study. Histological changes characteristic of steroid hepatopathy – hepatocyte swelling, cytoplasmic vacuolization, glycogen accumulation, and others, were observed even after a single MPA administration. Although partial regression of these changes occurred within 56 days, complete morphological recovery of liver tissue was not observed.
2. Hepatoprotective therapy following MPA administration promoted faster reversal of liver functional parameters in dogs but did not completely prevent the increase in enzyme activity. In the clinical study, the hepatoprotective preparation containing mainly extracts of milk thistle (*Silybum marianum*), turmeric (*Curcuma longa*), and artichoke (*Cynara scolymus*) reduced the MPA-induced increase in liver enzyme activity, particularly GGT and ALP. In the experimental study, mitoquinol mesylate also reduced liver enzyme activity, especially ALP and cALP.
3. The use of the antioxidant mitoquinol mesylate in cases of steroid hepatopathy in dogs did not demonstrate a statistically significant effect on the reversal of pathological changes in liver tissue, as the severity of hepatocyte morphological alterations and glycogen accumulation was generally similar between the mitoquinol and placebo groups. At certain time points, less pronounced structural changes in hepatocytes were observed in dogs receiving mitoquinol mesylate. Overall, regression of liver tissue changes in both groups was only partial, and complete morphological recovery was not achieved.
4. Ultrastructural analysis of hepatocytes following MPA exposure revealed changes in nuclear morphology, manifested by an increased coefficient of variation and Feret diameter, as well as a more heterogeneous DAPI fluorescence signal, indicating increased nuclear heterogeneity. Mitoquinol mesylate did not significantly affect nuclear morphological parameters. In contrast, mitochondrial morphology showed an increase in mitochondrial roundness, a decrease in elongation, and alterations in TOMM20 fluorescence signal. The use of mitoquinol mesylate was associated with less pronounced mitochondrial structural changes, suggesting a protective effect on hepatocyte mitochondrial ultrastructure.
5. The crossover study design revealed a carryover effect of the antioxidant mitoquinol mesylate, manifested as stabilization of hepatocyte function and structure even after discontinuation of the antioxidant. In the second-period

placebo group (animals that received mitoquinol mesylate in the first period), mitochondrial morphometric parameters remained similar to or, at certain time points, even better than those in the MQ2 group (animals that received mitoquinol mesylate in the second period). Histologically, the overall severity of hepatocyte alterations was lower in the P2 group compared to the MQ2 group.

RECOMMENDATIONS

1. Before administering long-acting corticosteroids, it is recommended to assess the patient's liver functional status and risk factors (previous liver damage, chronic medication use, etc.), and to plan follow-up visits with laboratory monitoring.
2. During therapy, regular monitoring of liver enzymes (ALT, ALP, GGT, and, if possible, cALP) is recommended, along with evaluation of their dynamics; in patients with risk factors, hepatoprotective support should be initiated concurrently with corticosteroid therapy and continued until stable normalization of parameters.
3. Mitoquinol mesylate may be considered as adjunct therapy in cases where signs of steroid hepatopathy are present; if laboratory parameters worsen or remain markedly elevated, reduction of corticosteroid dose, extension of dosing intervals, or modification of therapy should be considered.
4. In clinical practice, preference should be given to treatment protocols with better titratability (short-acting formulations, alternative anti-inflammatory and immunomodulatory approaches), as well as ensuring adequate intervals between repeated long-acting corticosteroid injections.